



FACULTÉ
DES SCIENCES

UNIVERSITÉ LIBRE DE BRUXELLES

Les communautés bactériennes de rivières: étude de la dynamique des espèces au sein d'une communauté modèle

Thèse présentée par Lise GOETGHEBUER

en vue de l'obtention du grade académique de docteur en Sciences
agronomiques et ingénierie biologique
Année académique 2018-2019

Sous la direction de la Professeure Isabelle GEORGE,
promotrice
et du Professeur Pierre SERVAIS,
co-promoteur
Laboratoire d'Ecologie des Systèmes Aquatiques



LES COMMUNAUTÉS BACTÉRIENNES DE RIVIÈRES: ÉTUDE DE LA DYNAMIQUE DES ESPÈCES AU SEIN D'UNE COMMUNAUTÉ MODÈLE

Thèse présentée par Lise GOETGHEBUER

Jury de thèse :

Thierry BOUVIER (Université de Montpellier)

Sigrid FLAHAUT (Université libre de Bruxelles, Présidente du jury)

Isabelle GEORGE (Université libre de Bruxelles, Promotrice)

David GILLAN (Université de Mons)

Maric LLIROS (Université autonome de Barcelone)

Pierre SERVAIS (Université libre de Bruxelles, Co-promoteur et Secrétaire du jury)

Remerciements

Après 4 ans passés à l'ESA, j'en ai des personnes à remercier !

A commencer évidemment par mes promoteurs, Isabelle George et Pierre Servais, qui m'ont soutenue, conseillée, et motivée tout au long du projet. Merci pour votre confiance, pour les nombreuses discussions constructives, pour les corrections (parfois tard dans la nuit ou le week-end), et surtout d'y avoir toujours cru même dans les moments où il m'arrivait de douter.

Isabelle, merci aussi pour les chouettes moments passés à Maastricht et à Montréal. Du mémoire à la thèse, ces 5 années de travail avec toi ont été très enrichissantes. Merci pour le temps passé à m'expliquer des concepts écologiques dont la complexité me faisait pâlir, de ta disponibilité à toute épreuve et de ton enthousiasme. Peu importe le jour de la semaine ou le temps qu'il faisait dehors! Pierre, merci pour ton écoute, ton soutien, ta disponibilité (et pour les bons plans lors de notre voyage à Montréal).

Merci aux membres de mon comité d'accompagnement, David Gillan et Olivier Hardy pour les remarques et propositions judicieuses lors de nos réunions annuelles.

Ensuite, Je voudrais remercier toute l'équipe du laboratoire ESA, pour leur bonne humeur, pour la qualité de leur accueil, pour les chouettes pauses de midi, pour les sorties et les « Tea-time » à l'anglaise. On a bien rigolé ! Je voudrais remercier particulièrement Adri qui a été un véritable pilier pour moi au laboratoire, autant sur le point humain que scientifique. Nos fous rires ont été innombrables, du Colruyt à la chambre froide. Merci Adri !

Merci aux copines (le quatuor se reconnaîtra) pour m'avoir soutenue et changé les idées.

Et puis merci à ma famille. Merci à Gilles pour son intérêt et les corrections tard après son travail. Merci à Ghislaine pour ses attentions et ses appels encourageants dans le courant d'une fin de thèse (parfois douloureuse). Merci à Greta de m'avoir soutenue quoiqu'il arrive et à Mazarine qui, du haut de ses deux mois, savait m'apaiser d'un seul regard.

Enfin, merci à Théo de m'avoir supportée tout au long de ce travail, surtout durant cette rédaction stressante doublée d'une campagne politique. Je n'ai pas toujours été des plus tendres. Merci pour ton aide et ta patience !

Résumé

L'eau douce des rivières est indispensable à la vie sur terre, elle constitue un habitat pour la faune et la flore ainsi qu'une ressource majeure d'eau potabilisable pour l'être humain. A travers le monde, les eaux de rivières sont le milieu récepteur de nombreux déchets qui dégradent leur qualité. En particulier, les rivières traversant les villes réceptionnent les eaux usées domestiques et industrielles, introduisant de grandes quantités de matière organique et de nutriment dans l'écosystème. Ces perturbations anthropiques augmentent avec la démographie urbaine. Dans ce contexte de détérioration grandissante des rivières urbaines, les communautés microbiennes jouent un rôle clé. En effet, elles minéralisent la matière organique et les nutriments introduits en masse dans le milieu, réalisant ainsi une auto-épuration des eaux de rivières. La compréhension du fonctionnement de ces communautés est dès lors un atout précieux à la préservation de ces écosystèmes que constituent les rivières.

En raison de la grande complexité des interactions se déroulant au sein des communautés bactériennes naturelles, nous avons décidé de travailler avec une communauté 'modèle' constituée de souches 'typiques' isolées en rivière.

Dans la première partie du travail de thèse, la performance de la communauté modèle et de ses souches la composant a été analysée face à plus de 190 sources de carbone différentes à l'aide de microplaques Biolog Phenotype Microarray. Nos résultats suggéraient fortement des interactions se déroulant entre les espèces formant notre communauté modèle. En effet, cette dernière présentait des propriétés métaboliques qui n'étaient présentes chez aucune des souches individuelles la composant. Par la suite, la performance catabolique de la communauté modèle fut comparée avec celle de la communauté naturelle à la station d'échantillonnage (Lembeek, Belgique). La communauté modèle présentait un comportement relativement similaire à la communauté naturelle, ce qui nous assure d'une bonne représentativité à l'égard de la consommation de sources de carbone.

Ensuite, afin d'appréhender la dynamique de la communauté au cours du temps, nous avons étudié son évolution dans deux milieux caractérisés par des concentrations en carbone très différentes. Sur une période de 27 jours, un suivi de la diversité bactérienne a été réalisé. Les résultats de cette étude ont révélés des successions bactériennes différentes dans les deux milieux au sein desquelles la croissance de certaines souches semblait être améliorée en communauté en comparaison aux monocultures, suggérant l'existence d'un consortium de souche interdépendante dans la communauté.

Ce travail de thèse a permis une meilleure compréhension de la dynamique et du fonctionnement des communautés bactériennes de rivières, grâce à une approche de laboratoire simplifiée par des conditions contrôlées, en s'affranchissant des variations des paramètres physico-chimiques à l'exception de la quantité et de la qualité des sources de carbone.

Abstract

Freshwaters are essential for life on earth by representing a habitat for the fauna and the flora as well as a major resource for drinking water production. All over the world, river waters are frequently used as receiving body for waste disturbing the water quality. In particular, rivers flowing through cities often receive treated and untreated urban wastewaters, bring high loads of organic matter and inorganic resources within the ecosystem. Those perturbations are predicted to increase with urban demography. In a context of diminishing resources and increasingly difficult access to clean resources, aquatic microbial communities play a fundamental role in water, though the biogeochemical cycling of organic matter and nutrients and thus in the self-purification i.e. the recovery and maintenance of ecosystem health and balance. In these conditions, understanding the dynamic of microbial communities in freshwaters under anthropogenic pressure is a prerequisite in order to maintain the quality of this essential resource.

Because of the huge complexity of the interactions occurring within bacterial communities, we decided to work with a model community composed of 20 'typical' freshwater bacterial species mainly isolated from the Zenne River (Belgium). In the first part of our work, the carbon source utilization profiles of each individual strain and of the mixed community were measured in Biolog Phenotype MicroArrays PM1 and PM2A microplates that allowed testing 190 different carbon sources. Our results strongly suggest interactions occurring between our planktonic strains as our synthetic community showed metabolic properties that were not displayed by its single components. The catabolic performances of the synthetic community and a natural community from the same sampling site were further compared. The synthetic community behaved like the natural one and was therefore representative of the latter in regard to carbon source consumption.

Then, the dynamic of the community was followed in two media characterized by strong differences in carbon concentration (R2 broth and autoclaved river water). Over a period of 27 days, a follow-up of the bacterial community composition was performed in batch experiments. The results of this experiment revealed divergent bacterial successions in both media. Some of the strains displayed enhanced growth in the community compared to monocultures suggesting the existence of cooperative interactions within the community.

This work has attempted to provide a better understanding of the dynamic of river bacterial communities, through a simplified experimental approach in controlled conditions without any physicochemical parameters variations with the exception of carbon quality and quantity.

Table des matières

Remerciements	1
Résumé	2
Abstract	3
Table des figures	6
Table des tables	9
Liste des acronymes	10
CHAPITRE 1	11
1. Introduction Générale.....	12
1.1. L'écosystème rivière.....	12
1.2. La diversité microbienne de rivière	14
<i>Census of the river microbiome: a review</i>	16
References	28
1.3. L'écosystème de la rivière Senne	33
1.4. Ecophysiologie de quelques taxons bactériens typiques des eaux douces	37
1.5. Les interactions interspécifiques	39
1.5.1. Types d'interactions	39
1.5.2. Approches et limitations à l'étude des interactions microbiennes	43
1.6. Objectifs et plan de thèse.....	48
CHAPITRE 2	51
2. Construction de la communauté modèle	52
CHAPITRE 3	59
3. Les profils d'utilisation de carbone de bactéries de rivières soumises à des sources uniques de carbone suggèrent des interactions métaboliques	60
Résumé.....	61
<i>Carbon utilization profiles of river bacterial strains facing sole carbon sources suggest metabolic interactions</i>	62
Introduction	62
Material and methods	63
Results and discussion.....	66
Supplementary data	71
Funding.....	73
References	73

3.1. Production de substances antagonistes par les bactéries de la communauté	75
CHAPITRE 4.....	78
4. La dynamique d'une communauté bactérienne modèle de rivière dans deux milieux différents révèle des successions divergentes et une croissance améliorée pour la plupart des souches en comparaison aux monocultures	79
Résumé	81
<i>Dynamic of a river model bacterial community in two different media reveals divergent succession and enhanced growth of most strains compared to monocultures.....</i>	82
Introduction	82
Methods	84
Results	86
Discussion	95
Acknowledgments	97
Supplementary data	98
References	101
CHAPITRE 5.....	105
5. Discussion générale et perspectives	106
5.1. Mise au point et caractérisation des souches composant la communauté modèle. .	106
5.2. Caractérisation de la communauté modèle	107
5.3. Etude temporelle de la communauté modèle.....	110
5.4. Les difficultés et biais expérimentaux	113
Références	117

