

Université de Montréal

Concentrations et flux d'azote dans les sédiments hypoxiques de
l'Estuaire Maritime du St-Laurent.

par
Jacqueline Kowarzyk Moreno

Département des sciences biologiques
Faculté des arts et des sciences

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

Décembre 2009

© Jacqueline Kowarzyk, 2009

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Concentrations et flux d'azote dans les sédiments hypoxiques de
l'Estuaire Maritime du St-Laurent.

présenté par :
Jacqueline Kowarzyk Moreno

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Roxane Maranger
Université de Montréal
Directrice de recherche

Mohamed Hijri
Université de Montréal, IRBV
Président-rapporteur

Yves Gélinas
Concordia University
Membre du jury

RÉSUMÉ

Les sédiments sont des sites importants d'élimination d'azote (N) puisqu'ils possèdent des gradients d'oxydoréduction leur conférant les conditions idéales pour les réactions microbiennes de transformation de N. L'eutrophisation des régions côtières peut altérer ces gradients, par des changements dans la concentration d'oxygène (O_2) de l'eau interstitielle, et modifier l'importance relative des processus transformant le N. Afin de mieux comprendre comment l' O_2 pourrait influencer les transformations de N, nous avons mesuré les flux diffusifs de diazote (N_2), nitrate (NO_3^-), oxygène et ammonium (NH_4^+) dans les sédiments de l'Estuaire Maritime du St-Laurent (EMSL), et nous avons estimé les taux de dénitrification. L'importance du couple nitrification-dénitrification en fonction d'un gradient de concentrations d' O_2 dans la zone d'hypoxie de l'EMSL fut aussi évaluée. La concentration des gaz dissous fut mesurée en utilisant une nouvelle approche développée dans cette étude. Les flux diffusifs de N_2 , O_2 , NO_3^- et NH_4^+ variaient de 5.5 à 8.8, de -37.1 à -84.8, de -4.0 à -5.8 et de 0.6 à 0.8 $\mu\text{mol N m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ respectivement. Les concentrations de N_2 et NO_3^- dans l'eau porale et les flux de NO_3^- et de N_2 des sédiments, suggèrent que la diffusion de NO_3^- provenant de l'eau à la surface des sédiments ne peut pas expliquer par elle-même la production de N_2 observée. En utilisant une approche stoichiométrique, les taux de nitrification potentielle estimés comptent pour 0.01 à 52% du flux total de NO_3^- nécessaire pour aboutir aux flux de N_2 observés et diminuent avec l'augmentation de l'hypoxie.

Mots clés: Estuaire Maritime du St-Laurent; hypoxie; sédiments; couple nitrification-dénitrification; flux de diazote; concentrations de diazote.

ABSTRACT

Sediments display strong redox gradients and represent important sites of various microbially mediated nitrogen (N) transformation pathways resulting in the loss of fixed N. Increased eutrophication of coastal systems will likely impact the overall function of these sediments via changes in the oxygen (O₂) concentration in the overlying water, thus influencing the redox gradient and the relative importance of different N processes. To have a better understanding of how O₂ could influence N transformations, we measured dinitrogen (N₂), nitrate (NO₃⁻), oxygen and ammonium (NH₄⁺) diffusive fluxes in the sediments of the Lower St. Lawrence Estuary (LSLE) and estimated denitrification rates. The importance of the nitrification-denitrification couple as a function of a gradient of hypoxic O₂ concentrations was also evaluated. Dissolved gas concentrations were measured using a new approach developed in this study. N₂, O₂, NO₃⁻ and NH₄⁺ diffusive fluxes varied respectively from 5.5 to 8.8, from -37.1 to -84.8, from -4 to -5.8 and from 0.6 to 0.8 μmol N m⁻² h⁻¹ among the five stations sampled. N₂ and NO₃⁻ concentrations in sediment pore water and measured fluxes of NO₃⁻ in and N₂ out of the sediments suggested that NO₃⁻ diffusion from the overlying water alone could not support N₂ production. Using a stoichiometric approach, estimated potential nitrification rates varied among sites, from 0.01 to 52% of the total NO₃⁻ supply rate. The relative importance of nitrification decreased with increasing hypoxia.

Keywords : Lower St. Lawrence Estuary; hypoxia; sediments; nitrification-denitrification couple; dinitrogen fluxes; dinitrogen concentration.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ.....	iii
ABSTRACT.....	iv
TABLE DES MATIÈRES.....	v
LISTE DES TABLEAUX.....	vii
LISTE DES FIGURES.....	ix
LISTE DES ABRÉVIATIONS ET DES ACRONYMES.....	xi
REMERCIEMENTS.....	xiii
CHAPITRE 1 : INTRODUCTION GÉNÉRALE.....	1
1.1 PROBLÉMATIQUE GÉNÉRALE : CAUSE ET CONSÉQUENCES DE L'AUGMENTATION DES APPORTS EN AZOTE DANS LES SYSTÈMES AQUATIQUES.....	2
1.2 IMPORTANCE DE L'AZOTE DANS LES ESTUAIRES ET LES SÉDIMENTS.....	3
1.3 LE CYCLE DE L'AZOTE DANS LES SYSTÈMES AQUATIQUES.....	4
1.4 LE COUPLE NITRIFICATION-DÉNITRIFICATION DANS LES SÉDIMENTS.....	10
1.5 L'HYPOXIE DE L'ESTUAIRE MARITIME DU ST- LAURENT.....	12
1.6 MÉTHODES DE MESURE DE LA DÉNITRIFICATION DANS LES SÉDIMENTS.....	14
1.7 OBJECTIFS DE L'ÉTUDE	16
CHAPITRE 2 : DINITROGEN FLUXES IN SEDIMENTS ALONG A HYPOXIC GRADIENT IN THE LOWER ST. LAWRENCE ESTUARY.....	17
2.1 ABSTRACT.....	18
2.2 RÉSUMÉ.....	19
2.3 INTRODUCTION.....	20
2.4 MATERIALS AND METHODS.....	23

2.4.1 Study site.....	23
2.4.2 Sampling site, sediment and pore water collection.....	24
2.4.3 Analytical techniques.....	25
2.4.4 Pore water concentration depth calculations.....	27
2.4.5 Benthic diffusion flux calculations.....	27
2.4.6 Statistical analyses.....	28
2.5 RESULTS.....	28
2.5.1 General site characteristics.....	28
2.5.2 Pore water concentration profiles, linear regressions and ANCOVA.....	28
2.5.3 Benthic fluxes.....	30
2.5.4 Potential nitrification, nitrification oxygen consumption and anammox.....	31
2.6 DISCUSSION.....	32
2.7 CONCLUSIONS.....	36
2.8 ACKNOWLEDGEMENTS.....	37
TABLES AND FIGURES.....	38
CHAPITRE 3 : CONCLUSIONS GÉNÉRALES.....	48
ANNEXE : Diversité des communautés de bactéries effectuant la nitrification, la dénitrification et l'anammox : Rôles écologiques possibles et analyses moléculaires effectuées.	54
A. Introduction.	55
B. Impact de la diversité d'une communauté bactérienne sur sa fonction écologique.....	55
C. Principes des méthodes utilisées pour étudier la diversité bactérienne.	57
D. Méthodes.	60
a) Sites d'échantillonnage.	60
b) Obtention et conservation des sédiments.	60
c) Extraction de l'ADN de la matrice sédimentaire.....	61
d) Amplification des gènes d'intérêts par PCR.	68
E. Commentaires pour des recherches futures.	72
RÉFÉRENCES.....	76

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I: Facteurs contrôlant la fixation d'azote dans les systèmes aquatiques (Vitousek et al. 2002a).....	5
Tableau II: Facteurs contrôlant la nitrification dans les systèmes aquatiques et les sédiments (Ward 2000).....	6
Tableau III: Facteurs contrôlant la dénitrification dans les systèmes aquatiques et les sédiments.....	8
Tableau IV: Facteurs principaux contrôlant l'anammox dans les systèmes aquatiques et les sédiments (issus de Dalgaard et al. 2002, 2005).....	9
Table V: Bottom water and sediment characteristics at each sampling station.....	44
Table VI: Slope and R^2 of linear regressions between N_2 and NO_3^- concentrations for each station sampled.....	45
Table VII: N_2 , O_2 , NO_3^- and NH_4^+ fluxes calculated from concentration profiles for all stations sampled.....	46
Table VIII: Estimated fluxes ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{h}^{-1}$) for potential nitrification and anammox based stoichiometry and on observed N_2 and NO_3^- under two scenarios.....	47
Tableaux de l'ANNEXE:	
Tableau Ia: Enzymes réactionnelles pour la nitrification et la dénitrification....	60
Tableau IIa: Séquence des amorces utilisées pour les amplifications PCR destinées à évaluer l'efficacité d'extraction selon plusieurs kits.	63

Tableau IIIa: Réactifs utilisés pour l'amplification PCR de l'ensemble de l'ADNr 16S et de la région V3.....	63
Tableau IVa: Cycle PCR appliqué pour l'amplification de l'ensemble de l'ADNr 16S avec les amorces pA/pH.	64
Tableau Va: Cycle PCR appliqué pour l'amplification de la région V3 avec les amorces 341 F +GC/534 R.	64
Tableau VIa: Paramètres utilisés pour la DGGE des produits de PCR de la région V3.....	64
Tableau VIIa: Séquence des amorces utilisées pour les amplifications PCR destinées à évaluer la diversité des communautés de bactéries nitrifiantes et dénitrifiantes.....	69
Tableau VIIIa: Réactifs utilisés pour l'amplification PCR des gènes <i>nosZ</i> et <i>AmoA</i>	69
Tableau IXa: Cycle PCR appliqué pour l'amplification du gène <i>AmoA</i> avec les amorces AmoA-1F/AmoA-2R-TC (selon Nicolaisen et al. 2002).	70
Tableau Xa: Cycle PCR appliqué pour l'amplification du gène <i>nosZ</i> avec les amorces nosZ-F/nosZ1622R (selon Throbäck et al. 2004).....	70
Tableau XIa: Conseils pratiques à suivre lors de l'étude de la diversité bactérienne des sédiments en suivant la méthode de PCR-DGGE.	75

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1. Le cycle de l'azote simplifié.....	5
Figure 1.2. Sources de nitrates pour la dénitrification sédimentaire. Quatre principaux scénarios sont présentés : 1) Faibles concentrations en O ₂ , fortes concentrations de NO ₃ ⁻ : la diffusion des NO ₃ ⁻ provenant de la colonne d'eau est favorisée; 2) Fortes concentrations en O ₂ et en NO ₃ ⁻ : la nitrification sédimentaire et la diffusion de NO ₃ ⁻ de la colonne d'eau sont en compétition comme source de NO ₃ ⁻ ; 3) Faibles concentrations en NO ₃ ⁻ et fortes concentrations en O ₂ : le couple nitrification-dénitrification est potentiellement important; 4) Faibles concentration en O ₂ et en NO ₃ ⁻ : la nitrification sédimentaire et la diffusion de NO ₃ ⁻ de la colonne d'eau peuvent être en compétition comme source de NO ₃ ⁻ (cas de l'Estuaire Maritime du St-Laurent).....	11
Figure 2.1. Sampling sites in the Lower St. Lawrence Estuary.....	38
Figure 2.2. A-E Dinitrogen (black dots) and nitrate (white dots) pore water concentration profiles of stations 18 to 22 sampled in the LSLE in August 2006.....	39
Figure 2.3. O ₂ pore water concentration profiles of all stations sampled in August 2006.....	40
Figure 2.4. A) Overall relationship using a linear regression between dinitrogen and nitrate concentrations (μmol L ⁻¹) in pore waters sampled at all depths of every station sampled. B) Linear regressions between N ₂ and NO ₃ ⁻ concentrations in pore waters among stations.....	41
Figure 2.5. A) Relationship between dinitrogen and oxygen concentrations and B) nitrate and oxygen concentrations in pore water at all depths of every station sampled. The lines represent regression lines.....	42

Figures de l'ANNEXE:

Figure 1a. Facteurs distaux et proximaux influençant les caractéristiques et l'activité d'une communauté bactérienne. Facteurs distaux : influencent à long terme la communauté et sont responsables de la composition, la diversité et de l'abondance des espèces de la communauté. Facteurs proximaux : influencent de façon ponctuelle les communautés bactériennes et sont responsables de l'activité et des taux réactionnels bactériens.....57

Figure 2a. Étapes de l'analyse moléculaire de la diversité d'une communauté bactérienne dans les sédiments en utilisant une combinaison de la PCR et la DGGE.59

Figure 3a. Résultats sur gel d'agarose 1% des produits de PCR issus de l'amplification de la région V3. L'extraction de l'ADN de 10 réplicats d'un même échantillon de sédiments de l'EMSL fut effectuée grâce à 3 kits d'extraction différents. Les réplicats L ont été lyophilisés alors que autres ont conservé l'eau porale. Kits d'extraction d'ADN (MoBio) utilisés: Puit 1 : échelle moléculaire de 100 pb; Puits P: Power soil DNA isolation kit; Puits M: UltraClean Microbial DNA isolation kit; puits U: UltraClean Soil DNA Isolation kit. Les bandes rouges représentent les deux dernières bandes de l'échelle moléculaire (correspondant de haut en bas à 200 pb et à 100 pb), qui ne sont pas apparues clairement sur la photo du au manque de qualité de celle-ci.....66

Figure 4a. Patrons de bandes d'ADN obtenus après migration des produits de PCR issus de l'amplification de la région V3 sur DGGE (8% d'acrylamide; gradient de dénaturant 40%-70%) à 80V pendant 20 min, et à 60V 17 heures. L'échantillon de sédiments est le même pour tous les puits. Les réplicats L ont été lyophilisés alors que les autres ont conservé l'eau porale. Plusieurs kits d'extraction d'ADN ont été utilisés: Puits P: Power soil DNA isolation kit; Puits M: UltraClean Microbial DNA isolation kit; puits U: UltraClean Soil DNA Isolation kit.....67

LISTE DES ABRÉVIATIONS ET DES ACRONYMES

ADN :	Acide déoxyribonucléique / Deoxyribonucleic acid
ANOVA :	Analyse de variance / <i>Analysis of variance</i>
C :	Carbone / <i>Carbon</i>
°C :	Degrés Celsius / <i>Celsius degrees</i>
CD :	Dénitrification canonique / <i>Canonical denitrification</i>
C :N :	Ratio stoichiométrique carbone et azote / <i>Stoichiometric ratio of carbon and nitrogen</i>
CO ₂ :	Dioxyde de carbone / <i>Carbon dioxide</i>
Corg :	Carbone organique / <i>Organic carbon</i>
Df :	Degré de liberté / <i>degree of freedom</i>
DGGE :	<i>Denaturing Gradient Gel-Electrophoresis</i>
DNRA :	Réduction Dissimilatoire des Nitrates en Ammonium / <i>Dissimilatory Nitrate Reduction to Ammonium</i>
EMSL :	Estuaire Maritime du St-Laurent
Fe :	Fer / <i>Iron</i>
FISH :	<i>Fluorescent In Situ Hybridization</i>
h / hrs :	Heures / <i>Hours</i>
L :	Litres / <i>Liters</i>
LSLE :	Lower St. Lawrence Estuary
m :	Mètres / <i>Meters</i>
mg :	Milligrammes / <i>Milligrams</i>
MIMS :	<i>Membrane Inlet Mass Spectrometry</i>
Mn :	Manganèse / <i>Manganese</i>
Mo :	Molybdate / <i>Molybdate</i>
N :	Azote / <i>Nitrogen</i>
N ₂ :	Diazote / <i>Dinitrogen</i>
N ₂ /Ar :	Ratios de diazote - argon / <i>Dinitrogen-argon ratios</i>
N ₂ O :	Protoxyde d'azote / <i>Nitrous oxide</i>
NO :	Oxide nitrique / <i>Nitric oxide</i>
NO ₂ ⁻ :	Nitrite / <i>Nitrite</i>
NO ₃ ⁻ :	Nitrate / <i>Nitrate</i>
NH ₃ :	Ammoniaque / <i>Ammoniac</i>

NH_4^+ :	Ammonium / <i>Ammonium</i>
Nr :	Azote réactif / <i>Reactive nitrogen</i>
O_2 :	Oxygène / <i>Oxygen</i>
O_2/Ar :	Ratios d'oxygène -argon / <i>Oxygen-argon ratios</i>
p :	Probabilité
PCR :	Réaction en chaîne de la polymérase / <i>Polymerase chain reaction</i>
ppm :	Parties par millions / <i>Parts per million</i>
pw DOC :	Concentrations d'oxygène dissous dans l'eau porale / <i>Pore water dissolved oxygen concentrations</i>
R adj :	R ajusté / <i>Adjusted R</i>
Tg :	Teragramme / <i>Teragram</i>
vs :	Versus / <i>Versus</i>
~ :	Approximativement / <i>Approximately</i>
yr^{-1} :	Par an / <i>Per year</i>
μmol :	Micromoles / <i>Micromoles</i>

REMERCIEMENTS :

Je tiens à remercier Roxane Maranger pour son accueil chaleureux au sein du laboratoire, mais surtout de m'avoir enseigné un esprit scientifique ouvert et passionné. Merci de m'avoir fait connaître l'incroyable lien entre l'infiniment grand et l'infiniment petit.

Merci à mes amis de laboratoire Catherine Blanchet, Laure Tall, Gabriel Maltais-Landry et Dan Nguyen avec qui j'ai échangé beaucoup de connaissances lors de nos débats d'azote et avec qui j'ai passé des moments fort agréables. Je remercie Laure et Dan pour leur aide et conseils (et patience) lors de mes blocages statistiques. Je tiens à remercier Catherine pour son aide au cours des croisières. Je garde de bons souvenirs de nos escapades.

Merci aussi à Mohamed Hijri, à Marc St-Arnaud et aux étudiants que j'ai rencontré à l'IRBV, de m'avoir accueillie dans leur laboratoire pour mes expériences de biologie moléculaire. Mon « séjour » à l'IRBV fut des plus agréables et inoubliables.

Merci à Marie Pierre-Gauthier pour son enseignement de la biologie moléculaire mais surtout pour sa patience et ses encouragements pendant mon apprentissage.

Merci à ma famille et mes amis pour leur grand support pendant mes années d'études.

CHAPITRE 1
INTRODUCTION GÉNÉRALE

1.1 Problématique générale : Causes et conséquences de l'augmentation des apports en azote dans les systèmes aquatiques.

L'azote (N) est un nutriment fondamental contenu dans l'ADN et les protéines. Le cycle de N possède de ce fait un rôle écologique capital : la biodisponibilité de N contrôle la production primaire des systèmes terrestres et aquatiques (Matson et al. 2002; Rabalais 2002; Vitousek et al. 2002b). De plus, le cycle de N interagit avec d'autres cycles biogéochimiques, tel que le cycle de carbone (C), où il régule indirectement la fixation et l'exportation du C (Mackenzie et al. 2002). Dans certains systèmes tels que les océans, le N limite la production primaire puisque les apports en N ne sont pas suffisants pour répondre aux besoins en N de ces systèmes. En excès, l'azote réactif (Nr) peut entraîner l'acidification des sols et des eaux douces ainsi que l'eutrophisation et l'hypoxie des lacs, des rivières et des régions côtières (Galloway and Cowling 2002). Accumulé sous forme de nitrates (NO_3^-) dans l'eau potable, le N constitue un des polluants les plus toxiques pour la santé publique. Le cycle de N contribue de plus aux changements climatiques par la production d'oxyde nitreux (N_2O) (Vitousek et al. 1997), un gaz à effet de serre 310 fois plus puissant que le dioxyde de carbone (CO_2). Malgré son importance écologique sans contradiction, le cycle de N se voit depuis les dernières décennies, modifié par les activités humaines.

Soutenues par une croissance démographique exponentielle, les productions alimentaires et énergétiques industrielles se développent depuis le début du XXe siècle. La découverte du processus de Haber-Bosch a permis de répondre aux nouveaux besoins de la population par la création chimique illimitée de N utilisée pour les fertilisants. Cette nouvelle production de N a entraîné l'augmentation et l'accumulation Nr total dans les systèmes terrestres (Galloway et al. 1995). En

1990, le Nr total fixé par les systèmes terrestres représente $\sim 270 \text{ Tg N an}^{-1}$, soit plus du double du taux de fixation de Nr en 1890 (Galloway 2004). De ces $\sim 270 \text{ Tg N an}^{-1}$, environ 157 Tg N an^{-1} proviennent du N produit par les activités anthropiques (Galloway 2004), constituées principalement par des fertilisants chimiques en agriculture ($\sim 100 \text{ Tg N an}^{-1}$), la culture en masse de récoltes de légumineuses ($\sim 32 \text{ Tg N an}^{-1}$) et l'ignition de combustibles fossiles ($\sim 25 \text{ Tg N an}^{-1}$) (Galloway 2004). L'augmentation de N dans les systèmes terrestres provoque aussi des répercussions écologiques dans les milieux aquatiques puisqu'ils reçoivent, par lessivage et ruissellement, des apports en N accrus (Vitousek et al. 1997; Galloway et al. 2003; Galloway 2004; Conley et al. 2009).

L'azote en excès dans les systèmes terrestres est partiellement exporté vers les milieux aquatiques (eaux souterraines, marais, lacs, rivières, estuaires, régions côtières et océans). Environ 48 Tg N an^{-1} sont transportés par les rivières vers les régions côtières (Seitzinger et al. 2006). Une fois dans les systèmes aquatiques, le N peut être assimilé par les plantes et les autres organismes vivants, sédimenter, transporté par advection, et/ou dénitrifié (Saunders and Kalff 2001). La compréhension des facteurs contrôlant le destin et les diverses réactions du cycle de N ainsi que la détermination de budgets de N tenant en compte les répercussions anthropiques sont essentielles pour prévoir les impacts écologiques liés au cycle de N.

1.2 Importance de la dénitrification dans les estuaires et les sédiments.

La dénitrification est une réaction qui transforme le Nr en diazote (N_2), une forme de N gazeuse qui est peu disponible pour la plupart des organismes et représente une perte nette de N du système. De ce fait, les apports en excès de N

causant l'eutrophisation des systèmes aquatiques peuvent être réduits par cette réaction. Par unité de surface, les systèmes aquatiques ont des meilleurs taux de dénitrification que les systèmes terrestres (Seitzinger et al. 2006). Ces systèmes sont aussi plus efficaces pour éliminer le N directement en N_2 , en produisant moins d'oxyde nitreux (N_2O), un sous produit de la réaction de dénitrification (Seitzinger et al. 2006). Plus spécifiquement, les sédiments des estuaires sont reconnus comme étant des sites fondamentaux d'élimination de N en excès par la production de N_2 via la dénitrification (Seitzinger 1988). Environ 50% du N_r entrant dans les estuaires est éliminé par cette réaction (Galloway 2004). Ceci équivaut à 24 Tg N an^{-1} éliminé par les estuaires seulement (Galloway 2004). L'augmentation des apports de N dans les systèmes aquatiques due aux activités anthropiques remet cependant en question la capacité de la dénitrification à éliminer le N en excès.

1.3 Le cycle de l'azote dans les systèmes aquatiques.

L'azote possède de multiples formes d'oxydoréduction lui permettant de participer à de nombreuses réactions chimiques et biologiques. Le cycle de N (Figure 1.1) est cependant principalement régi par des réactions microbiennes (bactéries, Archea, champignons).

La fixation biologique du N est un processus réalisé exclusivement par les procaryotes (eubactéries et archaebactéries) possédant le complexe enzymatique de la nitrogénase. Ce dernier réduit le N_2 en ammoniac (NH_3) (ou ammonium, NH_4^+), la forme de N inorganique dissoute la plus bioassimilable. La réaction est contrôlée par plusieurs facteurs (Tableau I), principalement les concentrations en oxygène (O_2), fer et NH_4^+ (Vitousek et al. 2002a). Dans les estuaires, la fixation

biologique de N ne serait pas importante dû aux turbulences qui détruisent les mats de cyanobactéries, principales fixatrices dans ces systèmes (Vitousek et al. 2002a). L'azote proviendrait alors principalement de l'écoulement des nutriments issus des sources anthropiques sous forme de matière organique particulaire terrigène.

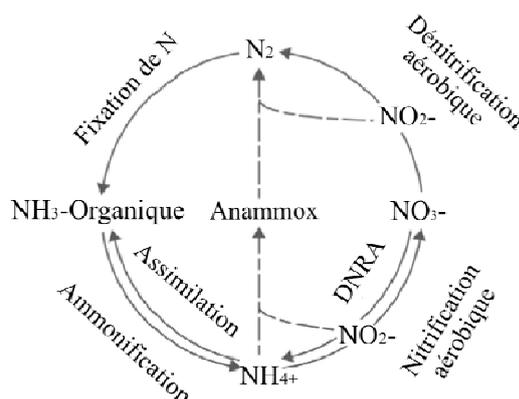


Figure 1.1. Le cycle de l'azote simplifié (Modifié de Trimmer et al. 2003).

Tableau I: Facteurs contrôlant la fixation d'azote dans les systèmes aquatiques (Vitousek et al. 2002a).

Facteurs	Effets
[O ₂]	Inactive irréversiblement la nitrogénase. Techniques de barrière contre l'O ₂ utilisées par les organismes fixateurs: hétérocystes, séparation temporelle de la photosynthèse et de la fixation de N.
N :P	Un faible ratio N :P stimule la fixation. Les organismes fixateurs deviennent plus compétitifs.
[NH ₃]	Inhibition de la fixation à de fortes concentrations de NH ₃
[Fe], [Mo]	Nécessaires à la synthèse des protéines du complexe de la nitrogénase.
Eau/pénétration dans les sédiments	Vecteur de diffusion. Assure la disponibilité de N ₂ , influence la présence d'O ₂ , des ions et de substrats pour la réaction.
Lumière	Essentielle pour la production d'énergie des cyanobactéries autotrophes, fixatrices les plus importantes des systèmes aquatiques.

Légende : [O₂], [NH₃], [Fe], [Mo] : concentrations d'oxygène, ammoniac, fer et molybdate respectivement.

La matière organique particulaire est minéralisée par l'ammonification, une réaction bactérienne transformant le N organique en NH₄⁺. L'ammonification est effectuée par des bactéries hétérotrophes et est cinétiquement plus rapide que la nitrification. L'ammonification est de ce fait rarement une réaction limitante.

La nitrification est un processus chimio-autotrophe, utilisant le bicarbonate comme source de carbone. Il s'agit d'une réaction microbienne aérobie (~4 mg d'O₂ pour dégrader 1 mg) qui consiste à l'oxydation de NH₄⁺ en nitrites (NO₂⁻) puis en NO₃⁻ (Ward 2000). Cette réaction est réalisée par deux communautés distinctes. La première étape de la nitrification consiste à l'oxydation de NH₄⁺ en NO₂⁻ et est réalisée par les genres *Nitrosomonas*, *Nitrosococcus* et *Nitrospira*:

$$\text{NH}_4^+ + \text{O}_2 \rightarrow \text{NO}_2^- + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^-$$
La deuxième étape de la nitrification consiste à l'oxydation des NO₂⁻ en NO₃⁻:

$$\text{NO}_2^- + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{NO}_3^- + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^-$$
Les genres *Nitrobacter*, *Nitrospina*, *Nitrococcus* et *Nitrospira* sont les plus communs réalisant cette réaction. La réaction finale de la nitrification est la suivante :

$$\text{NH}_4^+ + 1,86 \text{O}_2 + 1,98 \text{HCO}_3^- \rightarrow 0,98 \text{NO}_3^- + 1,88 \text{H}_2\text{CO}_3^- + 1,04 \text{H}_2\text{O} + 0,020 \text{C}_5\text{H}_7\text{NO}_2$$
La nitrification hétérotrophe par les bactéries et champignons existe aussi, mais se déroule à des taux inférieurs à ceux des organismes autotrophes. Les principaux facteurs contrôlant le taux de nitrification peuvent être consultés dans le Tableau II.

Tableau II: Facteurs contrôlant la nitrification dans les systèmes aquatiques et les sédiments (Ward 2000).

Facteurs	Effets
[O ₂]	Inhibe à des concentrations inférieures à ~3 mg L ⁻¹ .
[NH ₄ ⁺]	Substrat de la réaction. Provient de l'ammonification, étape rarement limitante mais contrôlée par le taux d'immobilisation de N par d'autres organismes.
pH	Optimal : 6-8 <6 : NH ₄ ⁺ ne peut se transformer en NH ₃ (substrat de l'ammoniac monooxygénase) >8 : Oxydation des NO ₂ ⁻ est impossible. La consommation de HCO ₃ ⁻ acidifie le milieu.
MO	Source d'ammonium par la minéralisation.
Salinité	Diminution des taux de nitrification de 50% à des concentrations de sel de 10 ppm (Rysgaard et al. 1999).

Légende : [O₂], [NH₄⁺] : concentrations d'oxygène, ammonium respectivement; ppm : parties par millions; MO : Matière Organique.

Le produit de la nitrification (NO_3^-) est le substrat de la dénitrification. La dénitrification canonique consiste à la réduction de NO_3^- en formes gazeuses de N (Knowles 1982): $\text{NO}_3^- + 1,08 \text{CH}_3\text{OH} + 0,24 \text{H}_2\text{CO}_3 \rightarrow 0,056 \text{C}_5\text{H}_7\text{NO}_2 + 0,47 \text{N}_2 + 1,68 \text{H}_2\text{O} + \text{HCO}_3^-$. Les différentes étapes de la chaîne réactionnelle de la dénitrification sont : $\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO} \rightarrow \text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2$. Pour chaque réaction, les substrats oxydés servent comme accepteurs d'électrons dans la respiration, processus couplé à l'oxydation de la matière organique. La première étape de ce processus, la réduction des NO_3^- en NO_2^- , est appelée la réduction dissimilaire de NO_3^- et a lieu dans une grande variété de bactéries, alors que la réduction des NO_3^- en N_2O ou N_2 n'est effectuée que par un sous échantillon de ces bactéries (Knowles 1982). La dénitrification est une réaction de respiration anaérobie effectuée par des bactéries hétérotrophes (les genres les plus communs sont: *Bacillus*, *Enterobacter*, *Micrococcus*, *Pseudomonas* et *Spirillum*) qui réalisent cette réaction de façon facultative étant donné qu'elles peuvent aussi respirer en milieu aérobie. En présence d' O_2 , ces bactéries favorisent la respiration aérobie qui est plus rentable énergétiquement que la dénitrification. Les bactéries dénitrifiantes se retrouvent de façon ubiquitaire et de ce fait, ce processus peut avoir lieu tant dans les milieux terrestres, que les milieux d'eau douce et d'eau salée. La présence et l'amplitude de la dénitrification dépendent de plusieurs facteurs (Tableau III).

La dénitrification a souvent été considérée comme la seule réaction importante qui élimine le N des systèmes aquatiques (Nixon et al. 1996). Cependant, d'autres réactions transformant le N peuvent aboutir à la production de N_2 . Le processus d'anammox effectué par des bactéries appartenant au phylum des planctomycètes (*Planctomyces* et *Pirellula* étant les genres les mieux connus), produit du N_2 par

l'oxydation anaérobique de NH_4^+ par les NO_2^- (Kuypers et al. 2005): $\text{NH}_4^+ + \text{NO}_2^- \rightarrow \text{N}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$.

Tableau III: Facteurs contrôlant la dénitrification dans les systèmes aquatiques et les sédiments.

Facteurs	Effets	Références
$[\text{NO}_3^-]$, $[\text{NO}_2^-]$ $[\text{O}_2]$	Substrats de la réaction Induisent la synthèse des enzymes réactionnelles Réaction anaérobique ($< 2 \text{ mg O}_2/\text{L}$) ¹ $[\text{O}_2] > 2 \text{ mg O}_2/\text{L}$: inhibition de la synthèse enzymatique, en particulier des enzymes terminales, plus sensibles; dénitrification incomplète; accumulation de sous produits (NO ou le N_2O) ² Régule la source de NO_3^- pour la dénitrification et l'importance du couple nitrification-dénitrification ³	(Knowles 1982) ¹ (Zumft 1997) ² (Knowles 1982) ³ (Jensen et al. 1994; Rysgaard et al. 1994)
Carbone organique	Contrôle l'activité des organismes dénitrifiants hétérotrophes (source d'électrons) Effet de la labilité de la matière organique inconnu	(Knowles 1982; Sloth et al. 1995)
Température pH	Peut avoir lieu à des températures entre 2°C et 5°C . Réaction possible entre 4 et 11. pH légèrement basique est optimal	(Zumft 1997) (Knowles 1982)
$[\text{Fe}]$, $[\text{Cu}]$, $[\text{Mo}]$	Nécessaires aux enzymes de la chaîne réactionnelle. Fe : NO_3^- réductase, NO réductase; Cu : NO_2^- réductase, N_2O réductase, NO réductase; Mo : NO_3^- réductase	(Zumft 1997)
Nitrification	Produit des NO_3^- , substrats de la dénitrification	(Seitzinger et al. 2006)
DNRA	Consomme des nitrates. La dénitrification et la DNRA sont en compétition.	(Christensen et al. 2000)
Sulfides	Inhibiteurs de la réduction de NO en N_2O . Provoque l'accumulation de NO dans les sédiments marins.	(Zumft 1997)

Légende : $[\text{NO}_3^-]$, $[\text{NO}_2^-]$, $[\text{O}_2]$, $[\text{Fe}]$, $[\text{Cu}]$, $[\text{Mo}]$: concentrations de nitrates, nitrites, d'oxygène, de fer, de cuivre et de molybdate respectivement; NO : Oxyde nitrique; DNRA : réduction dissimilaire des nitrates en ammonium.

Certaines recherches stipulent que l'anammox pourrait être responsable de 67% du N_2 produit dans les sédiments marins (Thamdrup and Dalsgaard 2002. À l'échelle globale, l'importance de l'anammox reste à être vérifiée (Francis et al. 2007). Les facteurs contrôlant les taux d'anammox sont présentés dans le Tableau IV.

Tableau IV: Facteurs principaux contrôlant l'anammox dans les systèmes aquatiques et les sédiments (issus de Dalsgaard et al. 2002, 2005).

Facteurs	Effets
[NH ₄ ⁺], [NO ₂ ⁻] [O ₂]	Substrats de la réaction Induisent la synthèse des enzymes réactionnelles Réaction anaérobie, inhibée à des concentrations d'O ₂ de 1.1 μM.
Température	Optimale : 15°C; Maximale 37°C.
[Mn]	Si importantes, l'oxydation des NH ₄ ⁺ aboutit à la production de NO ₃ ⁻ et non de N ₂ , par la réduction du Mn.
[NO ₃ ⁻]	Si importantes, la zone de dénitrification saturée en NO ₃ ⁻ dans les sédiments est plus grande, et la zone d'excrétion de NO ₂ ⁻ par la dénitrification est plus importante aussi.

Légende : [NH₄⁺], [NO₃⁻], [NO₂⁻], [O₂], [Mn]: concentrations d'ammonium, nitrates, nitrites, d'oxygène, d'oxydes de manganese respectivement.

La dénitrification aérobie (Robertson et al. 1995), la production chimique de N₂ utilisant du Fer oxydé, des sulfides ou du Mn comme donneur d'électrons et la destruction acide de NO₂⁻ (appelé aussi la chimio-dénitrification; Postma et al. 1991; Luther et al. 1997; Hulth et al. 1999) sont d'autres réactions biochimiques éliminant le N sous forme de N₂. De nombreuses études sont toujours nécessaires pour comprendre l'amplitude et l'importance de ces processus.

La DNRA (Réduction Dissimilatoire des Nitrates en Ammonium), comme son nom l'indique, consiste à la réduction des nitrates en ammonium : NO₃⁻ → NO₂⁻ → NH₄⁺. La dénitrification et la DNRA sont en compétition pour les NO₃⁻ comme substrat, mais ces deux réactions ont des répercussions écologiques différentes. A la différence de la dénitrification qui consomme les NO₃⁻ et produit du N₂ aboutissant à la perte nette de N dans le système, la DNRA produit du NH₄⁺, une forme de N facilement réutilisée par les organismes vivants. La présence de sulfides semble être le facteur déterminant le destin des NO₃⁻, étant donné que la DNRA est favorisée par la présence de sulfides dans le milieu et que les sulfides inhibent la dénitrification (Burgin and Hamilton 2007).

1.4 Le couple nitrification-dénitrification dans les sédiments.

Les sédiments sont des sites importants de transformations de N dû à la présence de substrats nécessaires aux réactions bactériennes à des concentrations variables. La plupart des réactions chimiques et biologiques ont lieu dans l'eau porale des sédiments puisqu'elle transporte les substrats nécessaires aux réactions. La pénétration de l'eau dans les sédiments est un facteur déterminant de l'amplitude et le type de réactions ayant lieu dans ces systèmes (Schulz 2000). La profondeur de pénétration de l'eau dépend majoritairement de la texture des sédiments (porosité, tortuosité, quantité de matière organique). Des sédiments riches en carbone (C) forment des agrégats, rendant difficile la pénétration de l'eau à l'intérieur des sédiments. Par contre, des sédiments sablonneux pauvres en C permettent une entrée plus profonde de l'eau (Schulz 2000). Les organismes benthiques contrôlent aussi la pénétration de l'eau dans les sédiments en mélangeant les sédiments par bioturbation et bioirrigations (Katsev et al. 2007).

Dans les sédiments, la nitrification a lieu dans une fine couche à la superficie, correspondant à la zone oxygène. Quant à la localisation de la dénitrification, deux hypothèses existent : 1) la dénitrification a lieu uniquement dans la zone anoxique des sédiments, située en dessous de la couche oxygène (Vanderborgh and Billen 1975; Patrick and Reddy 1976); 2) les bactéries nitrifiantes et dénitrifiantes coexistent à proximité grâce à la présence des microsites anoxiques ou hypoxiques dans les sédiments hétérogènes (Seitzinger et al. 2006). L'interface eau-sédiments posséderait les gradients de concentrations de substrats spatiaux ou temporels, permettant aux deux réactions d'avoir lieu. Un fort couple nitrification-dénitrification se retrouve généralement dans des eaux profondes suboxygènes des

lacs et des estuaires ainsi que dans les zones d'oxygène minimales des eaux intermédiaires des océans (Seitzinger et al. 2006).

L'importance du couple nitrification-dénitrification dans les sédiments dépend des facteurs contrôlant ces deux réactions (Tableau II et III), en particulier des concentrations en O_2 et en NO_3^- . Quatre scénarios principaux sont possibles en fonction des concentrations de O_2 et NO_3^- (Figure 1.2) : 1) Dans le cas où les concentrations en O_2 ne sont pas assez importantes pour soutenir la nitrification, mais que la concentration de NO_3^- dans la colonne d'eau est importante, le couple nitrification-dénitrification est faible étant donné que les NO_3^- pour la dénitrification proviendront majoritairement de la diffusion des NO_3^- de la colonne d'eau; 2) Dans le cas de concentrations d' O_2 suffisantes pour la nitrification et la présence de NO_3^- en abondance, la nitrification et la diffusion des nitrates de la colonne d'eau sont en compétition pour être la source de NO_3^- pour la dénitrification. 3) Dans le cas de fortes concentrations d' O_2 et de faibles quantités de NO_3^- , la nitrification est la principale source de NO_3^- , et le couple nitrification-dénitrification est fort (Seitzinger and Giblin 1996); 4) Dans le cas de faibles concentrations d' O_2 et de NO_3^- , la nitrification et la diffusion de NO_3^- de la colonne d'eau devraient aussi entrer en compétition. Ce dernier scénario représente le cas de l'Estuaire Maritime du St-Laurent, notre site d'étude (Figure 1.2).

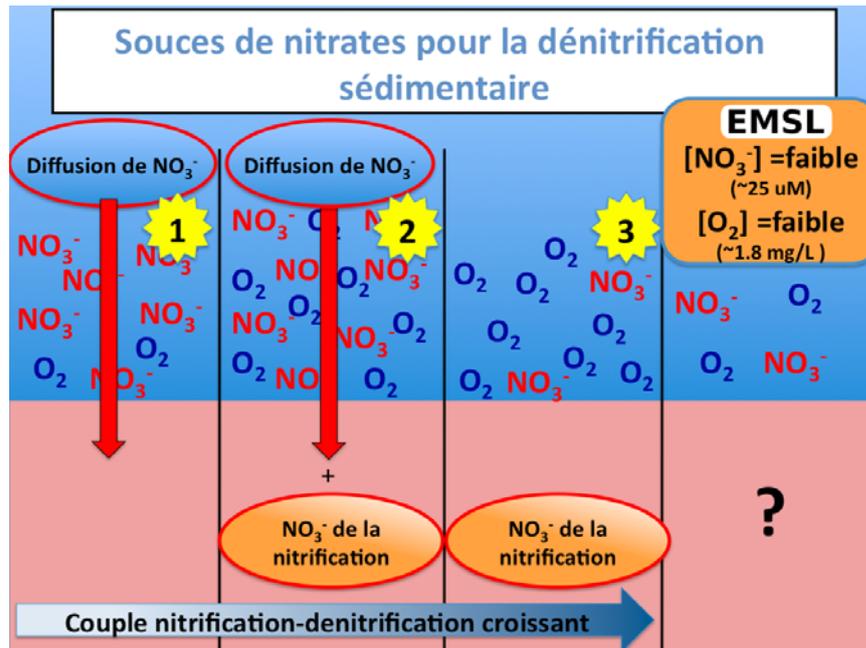


Figure 1.2. Sources de nitrates pour la dénitrification sédimentaire. Quatre principaux scénarios sont présentés : 1) Faibles concentrations en O₂, fortes concentrations de NO₃⁻: la diffusion des NO₃⁻ de la colonne d'eau est favorisée; 2) Fortes concentrations en O₂ et en NO₃⁻: la nitrification sédimentaire et la diffusion de NO₃⁻ de la colonne d'eau sont en compétition comme source de NO₃⁻; 3) Faibles concentrations en NO₃⁻ et fortes concentrations en O₂: le couple nitrification-dénitrification est potentiellement important; 4) Faibles concentrations en O₂ et en NO₃⁻: la nitrification sédimentaire et la diffusion de NO₃⁻ de la colonne d'eau peuvent être en compétition comme source de NO₃⁻ (cas de l'Estuaire Maritime du St-Laurent).