Table des figures

Figure 1-1 Relative abundance (%) of the 7 most dominant bacterial phyla and subclasses of Proteobacteria based on published data of 28 papers. The number of studies included for each phylum is detailed in parenthesis. Red triangles represent the mean values obtained by Zeglin (2015) (this value was not taken into account in the boxplot). The box represents the first and the third quartile, separated by the median.	21
Figure 1-2 Comparison of the relative proportion (% , medians for rivers, oceans and soils; means for lakes) of dominant bacterial phyla in rivers, lakes, oceans and soils ecosystems. Some phyla were not represented in all ecosystems.	23
Figure 1-3 Relative abundance (%) of shared genera among at least two of the five studies. Genera are sorted by abundance and color intensity is proportional to relative abundance. The uncolored boxes do not necessarily represent a zero value as each of the five studies presented data with a different threshold.....	25
Figure 1-4 Carte de la partie aval de la Senne. La région Bruxelles Capitale est représentée en gris. Les points de déversement des eaux traitées des stations d'épuration (WWTP) de Bruxelles-Sud et Bruxelles-Nord sont représentés par les flèches blanches et les confluences avec le Zuunbeek et la Woluwe par les flèches noires (D'après García-Armisen et al. 2014).	34
Figure 1-5 Genres dominants (dont l'abondance relative moyenne annuelle représentait plus de 0,5% de celle de l'ensemble des genres) à la station Z1 (Lembeek) en 2010 et 2016.....	36
Figure 1-6 Types d'interactions de compétition (A), de coopération par échanges métaboliques (B) et par production de biens communs (C, exemple d'une enzyme de dégradation de substrat). D'après Cavaliere et al. (2017), avec modifications.	40
Figure 1-7 Evolution du taux de croissance (h^{-1}) des souches A et B en fonction de la concentration en substrat (g/L). Les zones grises claires et foncées représentent l'intervalle de concentration pour lequel la souche B (zone claire)/A (zone foncée) remporte la compétition.	41
Figure 1-8 A) Exemple de réseau de co-occurrence. Les taxons, correspondant à des lettres, sont représentés par des nœuds, les interactions présumées par des arêtes les reliant en noir dans le cas de relation positive et rouge dans le cas de relation négative. D'après Berry and Widder (2014). B) Distribution des connexions entre les nœuds des réseaux invariants d'échelle en comparaison avec une distribution aléatoire.	44

Figure 1-9 Schéma reprenant le plan de thèse suivi afin de répondre aux objectifs du travail et les principaux résultats.	50
Figure 2-1 Nombre de colonies apparues au cours du temps sur les milieux gélosés R2A et Z pour la dilution décimale 10^{-3} avec l'écart type sur la moyenne sur les trois réplicats.	54
Figure 2-2 Proportion et répartition des phyla (et sous classes de Proteobacteria) et des genres représentés au sein des souches cultivables isolées à partir de l'échantillon collecté à Lembeek (Senne) en novembre 2014.	56
Figure 3-1 Phylogenetic tree of the 20 strains' 16S rRNA gene sequence. The evolutionary tree was inferred in MEGA7 by the maximum-likelihood method based on the Kimura 2-parameter model. Bootstrap values are shown on internal nodes (500 bootstraps).	65
Figure 3-2 Comparison of the final OD600nm of pure strains, the initially even community mix and the natural community in R2B medium (n = 3). An asterisk indicates that the performances of the pure strains and the initially even community are significantly different (P < 0.05).	67
Figure 3-3 Number of C sources catabolized by each strain in Biolog plates.	67
Figure 3-4 Comparison of the intensity of carbon catabolism (CD measured in PM microplate) by the mixed community (20 strains) with (a) the best-performing strain for each of the 190 C sources tested and (b) the natural community performance.	70
Supp 3-1 Carbon utilization profiles of the 20 pure strains, the even mixed community and the natural community. The intensity of the blue color represents the CD after 48 hours (partie 1)	71
Figure 3-5 Description du test d'antagonisme en double couche gélosée.	75
Figure 3-6 Exemple de relation antagoniste entre la souche productrice (colonie au centre) et la souche indicatrice (versée par-dessus la colonie après avoir tué cette dernière). Le diamètre d'inhibition est indiqué.	76
Figure 3-7 Représentation schématique établie à l'aide du logiciel Cytoscape des 111 résultats positifs des tests d'antagonisme. La largeur des nœuds est proportionnelle au nombre de souches affectées par les composés antimicrobiens produits par la souche du nœud. La largeur et la couleur des traits sont proportionnelles à l'intensité (le rapport) de l'inhibition.	77
Figure 4-0 Photo illustrant la mise en place du suivi temporel de la communauté dans deux milieux différents (Z à gauche, R2B à droite), ainsi que de la seringue traversant le bouchon et le tube permettant d'échantillonner la communauté.	80
Figure 4-1 Logarithm of the bacterial abundances (cells/mL) of the community in 4 biological replicates during a 27-day incubation period (20°C) in R2 (left, replicates a,b,c,d,) and Z (right,	

replicates e,f,g,h) medium measured by flow cytometry. Values are the mean of triplicates and error bars represent standard deviation. 89

Figure 4-2 Non-metric multidimensional scaling plot of the compositional dissimilarities between replicates over time (Bray-Curtis dissimilarities) in R2 (A) and Z (B) media. Taxa's absolute abundance are plotted as correlation with the samples. The overlaid contours are based on results from group-average cluster analysis (similarity threshold set at 80). 90

Figure 4-3 Relative abundances of the 20 bacterial strains forming the community at the different sampling times in R2 medium (a) and Z medium (b). For each time points, there are 4 replicates (a,b,c,d in R2 and e,f,g,h in Z). Colors refers to strain's numbers indicated in Table 4.1. 92

Figure 4-4 Growth rate of strains showing transient or progressive growth in the community (h^{-1}) on Fig.4-3 as a function of their growth rate measured in monoculture (h^{-1}) in R2 medium (open circles) and Z medium (full circles). The diagonal represent an identical growth rate in community and monoculture. The data point representing 218R in Z medium is missing because its growth rate in monoculture was not measured (see Table 4.1). 93

Figure 4-5 Temporal development of Pielou's evenness in R2 and Z media. An index was calculated for each replicate, the value on the graph corresponds to the mean of it. 94

Figure 4-6 Mean of the community composition's dissimilarity across replicates for each time point (Bray-Curtis dissimilarity) for R2 (pink) and Z (blue) media. 94

Supp 4-0 Summary of reads analysis with Mothur and rarefaction curves. 98

Supp 4-1 Bacterial abundances (cells/mL) of the community in 4 biological replicates during a 27-day incubation period (20°C) in R2 (upper, replicates a,b,c,d,) and Z (low, replicates e,f,g,h) medium measured by flow cytometry. Values are the mean of triplicates and error bars represent standard deviation. 99

Supp 4-2 Absolute abundances (cells/mL) of the 20 bacterial strains forming the community at the different sampling times in R2 medium (A) and Z medium (B). For each time points, there are 4 replicates (a,b,c,d in R2 and e,f,g,h in Z). Colors refers to strain's numbers indicated in Table 4.1. 100

Table des tables

<i>Table 1.1</i> Synthesis of the publications selected for the diversity census. NM= Not mentioned	19
<i>Table 1.2</i> Factors driving the bacterial community composition in rivers	27
<i>Table 2.1</i> Caractéristiques physico-chimiques de l'eau échantillonnée en novembre 2014	53
<i>Table 2.2</i> Table des souches composant la communauté modèle	58
<i>Table 4.1</i> Identification of the strains composing the synthetic community, their individual growth rates in R2 and Z media and their growth rate ratio (μ_Z/μ_{R2}). The growth rates of the 20-strain community are given in the last line of the table. ND=not determined	88

Liste des acronymes

En anglais:

BA: Bacterial abundance

BCC: Bacterial community composition

C: Carbon

CD: Color development

COD: Chemical oxygen demand

DOC: Dissolved organic carbon

HTS: High-throughput sequencing

OD: Optical density

POC: Particulate organic carbon

SPM: Suspended particulate matter

En français:

COD : Carbone organique dissous

MES : Matière particulaire en suspension

UFC : Unité formant colonie

CHAPITRE 1

INTRODUCTION GÉNÉRALE

1. Introduction Générale

Cette introduction définit l'importance et la place de l'écosystème rivière dans notre société. Nous analyserons ensuite la diversité de ses microorganismes ainsi que les facteurs influençant leur répartition. Enfin, nous nous intéresserons aux interactions interspécifiques qui peuvent se dérouler au sein de ces communautés bactériennes et aux différentes approches qui permettent de les étudier.

1.1. L'écosystème rivière

Les eaux douces ne représentent que 2,5% du volume total d'eau présente sur terre (l'hydrosphère) et les eaux des rivières ne constituent que 0,006% de cette fraction (Shiklomanov 2003). Malgré le très faible volume d'eau qu'elles représentent à l'échelle planétaire, les rivières sont indispensables à l'humanité à de nombreux égards. De fait, elles fournissent un grand nombre de services écosystémiques (Sarukhan *et al.* 2005). Elles constituent une source d'eau pour l'irrigation des cultures, une voie pour le transport fluvial, un moyen de production d'électricité, un lieu de baignade et d'activités récréatives, ainsi que le milieu récepteur des eaux de ruissellement et des eaux usées domestiques ou industrielles. Enfin, elles sont une source d'eau potable et de nourriture pour les humains, comme pour la faune et la flore avoisinant.

Les rivières sont des systèmes ouverts, donc très vulnérables à la dégradation du point de vue environnemental et sanitaire. De nombreuses sources de pollution liées à l'affectation des sols telle que l'agriculture intensive et l'urbanisation ainsi qu'à certaines activités industrielles détériorent la qualité des eaux des milieux lotiques et compromettent l'ensemble des services préalablement mentionnés (Vörösmarty *et al.* 2010). Des études menées sur la contamination des eaux et des sédiments de rivières en zones urbaines ont révélé la présence à haute concentration de métaux lourds et d'hydrocarbures ainsi que l'émergence de micropolluants, pour la plupart d'origine anthropique. Tous ces polluants altèrent la survie des macroorganismes et l'utilisation des eaux de surface pour la potabilisation (Gasperi *et al.* 2009; Schwarzenbach *et al.* 2010). Par ailleurs, les ruissellements agricoles et les rejets d'eaux usées domestiques (traitées ou non traitées) enrichissent les eaux de rivière en matière organique et nutriments pouvant engendrer un phénomène d'eutrophisation et des conditions anoxiques

dévastatrices pour les organismes aérobies du milieu. Enfin, l'eau des rivières contaminées par des matières fécales animales et humaines peut être vectrice d'agents infectieux (bactéries, virus, protozoaires parasites) responsables de maladies dites d'origine hydrique, qui ont entraîné de vastes épidémies dévastatrices marquant l'histoire telles que le choléra (*Vibrio cholerae*) et la dysenterie (*Shigella dysenteriae*). Actuellement, dans de nombreux pays pauvres, les stations d'épuration restent rares et les rejets d'eaux usées non traitées dans les rivières introduisent des organismes pathogènes disséminant des maladies responsables de milliers de décès chaque année (Schwarzenbach *et al.* 2010). Etant donné l'importance des rivières et malgré leur faible contingence au sein de l'hydrosphère, une gestion écologique et durable de ce milieu est essentielle pour des raisons à la fois sanitaires et économiques.