1.5 L'hypoxie de l'Estuaire Maritime du St-Laurent.

Durant les 70 dernières années, la concentration en O₂ des eaux profondes de l'Estuaire Maritime du St-Laurent (EMSL) a diminué progressivement à un taux d'environ 1 μmol L⁻¹ par an. Les eaux profondes et les sédiments de l'EMSL sont de nos jours hypoxiques (Gilbert et al. 2005).

L'hypoxie correspond à des concentrations d'O₂ inférieures aux besoins fondamentaux de la plupart des organismes et est inférieur ou égale à 2 mg/L (Rabalais 2002). L'hypoxie est un problème environnemental critique, ayant déjà

été responsable de pertes ou de déplacement de communautés entières de poissons, la réduction de la diversité et l'abondance des communautés benthiques et la diminution de la capacité des sédiments à retenir ou libérer des nutriments et d'autres espèces chimiques (Breitburg 2002; Gray et al. 2002; Katsev et al. 2007). Plusieurs causes expliquent l'épuisement progressif de l'O₂ dans l'EMSL. Tout d'abord, l'hypoxie est due à un changement dans les proportions des deux principales masses d'eau entrant dans l'estuaire depuis l'océan (Gilbert et al. 2005) : la masse d'eau du Nord Atlantique est chaude et pauvre en O₂; et la masse d'eau du Labrador qui au contraire, est froide et riche en O₂. La proportion de la masse d'eau du Labrador entrant dans l'estuaire aurait diminué de 20% alors que celle du Nord Atlantique aurait augmenté, causant une diminution des apports d'O₂ dans le milieu. Le changement dans les proportions des masses d'eau entrant dans l'estuaire serait responsable de deux tiers de l'hypoxie dans l'estuaire (Gilbert et al. 2005). Une autre cause expliquant l'hypoxie serait l'augmentation de la respiration bactérienne dans les eaux profondes et les sédiments (Gilbert et al. 2005). La respiration serait stimulée par des apports croissants de matière organique vers les sédiments à cause de l'exportation accrue de nutriments provenant des côtes. La demande en O₂ des sédiments et des eaux profondes semble d'ailleurs avoir augmenté (Gilbert et al. 2005). De plus, la masse d'eau du Nord Atlantique plus chaude aurait stimulé l'activité bactérienne et par conséquent aussi la respiration (Gilbert et al. 2005). L'hypoxie de l'EMSL est permanente dû à la présence d'une pycnocline permanente à environ 50 mètres de profondeur, empêchant le mélange des eaux de surfaces riches en O₂ avec les eaux profondes (Gilbert et al. 2005).

Étant donné que l'O₂ est un facteur clé contrôlant la nitrification et la dénitrification, l'hypoxie a un rôle crucial sur l'importance relative de ces deux réactions et sur la présence du couple nitrification-dénitrification. Si l'hypoxie de l'EMSL progresse vers des conditions anoxiques (absence d'O₂), les transformations bactériennes de N anaérobiques pourraient être plus importantes et le couple nitrification-dénitrification serait probablement absent (Scénario 1, Figure 1.2).

1.6 Méthodes de mesure de la dénitrification dans les sédiments.

La dénitrification dans les sédiments a été mesurée en utilisant une variété de techniques telles que l'inhibition par acétylène, l'utilisation de marqueurs isotopiques ¹⁵N, la mesure de flux de N₂, la consommation de NO₃⁻ et les approches de bilan de masse (Seitzinger et al. 1993). Toutes ces techniques présentent des avantages mais aussi des limites potentielles qui peuvent amener à une sur/sous-estimation de la dénitrification sédimentaire (Seitzinger et al. 1993). La mesure de flux de N₂ est importante parce que le N₂ est le produit principal de la dénitrification. Les mesures *in situ* de N₂ sont cependant difficiles puisque les concentrations importantes de N₂ dans l'atmosphère et l'eau peuvent causer des biais dans les mesures. L'utilisation de la spectrométrie de masse ("Membrane Inlet Mass spectrometry"; MIMS) a considérablement amélioré la capacité de mesurer les flux de N₂ (Kana et al. 1994), en diminuant la contamination des échantillons par le N₂ environnemental, et a été combinée avec des chambres benthiques, des incubations de carottes de sédiments statiques et des incubations de carottes de sédiments dans un système à écoulement continu (Laursen and Seitzinger 2002; Seitzinger et al. 1993; McCarthy et al. 2008). Les chambres

benthiques sont cependant utilisées principalement dans des estuaires peu profonds et rarement pour des sédiments creux, étant donné que l'installation des chambres doit être faite par des plongeurs (An and Joye 2001). Les techniques d'incubation sont longues puisque 2 à 3 jours de préincubation sont nécessaires pour diminuer les biais de N_2 dans l'eau porale (Oviatt et al. 1993) et ne reflètent pas les concentrations de N_2 à l'intérieur des sédiments.

D'autres méthodes consistent à mesurer les concentrations de N dans les sédiments avec quelques millimètres d'intervalle entre chaque mesure, permettant l'élaboration des profils de concentrations de haute résolution. Grâce à ces profils, il est possible de déterminer la dynamique de N dans les sédiments telle que la diffusion de NO_3^- dans l'eau porale et dans l'interface eau-sédiments. La diffusion d'une substance dissoute suit le gradient de concentration : un profil dans lequel les concentrations augmentent en profondeur traduit une libération d'une substance vers l'eau à la surface des sédiments; un profil où les concentrations diminuent en profondeur signifie un épuisement d'une substance de l'eau porale (Schulz 2000). Ces profils ne tiennent pas en compte le transport des substances liquides par advection et le mélange des sédiments par la faune benthique (bioirrigation et bioturbation).

Hartnett et Seitzinger (2003) ont établi une technique intéressante dans laquelle la sonde du MIMS a été modifiée pour mesurer les ratios N_2/Ar de façon directe, à une très haute résolution dans la carotte de sédiments, permettant ainsi l'estimation des flux de N_2 . Le désavantage de cette technique réside sur le fait que le MIMS modifié doit être installé sur le bateau et utilisé pendant l'échantillonnage. De nouvelles techniques de mesures fiables, pratiques et précises doivent être établies.

1.7 Objectifs de l'étude.

Les objectifs de cette étude consistaient à déterminer les flux de N_2 et de NO_3^- dans les sédiments profonds (~350 m) de l'EMSL, à partir de profils de concentrations, afin d'estimer les taux de dénitrification.

En utilisant les flux mesurés et des ratios stoechiométriques, je voulais évaluer l'importance potentielle du couple nitrification-dénitrification et de l'anammox dans les sédiments, en fonction des concentrations de O_2 affectées par l'hypoxie.

L'application d'une nouvelle méthode pour mesurer des concentrations à haute résolution et des flux de N_2 dans les sédiments de l'EMSL, s'avérait aussi un objectif important.

CHAPITRE 2

**DINITROGEN FLUXES IN SEDIMENTS ALONG A HYPOXIC
GRADIENT IN THE LOWER ST. LAWRENCE ESTUARY**

**Jacqueline Kowarzyk, Benoît Thibodeau,
Moritz Lehmann et Roxane Maranger (2009).**

2.1 Abstract.

Sediments display strong redox gradients and represent important sites of various microbially mediated nitrogen transformation pathways resulting in the loss of fixed N. Increased eutrophication of coastal systems will likely impact the overall function of these sediments via changes in the O₂ concentration in the overlying water, thus influencing the redox gradient and the relative importance of different N processes. To have a better understanding of how O₂ could influence N transformations, we measured dissolved N₂, NO₃⁻, O₂ and NH₄⁺ concentrations in pore water from sediment cores at five deep stations along an O₂ gradient of increasing hypoxia in the Lower St. Lawrence Estuary (LSLE). N₂ and O₂ concentrations in pore water were measured using a novel technique combining whole core squeezing for extraction and Membrane Inlet Mass Spectrometry for gas measurement. The high-resolution profiles allowed for the calculation of diffusive fluxes of N₂, O₂, NO₃⁻ and NH₄⁺ that varied respectively from 5.5 to 8.8, from -37.1 to -84.8, from -4 to -5.8 and from 0.6 to 0.8 μmol N m⁻² h⁻¹ among sites. We obtained a significant negative linear relationship between N₂ and NO₃⁻ concentrations in sediment pore water ($R^2 = 0.68$, $p < 0.0001$). However the slope of that correlation (-1.37) combined with the measured flux of NO₃⁻ in and N₂ out of the sediments suggested that NO₃⁻ diffusion from the overlying water alone could not support N₂ production. Using a stoichiometric approach, estimated potential nitrification rates varied among stations from 0.01 to 52% of the total NO₃⁻ supply rate. The relative importance of nitrification decreased with increasing hypoxia.

Keywords : Lower St. Lawrence Estuary; hypoxia; sediments; nitrification-denitrification couple; dinitrogen fluxes; dinitrogen concentration.

2.2 Résumé.

Les sédiments sont des sites importants d'élimination d'azote puisqu'ils possèdent des gradients d'oxydoréduction leur conférant les conditions idéales pour les réactions microbiennes de transformation de N. L'eutrophisation des régions côtières peut altérer ces gradients, par des changements dans la concentration d'O₂ de l'eau interstitielle, et modifier l'importance relative des processus transformant le N. Nous avons mesuré les concentrations de N₂, NO₃⁻, O₂ et NH₄⁺ dissous dans l'eau porale de sédiments profonds, provenant de cinq stations suivant le gradient d'O₂ de la zone d'hypoxie de l'Estuaire Maritime du St-Laurent (EMSL). Les concentrations de N₂ et O₂ ont été mesurées en utilisant une nouvelle technique combinant la compression de carottes entières de sédiments pour l'extraction d'eau porale, et la *Membrane Inlet Mass Spectrometry* pour la mesure des concentrations. Les profils de concentrations de haute résolution obtenus ont permis le calcul des flux diffusifs de N₂, O₂, NO₃⁻ et NH₄⁺ qui varient de 5.5 à 8.8, de -37.1 à -84.8, de -4.0 à -5.8 et de 0.6 à 0.8 μmol N m⁻² h⁻¹ respectivement. Une forte relation négative linéaire entre les concentrations de N₂ et de NO₃⁻ (R² = 0.68, p<0.0001) fut obtenue. Cependant, la pente de la relation (-1.37) et les flux de NO₃⁻ et de N₂ entrant et sortant respectivement des sédiments, suggèrent que la diffusion de NO₃⁻ provenant de l'eau à la surface des sédiments ne peut pas expliquer par elle-même la production de N₂ observée. En utilisant une approche stoichiométrique, les taux de nitrification potentielle estimés comptent pour 0.01 à 52% du flux total de NO₃⁻ nécessaire pour aboutir aux flux de N₂ observés et diminuent avec l'augmentation de l'hypoxie.

Mots clés: Estuaire Maritime du St-Laurent; hypoxie; sédiments; couple nitrification-dénitrification; flux de diazote; concentrations de diazote.

2.3 Introduction.

Estuarine sediments are critical sites for removing excess nitrogen (N) through dinitrogen (N_2) production via various denitrification pathways (Seitzinger 1988). Approximately 50% of the estimated reactive N (Nr) entering estuaries is lost to denitrification. This results in a net global removal of 24 Tg N yr^{-1} from estuaries alone (Galloway 2004). Canonical denitrification consists of degradation of organic matter and the reductive respiration of nitrate (NO_3^-) or nitrite (NO_2^-) to various N gases such as nitrous oxide (N_2O) and/or N_2 by heterotrophic bacteria (Knowles 1982). Alternate pathways of N_2 production, such as anammox exist (Burgin and Hamilton 2007), but canonical denitrification is considered to be the predominant pathway of N removal in marine sediments resulting in a permanent N sink.

Nitrogen loss from estuaries through denitrification has important ecological consequences including further limiting the amount of N available for primary producers (Vitousek and Howarth 1991). In cases where systems are heavily enriched with N, denitrification helps to alleviate N eutrophication (Seitzinger et al. 2006). Denitrification is favored under anoxic or hypoxic conditions (ideally oxygen (O_2) concentrations under $0.2 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$), combined with a suitable source of labile organic matter and a constant supply of NO_3^- (Zumft 1997; Knowles 1982). The strong redox gradients in sediments, coupled with the supply of NO_3^- due to diffusion from the overlying water, or, via sediment nitrification provide ideal conditions for N_2 loss (Seitzinger 1988; Devol and Christensen 1993).

Nitrification, the oxidation of ammonium (NH_4^+) into NO_3^- , is an aerobic bacterial chemoautotrophic reaction that appears to be a critical source of NO_3^- to sediment

denitrifying bacteria, particularly when NO_3^- concentrations are low (Seitzinger 1988). Given their differential needs for oxic and anoxic conditions for nitrifying and denitrifying bacteria respectively, it was initially believed that these processes were separated spatially in the sediments (Vanderborght and Billen 1975; Patrick and Reddy 1976). However, anoxic microsites in surface layers of the sediments favor a coupled nitrification/denitrification reaction (Seitzinger et al. 2006; Brandes et al. 2007).

Pore waters are the main vectors of substrate diffusion for biochemical reactions in the sediments. Water diffusion depth depends on sediment texture (porosity, tortuosity, carbon content, type of sediment matrix) and indirectly controls NO_3^- source for denitrification since it affects O_2 and NO_3^- availability with depth. The direction of substrate diffusion, in or out of sediments, follows a concentration gradient (Schulz 2000).

The predominant source of NO_3^- used by denitrifying bacteria in the sediments depends on the relative concentrations of O_2 and NO_3^- in the overlying water (Seitzinger and Giblin 1996). Under conditions of low O_2 and elevated NO_3^- concentrations, diffusion from the water column is the major source of NO_3^- for denitrifying bacteria, as sediment nitrification will be limited by the availability of O_2 . When O_2 and NO_3^- concentrations are both high in the overlying water, NO_3^- may be provided from both sediment nitrification or from diffusion from the water column, but denitrification rates will be slowed by the diffusion of O_2 . When NO_3^- concentrations are low, the nitrification-denitrification couple in the sediments will be favored, but the differential concentration of O_2 and organic matter composition will dictate the relative importance of NO_3^- supplied via nitrification (Seitzinger and Giblin 1996).

Sediment denitrification has been measured using a variety of techniques such as the acetylene inhibition, ^{15}N isotope pairing, N_2 flux methods, NO_3^- disappearance and N mass balance approaches (Seitzinger et al. 1993). All of these techniques have advantages but also potential limitations that can lead to under/overestimations of sediment denitrification (Seitzinger et al. 1993). Measuring N_2 fluxes is important because N_2 is the main product of the denitrification reaction and represents a net N loss in the system. However, *in situ* N_2 measurements are difficult due to high background concentrations of N_2 in the atmosphere and in the water. The use of Membrane Inlet Mass spectrometry (MIMS) has greatly improved our capacity to measure N_2 fluxes (Kana et al. 1994; 1998), by reducing background contamination and has been combined with benthic chambers, static core incubations, and sediment core incubations with continuous flow systems (Laurson and Seitzinger 2002; Seitzinger et al. 1993; McCarthy et al. 2008). However, benthic chambers are mainly used in shallow estuaries and are rarely used for deep sediments since diving or specialized benthic landers are required to install the chambers (An and Joye 2001). Incubation techniques are time consuming given that two to three days of pre-incubation are necessary to decrease background N_2 in the pore water (Oviatt et al. 1993) and do not reflect N_2 concentrations inside sediment layers. Hartnett and Seitzinger (2003) devised a clever technique, where the MIMS probe was modified to measure N_2/Ar immediately at very high resolution in a sediment core, thus allowing for the estimation of a N_2 flux rate. The inconvenience of this technique is that the modified MIMS must be ship-board to carry out these measurements in remote locations.

In this study, we measured dissolved gases concentrations in pore water of the Lower St. Lawrence Estuary (LSLE), using a unique approach combining two methods: the MIMS method, to measure N_2 and O_2 concentrations; and the Whole Core Squeezing method (WCS) (Bender et al. 1987), to extract pore water. In addition to the development of this method, our goal was to determine N_2 and NO_3^- fluxes in the sediments of LSLE in order to estimate denitrification rates and evaluate the importance of nitrification-denitrification couple as a function of a gradient of hypoxic O_2 concentrations. Like Hartnett and Seitzinger (2003), we obtained high-resolution concentration profiles of N_2 , NO_3^- and O_2 inside the sediments in order to estimate diffusion fluxes of these N species. Fluxes were used to estimate denitrification rates as a function of N_2 concentrations where N_2 flux was considered as total denitrification losses and NO_3^- diffusive fluxes as consumption by denitrification. Knowing the proportion of NO_3^- fluxes that accounts for the N_2 fluxes, we indirectly estimated the contribution of nitrification to NO_3^- production within the sediment, suggesting a possible nitrification-denitrification couple. The deep waters of LSLE are hypoxic due to isolation from exchange from oxygenated surface and mid-waters, changes in deep water circulation and increasing eutrophication (Gilbert et al. 2005; Thibodeau et al. 2006). Changes in the O_2 dynamic may impact N cycling by reducing sediment NO_3^- production via nitrification.

2.4 Materials and Methods.

2.4.1 Study site.

The Lower St. Lawrence Estuary (LSLE) is located in the province of Quebec, Canada. The deep-water mass of LSLE flows landwards through the Laurentian

Channel, a submarine valley 250 to 500 m deep. O₂ concentrations have progressively decreased in LSLE's deep-water mass at a rate of approximately 1 $\mu\text{mol L}^{-1} \text{ yr}^{-1}$ over the last 70 years, leading to hypoxic conditions (Gilbert et al. 2005). Hypoxia corresponds to O₂ concentrations below 2 mg L⁻¹ or 62.5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (Diaz and Rosenberg 1995) and has been explained by several factors such as a decreased delivery of O₂ by the bottom water masses entering the estuary, as well as a potential increase of bottom water and sediment bacterial respiration due to increased particle settling as a result of eutrophication (Gilbert et al. 2005; Benoit et al. 2006; Thibodeau et al. 2006). Hypoxia in the LSLE is a year-round state due to a permanent pycnocline at about 50 m, which does not allow mixing with the oxygen-rich surface water (Gilbert et al. 2005).

2.4.2 Sampling sites, sediment and pore water collection.

Five stations were sampled from August 6th to 10th 2006 along the LSLE aboard Coriolis II (Figure 2.1, Table V). At each station, sediment cores were collected with minimal disturbance using a multicorer, then capped and processed immediately after corer recovery in order to prevent gas exchange with the atmosphere. Temperature of sediment cores was maintained as constant as possible using icepacks.

Shipboard whole core squeezing method (WCS; Bender et al. 1987; Martin et al. 1991) was applied to extract pore water samples from each sediment core. One sediment core per station was used to measure dissolved N₂ and O₂, and another was squeezed to measure NO₃⁻ and NH₄⁺. The WCS setup was connected to gas tight tubing with a sterilized syringe filter and terminated with a graduated syringe that collected the pore water. Volumes were carefully noted to allow for depth

calculation into the profile. Using the WCS method, we produced good resolution concentration profiles near the sediment-water interface, obtaining concentrations values at approximately every 0.5 cm depth for N_2 and O_2 and at approximately every 0.25 cm depth for NO_3^- and NH_4^+ .

For each N_2 and O_2 concentration measurement (i.e. one concentration value in a sediment profile), about 30 mL of pore water were collected and transferred in 7-mL gas-tight glass tubes by disconnecting the syringe from the gas tight line and fixing it rapidly to a 10-cm tubing on the tip of the syringe. The 7-mL glass tubes were filled from the bottom, allowed to overflow four times to prevent bubbles and air contamination. Samples were fixed with 25 μ L of 1 N $HgCl_2$ to inhibit microbial activity, and then stored submersed in water at 4°C until analyzed in the laboratory at a later date. For each NO_3^- and NH_4^+ concentrations measurement, about 15 mL of pore water were collected per depth using the WCS set-up described above. Pore water was frozen and stored in screw-capped acid cleaned vials until analyzed in the laboratory. Replicates were not performed because of the limited amount of water available.

Deep-water samples (see depth in Table I) were collected by a 12-Niskin bottle rosette/ CTD sampling system (SeaBird SB911) at all stations. Sediment and pore water for carbon measurements were collected with a box-core and the top 5 cm sub-sampled by a push core with PVC tubing. Push-cores were then sliced, transferred to 50-mL centrifuge tubes, centrifuged at 3000 x g to remove interstitial water and sediments, and stored at -80 °C.

2.4.3 Analytical techniques.

Dinitrogen/Argon (N_2/Ar) and Oxygen/Argon (O_2/Ar) ratios were measured by

MIMS (mass spectrometer Pfeiffer Vacuum PrismaTM, QME 200; coefficient of variation <0.05 for N₂/Ar and O₂/Ar ratio data) (Kana et al. 1994;1998). N₂/Ar and O₂/Ar ratios were calculated from the quadrupole instrument signal (N₂, O₂ and Ar pressures at the detector) and standardized using atmosphere-equilibrated distilled water standards. Running temperature of the pore water samples and standards was maintained at 4 °C. Standards corresponded to a 1-liter reservoir of distilled water, which was constantly stirred slowly while measurements were taken. Three standards were measured after every twelve samples, in order to establish a standard curve (quadrupole signal vs time) to correct for instrument drift. Molar concentration was then calculated by multiplying standardized N₂/Ar and O₂/Ar ratios with the *in situ* saturation concentrations, taking into account solubility properties of the gases at *in situ* salinity, temperature, and pressure (determined using equations from Weiss 1970).

Nitrate, NO₂⁻, and NH₄⁺ concentrations were determined from frozen water aliquots using a Braan and Luebbe autoanalyzer (Strickland and Parsons 1972).

Temperature and salinity of bottom water column samples were measured by the CTD probe after calibration by the manufacturer. Dissolved O₂ of deep water was determined by Winkler titration (Strickland and Parsons 1972) with reproducibility generally better than 3 μmol L⁻¹.

Sediments for carbon (C) measurements were treated as follows: after lyophilization on-shore, dry sediments were homogenized and weighed (20-30 mg) directly into Ag capsules and de-carbonated by exposure to HCl fumes in a sealed container for 10-12 hrs, then placed in an oven at 55°C to remove all traces of acid. The samples were then analyzed with a GV Instruments EuroVector IsoPrime EA-IRMS.

2.4.4 Pore water concentration depth calculations.

Pore water concentration depths were estimated using the following equation:

$$d = (V / \pi * r^2) / P$$

where d is the depth (cm), V is the pore water volume (cm³) that has been collected by whole core squeezing, r is the radius of the sediment core (STN18: 4.76 cm; STN 19: 4.76 cm; STN 20: 4.76 cm; STN 21: 4.75 cm; STN 22: 4.76 cm), and P is the porosity (%) for the corresponding depth interval. Porosity was determined for the top 5 cm of an intact sediment core by weighing samples of known volume before and after drying in the oven and decreased from 95% to 75%.

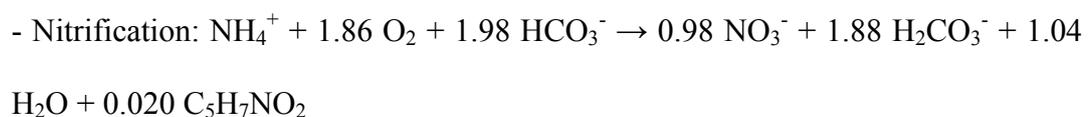
2.4.5 Benthic diffusion flux calculations.

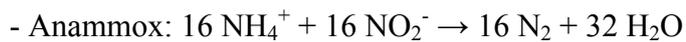
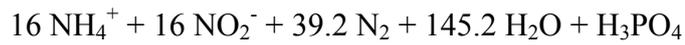
Net diffusion fluxes in the sediment water interface of N₂, O₂, NO₃⁻, and NH₄⁺ were calculated using Ficks first law of diffusion (Schulz 2000):

$$F = D_{sed} * (\delta C / \delta z)$$

where F is the diffusive flux in the sediment, D_{sed} is the diffusion coefficient for a specific N species (N₂, O₂, NO₃⁻ or NH₄⁺) corrected for sediment porosity and temperature (Boudreau 1997) and $(\delta C / \delta z)$ is the concentration gradient with depth z in the sediment. $(\delta C / \delta z)$ is calculated from the linear portion of the concentration profiles just below the sediment-water interface.

Once the N₂, O₂, NO₃⁻, and NH₄⁺ fluxes were calculated, potential nitrification, potential nitrification O₂ consumption and potential anammox were estimated via stoichiometry using the following equations:





2.4.6 Statistical analyses.

All statistical analyses, linear regression and analysis of covariance (ANCOVA) were performed using JMP 5.0.1 and SPSS 16.0 respectively. Statistical assumptions were verified for both tests (regression and ANCOVA) before analyzing the data. In the case of ANCOVA analyzes, logarithmic values of concentrations were used.

2.5 Results.

2.5.1 General site characteristics.

Bottom water and sediment characteristics were similar for each sampling site with the exception of O_2 (Table V). Although sampling depths varied from 301 m to 370 m for bottom water samples among stations, temperature, salinity, and NO_3^- concentrations were relatively constant with an average equal to 5.4°C, 34.8 p.s.u. and 26.6 μM , respectively. Bottom water O_2 concentrations decreased dramatically as one moved landward into the estuary, from 122.4 μM at station 18 to 69.6 μM at station 22. Organic C (Corg), pore water dissolved organic carbon (pwDOC) and C:N mass ratios were on average 16.02 mg g^{-1} , 3.6 mg/L and 10.19 respectively.

2.5.2 Pore water concentration profiles, linear regressions and ANCOVA.

Pore water NO_3^- concentrations from LSLE sediments decreased with depth at all of the stations sampled, varying from $\sim 25 \mu\text{mol L}^{-1}$ at the sediment-water interface

to $0 \mu\text{mol L}^{-1}$ at 5 cm in the sediment profile (Figure 2.2 A-E). In contrast, N_2 concentrations clearly and gradually increased with depth in the sediment from $\sim 590 \mu\text{mol L}^{-1}$ in overlying water to $\sim 630 \mu\text{mol L}^{-1}$ at approximately 5 cm depth in all stations (Figure 2.2 A-E). Although O_2 concentrations varied among stations (Figure 2.3), patterns of NO_3^- loss and N_2 gain within the sediment cores were similar.

Oxygen was rapidly consumed in the first few centimeters in all the profiles (Figure 2.3) with lower concentrations in the overlying water at the landward station 22 compared to the station 18. Bottom water O_2 concentrations measured using Winkler titration (Table V) followed the same trend of decreasing O_2 measured using MIMS but values were slightly different. O_2 penetration depth was deeper in the seaward sediment stations as compared to station 22, however, O_2 was never fully depleted in the profile (Figure 2.3). The minimal O_2 concentration observed in all cores was $\sim 20 \mu\text{M}$ from about 0.5 to 2 cm depth. This is potentially due to effects of bioturbation or analytical artifacts that should be tested.

Using a linear regression approach, N_2 concentrations could be predicted from the change in NO_3^- concentrations in the sediments given the strong negative linear relationship between the two variables within and among cores following this equation: $\text{N}_2 (\mu\text{mol L}^{-1}) = -1.37 \times \text{NO}_3^- (\mu\text{mol L}^{-1}) + 625.15$ (Figure 2.4, $R^2 \text{ adj} = 0.68$, $n=49$, $p<0.0001$). When stations were modeled independently, relationships remained robust (Table VI). The slope of the overall relationship, -1.37, also suggested that NO_3^- alone could not support the entire N_2 production observed.

Differences between the slopes of the relationship between NO_3^- and N_2 concentrations of the stations were observed using an Analysis of Variance (ANCOVA model $F=18.83$, $p<0.0001$, $d.f. =9$). Analyzing the stations separately,

the effect of NO_3^- on N_2 concentrations at station 18 was not significantly different from stations 19 ($p=0.055$), 20 ($p=1.000$), 21 ($p=1.000$) and 22 ($p=0.913$). Station 22 was not significantly different from stations 20 ($p=0.998$) and 21 ($p=0.936$). However, station 19 differed from stations 20 ($p=0.031$) and 22 ($p=0.015$).

N_2 and NO_3^- pore water concentrations could both be predicted from changes in O_2 concentrations. There was a strong negative linear relationship between N_2 and O_2 , where the N_2 concentrations could be predicted using the following equation: N_2 ($\mu\text{mol L}^{-1}$) = $-0.27 \times \text{O}_2$ ($\mu\text{mol L}^{-1}$) + 626.01 (Figure 2.5A, R^2 adj=0.54, $n=49$, $P<0.0001$). A positive linear regression between NO_3^- and O_2 was observed, where NO_3^- concentrations could be predicted with the following equation: NO_3^- ($\mu\text{mol L}^{-1}$) = $0.20 \times \text{O}_2$ ($\mu\text{mol L}^{-1}$) - 0.80 (Fig. 5B, R^2 adj=0.84, $n=49$, $p<0.0001$). Using an ANCOVA, we observed a significant difference in the slopes of the relationship between N_2 and O_2 among the different stations (ANCOVA model $F=13.07$, $p<0.0001$, $d.f. =9$;) suggesting that the effect of O_2 on N_2 concentrations was significantly different among stations. Analyzing the stations separately for this relationship, station 18 was significantly different from station 22 ($p=0.029$) but not from stations 19 ($p=1.000$), 20 ($p=1.000$), and 21 ($p=0.915$). Stations 19, 20, and 21 were not significantly different from each other or from stations 18 and 22 (p was always >0.05).

2.5.3 Benthic fluxes.

Dinitrogen, NO_3^- , O_2 and NH_4^+ concentration gradients were used to calculate their fluxes into (or out of) the sediments, and to estimate sedimentary denitrification and oxygen consumption rates. Dinitrogen fluxes out of the sediment were the most variable, albeit minimally from site to site ranging from

5.5 (station 22) to $8.8 \mu\text{mol N m}^{-2} \text{h}^{-1}$ (station 21). NO_3^- fluxes into the sediments were less variable: $-4 \mu\text{mol N m}^{-2} \text{h}^{-1}$ for station 18 to $-5.8 \mu\text{mol N m}^{-2} \text{h}^{-1}$ for station 21 (see Table VII). O_2 fluxes estimated using the MIMS profiles were relatively variable ranging from -37.1 (Station 18) to $-84.8 \mu\text{mol m}^{-2} \text{h}^{-1}$ (Station 22) (Table VII). NH_3 fluxes from the sediments were negligible at all stations (Table VII).

2.5.4 Potential nitrification, nitrification oxygen consumption and anammox.

Given that we measured N_2 fluxes out of the sediment directly and that NO_3^- from the overlying water alone could not account for all the N_2 produced, potential rates of nitrification were calculated using stoichiometric equations in order to create two possible scenarios to account for the missing N source.

In the first scenario, we calculated the potential *in situ* nitrification required to produce the additional NO_3^- to supply canonical denitrification (CD), assuming that N_2 was produced via CD only.

In the second scenario, we assumed that anammox was coupled to CD. We considered that the 16 moles of both the NH_4^+ and the NO_2^- produced during CD (see stoichiometric ratios in denitrification equation, section 2.4.5) were used in the anammox reaction to produce N_2 , and that the deficit of NO_3^- was produced by denitrification.

The importance of nitrification in supplying NO_3^- and in consuming O_2 varied significantly among stations under both scenarios (Table VIII). Under scenario 1, potential nitrification supplied approximately 52% of the NO_3^- required for N_2 production at station 18, the most O_2 repleted station, and only 14% at station 22, the most O_2 depleted one. Under scenario 2, this proportion decreased to 44 and

0.01% respectively for stations 18 and 22. There appeared to be a general decrease in the proportion of NO_3^- supplied or the proportion of O_2 consumed via nitrification with increasing hypoxia among stations with the exception of station 21. Not only does nitrification apparently play an important role in supplying NO_3^- at station 21, but nitrification may account for up to 24% of the sediment oxygen demand at that station (Table VIII).

2.6 Discussion.

A new promising technique was applied to measure N_2 and O_2 concentrations in sediment pore waters sampled at five stations of the LSLE along an O_2 gradient. The WCS method combined with MIMS allowed an adequate depth resolution for the determination of linear concentration gradients in the first 5 cm of the sediments, which are required to calculate N_2 and O_2 fluxes at the sediment-water interface. To our knowledge, these are the first N_2 concentration measurements reported in deep sediment pore waters of the LSLE. Surprisingly similar profiles were obtained for all stations sampled even though each profile resulted from different sediment cores (Figure 2.2).

This new method was suitable to extract pore water of the LSLE deep sediments, but may be difficult to be applied to other sediment types. Sediments from the LSLE are silty clays and thus can be easily compressed by WCS. This method may not be appropriate for sandy or rocky sediments that cannot be easily compacted by pressure exertion. Appropriate sediments for this technique should also be relatively devoid of macrofauna since it may alter the N concentrations measured.

The measured sediment O_2 and NO_3^- fluxes into the sediment correspond to consumption rates (Table VII, negative numbers). Oxygen fluxes ranged from -37.1 (Station 18) to -84.8 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{h}^{-1}$ (Station 22) and were lower than or within the same range as those previously reported by Wang et al. (2003) who sampled three stations further upstream in the estuary (102 to 187 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{h}^{-1}$) and by Silverberg et al. (2000) who sampled in the St. Lawrence Gulf (75 to 171 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{h}^{-1}$). NO_3^- fluxes ranged from -4.0 to -5.8 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{h}^{-1}$ and were lower than those observed by Wang et al. (2003) (-13.9 to -25.5 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{h}^{-1}$). Sediment organic carbon content in both studies was relatively similar and cannot explain the flux differences observed. Differences in fluxes are potentially influenced by C quality, benthic biological activity, as well as methodological discrepancies. It should be noted that our method and those reported by others (Wang et al, 2003, Silverberg et al. 2000), only considered a diffusive flux of N_2 , NO_3^- and O_2 , where bioirrigation, bioturbation and advection were not taken into account. Fluxes presented here are therefore a simplification of the actual conditions.

Using a modeling approach, Katsev et al (2007) estimated that bioirrigation and bioturbation increased fluxes in the St. Lawrence sediment-water interface, and determined that this biological activity could account for 44% to 99% of the estimate, depending on O_2 penetration depth and O_2 concentrations of the overlying waters. Katsev et al. (2007) also established that bioturbation and bioirrigation in the LSLE were constant and maximal at O_2 concentrations superior to 80 $\mu\text{mol L}^{-1}$. In our study, O_2 concentrations measured in overlying water were always higher than 80 $\mu\text{mol L}^{-1}$ at all stations sampled (Figure 2.3) suggesting the presence of bioturbation and bioirrigation. Fluxes reported in our study could therefore be higher.

N_2 fluxes represented total production rates (Table VII, positive numbers) and ranged from 5.5 to 8.8 $\mu\text{mol N m}^{-2} \text{h}^{-1}$. The fluxes we observed were very similar to those reported using the isotope pairing technique (Wang et al. 2003). Our estimates were also well within the range of the rates measured in other shelf and coastal regions (Devol and Christensen 1993; Jensen et al. 1996).

Oxygen profiles into the sediment using WCS-MIMS revealed an O_2 depth penetration varying from 0.5 mm to 2 cm depth depending on the station sampled. O_2 penetration depth was shallowest in the upstream station 22 (0.5 mm), and was similar to the O_2 penetration depth observed by Wang et al. (2003) for station 23 (0.4 mm). Overlying water O_2 concentration decreased landward, known as the bottom water hypoxia phenomenon that has been well reported by others (Gilbert et al. 2005; Thibodeau et al. 2006). O_2 is one of the primary factors controlling nitrification and denitrification rates (Kemp et al. 1990, Seitzinger and Giblin 1996) and increased O_2 penetration depth into the sediment is important to increase potential nitrification. The presence of anoxic microsites within the oxygenated zone of the sediments allows for denitrification processes, and the presence of a tight nitrification-denitrification couple.

We obtained a strong linear negative overall relationship between N_2 and NO_3^- concentrations measured in the pore water. This relationship may be translated to a coupling of N_2 production via NO_3^- consumption, however on a mol per mol basis, NO_3^- concentrations alone cannot account for the measured N_2 production, suggesting the presence of a possible nitrification-denitrification couple. Slopes of this relationship differed among stations, from -0.97 at Station 22 to -1.83 at Station 22. Although these relationships were not considered statistically

significantly different, the different slopes suggest that a differential input of NO_3^- was required among stations to satisfy the production of N_2 .

Considering the possible presence of a variable nitrification-denitrification couple among stations, we calculated potential nitrification using measured flux estimates of NO_3^- and N_2 combined with known stoichiometric equations under scenarios 1 and 2 described previously (Table VIII). Potential nitrification was estimated to supply from 14 to 52% of the N requirements of N_2 flux assuming canonical denitrification as per scenario 1, and from 0.01% to 44% in scenario 2, assuming that 29% of the N_2 flux derived from anammox. Our estimates of the relative importance of nitrification in the supply of NO_3^- for N_2 production are lower than the 56%-79% previously reported (Wang et al. 2003). Regardless, we suggest that nitrification is likely occurring within the sediment but is a spatially variable source of *in situ* NO_3^- supply to support N_2 production. Stoichiometrically, anammox could potentially account for ~29% of the N_2 obtained in all stations, but it is difficult to confirm this in the context of this study. Ladderane lipids, a lipid biomarker that suggests the presence of anammox bacteria or archaea, were not detected at station 20, suggesting that CD may be the dominant pathway of N_2 production (Gélinas, pers comm.).

Considering the potential nitrification calculated, we observed a gradual landward decreasing importance of nitrification-denitrification couple with loss of O_2 in the overlying water. Given that site characteristics are very similar except for O_2 concentrations, we can assume that O_2 is the main factor controlling the nitrification-denitrification couple in LSLE sediments. Regardless of the scenario, nitrification was most important at station 18, the most O_2 repleted site, compare to the reduced nitrification requirements estimated at station 22, the most O_2

depleted site. Station 21 was certainly an exception of this pattern where potential nitrification seems to be less affected by the decrease in O₂ concentrations. One possible explanation may be that at station 21, N₂ production via the nitrification-denitrification couple may be short-circuited by alternatively N₂ production, through the oxidation of NH₄⁺ and organic-N by MnO₂ (Luther et al 1997). This pathway may indeed be important in the LSLE estuary, where Mn is present in the sediment, but is potentially variable among stations.

2.7 Conclusions.

Whole Core Squeezing method combined with Membrane Inlet Mass Spectrometry was a new promising technique to measure rapid and precise N₂ and O₂ concentrations in the sediments at a high resolution. The fluxes estimated using this novel technique were in the range of those measured in other shelf and coastal regions. However, they were slightly lower for O₂ and NO₃⁻ fluxes and similar for N₂ fluxes previously reported in sediments sampled in other sections of the Estuary. These differences may be a function of spatial variability, methodological differences or the need to take into account non-diffusive processes (i.e. bioturbation and bioirrigation) for flux estimates. In future studies, increasing the number of sediment core replicates per N species analyzed would be interesting for more precision.

The differential fluxes of N₂ out of and NO₃⁻ into the sediment, suggest that the NO₃⁻ supply from the overlying water alone cannot support the measured N₂ production. The importance of nitrification as an *in situ* sediment NO₃⁻ supply source ranged from 0.01 to 52% where the relative importance of nitrification decreased with increased hypoxia. A better understanding of the presence of the

dominant microbial pathway would be obtained using molecular techniques of mRNA expression combined with stable isotopic tracers (Risgaard-Petersen 2004; Smith et al. 2007). As highlighted by our results, the sedimentary N-cycling in the LSLE is far from being trivial. Further studies are needed to understand the exact mechanisms and active pathways by which N is transformed. Moreover, we still lack the knowledge to predict how sedimentary N fluxes would react to a further lowering of dissolved O₂ concentrations.

Acknowledgements: We would like to thank the captain and the crew of the R/V Coriolis II for their excellent technical support and C. Blanchet for field assistance. Carbon and oxygen data were kindly provided by Yves Gélinas and Alfonso Mucci of Concordia and McGill University respectively. This research was funded by an NSERC Discovery grant to RM, and a NSERC Ship-time grant to RM and MFL and an FQRNT Strategic Professor grant to RM. This is a contribution to the GRIL and GÉOTOP.