Auparavant considérées comme des tunnels passifs conduisant les masses d'eau du milieu continental vers les océans, les rivières sont désormais reconnues comme un milieu de production, de transformation et de recyclage des éléments en raison de l'activité des producteurs primaires et des consommateurs à divers niveaux. Elles constituent un lien important de transfert de carbone entre les écosystèmes terrestres, atmosphériques et océaniques (Raymond *et al.* 2013). En 2013, une étude estimait que les rivières relarguaient jusqu'à 5 fois plus de CO₂ dans l'atmosphère que l'ensemble des lacs et autres réservoirs d'eau dans le monde (Raymond *et al.* 2013).

Ainsi, des têtes de bassin à l'embouchure dans le milieu marin, les rivières forment un gradient continu de conditions physico-chimiques, qui implique, chez les populations du milieu, une série d'ajustements conduisant à un continuum biotique. En 1980, le « River Continuum Concept » fut la première théorie développée dans le but d'expliquer l'influence des conditions physico-chimiques sur la répartition d'organismes au sein d'une rivière. Ce concept considère la répartition longitudinale des populations de macro-invertébrés benthiques. Il postule que les changements longitudinaux de ces communautés sont une adaptation aux changements des types de substrats de l'amont vers l'aval : les communautés en aval étant adaptées aux substrats transformés ou non consommés par les communautés de l'amont. En effet, on observe une succession de macro-invertébrés benthiques dont les modes de nutrition reflètent le changement de qualité de la matière organique: une majorité d'individus broyeurs fragmentent la matière organique grossière en amont; et des individus collecteurs récoltent la matière organique en aval (Vannote *et al.* 1980). Développé pour les rivières proustines, ce concept n'est néanmoins pas valable pour la plupart des rivières du globe qui sont sous pression anthropique

(déversements, ruissellements, construction de barrages,...) où les perturbations complexifient les processus de répartition longitudinale de la diversité biologique.

La répartition longitudinale d'une communauté dépend de deux mécanismes majeurs : les processus régionaux (la dispersion, qui s'opèrent à une échelle plus large que l'habitat considéré) et les processus locaux (la sélection par l'habitat) (Lindström and Langenheder 2012; Niño-García, Ruiz-González and Giorgio 2016). La dispersion désigne le transport des espèces dans l'écosystème, première étape d'une éventuelle colonisation. Les moyens de dispersion au sein de l'écosystème rivière sont nombreux et varient selon la population et l'échelle considérée. On distingue la dispersion par les airs (via aérosols et particules), par des vecteurs vivants, par contact et surtout par apport de masses d'eau (de l'amont vers l'aval, affluents, rejets de stations d'épuration, ruissellement...) (Lindström and Langenheder 2012). Les processus locaux représentent la sélection des espèces par l'habitat, résultant de leurs préférences physico-chimiques et des interactions entre elles (Hanson *et al.* 2012; Székely, Berga and Langenheder 2013). En conséquence, l'assemblage et les changements au sein des communautés le long du continuum rivière peuvent résulter de variations des facteurs locaux, ce qui correspond à la théorie des niches ; ou de facteurs régionaux (importance de la dispersion), c'est la théorie du modèle neutre de biodiversité. Pour de nombreuses communautés, la coexistence de ces deux processus complexifie l'interprétation des données locales et l'étude de leur répartition au sein de l'écosystème rivière. C'est particulièrement le cas des organismes planctoniques tels que les microorganismes (comme les bactéries), ce qui explique probablement que leur répartition soit si peu étudiée en comparaison aux autres organismes de rivières.

1.2. La diversité microbienne de rivière

Les études sur la diversité microbienne dans les milieux d'eau douce ont jusqu'à présent principalement porté sur les lacs, mais aujourd'hui la diversité microbienne des rivières fait l'objet d'études de plus en plus nombreuses. Elle a d'abord été étudiée par des techniques de microbiologie classique basées sur la mise en culture. Seulement, l'intérêt de cette approche est limité en raison de la faible proportion de bactéries de l'environnement qui peuvent être cultivées (Staley *et al.* 2013). Par la suite, diverses méthodes moléculaires ont pu être utilisées pour ces études (Zeglin 2015). Depuis une dizaine d'années, le recourt de plus en plus systématique aux méthodes de séquençage haut débit a considérablement changé la résolution

des données comparativement à celles obtenues à l'aide des précédentes méthodes moléculaires. De ce fait, le nombre de publications réalisées sur le plancton bactérien des milieux lotiques augmente considérablement. C'est pourquoi il nous est apparu nécessaire de faire un état de l'art sous forme de note synthétique reprenant les principales données et progrès en la matière. Le chapitre suivant a été rédigé en anglais car il fera l'objet d'une soumission sous forme de 'minireview'.

Census of the river microbiome: a review

Goetghebuer Lise, Servais Pierre, George Isabelle

In the 17th century, the invention of the microscope confirmed the suspected existence of microscopic cells too small to be seen with the naked eye, now known as bacteria. Since then, discoveries in the microbiology field have multiplied and nowadays it seems clear that one way or another, microorganisms affect every life form on earth. For long, the emphasis on autoecology, i.e. study of microbes in pure culture, has focused on their behavior in simple environments and as pure cultures, i.e. isolated from other community members. Although this approach enabled to greatly improve our understanding in cellular processes and was for several decades the only way to access microbial genomes, the observations made through pure culture studies do not allow to draw theories that can be easily extrapolated to natural environments and their complexity. The synecology, i.e. study of natural communities in their environment, requires more adapted methods.

The global microbial diversity on earth is enormous and is estimated at 10^{12} species (Locey and Lennon 2016). Microbial communities inhabiting some habitats can be extremely dense. For example, there are more than 1×10^{16} prokaryotes in a ton of soil (Curtis and Sloan 2005), and 3.8×10^{13} bacterial cells in a human body of 70kg (Sender, Fuchs and Milo

2016). Both of those habitats are inhabited by several thousand of species (Roesch *et al.* 2007; Claesson *et al.* 2009). Such diversity and density define the potential complexity of microbial communities which constitute a major brake to their study, despite their ecological importance.

Bacterial communities play a fundamental role in ecosystems as they are among primary drivers (with archaea) of biogeochemical cycles: they are responsible for the degradation and mineralization of organic matter but also for specific activities like in nitrification/denitrification, sulfate reduction and methane production processes (Bryant 1979; Fauque 1995; Amon and Benner 1996; Hagopian and Riley 1998). Therefore, they are essential for the functioning of all ecosystems on earth as they have an important impact on the biogeochemical budget and participate actively in the biodegradation of organic and inorganic pollutants. In a context of diminishing resources and increasingly difficult access to clean resources, aquatic microbial communities play a fundamental role in water self-purification. In rivers, this natural self-purification of running waters depends on the structure and the dynamic of the microbial communities. The makeup of those communities, called Bacterial Community Composition (BCC), is likely to change under all the disturbances the river is exposed to (surface water runoff, wastewater

discharges...). In these conditions, the characterization of microbial communities in freshwaters is therefore a prerequisite to maintain the river water quality and services as it is expected to be a scarce resource in the future.

Before the availability of molecular tools, bacterial diversity was studied by microscopy and cultivation on specific solid media through the observation and description of colonies. Microbiologists rapidly realized that only a very small fraction (1% or less) of the bacteria counted by microscopy could be cultivated in plating conditions, a phenomena referred as “The Great plate count anomaly” (Staley and Konopka 1985). Over the last decade, huge technological advances led to the development of techniques and platforms for the molecular analysis of biodiversity, allowing to characterize the bacterial and archaeal kingdom. Compared to other microbiomes (oceans, soils, human-associated...) that are/were the focus of ambitious international programs, freshwaters communities remain largely uncharacterized. As an illustration, over 423 publicly available studies on the Earth Microbiome Project’s website (<http://www.earthmicrobiome.org/>), only 4 of them were conducted on river waters (by searching the database using “river water” in their title and/or abstract on the Qiita platform).

To date, little attention has been paid to river bacterial diversity and therefore our current understanding of freshwater bacterioplankton diversity comes almost entirely from studies conducted on lakes (Zinger, Gobet and

Pommier 2012), maybe because they represent a larger part of the freshwater volume on earth (0.26% for lakes and 0.006% for rivers) (Shiklomanov and Rodda 2003). Nevertheless, a good indication of the most abundant taxa within various rivers was brought to light by early studies by means of fingerprinting techniques (PCR-DGGE, PCR-TGGE, T-RFLP), fluorescent in situ hybridization (FISH) and/or clone libraries methods (Crump, Armbrust and Baross 1999; Dumestre *et al.* 2001; Kenzaka *et al.* 2001). Despite the limitations of such methods, a core of “typical” freshwater bacteria has been demonstrated (Zwart *et al.* 2002; Newton *et al.* 2011). Since 2005, thanks to high-throughput sequencing (HTS) methods such as 454 pyrosequencing and then Illumina sequencing, other investigators have been able to accurately measure the diversity of microbial communities in rivers to an unprecedented degree of precision (see references in Table 1.1).

In this mini-review, we intend to i) shed light on the riverine bacterioplankton diversity based on available and published data using HTS, ii) compare the results with those obtained with former molecular methods and in other natural microbiomes and iii) establish what are the main physico-chemical drivers of the BCC over the river course.

We screened the literature to collect as many papers on stream microbial diversity as possible, and retained publications dealing with **free-living bacteria**, using **HTS methods** and presenting at least the **relative abundance of the major phyla (or classes)**. With this

approach, 28 published studies could be retrieved, with publication year ranging from 2011 to 2018. They were conducted on rivers from four different continents (Africa, America, Europe, Asia). For each of them, we harvested the relative abundances of phyla representing more than 0.5% of the community composition, as well as the abundance of the subclasses of the phylum *Proteobacteria* (the most abundant phylum in freshwater) when it was available¹. Table 1.1 displays information on the rivers' name and location, the sequencing method, the sampling station(s), season and year and the taxonomic information included in the selected papers. For the studies which performed a longitudinal analysis of the microbial diversity, when it was possible, we did not take into account the sampling stations downstream a wastewater treatment plant discharge nor other untreated discharges. We also avoided samples including lakes or sediment diversity. The relative proportion of phyla and subclasses were, when available, collected from raw data tables included in the supplementary

information of some publications. Nonetheless, the information was most of the time only available in the form of stacked bar graphs. In those cases, the relative proportion were extracted through an image processing program "Image J" (Schneider, Rasband and Eliceiri 2012). The proportion of each phylum (or *Proteobacteria* subclasses) was then calculated by measuring its corresponding area in the graphs. For each study, we calculated the mean of all stations (for the longitudinal measures) or samples (for the temporal measures) in order to obtain only one value of abundance per phylum at the end. Twenty-one different phyla were measured, but they were not present in the results of each study. We are aware of the molecular biases occurring when comparing sequencing data resulting from different sequencing methods, primers and DNA extraction protocol (Fouhy *et al.* 2016). That is why we further focused on dominant phyla, defined as phyla representing a relative abundance greater than 0.5% in at least 50% of the screened publications.

¹ Relative abundances of phyla were obtained in 26 studies, *Proteobacteria* subclasses in 17 studies and genera in 5 studies.

Table 1-1 Synthesis of the publications selected for the diversity census. NM= Not mentioned

Authors	sequencing method	16S region	Software used	16S rRNA gene database	River	location	sampling year	sampling season	station taken into account	taxonomic information
(Abia <i>et al.</i> 2018)	Illumina	V3-V4	Mothur	Greengenes	Apies River	South Africa	2016	/	rural water (1 station)	Phyla and <i>Proteobacteria</i> subclasses
(Henson <i>et al.</i> 2018)	Illumina	V4	Mothur	Silva	Mississippi river	USA	2014	autumn	all stations (38 stations over 2914km and 70 days)	Phyla
(Hu <i>et al.</i> 2017)	Illumina	V4-V5	Qiime	Greengenes	Jiulong River	China	2012-2013	Spring and autumn	All stations	Genera only
(Liu <i>et al.</i> 2018)	Illumina	V4-V5	Qiime	Greengenes	Yangtze river	Japan	2014	spring and autumn	stations 1 to 24	Phyla
(Price <i>et al.</i> 2018)	Illumina	V4-V5	Dada2	Silva	Wissahickon Creek and one tributary (Sandy run)	Pennsylvania, USA	2016	spring	stations 1, 3, 5 and 6	Phyla
(Reza <i>et al.</i> 2018)	Illumina / Ion torrent PGM	V1-V3	PGM software	Silva	Tama river	Japan	2015-16	4 seasons	all samples (1 station during 12months)	Phyla, <i>Proteobacteria</i> subclasses and genera
(Wang <i>et al.</i> 2018)	Illumina	V4-V5	Qiime	NM	Jialing river	China	2016	summer	1W to 5BW (5 stations)	Phyla and <i>Proteobacteria</i> subclasses
(Doherty <i>et al.</i> 2017)	Pyrosequencing	V1-V2	Qiime / Mothur	Silva	Amazon river	Brazil	2010	spring and autumn	All Obidos stations (9 stations)	Phyla and <i>Proteobacteria</i> subclasses
(Gao <i>et al.</i> 2017)	Illumina	V4	Qiime	Greengenes	River near the Zhongshan scenic area	China	/	winter and summer	stations S1, S2, S3, S4	Phyla
(Hosen <i>et al.</i> 2017)	Illumina	V4	Qiime	Silva	Parkers Creek watershed	Maryland, USA	2012	4 seasons	Forested water sample (5 stations)	<i>Proteobacteria</i> subclasses
(Köchling <i>et al.</i> 2017)	Pyrosequencing	V6-V8	Qiime	RDP classifier	Jaboatão River	Brazil	2013	autumn	stations W1, W2 and W3	Phyla, <i>Proteobacteria</i> subclasses and genera
(Payne <i>et al.</i> 2017)	Illumina	V4	Mothur	Silva	Mississippi river	USA	2013	summer	all stations (13 stations over 1300km)	Phyla
(Kaevska <i>et al.</i> 2016)	Pyrosequencing	V2-V3	Qiime	RDP classifier	5 different rivers in the proximity of a city	Czech Republic	2013	4 seasons	all stations	Phyla
(Ma <i>et al.</i> 2016)	Pyrosequencing	V3-V4	Qiime	RDP classifier	Haihe river	China	2011-12	4 seasons	river samples (in the text)	Phyla and <i>Proteobacteria</i> subclasses
(Meziti <i>et al.</i> 2016)	Illumina	V1-V3	Mothur	Silva	Kalamas River	Greece	2012-13	spring, autumn and winter	all samples of kal 1 and kal 2 stations	<i>Proteobacteria</i> subclasses
(Niño-García, Ruiz-González and del Giorgio 2016)	Illumina	V3-V4	Qiime	RDP classifier	188 rivers across seven boreal regions	Québec, Canada	2009 to 2013	4 seasons	G3 to G7	Phyla and <i>Proteobacteria</i> subclasses

Authors	sequencing method	16S region	Software used	16S rRNA gene database	River	location	sampling year	sampling season	station taken into account	taxonomic information
(de Oliveira and Margis 2015)	Illumina	V4	Qiime	Greengenes	Sinos river	Brazil	2012	summer and winter	all stations	Phyla
(Savio <i>et al.</i> 2015)	Illumina	V3-V4	Qiime	Silva	Danube	East Europe	2007	summer	1 measure every 5 stations (2600km covered)	Phyla
(Fagervold <i>et al.</i> 2014)	Pyrosequencing	V1-V3	Qiime	RDP classifier	Rhône river	France	2010	winter, spring, summer	samples at 0cm depth	Phyla and <i>Proteobacteria</i> subclasses
(García-Armisen <i>et al.</i> 2014)	Pyrosequencing	V1-V3	Mothur	Silva	Zenne river	Belgium	2010	4 seasons	stations Z1, Z3, Z7, Z11 and Z12	Phyla, <i>Proteobacteria</i> subclasses and genera
(Jackson <i>et al.</i> 2014)	Ion Torrent PGM	V4	Mothur	Silva	6 Mississippi tributaries	USA	2012	summer	all stations	Phyla and <i>Proteobacteria</i> subclasses
(Kolmakova <i>et al.</i> 2014)	Illumina	V4	Qiime	Greengenes	Yenisei river	Russia	2011	summer	all stations (mainstream samples)	Phyla and genera
(Read <i>et al.</i> 2014)	Pyrosequencing	V1-V3	Qiime	Greengenes	Thames river	England	2011	summer	6 stations (Tm, Tw, TR, TH, Ts, Tso)	Phyla
(Bai <i>et al.</i> 2013)	Pyrosequencing	V1-V3	Qiime	Greengenes	Haihe river	China	2011	autumn	station 1	Phyla and <i>Proteobacteria</i> subclasses
(Schultz, Kovatch and Anneken 2013)	Pyrosequencing	V2-V3	RTL operating procedure	Blastn+	Ohio river	USA	2010	summer	all mainstream samples	Phyla
(Staley <i>et al.</i> 2013)	Illumina	V6-V8	Qiime	Silva	Upper Mississippi river	USA	2011	summer	all stations	Phyla
(Crump, Amaral-Zettler and Kling 2012)	Pyrosequencing	V6-V8	Mothur	Silva	Arctic stream	Alaska, USA	2008	summer	headwater samples	Phyla and <i>Proteobacteria</i> subclasses
(Portillo, Anderson and Fierer 2012)	Pyrosequencing	V4	Qiime	Greengenes	Boulder Creek	Colorado, USA	2008-09	4 seasons	all samples	Phyla and <i>Proteobacteria</i> subclasses
(Ghai <i>et al.</i> 2011)	Pyrosequencing	NM	NM	RDP classifier	Amazon river	Brazil	2008	summer	1 sample	Phyla and <i>Proteobacteria</i> subclasses

A review published in 2015 performed a similar research on stream bacterial diversity: the author Lydia Zeglin (Zeglin 2015), also harvested the repartition of phyla across several studies focusing on river bacterial diversity. Though, the majority of the publications she

selected were based on clone libraries and DGGE methods. We decided then to compare the repartition of the dominant phyla across our selected publications with their repartition in Zeglin (2015) (Figure 1.1).

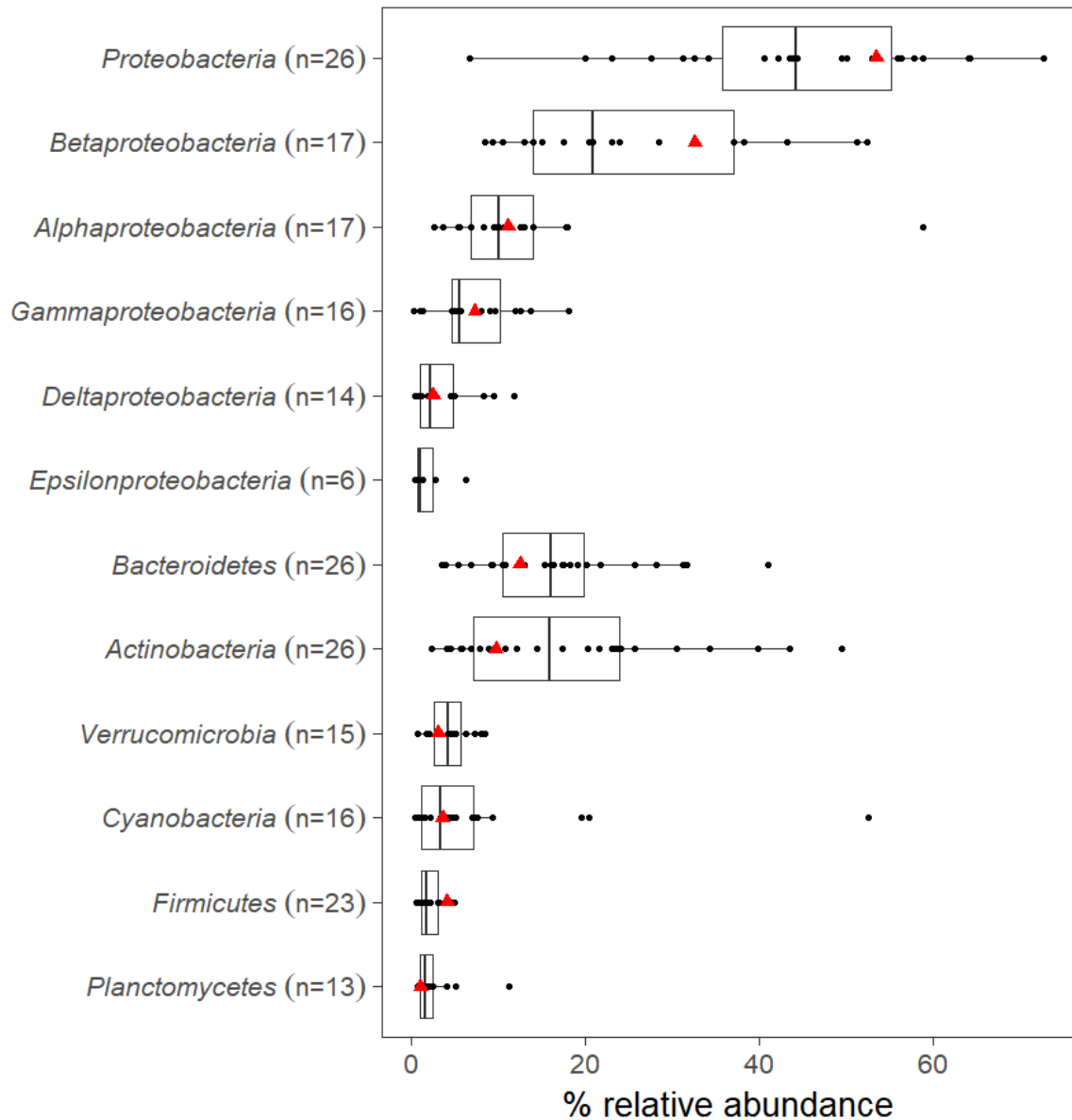


Figure 1-1 Relative abundance (%) of the 7 most dominant bacterial phyla and subclasses of Proteobacteria based on published data of 28 papers. The number of studies included for each phylum is detailed in parenthesis. Red triangles represent the mean values obtained by Zeglin (2015) (this value was not taken into account in the boxplot). The box represents the first and the third quartile, separated by the median.