TABLES AND FIGURES

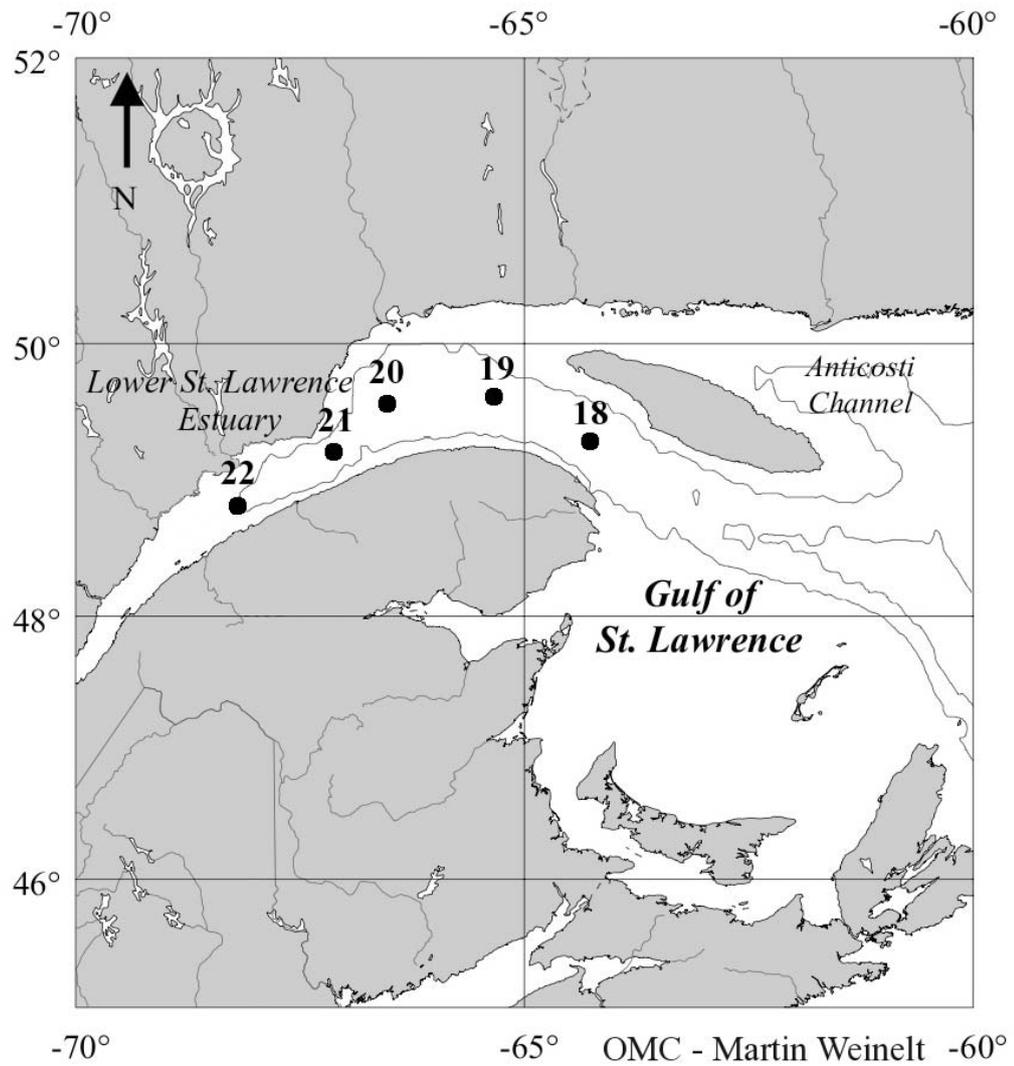


Figure 2.1. Sampling sites in the Lower St. Lawrence Estuary.

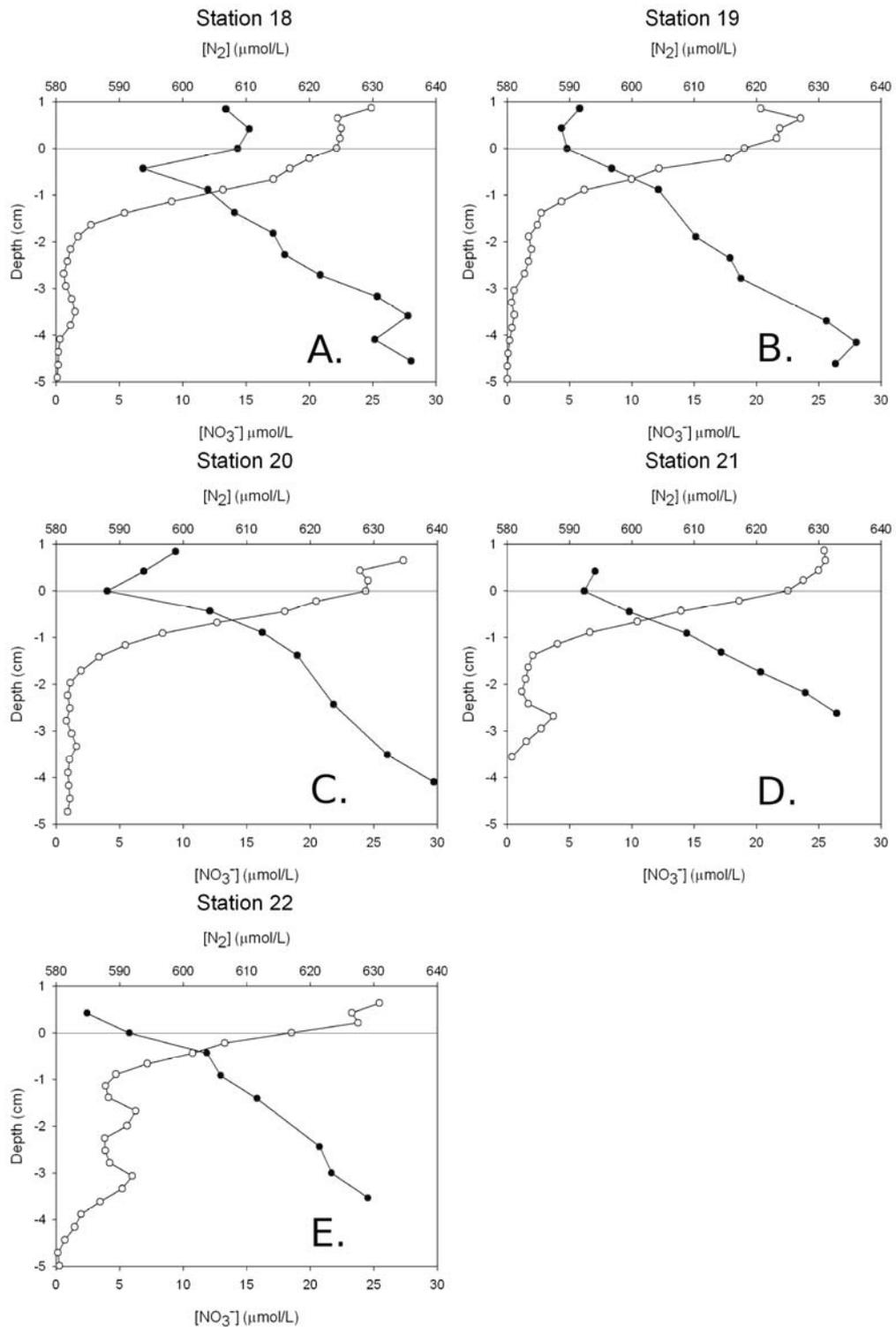


Figure 2.2. A-E Dinitrogen (black dots) and nitrate (white dots) pore water concentration profiles of stations 18 to 22 sampled in the LSLE in August 2006.

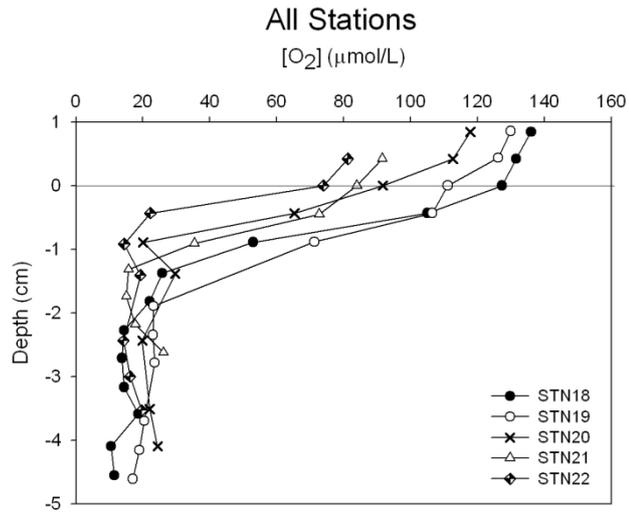


Figure 2.3. O₂ pore water concentration profiles of all stations sampled in August 2006.

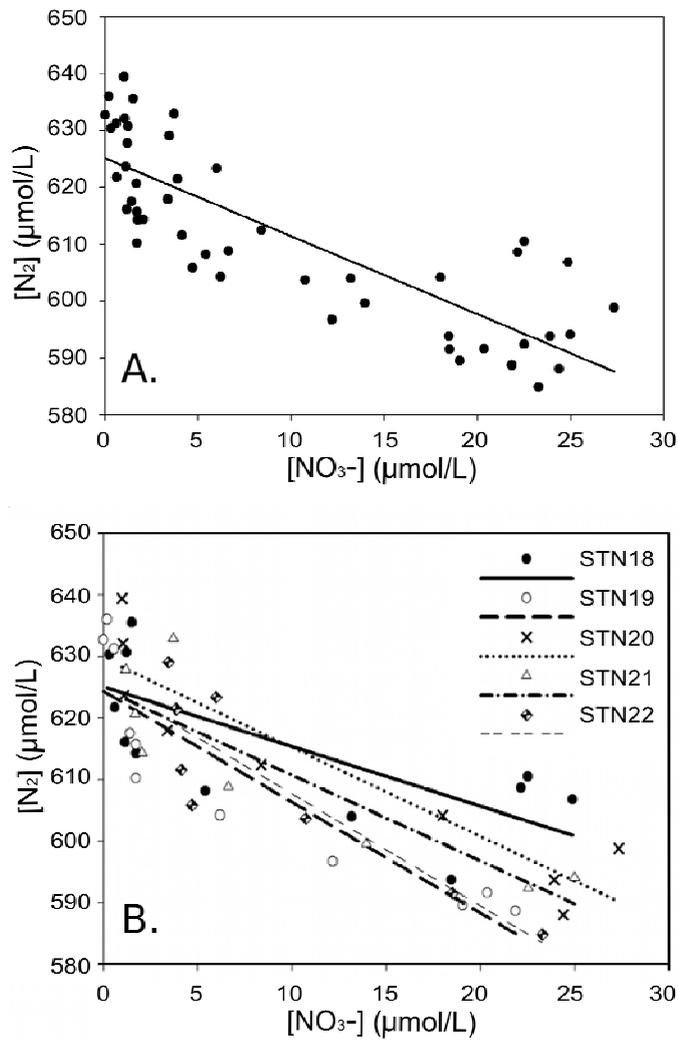


Figure 2.4. A) Overall relationship using a linear regression between dinitrogen and nitrate concentrations ($\mu\text{mol L}^{-1}$) in pore waters sampled at all depths of every station sampled. B) Linear regressions between N_2 and NO_3^- concentrations in pore waters among stations.

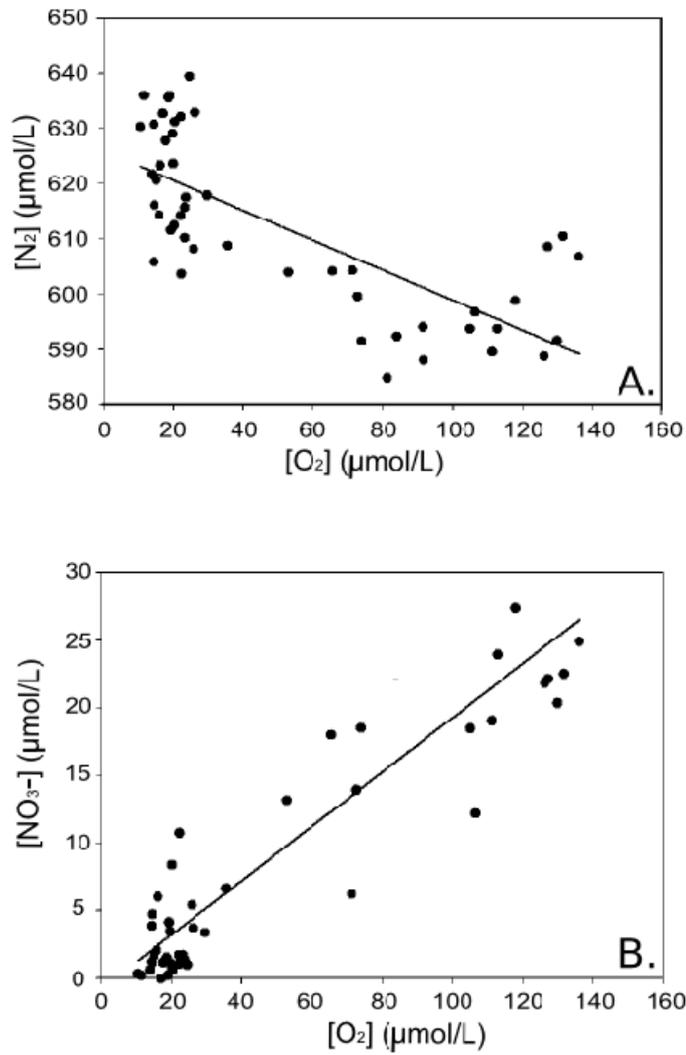


Figure 2.5. A) Relationship between dinitrogen and oxygen concentrations and B) nitrate and oxygen concentrations in pore water at all depths of every station sampled. The lines represent regression lines.

Table V: Bottom water and sediment characteristics at each sampling station.

Site	Bottom water					Sediments				
	Lat (°N) Lon (°W)	Sampling Depth (m)	Temp (°C)	Sal p.s.u	DO (μ M)	NO ₃ ⁻ +NO ₂ ⁻ (μ M)	Sampling Depth (m)	Corg* (mg g ⁻¹)	pwDOC* (mgC/L)	C:N*
18	49.290 64.255	370	5.37	34.80	122.42	26.14	390	16.71	3.91	9.33
19	49.483 65.191	360	5.44	34.76	108.22	26.09	374			
20	49.423 66.325	319	5.44	34.75	96.78	25.96	331	16.46	1.94	
21	49.115 67.280	312	5.38	34.68	74.55	28.75	320			
22	48.936 68.090	301	5.35	34.65	69.64	25.99	310	14.88	5.15	11.05

Lat latitude, *Lon* longitude, *Temp* temperature, *Sal* salinity, *DO* dissolved oxygen, *Corg* organic carbon, *pwDOC* pore water organic carbon.

*Carbon values correspond to concentrations measured in the first centimeter of the sediments.

Table VI: Slope and R^2 of linear regressions between N_2 and NO_3^- concentrations for each station sampled.

Station	Slope	R^2	p
All stations	-1.37	0.68	<0.0001
18	-0.97	0.53	0.0049
19	-1.80	0.81	0.0001
20	-1.45	0.86	0.0003
21	-1.40	0.78	0.0035
22	-1.82	0.79	0.0031

Table VII: N₂, O₂, NO₃⁻ and NH₄⁺ fluxes calculated from concentration profiles for all stations sampled.

Stations	N ₂ flux ($\mu\text{mol N m}^{-2} \text{ h}^{-1}$)	NO ₃ ⁻ flux ($\mu\text{mol N m}^{-2} \text{ h}^{-1}$)	O ₂ flux ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{ h}^{-1}$)	NH ₄ ⁺ flux ($\mu\text{mol N m}^{-2} \text{ h}^{-1}$)
18	6.9	-4.0	-53.5	-
19	5.8	-4.6	-37.1	-
20	6.3	-5.4	-56.9	0.8
21	8.8	-5.8	-38.3	0.6
22	5.5	-5.7	-84.8	-

Table VIII: Estimated fluxes ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{h}^{-1}$) for potential nitrification and anammox based stoichiometry and on observed N_2 and NO_3^- under two scenarios.

Station		18	19	20	21	22
	N_2 flux (observed)	6.9	5.8	6.3	8.8	5.5
	NO_3^- flux (observed)	4.0	4.6	5.4	5.8	5.7
Scenario 1*	Theoretical NO_3^- needs for N_2 production if CD only	8.31	6.98	7.58	10.60	6.62
	Potential nitrification***	4.31	2.38	2.18	4.80	0.92
Scenario 2**	Potential rate anammox	2.00	1.68	1.83	2.55	1.60
	Theoretical NO_3^- needs for N_2 production if CD coupled with anammox	7.2	6.06	6.58	9.18	5.74
	Potential nitrification***	3.2	1.46	1.18	3.39	0.04
	Potential O_2 consumed by nitrification (% SOD)	11-15	7-12	4-7	17-24	0-2

*Scenario 1) N_2 is produced by canonical denitrification (CD) only.

**Scenario 2) N_2 is produced by CD where the products of that reaction is coupled to anammox.

***Potential nitrification is estimated as the required *in situ* production of NO_3^- needed to supplement diffusive fluxes from the overlying water.

CHAPITRE 3
CONCLUSIONS GÉNÉRALES

Le cycle global de N se voit de nos jours affecté par des perturbations anthropiques qui modifient les flux et les budgets de N dans les systèmes terrestres et aquatiques (Galloway et al. 2003; Conley et al. 2009). Étant en interaction avec d'autres cycles biogéochimiques, toute perturbation du cycle de N a un impact sur l'ensemble de l'écosystème, d'où l'importance de comprendre les facteurs qui contrôlent les réactions d'assimilation, d'élimination et de transformation de N, notamment dans les sites fondamentaux réactionnels tels que les sédiments.

Si les méthodes de mesures de la dénitrification dans la colonne d'eau présentent déjà des difficultés et des disparités (Seitzinger et al. 2006), les mesures de cette réaction dans les sédiments s'avèrent aussi un défi important étant donné qu'il ne faut pas seulement comprendre la dynamique du N dans l'eau, mais aussi analyser comment l'eau porale interagit chimiquement et physiquement avec la matrice sédimentaire. La plupart des méthodes utilisées pour mesurer la dénitrification consistent en des incubations de carottes de sédiments et de prélèvements de l'eau à la surface des sédiments pour mesurer les concentrations de N_2 et de NO_3^- . Cependant, ces méthodes ne reflètent pas les concentrations de N_2 directement dans les sédiments. Dans ce projet de maîtrise, nous avons mesuré, à l'aide d'une nouvelle méthode, les concentrations de N_2 à haute résolution à l'intérieur des sédiments, en tentant de diminuer le plus possible les biais dus à la contamination avec l'atmosphère et l'eau, qui contiennent aussi du N_2 . Nous avons obtenu des profils de concentrations très similaires dans toutes les stations échantillonnées ce qui indique une certaine reproductibilité de la méthode. Il faut cependant continuer à faire des tests quant à la fiabilité de l'étanchéité de la méthode d'échantillonnage et d'analyse effectuée. De plus, il est impératif de s'attarder aux

questions de bioturbation et de bioirrigation qui peuvent affecter les flux des N dans les sédiments et que nous n'avons pas considérées dans cette étude. Les flux de N que nous avons obtenus s'avèrent cependant dans les mêmes ordres de grandeur que les flux mesurés dans d'autres études dans les régions côtières (Devol and Christensen 1993; Jensen et al. 1996).

Notre étude a mis en relief l'importance des concentrations en O_2 dans les sédiments pour les flux de N, cette variable expliquant les concentrations en N_2 et en NO_3^- observées. La diminution en O_2 dans les sédiments affecterait les flux de N de ces systèmes et l'importance du couple nitrification-dénitrification, responsable majeur des flux de N dans les estuaires (Jenkins and Kemp 1984; Kemp et al. 1990). L'hypoxie des sédiments de l'EMSL pourrait engendrer une diminution voir une inhibition de la nitrification, la découplant alors de la dénitrification. Les nitrates nécessaires pour la dénitrification seraient alors fournis par leur diffusion de la colonne d'eau. Étant donné que l'EMSL n'est pas un système considérablement riche en NO_3^- (~25 μM dans l'eau à la surface des sédiments), la dénitrification ne serait pas la réaction fondamentale pour l'élimination de N sous forme de N_2 . D'autres réactions anoxiques, tels que l'anammox, pourraient alors devenir des acteurs fondamentaux pour la production de N_2 (Thamdrup and Dalsgaard 2002). Notre étude a démontré, en considérant les coefficients stœchiométriques, que la réaction d'anammox pourrait être présente dans les sédiments de l'EMSL mais cela doit être confirmé par des études futures. Nous conseillons de ce fait d'analyser les concentrations de N par MIMS mais sous forme de marqueurs isotopiques ($^{14}N/^{15}N$), afin de savoir si le N_2 produit provient de la dénitrification ou de l'anammox (Risgaard-Petersen et al. 2004). Les marqueurs isotopiques pourraient aussi être utilisés pour les

nitrate, afin de distinguer les sources de NO_3^- issues de la nitrification et celles provenant de la colonne d'eau. Nous avons assumé que les flux de NO_3^- mesurés provenaient de la colonne d'eau et que les NO_3^- produits par la nitrification étaient rapidement et directement consommés par la dénitrification due à la présence d'un couple nitrification-dénitrification. Les flux et concentrations de N devraient être mesurés dans l'avenir avec une plus grande réplique spatiale et temporelle.