The major phylum was unquestionably *Proteobacteria* with a median of 44.3%, followed by *Bacteroidetes* (16.1%), *Actinobacteria* (15.8%), *Verrucomicrobia* (4.2%), *Cyanobacteria* (3.3%), *Firmicutes* (1.8%) and *Planctomycetes* (1.5%). Among the *Proteobacteria* subclasses, the *Betaproteobacteria* showed the highest median (20.8%) followed by the *alpha*- (10.1%), *gamma*- (5.5%), *delta*- (2.2%) and *epsilon*- (1%) subclasses. The phylum *Proteobacteria* was the most abundant in 80.8% of the studies (21 over 26), while 15.4% (4 over 26) and 3.8% (1 over 26) were dominated by the phylum *Actinobacteria* and *Cyanobacteria* respectively.

As we compared our dominant phyla abundances with the ones in Zeglin (2015) (represented by red triangles in Figure 1.1), we could see that they are highly similar. Though, the estimation of the phylum *Proteobacteria* (53.5% in Zeglin) and its beta-subclass (32.6%) were greater in Zeglin (2015) whereas the ones of phyla *Actinobacteria* (9.7%) and *Bacteroidetes* (12.5%) were lower in this review. This may be related to the primers choice and the 16S rRNA region targeted, as some taxa are less efficiently detected than others (Apprill *et al.* 2015).

Contrary to older sequencing methods suffering from a lack of resolution, studies using HTS methods allow a greater level of detail, highlighting the importance of rare taxa as well as candidates phyla (Zinger, Gobet and Pommier 2012). The sum of the 7 median in Figure 1.1 equals to 87%. Indeed, some phyla appeared in fewer studies and with lower

abundances than the dominant ones. They included *Chloroflexi*, *Acidobacteria*, *Gemmatimonadetes*, *Chlorobi*, *Fusobacteria*, *Thermotogae*, *Armatimonadetes*, *Spirochaetes*, *Chlamydiae*, *Elusimicrobia* as well as candidate phyla including OD1, TM7 and OP3. Finally, the number of species in rivers were estimated to several thousand based on the OTU_{0.03} found in different studies (García-Armisen *et al.* 2014; Read *et al.* 2014; Savio *et al.* 2015; Payne *et al.* 2017).

We further compared the relative proportion (medians) of the dominant phyla in river ecosystems with their repartition in other ecosystems, based on reviews conducted on microbial diversity in lakes (Newton *et al.* 2011), soils (Fierer 2017) and seawater (Sunagawa *et al.* 2015) (Figure 1.2). Rivers and lakes diversity displayed high similarities in the proportion of most of the phyla, though lakes contained less *Proteobacteria* (associated with a smaller proportion of each subclass) than rivers, and more *Cyanobacteria* and *Actinobacteria*. The greater *Cyanobacteria* proportion in lakes is likely due to the fact that some species of this phylum better grow in stagnant waters (Huisman *et al.* 2018). A previous comparison of lotic and lentic freshwater bacterioplankton also reported strong similarities at the phylum level but observed differences at higher taxonomic resolution, reporting a greater diversity at the family level in lotic systems (Tessler *et al.* 2017). On the other hand, bacterioplankton diversity in rivers differed greatly from the one in soils and in seawater. Ocean bacterioplankton

displayed a strong dominance of *Alphaproteobacteria* as well as a larger proportion of *Cyanobacteria* than rivers.

Finally, soils microbial diversity was highly dominated by *Acidobacteria*.

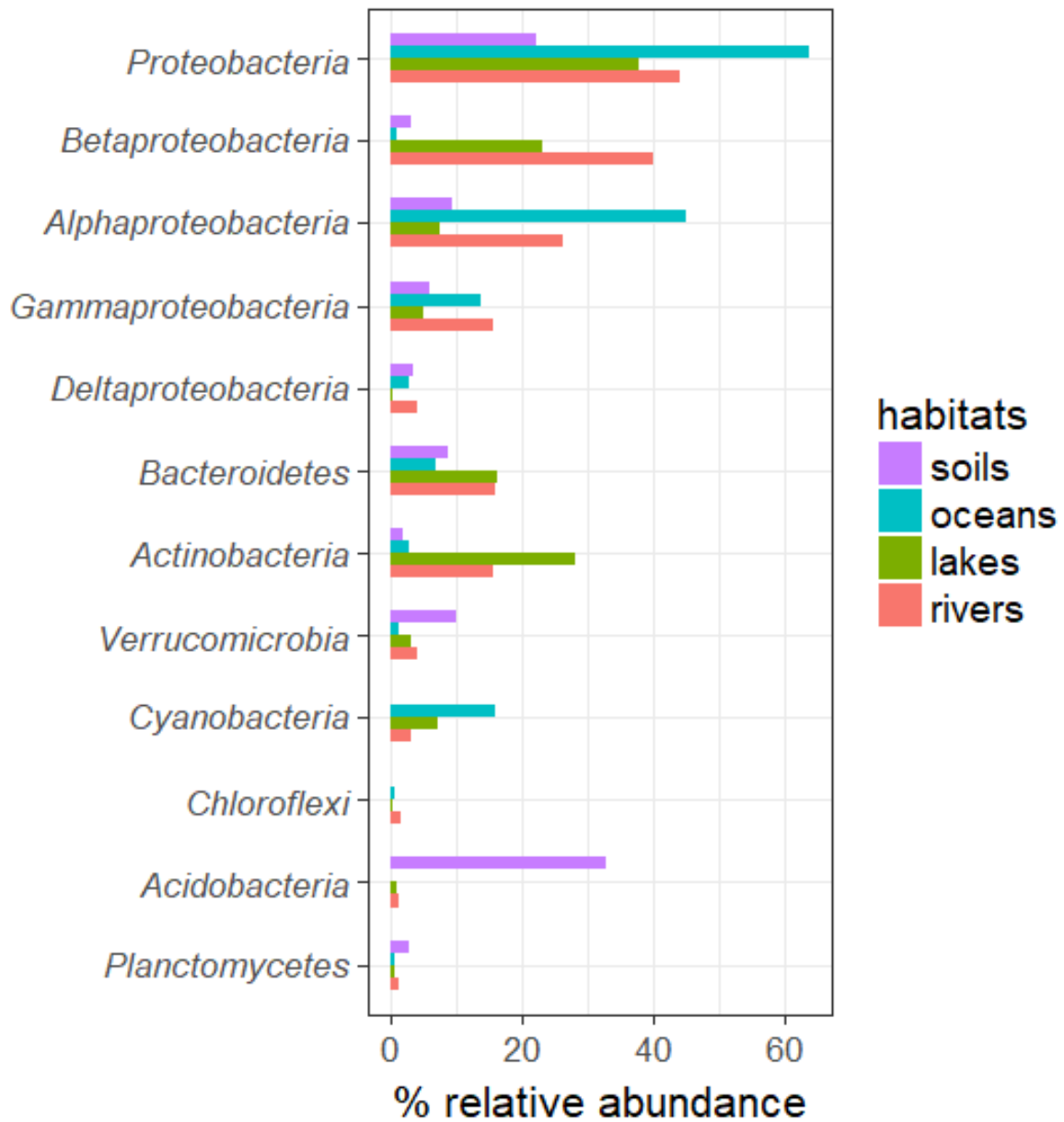


Figure 1-2 Comparison of the relative proportion (% , medians for rivers, oceans and soils; means for lakes) of dominant bacterial phyla in rivers, lakes, oceans and soils ecosystems. Some phyla were not represented in all ecosystems.

Five studies reported usable genera abundance in their results (see Table 1.1). We searched for genera commonly detected in at least two studies and displaying relative abundance greater than 0.25% in one them. With this approach, we obtained 36 genera (Figure 1.3).

One can rapidly notice that no genus were ubiquitous to all five studies. Though, the uncolored boxes do not necessarily represent a zero value as each of the five studies presented data with a different threshold². Five genera were reported in four of the five studies: *Flavobacterium* (*Bacteroidetes*), *Polynucleobacter* (*Betaproteobacteria*), *Zoogloea* (*Betaproteobacteria*), *Acinetobacter* (*Gammaproteobacteria*) and *Rhodobacter* (*Alphaproteobacteria*). In addition, the genus *Limnohabitans* was detected in only three studies but with high abundances. More studies reporting genus-level taxonomy are needed to determine ubiquitous genera, still those above-mentioned genera are likely to be detected in other rivers.

All in all, our results demonstrate that most riverine microbial assemblages are dominated by seven phyla (Figure 1.1). In particular, studies examining the BCC along rivers reported changes in relative abundance of those phyla, rather than presence/absence of them, and many of them detected ubiquitous taxa along longitudinal samples, suggesting the presence of a “core bacterial community” in those rivers (Bai *et al.* 2013; Staley *et al.* 2013;

de Oliveira and Margis 2015; Savio *et al.* 2015; Kaevska *et al.* 2016). Nevertheless, variations of taxa abundance (sometimes through strong shifts) are observed from headwaters to downstream areas as well as between watersheds. Indeed, rivers distinguish themselves from most other environments through their longitudinal dimension and directional connectivity, and the biogeography of microbes along their course is driven by both stochastic effects (such as dispersal) and deterministic factors (environmental filtering). Some of the longitudinal studies measured shifts supporting the River Continuum Concept, which reported a decreased riparian influence along the river course. They observed a progressive domination of ‘typical’ freshwater bacteria, which are small, non-motile, slow growing substrate specialists (Savio *et al.* 2015; Niño-García, Ruiz-González and del Giorgio 2016). The latter belong to acI clade (*Actinobacteria*), LD12 and LD28 clades (*Proteobacteria*), *Polynucleobacter* spp. (*Proteobacteria*) and *Limnohabitans* sp. (*Proteobacteria*), among others (Hahn *et al.* 2012; Garcia *et al.* 2013; Livermore *et al.* 2014; Pernthaler 2017). The authors hypothesized that local deterministic processes were progressively surpassing regional forces (dispersal) as BCC structuring mechanisms, thanks to increased water residence time and lower influence of terrestrial, riverbed and tributary sources.

² There was no threshold for García-Armisen *et al.* (2014) and Kolmakova *et al.* (2014). Hu *et al.* (2017) displayed genera of interest independently of their

abundance. Köchling *et al.* (2017) displayed the 40 most abundant genera and Reza *et al.* (2018) the genera with an abundance greater than 1%.

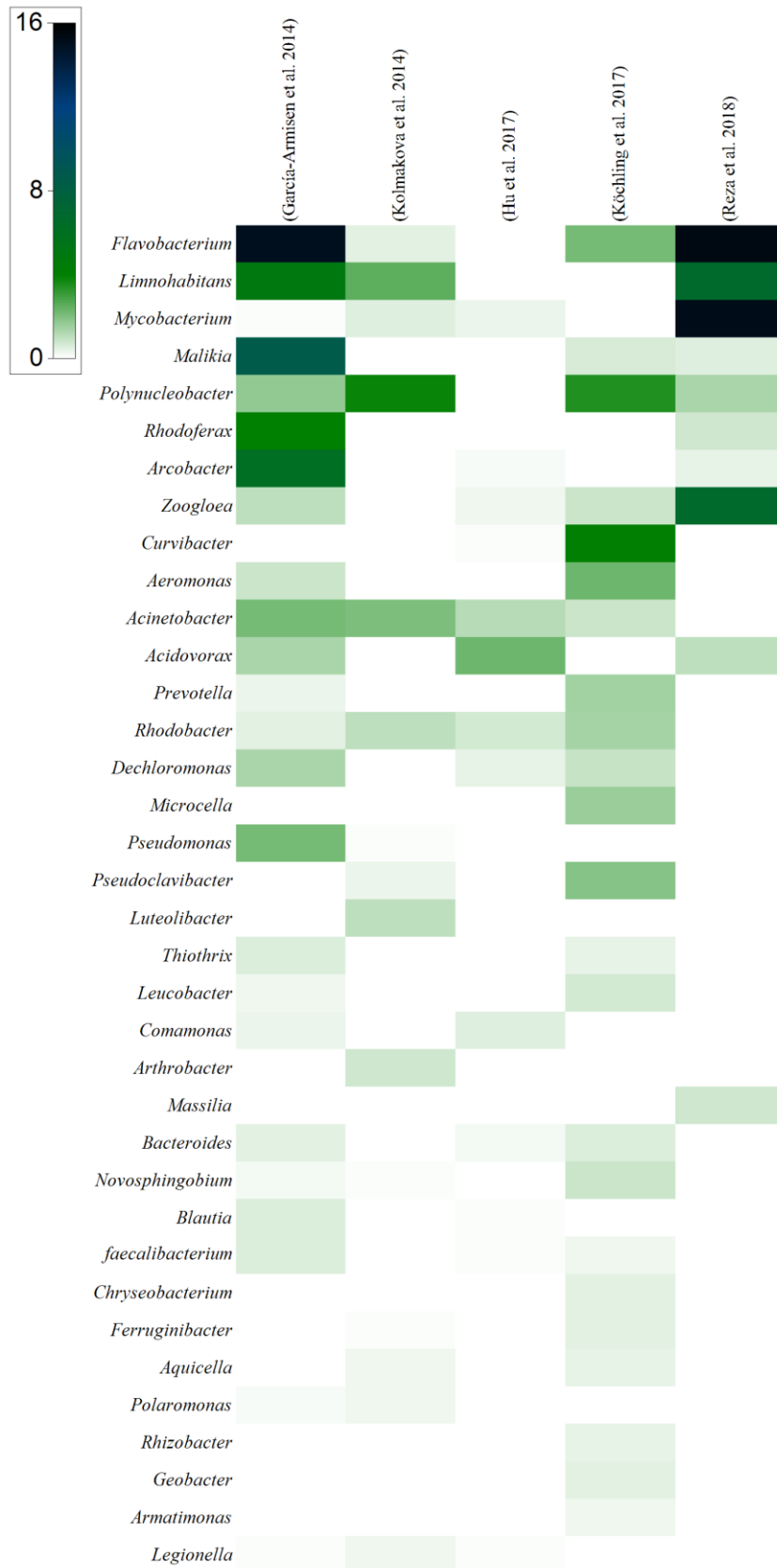


Figure 1-3 Relative abundance (%) of shared genera among at least two of the five studies. Genera are sorted by abundance and color intensity is proportional to relative abundance. The uncolored boxes do not necessarily represent a zero value as each of the five studies presented data with a different threshold.

Many studies have focused on the local abiotic factors responsible for the spatio-temporal variations of BCC over the river course. Aside from salinity, which is the main cause of BCC differences between fresh and saline water, BCC changes could be associated with fluctuations of parameters such as pH, temperature, organic matter quantity and quality and nutrients concentration. The effect of biotic factors on BCC was reported as well, such as phytoplanktonic composition (Šimek *et al.* 2011), grazing rate by protozoa (Salcher *et al.* 2016) or lysis by viruses (Weinbauer and Höfle 1998).

Again, we collected papers mentioning BCC driving abiotic factors. They were all using HTS methods except two of them which used PCR-DGGE (Jordaan and Bezuidenhout 2013) and clone library (Xia *et al.* 2014). Because of the different geographical environments, sampling strategies and measured parameters, studies on the factors driving the BCC of river waters have produced different results (Table 1.2). The most frequently reported factors explaining the BCC were nutrient concentration (including both nitrogen and phosphorus forms), organic matter and pH. In many studies, a strong correlation was observed between such factors and the abundance of specific taxa. For example, the phylum *Cyanobacteria* was significantly correlated to pH in the Mississippi river (USA) (Staley *et al.* 2013) and the genus *Acinetobacter* (*Gammaproteobacteria*) to the particulate organic carbon in the Zenne/Senne river (Belgium) (García-Armisen *et al.* 2014). Though, in most cases, such correlations were

very weak and could explain only a minor part of the BCC variability. One plausible explanation is the underestimation of bacterial immigration, i.e. dispersal processes. A recent concept referred as the “community coalescence” postulates that additionally to biotic and abiotic factors, inputs of allochthonous communities all over the river network are likely affecting bacterial assemblages (Rillig *et al.* 2015). This paradigm is unique to free-living microorganisms as the mixing of communities rarely happens to larger organisms. For example, in headwaters, microbial coalescence may occur via riparian runoff bringing soil-, and litter-associated microorganisms that enter the lotic system, which could explain the presence of terrestrial taxa and the great BCC variability in headwaters of some rivers (Ruiz-González, Niño-García and del Giorgio 2015; Savio *et al.* 2015). Downstream, community coalescence can occur via natural events with the lateral mixing of surface water with soil water along the riverbanks, vertical mixing with hyporheic water, or point mixing at river convergences, but also because of artificial events such as dam release and wastewater discharges (Mansour *et al.* 2018). For example, abrupt changes of the OTU diversity in the Mississippi River occurred following major tributary confluences (Payne *et al.* 2017). In conclusion, application of the microbial coalescence concept may help to understand the bacterioplankton biogeography in rivers.

Table 1-2 Factors driving the bacterial community composition in rivers

Driving Factors	Variables included	References
Nutrient concentrations	Nitrogen: any form of inorganic nitrogen (NO_3^- , NO_2^- , NH_4^+) and Total nitrogen (n=11)	(Portillo, Anderson and Fierer 2012; Fortunato <i>et al.</i> 2013; Jordaan and Bezuidenhout 2013; García-Armisen <i>et al.</i> 2014; Hu <i>et al.</i> 2014; Jackson <i>et al.</i> 2014; Read <i>et al.</i> 2014; Savio <i>et al.</i> 2015; Kaevska <i>et al.</i> 2016; Gao <i>et al.</i> 2017; Henson <i>et al.</i> 2018)
	Phosphorus: inorganic phosphorus (PO_4^{3-}) and Total phosphorus (n=7)	(Jordaan and Bezuidenhout 2013; Hu <i>et al.</i> 2014; Jackson <i>et al.</i> 2014; Kaevska <i>et al.</i> 2016; Gao <i>et al.</i> 2017; Henson <i>et al.</i> 2018; Wang <i>et al.</i> 2018)
	Sulfur: any form of inorganic sulfur (SO_3 , SO_4^{2-}) (n=4)	(Vishnivetskaya <i>et al.</i> 2011; Jordaan and Bezuidenhout 2013; Read <i>et al.</i> 2014; Kaevska <i>et al.</i> 2016)
Organic matter	Organic matter quantity (dissolved and particulate) and quality (lability) (n=10)	(Portillo, Anderson and Fierer 2012; Fortunato <i>et al.</i> 2013; Fagervold <i>et al.</i> 2014; García-Armisen <i>et al.</i> 2014; Jackson <i>et al.</i> 2014; Xia <i>et al.</i> 2014; Ruiz-González <i>et al.</i> 2015; Kaevska <i>et al.</i> 2016; Gao <i>et al.</i> 2017; Payne <i>et al.</i> 2017)
Temperature	Water temperature (n=5)	(Jordaan and Bezuidenhout 2013; Staley <i>et al.</i> 2013; García-Armisen <i>et al.</i> 2014; Ma <i>et al.</i> 2016; Reza <i>et al.</i> 2018)
pH	Water pH (n=7)	(Jordaan and Bezuidenhout 2013; Staley <i>et al.</i> 2013; Xia <i>et al.</i> 2014; de Oliveira and Margis 2015; Savio <i>et al.</i> 2015; Niño-García, Ruiz-González and del Giorgio 2016; Gao <i>et al.</i> 2017)
Oxygen	Dissolved oxygen concentration (n=3)	(Fortunato <i>et al.</i> 2013; García-Armisen <i>et al.</i> 2014; Kaevska <i>et al.</i> 2016)
Land-use	Riparian and watershed land-use (n=3)	(Kolmakova <i>et al.</i> 2014; Hosen <i>et al.</i> 2017; Abia <i>et al.</i> 2018)
Allochthonous inputs	Wastewater treatment plant effluents urban discharges (n=6)	(Bai <i>et al.</i> 2013; García-Armisen <i>et al.</i> 2014; Ma <i>et al.</i> 2016; Meziti <i>et al.</i> 2016; Payne <i>et al.</i> 2017; Wang <i>et al.</i> 2018)
	Tributaries (n=3)	(Schultz, Kovatch and Anneken 2013; Kolmakova <i>et al.</i> 2014; Payne <i>et al.</i> 2017)
Rainfall	Telluric inputs by resuspension of sediments, dilution effect (n=3)	(Staley <i>et al.</i> 2013; Köchling <i>et al.</i> 2017; Price <i>et al.</i> 2018)
Turbidity	Suspended Particulate Matter (SPM) (n=3)	(García-Armisen <i>et al.</i> 2014; Jackson <i>et al.</i> 2014; Xia <i>et al.</i> 2014)
Metals	Metals (Zn, Fe, Hg) (n=2)	(Vishnivetskaya <i>et al.</i> 2011; Wang <i>et al.</i> 2018)
Residence time	Water residence time (n=2)	(Read <i>et al.</i> 2014; Savio <i>et al.</i> 2015)