Les taux de dénitrification dépendent de plusieurs facteurs (Tableau III). Ces facteurs ont cependant aussi un profond impact sur la communauté bactérienne (tant dans sa composition que dans sa diversité) étant donné que l'ensemble des espèces de la communauté possède des tolérances différentes en vers les stress et les conditions environnementales (Cavigelli and Robertson 2000). Les changements environnementaux engendrés par les activités anthropiques ont probablement aussi un impact sur la communauté de bactéries nitrifiantes et dénitrifiantes. Nous ne comprenons pas encore exactement comment ces facteurs influencent les communautés et comment la composition et la diversité de la communauté affectent les flux de N (Wallenstein et al. 2006).

Les sédiments possèdent une diversité bactérienne importante à très petite échelle étant donné qu'un grand nombre de niches se concentrent dans un espace restreint. Ce ne sont pas toutes les bactéries dénitrifiantes qui sont capables de produire l'ensemble des enzymes pour effectuer les quatre étapes de la dénitrification (Zumft, 1997). Nous nous sommes intéressés à étudier, par des méthodes moléculaires, la diversité de la communauté nitrifiante et dénitrifiante afin de déterminer si les flux de NO_3^- , N_2 , O_2 et NH_4^+ observés pourraient être expliqués par une possible variabilité de la diversité bactérienne dans les différents sites échantillonnés. Pour ainsi faire, nous avons prélevé des sédiments de 1 à 5 cm de

profondeur dans toutes les stations de l'étude, afin d'en extraire l'ADN qui serait analysé par la méthode de *Denaturing Gradient-Gel Electrophoresis* (DGGE; Fisher and Lerman 1983) en utilisant des gènes fonctionnels codant pour les différentes enzymes participant aux étapes de la nitrification et de la dénitrification (*nar*, *nor*, *nirS*, *nirK* et *nos*; Bothe et al. 2000). Les profils génétiques résultants du DGGE représentent la structure de la communauté, et permettent une approximation du nombre de taxons. Cette méthode nécessite l'amplification de l'ADN par la « Polymerase Chain Reaction » (PCR), une réaction qui est facilement bloquée par des inhibiteurs présents dans l'environnement. Malgré les nombreuses tentatives, nous n'avons pas pu amplifier l'ADN par PCR, probablement dû à la présence de ces inhibiteurs dans l'eau porale. Après une lecture de la littérature plus détaillée, nous avons de plus aussi convenu que l'étude de la diversité des bactéries nitrifiantes et dénitrifiantes n'était pas essentielle, étant donné que le DGGE avec de l'ADN ne nous renseigne que sur la présence/absence d'un taxon, et non de son activité. Nous envisageons donc que les futures études de la communauté bactérienne devraient comprendre plutôt l'analyse de l'expression de gènes codant pour les enzymes réactionnelles de la nitrification et de la dénitrification, et ce par l'étude de l'ARN messager, afin d'estimer l'activité de ces bactéries (reflétée par l'ARN produit, étant donné que celui-ci sous entend l'expression génétique nécessaire à la production des enzymes réactionnelles) et la comparer avec les flux de N mesurés tel que dans la présente étude. En suivant les conseils mentionnés ci-haut, nous estimons que la nouvelle méthode appliquée (Whole Core Squeezing combiné avec la spectrométrie de masse) serait très intéressante pour l'étude du cycle de N dans les sédiments dans d'autres régions côtières et océaniques, particulièrement

dans les sites d'échantillonnage profonds et apporterait des données additionnelles solides, nécessaires à l'étude détaillée du cycle de N.

ANNEXE

DIVERSITÉ DES COMMUNAUTÉS DE BACTÉRIES EFFECTUANT LA
NITRIFICATION, LA DÉNITRIFICATION ET L'ANAMMOX:

RÔLES ÉCOLOGIQUES POSSIBLES ET ANALYSES MOLÉCULAIRES
EFFECTUÉES

A. Introduction.

En plus du volet qui consistait à l'étude des flux de N dans les sédiments de l'EMSL, je voulais aussi déterminer la diversité des communautés bactériennes sédimentaires effectuant la nitrification et la dénitrification. Le but était de comparer la diversité de gènes codant pour des enzymes participant à ces réactions, avec les taux biogéochimiques estimés grâce aux flux de N mesurés (Tableaux VII et VIII, section 2.5.3). Vérifier la présence de microorganismes réalisant l'anammox par la *Fluorescent in situ Hybridization* (FISH), était un autre de mes projets, mais je n'ai pas pu le mettre en œuvre, faute de temps. Schmid et al. 2007 proposent des séquences utiles pour l'élaboration de sondes détectant l'anammox.

Quant à la détermination de la diversité bactérienne, je n'ai malheureusement pas obtenus de résultats finaux concluants, mais j'ai tout de même acquis des connaissances intéressantes et j'ai appliqué des méthodes qui pourraient être utiles à toute recherche connexe. Les méthodes appliquées, les résultats et les conclusions sont inclus dans cette annexe. Je présente aussi différents concepts d'écologie microbienne aquatique très discutés et étudiés de nos jours.

B. Impact de la diversité d'une communauté bactérienne sur sa fonction écologique.

Plusieurs études scientifiques ont tenté et tentent toujours de déterminer les facteurs qui contrôlent la nitrification (Vitousek et al. 1982, Ward 2000) et la dénitrification (Firestone et al. 1979, Knowles 1983, Middelburg et al. 1996, Zumft 1997) afin de mieux comprendre ces processus et expliquer les taux réactionnels observés. Les facteurs les plus communément étudiés et compris,

sont regroupés dans les Tableaux II (nitrification) et III (dénitrification) du chapitre d'Introduction (section 1.3), et concernent surtout les concentrations des substrats réactionnels, la concentration en O_2 , en C et le pH. Cependant, la nitrification et la dénitrification sont des réactions effectuées majoritairement par des communautés bactériennes. Ainsi, la composition et la diversité de ces communautés bactériennes pourraient elles-mêmes représenter un facteur influençant les taux de ces réactions.

La diversité, la composition et l'abondance d'une communauté bactérienne s'établissent en fonction des conditions environnementales à long terme (perturbations et disponibilité des ressources) et dépendent aussi sur les tolérances spécifiques des espèces bactériennes aux différents stress (Cavigelli and Robertson 2000, Wallenstein et al. 2006). D'autres facteurs agissent sur ces communautés mais les affectent de façon instantanée, et modifient les taux d'activité à court terme (Figure 1a, ANNEXE). Par exemple, selon Wallenstein et al. (2006), la concentration de NO_3^- influenceraient les taux de dénitrification de façon immédiate et spontanée, mais ne détiendraient pas un rôle important sur l'établissement d'une communauté bactérienne caractéristique.

Essayer de déterminer le rôle de la composition, la diversité et l'abondance sur les taux de ces réactions de transformation de N reste difficile. Par exemple, 100 espèces de bactéries nitrifiantes, de composition « X » (X= taux de réaction faible) présentes dans un milieu, pourraient aboutir à des taux de nitrification moins importants que 2 espèces de composition « Y » (Y = taxons très actifs dans les conditions du milieu), pour une abondance bactérienne identique pour chaque espèce.

Le rôle des caractéristiques des communautés bactériennes sur les taux réactionnels de la nitrification et de la dénitrification semble exister, mais reste toujours une hypothèse à vérifier.

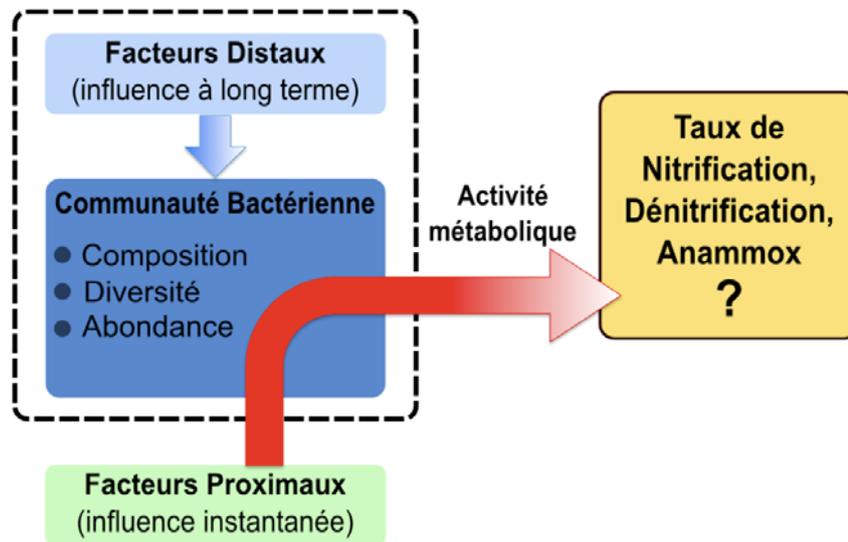


Figure 1a. Facteurs distaux et proximaux influençant les caractéristiques et l'activité d'une communauté bactérienne. Facteurs distaux : influencent à long terme la communauté et sont responsables de la composition, la diversité et de l'abondance des espèces de la communauté. Facteurs proximaux : influencent de façon ponctuelle les communautés bactériennes et sont responsables de l'activité et des taux réactionnels bactériens.

C. Principes des méthodes utilisées pour étudier la diversité bactérienne.

L'étude d'une communauté bactérienne se fait de nos jours grâce à diverses méthodes moléculaires. Les méthodes traditionnelles de cultures bactériennes sont de moins en moins utilisées puisqu'elles ne mettent en évidence que 1% des espèces bactériennes présentes, la plupart étant difficiles à isoler (Nakatsu 2007).

Pour l'application des techniques moléculaires, l'ADN des bactéries doit d'abord être extrait du milieu étudié (ici, les sédiments). Il est ensuite utilisé selon différentes méthodes pour caractériser la diversité génétique de la communauté.

Dans la présente étude, la Réaction de Polymérisation en Chaîne (PCR) et la DGGE (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*) furent combinées afin d'obtenir des profils génétiques des communautés de bactéries nitrifiantes et dénitrifiantes dans les sédiments (Figure 2a, ANNEXE).

La méthode de DGGE permet un grand débit de résultats interprétables et la comparaison de profils de plusieurs échantillons, ainsi qu'une analyse spatiale des communautés microbiennes dans un écosystème (Nakatsu 2007). En plus de renseigner sur la diversité bactérienne d'un échantillon, la DGGE permet aussi d'isoler une espèce théorique (correspondant à une bande du profil génétique; Figure 4a, ANNEXE) et de l'identifier par séquençage.

La DGGE s'effectue généralement sur des fragments de gènes d'ADN clonés par PCR. Les fragments de gènes obtenus sont appelés les « produits de PCR » et consistent en deux brins d'ADN complémentaires. La DGGE sépare les brins d'ADN de ces fragments de gènes amplifiés en fonction de la composition de leur séquence en acides nucléiques (Hovig et al. 1991). Les produits de PCR de séquences différentes sont séparés lors de leur migration dans un gel contenant un gradient linéaire de dénaturant chimique (urée ou formamide). La séparation différentielle entre brins de séquences différentes est possible étant donné que plus de dénaturant est nécessaire pour séparer les brins riches en guanine et cytosine, puisque ces nucléotides possèdent trois liaisons d'hydrogène pour relier les brins d'ADN vs deux liaisons d'hydrogènes entre l'adénine et la thymine. Au fur et à mesure que les brins d'ADN se séparent, leur migration est retardée dans le gel. La position finale des produits de PCR dans le gel après migration, dépend de leur séquence : les fragments ayant une même séquence ont une même position et forment une bande. Le résultat final de la DGGE correspond à un patron de

bandes (Figure 3a, ANNEXE) que l'on nomme aussi « profil génétique de la communauté ». Étant donné que chaque bande correspond à une espèce bactérienne théorique, les profils génétiques résultants représentent la diversité de la communauté.

La diversité des bactéries nitrifiantes et dénitrifiantes par des méthodes moléculaires se fait par amplification par PCR de fragments de gènes fonctionnels spécifiques codant pour des enzymes participant aux différentes étapes des chaînes réactionnelles (Tableau Ia, ANNEXE) (Bothe et al. 2000).

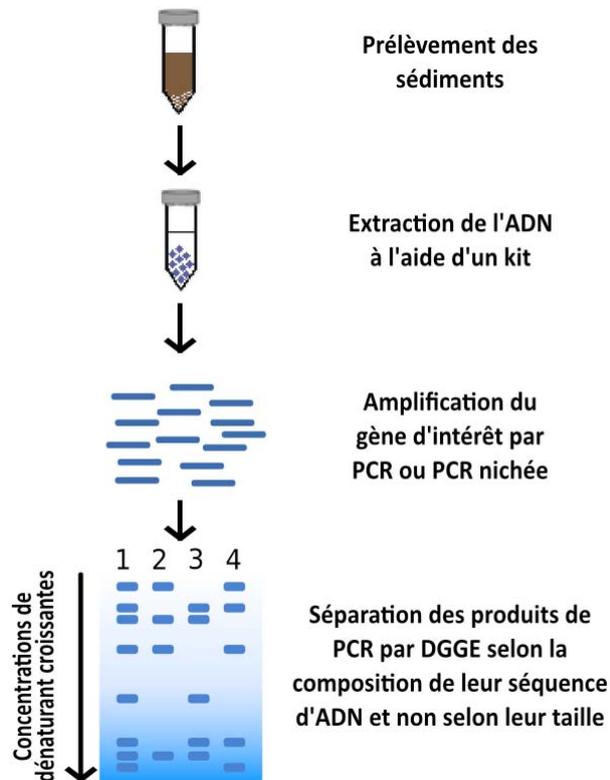


Figure 2a. Étapes de l'analyse moléculaire de la diversité d'une communauté bactérienne dans les sédiments en utilisant une combinaison de la PCR et la DGGE (Modifiée de Nakatsu 2007).

Tableau Ia: Enzymes réactionnelles pour la nitrification et la dénitrification.

	Enzyme	Réaction effectuée	Gènes
Nitrification	Ammoniac monooxygénase	$\text{NH}_3 + 2[\text{H}] + \text{O}_2 \rightarrow \text{NH}_2\text{OH} + \text{H}_2\text{O}$	<i>amoA, amoB, amoC</i>
	Hydroxylamine oxydoréductase	$\text{NH}_2\text{OH} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{HNO}_2 + 4[\text{H}]$	<i>hao</i>
Dénitrification	NO_3^- réductase	$\text{NO}_3^- + 2\text{e}^- + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{NO}_2^- + \text{H}_2\text{O}$	<i>narG, narH, narJ, narI</i>
	NO_2^- réductase	$\text{NO}_2^- + \text{e}^- + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{NO} + \text{H}_2\text{O}$	<i>nirS, nirK</i>
	NO réductase	$2\text{NO} + 2\text{e}^- + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{N}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}$	<i>norB, norC</i>
	N_2O réductase	$\text{N}_2\text{O} + 2\text{e}^- + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{N}_2 + \text{H}_2\text{O}$	<i>nosZ</i>

D. Méthodes.

a) Sites d'échantillonnage.

L'étude de la diversité des bactéries nitrifiantes et dénitrifiantes devait être réalisée pour les stations 18, 19, 20, 21 et 22 échantillonnées dans la présente étude (Tableau V et Figure 2.1 du Chapitre 2).

b) Obtention et conservation des sédiments.

À chaque station, deux carottes de sédiments intactes et exemptes de macrofaune visible furent prélevées grâce à un carottier à bord du Coriolis II. Une des carottes devait être utilisée pour mesurer l'abondance bactérienne, l'autre pour la diversité. Les carottes de sédiments furent coupées horizontalement à chaque demi-centimètre, jusqu'à cinq centimètres de profondeur. Après homogénéisation des sédiments appartenant à une même couche d'un demi centimètre, ils furent placés dans des contenants stériles et conservés à -20°C . Les sédiments destinés à l'abondance bactérienne, furent conservés dans des contenants stérilisés de à -4°C , après homogénéisation et ajout de formol (1 :5) pour fixer les bactéries.

Dans le cas où nous aurions travaillé avec de l'ARN pour déterminer la diversité des gènes actifs, les échantillons auraient du être conservés à -80°C ou dans une solution d'isothiocyanate de guanidine qui évite la dégradation de l'ARNm.

c) Extraction de l'ADN de la matrice sédimentaire.

L'utilisation d'un protocole d'extraction d'ADN approprié pour des fins d'analyses moléculaires est essentielle. Il a un impact direct sur la quantité et la qualité d'ADN extrait et de ce fait peut influencer les résultats de DGGE. De Liphthay et al. 2004 ont d'ailleurs prouvé que les résultats de DGGE pouvaient être variables pour un même échantillon selon les protocoles d'extraction utilisés. Pour étudier la diversité bactérienne, il faut comparer les résultats de DGGE entre plusieurs échantillons ce qui nécessite un protocole d'extraction d'ADN fiable, à haut débit, reproductible et standardisé. J'ai effectué plusieurs tests pour déterminer un protocole convenable pour l'extraction d'ADN de sédiments pour de fins de DGGE.

La particularité des sédiments est qu'ils représentent une matrice complexe et hétérogène contenant de l'eau et de la matière organique qui augmentent les chances de retrouver des inhibiteurs de PCR, tels que les substances humiques pouvant interférer avec l'activité de la Taq polymérase, enzyme nécessaire à la PCR. La qualité des produits de PCR affecte directement celle des résultats de DGGE. Les étapes d'extraction de l'ADN et de PCR doivent être impérativement optimisées pour aboutir à des résultats interprétables justes.

J'ai opté pour l'utilisation de kits d'extraction d'ADN commerciaux (MoBio) qui consistent en des approches rapides standardisées. Ces kits d'extraction permettent alors la bonne réplique des manipulations et la possibilité de comparer les échantillons.

Tests pour évaluer le meilleur kit d'extraction d'ADN pour des PCR et des résultats de DGGE satisfaisants.

Trois kits d'extraction MoBio furent testés avec des sédiments lyophilisés et non lyophilisés : *UltraClean Soil DNA Isolation kit*, *UltraClean Microbial DNA isolation kit*, et *Power soil DNA isolation kit*. Les tests consistaient d'une part à la capacité d'amplifier les échantillons par PCR, et d'une autre part, d'évaluer la qualité des résultats de DGGE obtenus. Après extraction de l'ADN avec chacun de ces kits, une PCR nichée fut effectuée selon la méthode de M.S. Beauregard (2009) pour évaluer la qualité et la quantité d'ADN extrait qui consiste à faire deux PCR successives, la première amplifiant la totalité du gène codant pour l'ADNr 16S et la deuxième amplifiant une des régions hypervariables de ce gène. Toutes les PCR furent effectuées dans un appareil thermocycleur de type DNA Thermal Cycler 480, PerkingElmer, MA. Les amorces utilisées pour ces deux PCR (Tableau IIa, ANNEXE) ont déjà été testées dans d'autres études (Edwards et al. 1989, Muyzer et al. 1993) et sont appropriées pour effectuer un test pour évaluer la qualité de l'extraction d'ADN uniquement.

Les amorces pA/pH (Tableau IIa, ANNEXE) furent utilisées pour la première PCR. Elles amplifient le gène ADNr 16s bactérien (~1500 pb). La recette et le cycle de PCR optimisé pour les amorces pA/pH sont présentés dans les Tableaux IIIa et IVa (ANNEXE). Une deuxième PCR fut effectuée avec les amorces 341F+GC et 534R (Tableau IIa, IIIa et Va, ANNEXE) qui amplifient une des régions hypervariables de l'ADNr 16S, la région V3. Afin de confirmer le succès des réactions de PCR, les produits de PCR furent visualisés par leur migration

dans un gel d'agarose de 1% à 120 V pendant 30 min, suivit de la coloration du gel au bromure d'éthidium pendant 10 minutes (10 minutes de rinçage).

Ce sont les produits de la deuxième PCR amplifiant la région V3 du ADNr 16S qui furent soumis à la DGGE et permettent la détermination de la diversité totale bactérienne. Les paramètres utilisés pour la DGGE se retrouvent dans le Tableau VIa (ANNEXE).

Tableau IIa: Séquence des amorces utilisées pour les amplifications PCR destinées à évaluer l'efficacité d'extraction selon plusieurs kits.

Gène	Amorces	Séquence (5'-3')	Référence
Gène codant pour ADNr 16S Région V3	pA	AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG	Edwards et al. 1989
	pH	AAG GAG GTG ATC CAG CCG CA	Edwards et al. 1989
	341F+GC	CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GCC TAC GGG AGG CAG CAG	Muyzer et al. 1993
	534 R	ATT ACC GCG GCT GCT GG	Muyzer et al. 1993

Tableau IIIa: Réactifs utilisés pour l'amplification PCR de l'ensemble de l'ADNr 16S et de la région V3.