This minireview has attempted to provide a picture of the diversity of microorganisms along with the parameters driving community composition in lotic systems. We have taken a generalized view of the river habitat, without considering the uniqueness of each hydrographical network (Strahler order and length of its streams, anthropic pressure, meteorological region...). Regarding the diversity, it is worth noting that all the literature published so far on river BCC has been based on DNA analysis (i.e. analysis of 16S rRNA genes), which does not allow to distinguish active cells from the dead and the dormant ones. Analysis of 16S rRNA, which reflects the metabolically active taxa, could reveal a pretty different picture of lotic bacterial diversity. In addition, molecular-based sequencing methods, including HTS, contain biases associated to DNA extraction, PCR amplifications and an irregular number of 16s rRNA genes per cells that may introduce discrepancies in measures of microbial diversity (Fouhy *et al.* 2016). Finally, some studies using metagenomics sequencing approaches that provide insight into community biodiversity and function have been run on river water (Ghai *et al.* 2011 ; Collins-Fairclough *et al.* 2018; Zhang *et al.* 2018) and constitute a promising path on BCC research.

Challenges remain in estimating BCC in a holistic way in lotic environments in order to properly understand responses to disturbances and thus phenomena as community resilience. Further research on lotic microbial diversity is essential to identify universal BCC drivers and to reinforce our ability to predict how readily

microbial communities will recover from stresses, for a long-term management of freshwater resources.

References

- Abia ALK, Alisoltani A, Keshri J *et al.* Metagenomic analysis of the bacterial communities and their functional profiles in water and sediments of the Apies River, South Africa, as a function of land use. *Sci Total Environ* 2018;**616–617**:326–34.
- Amon RMW, Benner R. Bacterial utilization of different size classes of dissolved organic matter. *Limnol Oceanogr* 1996;**41**:41–51.
- Apprill A, McNally S, Parsons R *et al.* Minor revision to V4 region SSU rRNA 806R gene primer greatly increases detection of SAR11 bacterioplankton. *Aquat Microb Ecol* 2015;**75**:129–37.
- Bai Y, Qi W, Liang J *et al.* Using high-throughput sequencing to assess the impacts of treated and untreated wastewater discharge on prokaryotic communities in an urban river. *Appl Microbiol Biotechnol* 2013;**98**:1841–51.
- Bryant MP. Microbial methane production: theoretical aspects. *J. Animal Sci.* 1979;**1**:193–201.
- Claesson MJ, O’Sullivan O, Wang Q *et al.* Comparative Analysis of Pyrosequencing and a Phylogenetic Microarray for Exploring Microbial Community Structures in the Human Distal Intestine. *PLOS ONE* 2009;**4**:e6669.
- Collins-Fairclough AM, Co R, Ellis MC *et al.* Widespread Antibiotic, Biocide, and Metal Resistance in Microbial Communities Inhabiting a Municipal Waste Environment and Anthropogenically Impacted River. *mSphere* 2018;**3**:e00346-18.

- Crump BC, Amaral-Zettler LA, Kling GW. Microbial diversity in arctic freshwaters is structured by inoculation of microbes from soils. *ISME J* 2012;**6**:1629–39.
- Crump BC, Armbrust EV, Baross JA. Phylogenetic analysis of particle-attached and free-living bacterial communities in the Columbia river, its estuary, and the adjacent coastal ocean. *Appl Environ Microbiol* 1999;**65**:3192–204.
- Curtis TP, Sloan WT. Microbiology. Exploring microbial diversity—a vast below. *Science* 2005;**309**:1331–3.
- Doherty M, Yager PL, Moran MA *et al.* Bacterial Biogeography across the Amazon River-Ocean Continuum. *Front Microbiol* 2017 ;**8** :882-899 DOI: 10.3389/fmicb.2017.00882.
- Dumestre J, Casamayor E, Massana R *et al.* Changes in bacterial and archaeal assemblages in an equatorial river induced by the water eutrophication of Petit Saut dam reservoir (French Guiana). *Aquat Microb Ecol* 2001;**26**:209–21.
- Fagervold SK, Bourgeois S, Pruski AM *et al.* River organic matter shapes microbial communities in the sediment of the Rhône prodelta. *ISME J* 2014;**8**:2327–38.
- Fauque GD. Ecology of Sulfate-Reducing Bacteria. In: Barton LL (ed.). *Sulfate-Reducing Bacteria*. Springer US, 1995, 217–41.
- Fierer N. Embracing the unknown: disentangling the complexities of the soil microbiome. *Nat Rev Microbiol* 2017;**15**:579–90.
- Fortunato CS, Eiler A, Herfort L *et al.* Determining indicator taxa across spatial and seasonal gradients in the Columbia River coastal margin. *ISME J* 2013;**7**:1899–911.
- Fouhy F, Clooney AG, Stanton C *et al.* 16S rRNA gene sequencing of mock microbial populations- impact of DNA extraction method, primer choice and sequencing platform. *BMC Microbiol* 2016;**16**:123-136.
- Gao Y, Wang C, Zhang W *et al.* Vertical and horizontal assemblage patterns of bacterial communities in a eutrophic river receiving domestic wastewater in southeast China. *Environ Pollut* 2017;**230**:469–78.
- Garcia SL, McMahon KD, Martinez-Garcia M *et al.* Metabolic potential of a single cell belonging to one of the most abundant lineages in freshwater bacterioplankton. *ISME J* 2013;**7**:137–47.
- García-Armisen T, Inceoğlu Ö, Ouattara NK *et al.* Seasonal Variations and Resilience of Bacterial Communities in a Sewage Polluted Urban River. *PLoS ONE* 2014;**9**:e92579.
- Ghai R, Rodriguez-Valera F, McMahon KD *et al.* Metagenomics of the Water Column in the Pristine Upper Course of the Amazon River. *PLoS ONE* 2011;**6**:e23785.
- Hagopian DS, Riley JG. A closer look at the bacteriology of nitrification. *Aquac Eng* 1998;**18**:223–44.
- Hahn MW, Scheuerl T, Jezberová J *et al.* The Passive Yet Successful Way of Planktonic Life: Genomic and Experimental Analysis of the Ecology of a Free-Living Polynucleobacter Population. *PLOS ONE* 2012;**7**:e32772.
- Henson MW, Hanssen J, Spooner G *et al.* Nutrient dynamics and stream order influence microbial community patterns along a 2914 kilometer transect of the Mississippi River. *Limnol Oceanogr* 2018;**0**:00–00, DOI: 10.1002/lno.10811.
- Hosen JD, Febria CM, Crump BC *et al.* Watershed Urbanization Linked to

- Differences in Stream Bacterial Community Composition. *Front Microbiol* 2017;**8**:1452-1469 DOI: 10.3389/fmicb.2017.01452.
- Hu A, Ju F, Hou L *et al.* Strong impact of anthropogenic contamination on the co-occurrence patterns of a riverine microbial community. *Environ Microbiol* 2017;**19**:4993-5009.
- Hu A, Yang X, Chen N *et al.* Response of bacterial communities to environmental changes in a mesoscale subtropical watershed, Southeast China. *Sci Total Environ* 2014;**472**:746-56.
- Huisman J, Codd GA, Paerl HW *et al.* Cyanobacterial blooms. *Nat Rev Microbiol* 2018;**16**:471:471-483.
- Jackson CR, Millar JJ, Payne JT *et al.* Free-Living and Particle-Associated Bacterioplankton in Large Rivers of the Mississippi River Basin Demonstrate Biogeographic Patterns. *Appl Environ Microbiol* 2014;**80**:7186-95.
- Jordaan K, Bezuidenhout CC. The impact of physico-chemical water quality parameters on bacterial diversity in the Vaal River, South Africa. *Water SA* 2013;**39**:385-96.
- Kaevska M, Videnska P, Sedlar K *et al.* Seasonal changes in microbial community composition in river water studied using 454-pyrosequencing. *SpringerPlus* 2016;**5**:409.
- Kenzaka T, Yamaguchi N, Prapagdee B *et al.* Bacterial Community Composition and Activity in Urban Rivers in Thailand and Malaysia. *J Health Sci* 2001;**47**:353-61.
- Köchling T, Sanz JL, Galdino L *et al.* Impact of pollution on the microbial diversity of a tropical river in an urbanized region of northeastern Brazil. *Int Microbiol Off J Span Soc Microbiol* 2017;**20**:11-24.
- Kolmakova OV, Gladyshev MI, Rozanov AS *et al.* Spatial biodiversity of bacteria along the largest Arctic river determined by next-generation sequencing. *FEMS Microbiol Ecol* 2014;**89**:442-50.
- Liu T, Zhang AN, Wang J *et al.* Integrated biogeography of planktonic and sedimentary bacterial communities in the Yangtze River. *Microbiome* 2018;**6**:16-30.
- Livermore JA, Emrich SJ, Tan J *et al.* Freshwater bacterial lifestyles inferred from comparative genomics. *Environ Microbiol* 2014;**16**:746-58.
- Locey KJ, Lennon JT. Scaling laws predict global microbial diversity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2016;**113**:5970-5.
- Ma L, Mao G, Liu J *et al.* Spatial-Temporal Changes of Bacterioplankton Community along an Exhorheic River. *Front Microbiol* 2016;**7**:250-262 DOI: 10.3389/fmicb.2016.00250.
- Mansour I, Heppell CM, Ryo M *et al.* Application of the microbial community coalescence concept to riverine networks. *Biol Rev* 2018;**0**:000-000. DOI: 10.1111/brv.12422.
- Meziti A, Tsementzi D, Kormas KA *et al.* Anthropogenic effects on bacterial diversity and function along a river-to-estuary gradient in Northwest Greece revealed by metagenomics. *Environ Microbiol* 2016;**18**:4640-52.
- Newton RJ, Jones SE, Eiler A *et al.* A Guide to the Natural History of Freshwater Lake Bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* 2011;**75**:14-49.
- Niño-García JP, Ruiz-González C, del Giorgio PA. Interactions between hydrology and water chemistry shape bacterioplankton biogeography across boreal freshwater networks. *ISME J* 2016;**10**:1755-66.
- de Oliveira LFV, Margis R. The Source of the River as a Nursery for Microbial Diversity. *PLoS ONE* 2015;**10**:e0120608.