Réactifs	Volume (µL)	
	Tout l'ADNr 16s	Région V3
Eau nanopure stérile	15.625	11.875
Tampon (10X)	2.5	2.5
Amorces sens (5 µM)	1.5	2.5
Amorce antisens (5 µM)	1.5	2.5
MgCl ₂	0.5	-
dNTP (10 mM)	0.5	0.5
Taq polymérase	0.25	0.125
ADN	1.0	5*
Tween	0.5	-
BSA	0.125	-
DMSO	1.0	-
Total	25	25

*ADN consiste en les produits de la première PCR utilisant les amorces pA/pH, dilué 1 :100. Les valeurs entre parenthèse correspondent aux concentrations des solutions mères.

Tableau IVa: Cycle PCR appliqué pour l'amplification de l'ensemble de l'ADNr 16S avec les amorces pA/pH.

Ordre chronologique	Temps (min)	Température	Nombre de cycles
1	3 :00	94°C	-
2	0 :30	94°C	35
	0 :30	58°C	
	1 :00	72°C	
3	5 :00	72°C	-
4	∞	4°C	-

Tableau Va: Cycle PCR appliqué pour l'amplification de la région V3 avec les amorces 341 F +GC/534 R.

Ordre chronologique	Temps (min)	Température	Nombre de cycles
1	0:01	94°C	-
2	1 :00	94°C	Deux cycles pour chaque degré diminué entre 65°C et 55°C (méthode Touch Down)
	0 :45	65°C-55°C	
	1 :00	72°C	
3	5 :00	72°C	-
4	∞	4°C	-

Tableau VIa: Paramètres utilisés pour la DGGE des produits de PCR de la région V3.

Appareil pour la DGGE	Dcode Universal Mutation Detection System (Bio-Rad, Hercules, CA); Gradient Former Model 485 (Bio-Rad).
Paramètres de l'électrophorèse	20 min à 80 V et à 60 °C 17 heures à 60 V et à 60 °C
Caractéristiques du gel d'acrylamide/bis-acrylamide	Gel à 6% Gradient dénaturant de 40% à 70% où 100% de dénaturant correspond à 7 M d'urée et 40% (v/v) de formamide.
Volume de produit de PCR de la région V3 chargé sur le gel	25 µL
Coloration du gel	15 minutes SYBR Gold 1X (Invitrogen, Carlsbad, CA)
Appareil pour la visualisation des bandes d'ADN	GeneSnap (Syngene, Frederick, MD)

Résultats et interprétation des tests des kits d'extraction d'ADN des sédiments :

Résultats et interprétation des PCR.

Le succès de l'amplification par PCR niché du gène codant pour l'ADNr 16S et de la région V3 a été vérifié par visualisation de l'ADN sur gel d'agarose des

produits PCR (Figure 2a, ANNEXE). Un manque d'amplification ou une faible amplification (exprimée par l'absence de bande ou une faible bande dans le patron de migration du gel) fut interprété comme une mauvaise extraction (manque d'ADN) ou la présence d'inhibiteurs de PCR dans l'ADN extrait.

Les produits finaux de la PCR nichée, correspondant aux produits de PCR de l'amplification de la région V3 sont présentés dans la Figure 2a (ANNEXE). La qualité de l'image fait en sorte que l'échelle moléculaire n'apparaît pas clairement, mais les produits de PCR pour tous les répliques apparaissent comme des bandes d'ADN d'environ 200 paires de bases (pb).

Avec tous les kits d'extraction d'ADN testés, l'amplification de la région V3 suite à la PCR nichée décrite précédemment s'est avérée efficace. La qualité et la quantité du produit de PCR de la région V3 obtenu est très homogène pour tous les répliques lyophilisés ou non-lyophilisés dont l'ADN fut extrait avec un même kit d'extraction, sauf pour un des échantillons extrait avec le kit UltraClean Microbial DNA isolation kit dont l'ADN n'a été amplifié que très faiblement. L'intensité des bandes sur gel est plus importante pour les échantillons dont l'ADN a été extrait avec le kit UltraSoil DNA Isolation kit ce qui indique une amplification d'ADN plus importante et efficace grâce à ce kit. Malgré que le Power Soil DNA Isolation Kit soit le kit le plus récent et mieux côté (ainsi que plus dispendieux) lors de la présente étude, le UltraClean Isolation Kit semble être le plus approprié pour l'extraction d'ADN de nos sédiments. Contrairement aux conseils du manufacturier, la lyophilisation des échantillons ne semble pas améliorer le taux d'amplification par rapport à une extraction d'ADN d'échantillons non-lyophilisés. Après plusieurs tests, nous avons donc conclu que

l'étape de lyophilisation ne serait pas nécessaire pour l'extraction d'ADN des sédiments échantillonnés (Fig. 2a et 3a, ANNEXE).

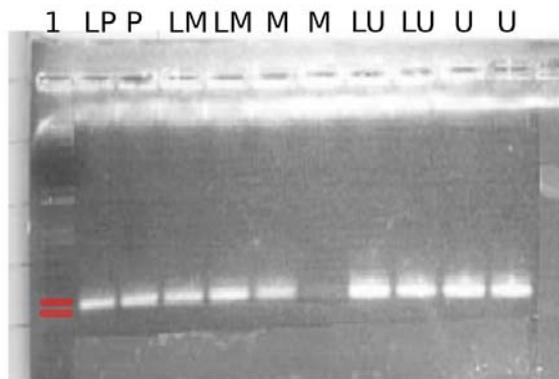


Figure 3a. Résultats sur gel d'agarose 1% des produits de PCR issus de l'amplification de la région V3. L'extraction de l'ADN de 10 réplicats d'un même échantillon de sédiments de l'EMSL fut effectuée grâce à 3 kits d'extraction différents. Les réplicats L ont été lyophilisés alors que autres ont conservé l'eau porale. Kits d'extraction d'ADN (MoBio) utilisés: Puit 1 : échelle moléculaire de 100 pb; Puits P: Power soil DNA isolation kit; Puits M: UltraClean Microbial DNA isolation kit; puits U: UltraClean Soil DNA Isolation kit. Les bandes rouges représentent les deux dernières bandes de l'échelle moléculaire (correspondant de haut en bas à 200 pb et à 100 pb), qui ne sont pas apparues clairement sur la photo du au manque de qualité de celle-ci.

Résultats de la DGGE.

Les profils de DGGE obtenus à partir des échantillons de sédiments extraits avec les 3 kits d'extractions, issus de PCR nichée, sont présentés dans la Figure 3a. Pour chaque échantillon, de nombreuses bandes ayant la même position verticale, correspondant à des espèces de bactéries différentes, peuvent être observées. Les patrons de bandes sont identiques pour l'ensemble les réplicats testés, ce qui indique que tous les kits d'extraction ont permis des résultats de DGGE de qualité et comparables. Comme dans le cas des résultats de PCR, l'intensité des bandes d'un des échantillons extrait avec le kit de UltraClean Microbial DNA Isolation

kit est plus faible que les autres, dû à plus faible concentration d'ADN amplifié. Ceci semble être dû à une erreur de manipulation, plus qu'à une propriété du kit d'extraction. Pour une diminution de la trainée d'ADN observée, une réduction de la quantité d'ADN par puits peut être effectuée. De même que pour les PCR, la lyophilisation n'améliore pas la résolution des patrons de bandes de DGGE observés.

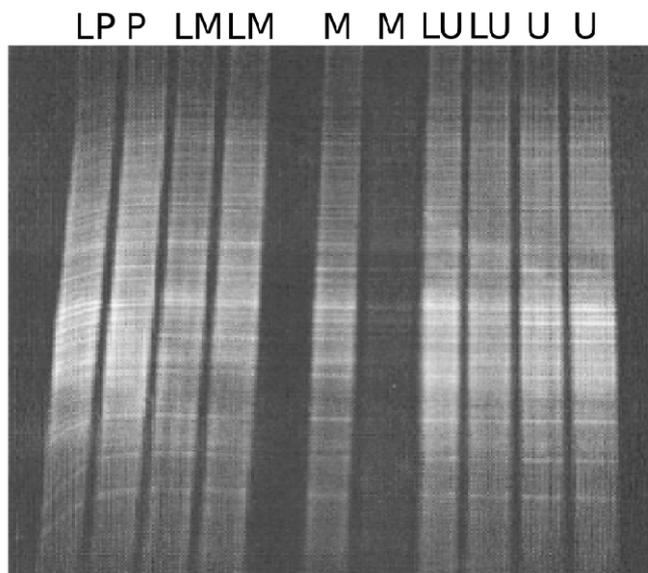


Figure 4a. Patrons de bandes d'ADN obtenus après migration des produits de PCR issus de l'amplification de la région V3 sur DGGE (8% d'acrylamide; gradient de dénaturant 40%-70%) à 80V pendant 20 min, et à 60V 17 heures. L'échantillon de sédiments est le même pour tous les puits. Les répliques L ont été lyophilisés alors que les autres ont conservé l'eau porale. Plusieurs kits d'extraction d'ADN ont été utilisés: Puits P: Power soil DNA isolation kit; Puits M: UltraClean Microbial DNA isolation kit; puits U: UltraClean Soil DNA Isolation kit.

Conclusion :

En conclusion, les trois kits d'ADN testés semblent permettre une PCR-DGGE convenable avec les sédiments utilisés. Cependant, le kit UltraClean Soil DNA Isolation Kit permet une extraction d'ADN plus importante et efficace que les

autres kits, ainsi qu'une meilleure résolution des résultats de PCR. Le kit UltraClean Soil DNA Isolation Kit qui fut utilisé pour le reste des expériences moléculaires de cette étude. De plus les échantillons de sédiments ne furent pas lyophilisés pour la suite des expériences de PCR et de DGGE, étant donné que cette étape ne semble pas nécessaire, n'améliorant pas la qualité des résultats.

d) Amplification des gènes d'intérêts par PCR.

Pour l'analyse des communautés de bactéries nitrifiantes et dénitrifiantes, nous avons utilisé les amorces nosZ-F/nosZ1622R (Throbäck et al. 2004) et AmoA-1F/Amo-2R-TC (Nicolaisen et al. 2002) présentées dans le Tableau VIIa (ANNEXE). Une séquence riche en guanine et cytosine («pince GC») fut attachée à la fin des amorces nosZ1622R et AmoA-1F de PCR afin d'augmenter le pourcentage théorique de détection de changements de base à 100%. Ceci devait aussi permettre de produire des bandes nettes sur le gel d'acrylamide de DGGE, la migration des fragments étant stabilisée puisque la pince GC empêche la séparation complète des brins (Sheffield et al. 1989).

Tableau VIIa: Séquence des amorces utilisées pour les amplifications PCR destinées à évaluer la diversité des communautés de bactéries nitrifiantes et dénitrifiantes.

	Gène	Amorces	Séquence (5'-3')	Référence
Dénitrification		nosZ-F	CG(C/T) TGT TC(A/C) TCG ACA	Kloos et al. 2001
	<i>nosZ</i>		GCC AG	
		nosZ1622R*	CGC (G/A)A(C/G) GGC AA(G/C)	Throback et al. 2004
			AAG GT(G/C) CG	
Nitrification		AmoA-1F*	GGG GTT TCT ACT GGT GGT	Nicolaisen 2002
	<i>amoA</i>	AmoA-2R-TC	CCC CTC TGC AAA GCC TTC	Nicolaisen 2002
			TTC	
		AmoA-1F-HY*	GGG G(A/T/C)T T(T/C)T ACT GGT	Stephen 1996
			GGT	
	AmoAr-i	CCC CTC IGI AAA ICC TTC TTC	Hornek et al. 2006	

*Une pince GC fut rajoutée à ces amorces pour la DGGE : 5' -CGC CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GC- 3' (Nicolaisen et al. 2002); « I » correspond à Iosine.

Les recettes et cycles PCR sont présentés dans les Tableaux VIIIa, IXa et Xa.

Tableau VIIIa: Réactifs utilisés pour l'amplification PCR des gènes *nosZ* et *AmoA*.

Réactifs	Concentration	Volume (µL)
Eau nanopure stérile		18.9
Tampon (10X)	1X	2.5
Amorces sens (5 µM)	0.5 µM	1
Amorce antisens (5 µM)	0.5 µM	1
dNTP (10 mM)	0.2 mM	0.5
Taq polymérase	0.5 U	0.1
ADN	Dilution 1 :10	1
Volume Total		25

Les valeurs entre parenthèse correspondent aux concentrations des solutions mères.

Tableau IXa: Cycle PCR appliqué pour l'amplification du gène *AmoA* avec les amorces AmoA-1F/AmoA-2R-TC (selon Nicolaisen et al. 2002).

Ordre chronologique	Temps (min)	Température	Nombre de cycles
1	1 :00	92°C	-
2	0 :30	92°C	35
	0 :30	57°C	
	45 s + 1 s/cycle	72°C	
3	5 :00	72°C	-
4	∞	4°C	-

Tableau Xa: Cycle PCR appliqué pour l'amplification du gène *nosZ* avec les amorces nosZ-F/nosZ1622R (selon Throbäck et al. 2004).

Ordre chronologique	Temps (min)	Température	Nombre de cycles
1	2 :00	94°C	-
2	0 :30	94°C	35
	1 :00	51°C	
	1 :00	72°C	
3	10:00	72°C	-
4	∞	4°C	-

Résultats – Diversité des communautés de bactéries nitrifiantes et dénitrifiantes :

Nous avons tenté d'amplifier par PCR les gènes *nosZ* et *amoA* de l'ADN bactérien contenu dans les sédiments des stations échantillonnées dans l'EMSL, gènes déjà amplifiés avec succès par cette méthode par d'autres auteurs (Nicolaisen et al. 2002, Throbäck et al. 2004). Malheureusement, malgré des nombreuses optimisations des recettes de PCR et des cycles PCR présentés ci-hauts, les PCR se sont toujours avérées un échec.

Il est possible que les PCR n'ont pas marché du à la présence d'inhibiteurs de PCR en excès. Les tests pour déterminer le meilleur kit d'extraction d'ADN ont été effectués avec des sédiments de l'EMSL de 7 cm de profondeur. Les sédiments de notre étude, étant plus en surface, pourraient avoir plus d'inhibiteurs que ceux utilisés pour les tests.

Voici les différentes solutions que nous avons tenté afin de contrer cet obstacle :

- Répétitions des extractions d'ADN en effectuant plusieurs lavages et diminuer les chances de retrouver des inhibiteurs de PCR.
- Dilutions des échantillons d'ADN afin de diluer de même les inhibiteurs de PCR (dilutions 1 :10 1 :100).
- Vérification d'une extraction d'ADN efficace en mesurant les concentrations d'ADN extraites par spectrométrie.
- Vérification d'une extraction d'ADN efficace par amplification du gène codant pour l'ADNr 16S avec les amorces pA/pH. Dans tous les cas, nous avons obtenu des produits PCR avec succès. La quantité d'ADN extraite avec les kits fut suffisante. La Taq polymérase ne fut pas inhibée puisqu'une amplification d'une séquence d'ADN a eu lieu.
- Utilisation de nouvelles amorces AmoA-1F/AmoA-2R-TC et nosZ-F/nosZ1622R ainsi que de nouveaux produits pour s'assurer que la non-réussite des PCR n'était pas due à une contamination de nos produits.
- Utilisation des amorces AmoA-1F/AmoA-2R-TC et nosZ-F/nosZ1622R sans la pince GC. La pince GC qui améliore la résolution des gels de DGGE s'est déjà avérée un facteur qui réduit l'efficacité d'une réaction PCR (Yasuda and Shiaris 2005).
- Optimisation des cycles et des recettes PCR : Augmentation des concentrations de $MgCl_2$ jusqu'à une concentration de 4.0 mM ainsi qu'une augmentation des acides nucléiques libres tel que conseillé par (Boleda et al. 1996); Variations de la température de la température d'hybridation entre 48 et 58 °C; Variations des concentrations en ADN; Augmentation des concentrations de la Taq polymérase et des amorces.

- Étude de la qualité des amorces utilisées (vérifier qu'il s'agit bien d'amorce complémentaires sens/anti-sens; vérifier qu'il n'y ait pas de formation de structures secondaires) à l'aide de programmes d'ordinateur tels que Amplify 3.1.

Je considère que l'ensemble des solutions testées ci-haut sont intéressantes et auraient pu donner des résultats satisfaisant concluants si les tests s'étaient poursuivis plus longuement. Étant donné que mon projet de recherche comportait un important volet biogéochimique, le temps important nécessaire à l'élaboration de ces tests fut réduit. L'option de la présence d'une substance inhibitrice ou interférant dans les réactions de PCR avec les deux paires d'amorces utilisées ne peut être niée. Je conseillerai cependant aussi d'effectuer des PCR nichées avec les amorces AmoA-1F/AmoA-2R-TC et nosZ-F/nosZ1622R. La PCR nichée s'est avérée dans d'autres études une approche permettant l'obtention de produits PCR abondants puisqu'elle augmente le nombre de séquences cibles potentielles dans l'échantillon (Dar et al. 2005). Aussi, je recommanderai d'essayer des PCR avec d'autres couples d'amorces tels que celles proposées par Hornek et al. 2006, AmoA-1F-HY/AmoAr-i, utilisé pour la diversité des bactéries nitrifiantes (voir séquences dans le Tableau VIIa, ANNEXE).

Malheureusement, l'inefficacité des réactions de PCR a empêché d'effectuer les DGGE nécessaire à l'étude de la diversité bactérienne des sédiments de l'EMSL.

E. Commentaires pour des recherches futures.

L'étude de la diversité des communautés de bactéries nitrifiantes et dénitrifiantes aurait été de grand intérêt dans notre étude, étant donné que la diversité aurait peut être permis de mieux expliquer les flux d'azote observé dans les stations

échantillonnées dans l'EMSL et puisque ce type d'étude n'a jamais été réalisée dans le EMSL auparavant. Pour les projets futurs, le Tableau XI présente des conseils utiles à suivre lors de l'étude de la diversité bactérienne des sédiments en suivant la méthode de PCR-DGGE.

La vérification de la présence de microorganismes effectuant l'anammox et la DNRA aurait aussi apporté des informations complémentaires intéressantes.

Dans le cas d'une nouvelle étude future, j'aurais cependant modifié le type d'analyses moléculaires utilisées. Malgré les avantages de la DGGE, cette méthode possède des limites qu'il faut tenir compte lors de l'interprétation des résultats. Par exemple, on peut affirmer la présence de deux communautés différentes de manière quantitative si le profil de migration des bandes est différent, mais on ne peut affirmer que deux communautés sont identiques si le patron est le même. Le nombre de bandes d'ADN observés dans un profil ne peut pas être interprété comme le nombre exact d'espèces dans une communauté. Dans certains cas, les recherches ont trouvé qu'un seul isolat de laboratoire produisait plusieurs bandes par DGGE (Satokari et al. 2001). Et, à l'inverse, une seule bande peut représenter plusieurs communautés (Yang and Crowley 2000). Pour faire face à cette limitation, j'aurai impérativement combiné la DGGE avec une technique de séquençage des bandes. De plus, une autre limite de la DGGE est que les résultats peuvent être difficilement reproductibles (le patron de bande de DGGE peut varier pour un même échantillon dû à une possible variation entre les gradients des gels (Fromin et al. 2002). L'inclusion de marqueurs de DGGE aurait été utilisée pour faciliter la comparaison entre gels et pour comprendre la variabilité entre gels.

Je me serais de plus aussi intéressée l'activité des bactéries nitrifiantes et dénitrifiantes, plutôt que leur diversité uniquement, par l'étude de l'ARNm nécessaire à la traduction des enzymes de la nitrification et de la dénitrification. La DGGE de fragments d'ADN n'informe que sur le nombre d'espèces présentes dans un échantillon, mais n'indique pas quelles espèces sont actives ou si elles sont actives. J'aurai combiné la DGGE avec la *Reverse Transcription-PCR* qui permet l'étude de l'ARNm et l'activité des communautés bactériennes. Ainsi, en utilisant tant des gènes pour l'ensemble de la communauté bactérienne tel que le gène codant pour l'ADNr 16S, et des gènes de communautés spécifiques, telles que *nosZ* et *amoA*, il serait possible d'analyser la communauté bactérienne en comparant les espèces bactériennes actives vs la communauté totale de bactérie. Il serait de même intéressant de quantifier l'abondance relative des gènes impliqués dans la nitrification et la dénitrification grâce à la PCR à temps réel.

Ce type d'étude nous rapprocherait définitivement à la compréhension du rôle des caractéristiques des communautés bactériennes dans la nitrification et la dénitrification comme facteurs contrôle de ces réactions.

Tableau XIa: Conseils pratiques à suivre lors de l'étude de la diversité bactérienne des sédiments en suivant la méthode de PCR-DGGE.

Paramètres :	Conseils :
Conservation des échantillons	Pour les échantillons d'ADN : conserver à -20°C. Pour l'ARN : conserver à -80°C ou dégrader les ARNases avec de l'isothiocyanate de guanidine.
Extraction de l'ADN	Effectuer des tests d'extraction d'ADN avec des sédiments identiques à ceux de l'étude. Effectuer des lavages additionnels de l'ADN/ARN pour enlever le plus d'inhibiteurs à PCR possibles.
Choix des amorces	Choisir des amorces complémentaires, sens/anti-sens. Vérifier avec des outils de software (tels que Amplify 3.1) que le couple d'amorces amplifie bien le fragment d'ADN/ARN d'intérêt. Vérifier que les amorces ne peuvent pas former des structures secondaires pouvant empêcher leur fixation sur l'ADN/ARN (des structures de « tige-boucle »).
Optimisation des PCR	Travailler de façon organisée. Apprendre à utiliser l'appareil de PCR pour effectuer plusieurs tests d'optimisation dans un même cycle pour économiser du temps. Faire varier les concentrations de MgCl ₂ , des acides nucléiques libres (Boleda et al. 1996), de l'ADN à amplifier, de la Taq polymérase et des amorces. Faire varier la température d'hybridation entre 48 et 58 °C.
Diminution des inhibiteurs de PCR	Augmenter le nombre de lavages lors de l'extraction de l'ADN/ARN. Diluer l'ADN (1 :10, 1 :100).

RÉFÉRENCES

- An, S., and S. Joye. 2001. Enhancement of coupled nitrification-denitrification by benthic photosynthesis in shallow estuarine sediments. *Limnology and Oceanography* **46**: 62-74.
- Beaugard, M. S. 2009. Impacts de la fertilisation phosphatée sur la biodiversité microbienne en sols agricoles. Sciences biologique. UdeM, 186p
- Bender, M., W. Martin, J. Hess, F. Sayles, L. Ball, and C. Lambert. 1987. A whole-core squeezer for interfacial pore-water sampling. *Limnology and Oceanography* **32**: 1214--1225.
- Benoit, P., Y. Gratton, and A. Mucci. 2006. Modeling of dissolved oxygen levels in the bottom waters of the Lower St. Lawrence Estuary: Coupling of benthic and pelagic processes. *Marine Chemistry* **102**: 13-32.
- Boleda, M. D., P. Briones, J. Farres, L. Tyfield, and R. Pi. 1996. Experimental design: A useful tool for PCR optimization. *Biotechniques* **21**: 134-140.
- Bothe, H., G. Jost, M. Schloter, B. B. Ward, and K. P. Witzel. 2000. Molecular analysis of ammonia oxidation and denitrification in natural environments. *Fems Microbiol. Rev.* **24**: 673-690.
- Boudreau, B. 1997. A one-dimensional model for bed boundary layer particle exchange. *Journal of Marine Systems* **11**: 279-303.
- Brandes, J. A., A. H. Devol, and C. Deutsch. 2007. New developments in the marine nitrogen cycle. *Chem. Rev.* **107**: 577-589.
- Breitburg, D. 2002. Effects of hypoxia, and the balance between hypoxia and enrichment, on coastal fishes and fisheries. *Estuaries* **25**: 767-781.
- Burgin, A. J., and S. K. Hamilton. 2007. Have we overemphasized the role of denitrification in aquatic ecosystems? A review of nitrate removal pathways. *Frontiers in Ecology and the Environment* **5**: 89-96.
- Cavigelli, M. A., and G. P. Robertson. 2000. The functional significance of denitrifier community composition in a terrestrial ecosystem. *Ecology* **81**: 1402-1414.
- Christensen, P. B., S. Rysgaard, N. P. Sloth, T. Dalsgaard, and S. Schwaerter. 2000. Sediment mineralization, nutrient fluxes, denitrification and dissimilatory nitrate reduction to ammonium in an estuarine fjord with sea cage trout farms. *Aquat. Microb. Ecol.* **21**: 73-84.
- Conley, D. J. and others 2009. Ecology Controlling Eutrophication: Nitrogen and Phosphorus. *Science* **323**: 1014-1015.
- Dalsgaard, T., Thamdrup, B. 2002. Factors Controlling Anaerobic Ammonium Oxidation with Nitrite in Marine Sediments. *Applied and Environmental Microbiology.* **68** : 3802–3808
- Dalsgaard, T., Thamdrup, B., Canfield D., E. 2005. Anaerobic ammonium oxidation (anammox) in the marine environment. *Research in Microbiology* **156** : 457–464
- Dar, S. A., J. G. Kuenen, and G. Muyzer. 2005. Nested PCR-denaturing gradient gel electrophoresis approach to determine the diversity of sulfate-reducing bacteria in complex microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology* **71**: 2325-2330.
- De Liphay, J. R., C. Enzinger, K. Johnsen, J. Aamand, and S. J. Sorensen. 2004. Impact of DNA extraction method on bacterial community composition

- measured by denaturing gradient gel electrophoresis. *Soil Biology & Biochemistry* **36**: 1607-1614.
- Devol, A. H., and J. P. Christensen. 1993. Benthic fluxes and nitrogen cycling in sediments of the continental-margin of the Eastern North Pacific. *Journal of Marine Research* **51**: 345-372.
- Diaz, R. J., and R. Rosenberg. 1995. Marine benthic hypoxia: A review of its ecological effects and the behavioural responses of benthic macrofauna, p. 245-303. *Oceanography and Marine Biology*.
- Edwards, U., T. Rogall, H. Blocker, M. Emde, and E. C. Bottger. 1989. Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. *Nucl. Acids Res.* **17**: 7843-7853.
- Firestone, M. K., M. S. Smith, R. B. Firestone, and J. M. Tiedje. 1979. The influence of nitrate, nitrite and oxygen on the composition of the gaseous products of denitrification in soil. *Soil Science Society of America Journal* **43**:1140–1144.
- Fischer, S. G., and L. S. Lerman. 1983. DNA fragments differing by single base-pair substitutions are separated in denaturing gradient gels—correspondence with melting theory. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Biological Sciences* **80**: 1579-1583.
- Francis, C. A., J. M. Beman, and M. M. M. Kuypers. 2007. New processes and players in the nitrogen cycle: the microbial ecology of anaerobic and archaeal ammonia oxidation. *Isme J.* **1**: 19-27.
- Fromin, N. and others 2002. Statistical analysis of denaturing gel electrophoresis (DGE) fingerprinting patterns. *Environmental Microbiology* **4**: 634-643.
- Galloway, J. N., W. H. Schlesinger, H. Levy, A. Michaels, and J. L. Schnoor. 1995. Nitrogen-fixation - Anthropogenic enhancement- Environmental response. *Global Biogeochemical Cycles* **9**: 235-252.
- Galloway, J. N., and E. B. Cowling. 2002. Reactive nitrogen and the world: 200 years of change, p. 64-71. *Royal Swedish Acad Sciences*.
- Galloway, J. and others 2003. The nitrogen cascade. *Bioscience* **53**: 341-356.
- Galloway, J., Dentener Fj Capone Dg Boyer Ew Howarth Rw Seitzinger Sp Asner Gp Cleveland Cc Green Pa Holland Ea Karl Dm Michaels Af Porter Jh Townsend Ar Voosmarty Cj. 2004. Nitrogen Cycles: Past, Present, and Future. *Biogeochemistry* **70**: 153-226.
- Gilbert, D., B. Sundby, C. Gobeil, A. Mucci, and G. H. Tremblay. 2005. A seventy-two-year record of diminishing deep-water oxygen in the St. Lawrence estuary: The northwest Atlantic connection. *Limnology and Oceanography* **50**: 1654--1666.
- Gray, J. S., R. S. S. Wu, and Y. Y. Or. 2002. Effects of hypoxia and organic enrichment on the coastal marine environment. *Marine Ecology - Progress Series* **238**: 249-279.
- Hartnett, H. E., and S. P. Seitzinger. 2003. High-resolution nitrogen gas profiles in sediment porewaters using a new membrane probe for membrane-inlet mass spectrometry. *Marine Chemistry* **83**: 23-30.
- Hornek, R. and others 2006. Primers containing universal bases reduce multiple amoA gene specific DGGE band patterns when analysing the diversity of beta-ammonia oxidizers in the environment. *Journal of Microbiological Methods* **66**: 147-155.

- Hovig, E., B. Smithsorensen, A. Brogger, and A. L. Borresen. 1991. Constant Denaturant Gel-Electrophoresis, A Modification Of Denaturing Gradient Gel-Electrophoresis, In Mutation Detection. *Mutation Research* **262**: 63-71.
- Hulth, S., R. C. Aller, and F. Gilbert. 1999. Coupled anoxic nitrification/manganese reduction in marine sediments. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **63**: 49--66.
- Jenkins, M. C., and W. M. Kemp. 1984. The coupling of nitrification and denitrification in two estuarine sediments. *Limnology and Oceanography* **29**: 609-619.
- Jensen, K., N. P. Sloth, N. Risgaardpetersen, S. Rysgaard, and N. P. Revsbech. 1994. Estimation of nitrification and denitrification from microprofiles of oxygen and nitrate in model sediment systems. *Applied and Environmental Microbiology* **60**: 2094--2100.
- Jensen, K. M., M. H. Jensen, and E. Kristensen. 1996. Nitrification and denitrification in Wadden Sea sediments (Konigshafen, Island of Sylt, Germany) as measured by nitrogen isotope pairing and isotope dilution. *Aquat. Microb. Ecol.* **11**: 181-191.
- Kana, T. M., C. Darkangelo, M. D. Hunt, J. B. Oldham, G. E. Bennett, and J. C. Cornwell. 1994. Membrane inlet mass-spectrometer for rapid high-precision determination of N-2, O-2, and Ar in environmental water samples. *Anal. Chem.* **66**: 4166-4170.
- Kana, T. M., M. B. Sullivan, J. C. Cornwell, and K. M. Groszkowski. 1998. Denitrification in estuarine sediments determined by membrane inlet mass spectrometry. *Limnology and Oceanography* **43**: 334-339.
- Katsev, S., G. Chaillou, B. Sundby, and A. Mucci. 2007. Effects of progressive oxygen depletion on sediment diagenesis and fluxes: A model for the lower St. Lawrence River Estuary. *Limnology and Oceanography* **52**: 2555-2568.
- Kemp, W. M., P. Sampou, J. Caffrey, and M. Mayer. 1990. Ammonium recycling versus denitrification in Chesapeake Bay sediments. *Limnology and Oceanography* **35**: 1545-1563.
- Kloos, K., A. Mergel, C. Rosch, and H. Bothe. 2001. Denitrification within the genus *Azospirillum* and other associative bacteria. *Australian Journal of Plant Physiology* **28**: 991-998.
- Knowles, R. 1982. Denitrification. *Microbiological Reviews* **46**: 43-70.
- Kuypers, M. M. M. and others 2005. Massive nitrogen loss from the Benguela upwelling system through anaerobic ammonium oxidation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**: 6478-6483.
- Laursen, A., and S. Seitzinger. 2002. The role of denitrification in nitrogen removal and carbon mineralization in Mid-Atlantic Bight sediments. *Continental Shelf Research* **22**: 1397-1416.
- Luther, G. W., B. Sundby, B. L. Lewis, P. J. Brendel, and N. Silverberg. 1997. Interactions of manganese with the nitrogen cycle: Alternative pathways to dinitrogen. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **61**: 4043--4052.
- Martin, W., M. Bender, M. Leinen, and J. Orchardo. 1991. Benthic organic-carbon degradation and biogenic silica dissolution in the central equatorial pacific. *Deep-sea research part A-Oceanographic Research Papers* **38**: 1481-1516.

- Mackenzie, F. T., L. M. Vera, and A. Lerman. 2002. Century-scale nitrogen and phosphorus controls of the carbon cycle. *Chem. Geol.* **190**: 13-32.
- Matson, P., K. A. Lohse, and S. J. Hall. 2002. The globalization of nitrogen deposition: Consequences for terrestrial ecosystems, p. 113-119. Royal Swedish Acad Sciences.
- Mccarthy, M. J., K. S. Mcneal, J. W. Morse, and W. S. Gardner. 2008. Bottom-water hypoxia effects on sediment-water interface nitrogen transformations in a seasonally hypoxic, shallow bay (Corpus christi bay, TX, USA). *Estuaries Coasts* **31**: 521-531.
- Middelburg, J. J., K. Soetaert, P. M. J. Herman, and C. H. R. Heip. 1996. Denitrification in marine sediments: A model study. *Global Biogeochemical Cycles* **10**: 661-673.
- Muyzer, G., E. C. Dewaal, and A. G. Uitterlinden. 1993. Profiling Of Complex Microbial-Populations By Denaturing Gradient Gel-Electrophoresis Analysis Of Polymerase Chain Reaction-Amplified Genes-Coding For 16S Ribosomal-RNA. *Applied and Environmental Microbiology* **59**: 695-700.
- Nakatsu, C. H. 2007. Soil microbial community analysis using denaturing gradient gel electrophoresis. *Soil Science Society of America Journal* **71**: 562-571.
- Nicolaisen, M. H., and N. B. Ramsing. 2002. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) approaches to study the diversity of ammonia-oxidizing bacteria. *Journal of Microbiological Methods* **50**: 189-203.
- Nixon, S. W. and others 1996. The fate of nitrogen and phosphorus at the land sea margin of the North Atlantic Ocean, p. 141-180. Kluwer Academic Publ.
- Oviatt, C. A., P. H. Doering, B. L. Nowicki, and A. Zoppini. 1993. Net system production in coastal waters as a function of eutrophication, seasonality and benthic macrofaunal abundance. *Estuaries* **16**: 247-254.
- Patrick, W. H., and K. R. Reddy. 1976. Nitrification-denitrification in flooded soils and water bottoms: Dependence on oxygen supply and ammonium diffusion. *Environ. Qual.* **5**: 469-472.
- Postma, D., C. Boesen, H. Kristiansen, and F. Larsen. 1991. Nitrate reduction in an unconfined sandy aquifer - water chemistry, reduction processes, and geochemical modeling. *Water Resources Research* **27**: 2027-2045.
- Rabalais, N. N. 2002. Nitrogen in aquatic ecosystems, p. 102-112. Royal Swedish Acad Sciences.
- Risgaard-Petersen, N. and others 2004. Anaerobic ammonium oxidation in an estuarine sediment. *Aquat. Microb. Ecol.* **36**: 293-304.
- Robertson, L. A., T. Dalsgaard, N. P. Revsbech, and J. G. Kuenen. 1995. Confirmation of aerobic denitrification in batch cultures, using gas-chromatography and N-15 mass-spectrometry. *FEMS Microbiology Ecology* **18**: 113-119.
- Rysgaard, S., N. Risgaardpetersen, N. P. Sloth, K. Jensen, and L. P. Nielsen. 1994. Oxygen regulation of nitrification and denitrification in sediments. *Limnology and Oceanography* **39**: 1643--1652.
- Rysgaard, S., P. Thastum, T. Dalsgaard, P. B. Christensen, and N. P. Sloth. 1999. Effects of salinity on NH₄⁺ adsorption capacity, nitrification, and denitrification in Danish estuarine sediments. *ESTUARIES* **22**: 21-30.
- Satokari, R. M., E. E. Vaughan, A. D. L. Akkermans, M. Saarela, and W. M. De Vos. 2001. Bifidobacterial diversity in human feces detected by genus-

- specific PCR and denaturing gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology* **67**: 504-513.
- Saunders, D. L., and J. Kalff. 2001. Nitrogen retention in wetlands, lakes and rivers. *Hydrobiologia* **443**: 205-212.
- Schmid, M. C. and others 2007. Anaerobic ammonium-oxidizing bacteria in marine environments: widespread occurrence but low diversity. *Environmental Microbiology* **9**: 1476-1484.
- Schulz, H. D. 2000. Quantification of early diagenesis: Dissolved constituents in marine pore water. *Marine Geochemistry*, Berlin, Springer: 85-128.
- Seitzinger, S. and others 2006. Denitrification across landscapes and waterscapes: A synthesis. *Ecological Applications* **16**: 2064-2090.
- Seitzinger, S., L. Nielsen, J. Caffrey, and P. Christensen. 1993. Denitrification measurements in aquatic sediments - A comparison of 3 methods. *Biogeochemistry* **23**: 147-167.
- Seitzinger, S. P. 1988. Denitrification in Freshwater and Coastal Marine Ecosystems: Ecological and Geochemical Significance. *Limnology and Oceanography* **33**: 702-724.
- Seitzinger, S. P., and A. E. Giblin. 1996. Estimating denitrification in North Atlantic continental shelf sediments. *Biogeochemistry* **35**: 235--260.
- Silverberg, N. and others 2000. Remineralization of organic carbon in eastern Canadian continental margin sediments. *Deep-Sea Res. Part II-Top. Stud. Oceanogr.* **47**: 699-731.
- Smith, C. J., D. B. Nedwell, L. F. Dong, and A. M. Osborn. 2007. Diversity and abundance of nitrate reductase genes (*narG* and *napA*), nitrite reductase genes (*nirS* and *nrfA*), and their transcripts in estuarine sediments. *Applied and Environmental Microbiology* **73**: 3612-3622.
- Sloth, N. P., H. Blackburn, L. S. Hansen, N. Risgaardpetersen, and B. A. Lomstein. 1995. Nitrogen cycling in sediments with different organic loading. *Marine Ecology - Progress Series* **116**: 163--170.
- Stephen J R, A. E. M., Z Smith, J I Prosser, and T M Embley. 1996 Molecular diversity of soil and marine 16S rRNA gene sequences related to beta-subgroup ammonia-oxidizing bacteria. *Appl Environ Microbiol.* **62**: 4147-4154.
- Strickland, J. D. H., and T. R. Parsons. 1972. A practical handbook of seawater analysis. *Bulletin Fisheries Research Board of Canada* **167**: 207-211.
- Thamdrup, B., and T. Dalsgaard. 2002. Production of N₂ through anaerobic ammonium oxidation coupled to nitrate reduction in marine sediments. *Applied and Environmental Microbiology* **68**: 1312-1318.
- Thibodeau, B., A. De Vernal, and A. Mucci. 2006. Recent eutrophication and consequent hypoxia in the bottom waters of the Lower St. Lawrence Estuary: Micropaleontological and geochemical evidence. *Marine Geology* **231**: 37--50.
- Throback, I. N., K. Enwall, A. Jarvis, and S. Hallin. 2004. Reassessing PCR primers targeting *nirS*, *nirK* and *nosZ* genes for community surveys of denitrifying bacteria with DGGE. *FEMS Microbiology Ecology* **49**: 401-417.
- Vanderborgh, J. P., and G. Billen. 1975. Vertical distribution of nitrate concentration in interstitial water of marine sediments with nitrification and denitrification. *Limnology and Oceanography* **20**: 953-961.

- Vitousek, P. M., J. R. Gosz, C. C. Grier, J. M. Melillo, and W. A. Reiners. 1982. A Comparative-Analysis Of Potential Nitrification And Nitrate Mobility In Forest Ecosystems. *Ecological Monographs* **52**: 155-177.
- Vitousek, P., and R. Howarth. 1991. Nitrogen limitation on land and in the sea - How can it occur. *Biogeochemistry* **13**: 87-115.
- Vitousek, P. M. and others 1997. Human alteration of the global nitrogen cycle: Sources and consequences. *Ecological Applications* **7**: 737-750.
- Vitousek, P. and others 2002a. Towards an ecological understanding of biological nitrogen fixation. *Biogeochemistry* **57**: 1-45.
- Vitousek, P. M., S. Hattenschwiler, L. Olander, and S. Allison. 2002b. Nitrogen and nature, p. 97-101. Royal Swedish Acad Sciences.
- Wallenstein, M. D., S. McNulty, I. J. Fernandez, J. Boggs, and W. H. Schlesinger. 2006. Nitrogen fertilization decreases forest soil fungal and bacterial biomass in three long-term experiments. *For. Ecol. Manage.* **222**: 459-468.
- Wang, F. H., S. K. Juniper, S. P. Pelegri, and S. A. Macko. 2003. Denitrification in sediments of the Laurentian Trough, St. Lawrence Estuary, Quebec, Canada. *Estuarine Coastal and Shelf Science* **57**: 515-522.
- Ward, B. 2000. Nitrification and the marine nitrogen cycle. Kirchmann, D.L. (Ed.) *Microbial ecology of the oceans*. Wiley Series in Ecological and Applied Microbiology.: 427-453.
- Weiss, R. F. 1970. The solubility of nitrogen, oxygen and argon in water and seawater. *Deep-Sea Research* **17**: 721-735.
- Yang, C. H., and D. E. Crowley. 2000. Rhizosphere microbial community structure in relation to root location and plant iron nutritional status. *Applied and Environmental Microbiology* **66**: 345-351.
- Yasuda, M., and M. P. Shiaris. 2005. Differentiation of bacterial strains by thermal gradient gel electrophoresis using non-GC-Clamped PCR primers for the 16S-23S rDNA intergenic spacer region. *FEMS Microbiology Letters* **243**: 235-242.
- Zumft, W. G. 1997. Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **61**: 533-616.