- Payne JT, Millar JJ, Jackson CR *et al.* Patterns of variation in diversity of the Mississippi river microbiome over 1,300 kilometers. *PLOS ONE* 2017;**12**:e0174890.
- Pernthaler J. Competition and niche separation of pelagic bacteria in freshwater habitats. *Environ Microbiol* 2017;**19**:2133–50.
- Portillo MC, Anderson SP, Fierer N. Temporal variability in the diversity and composition of stream bacterioplankton communities. *Environ Microbiol* 2012;**14**:2417–28.
- Price RJ, Ledford SH, Ryan MO *et al.* Wastewater treatment plant effluent introduces recoverable shifts in microbial community composition in receiving streams. *Sci Total Environ* 2018;**613–614**:1104–16.
- Read DS, Gweon HS, Bowes MJ *et al.* Catchment-scale biogeography of riverine bacterioplankton. *ISME J* 2014, DOI: 10.1038/ismej.2014.166.
- Reza MS, Mizusawa N, Kumano A *et al.* Metagenomic analysis using 16S ribosomal RNA genes of a bacterial community in an urban stream, the Tama River, Tokyo. *Fish Sci* 2018;**84**:563–577.
- Rillig MC, Antonovics J, Caruso T *et al.* Interchange of entire communities: microbial community coalescence. *Trends Ecol Evol* 2015;**30**:470–6.
- Roesch LFW, Fulthorpe RR, Riva A *et al.* Pyrosequencing enumerates and contrasts soil microbial diversity. *ISME J* 2007;**1**:283–90.
- Ruiz-González C, Niño-García JP, del Giorgio PA. Terrestrial origin of bacterial communities in complex boreal freshwater networks. *Ecol Lett* 2015;**18**:1198–206.
- Salcher MM, Ewert C, Šimek K *et al.* Interspecific competition and protistan grazing affect the coexistence of freshwater betaproteobacterial strains. *FEMS Microbiol Ecol* 2016;**92**:156–165, DOI: 10.1093/femsec/fiv156.
- Savio D, Sinclair L, Ijaz UZ *et al.* Bacterial diversity along a 2 600 km river continuum. *bioRxiv* 2015:010041.
- Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of Image Analysis. *Nat Methods* 2012;**9**:671–5.
- Schultz GE, Kovatch JJ, Anneken EM. Bacterial diversity in a large, temperate, heavily modified river, as determined by pyrosequencing. *Aquat Microb Ecol* 2013;**70**:169–79.
- Sender R, Fuchs S, Milo R. Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. *PLoS Biol* 2016;**14**:1–14. DOI: 10.1371/journal.pbio.1002533.
- Shiklomanov, Rodda. World Water Resources at the Beginning of the Twenty-First Century. *Camb Univ Press* 2003.
- Šimek K, Kasalický V, Zapomělová E *et al.* Alga-Derived Substrates Select for Distinct Betaproteobacterial Lineages and Contribute to Niche Separation in Limnohabitans Strains. *Appl Env Microbiol* 2011;**77**:7307–15.
- Staley C, Unno T, Gould T j. *et al.* Application of Illumina next-generation sequencing to characterize the bacterial community of the Upper Mississippi River. *J Appl Microbiol* 2013;**115**:1147–58.
- Staley JT, Konopka and A. Measurement of in Situ Activities of Nonphotosynthetic Microorganisms in Aquatic and Terrestrial Habitats. *Annu Rev Microbiol* 1985;**39**:321–46.
- Sunagawa S, Coelho LP, Chaffron S *et al.* Structure and function of the global ocean microbiome. *Science* 2015;**348**:1261359.
- Tessler M, Brugler MR, DeSalle R *et al.* A Global eDNA Comparison of Freshwater Bacterioplankton

- Assemblages Focusing on Large-River Floodplain Lakes of Brazil. *Microb Ecol* 2017;**73**:61–74.
- Vishnivetskaya TA, Mosher JJ, Palumbo AV *et al.* Mercury and Other Heavy Metals Influence Bacterial Community Structure in Contaminated Tennessee Streams. *Appl Environ Microbiol* 2011;**77**:302–11.
- Wang L, Zhang J, Li H *et al.* Shift in the microbial community composition of surface water and sediment along an urban river. *Sci Total Environ* 2018;**627**:600–12.
- Weinbauer MG, Höfle MG. Distribution and Life Strategies of Two Bacterial Populations in a Eutrophic Lake. *Appl Env Microbiol* 1998;**64**:3776–83.
- Xia N, Xia X, Liu T *et al.* Characteristics of bacterial community in the water and surface sediment of the Yellow River, China, the largest turbid river in the world. *J Soils Sediments* 2014;**14**:1894–904.
- Zeglin LH. Stream microbial diversity in response to environmental changes: review and synthesis of existing research. *Aquat Microbiol* 2015;**6**:454-469.
- Zhang S-Y, Tsementzi D, Hatt JK *et al.* Intensive allochthonous inputs along the Ganges River and their effect on microbial community composition and dynamics. *Environ Microbiol* 2018;0:00–00.
- Zinger L, Gobet A, Pommier T. Two decades of describing the unseen majority of aquatic microbial diversity. *Mol Ecol* 2012;**21**:1878–1896.
- Zwart G, Crump BC, Agterveld MPK *et al.* Typical freshwater bacteria: an analysis of available 16S rRNA gene sequences from plankton of lakes and rivers. *Aquat Microb Ecol* 2002;**28**:141–55.

1.3. L'écosystème de la rivière Senne

La Senne est l'écosystème rivière qui a été échantillonné dans le cadre de nos recherches. Cette rivière est située dans le bassin versant de l'Escaut ; elle prend source à Naast (Soignies), reçoit les eaux de plusieurs affluents, dont la Woluwe et le Zuunbeek (Figure 1.4) et parcourt un trajet de 103 kilomètres, pour finalement se jeter dans la Dyle à Zennegat (Malines). La Senne traverse la ville de Bruxelles du sud au nord et reçoit à l'occasion de ce passage les eaux usées de 1.200.000 habitants, après leur traitement dans les stations d'épuration Bruxelles-Sud (Vivaqua) et Bruxelles-Nord³ (Aquiris). La surface du bassin versant de la Senne est de 991 km². Il se caractérise par une forte activité agricole dans sa partie amont suivie par une importante urbanisation dans sa partie aval (Brion *et al.* 2015). Au 19^{ème} siècle, pour des raisons urbanistique et sanitaires, la Senne a été voutée et elle est de ce fait presque totalement invisible dans la capitale.

C'est en amont de Bruxelles, à Lembeek, que se situe la station d'échantillonnage de nos recherches (Z1 sur la Figure 1.4), le débit moyen annuel y est de 4 m³/s. Bien qu'en amont des déversements des stations d'épuration bruxelloises, les eaux de ce tronçon de rivière sont sous pression anthropique puisqu'elles ont déjà réceptionné des rejets de trois petites stations d'épuration en amont représentant un total d'environ 100.000 équivalent habitants (Ouattara *et al.* 2014).

³ Les deux stations d'épuration ensemble ont une capacité de traitement d'environ 1.500.000 équivalent habitants.

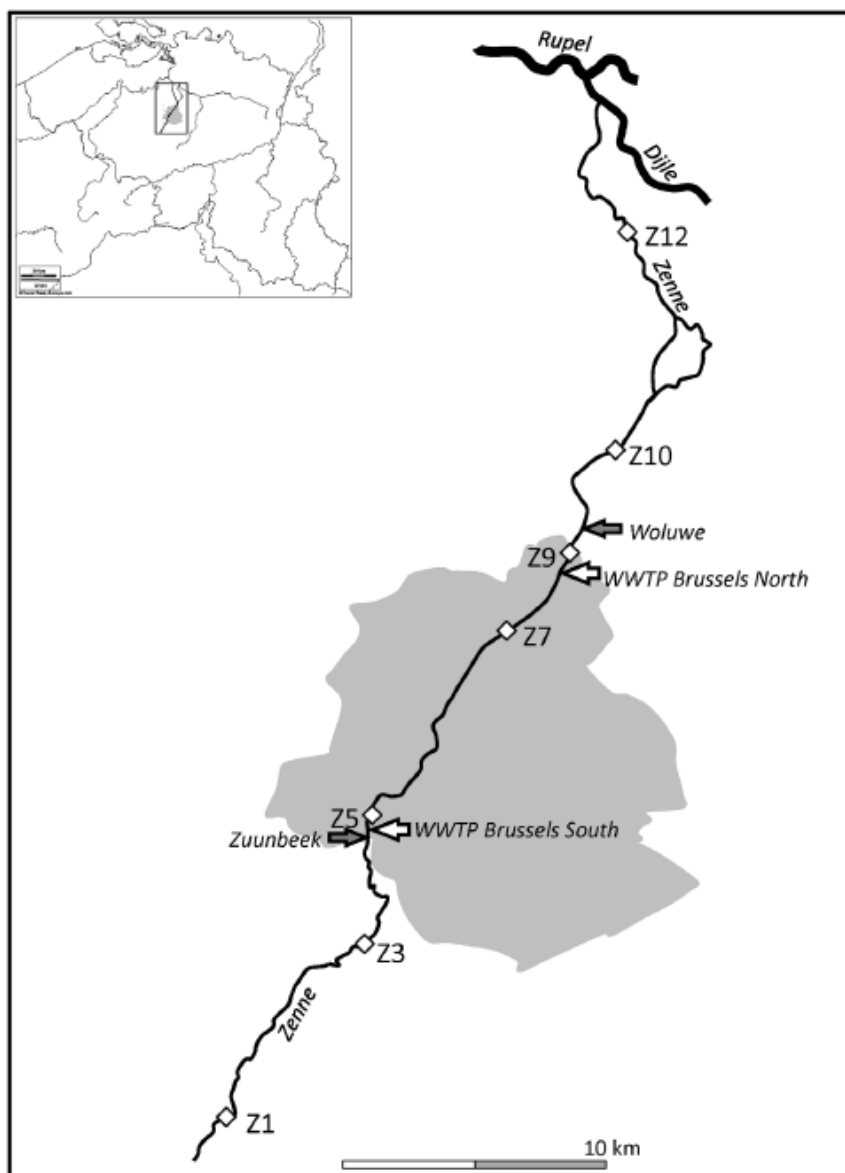


Figure 1-4 Carte de la partie aval de la Senne. La région Bruxelles Capitale est représentée en gris. Les points de déversement des eaux traitées des stations d'épuration (WWTP) de Bruxelles-Sud et Bruxelles-Nord sont représentés par les flèches blanches et les confluences avec le Zuunbeek et la Woluwe par les flèches noires (D'après García-Armisen *et al.* 2014).

En 2010, des mesures de la diversité microbienne ainsi que de divers paramètres environnementaux ont été réalisées sur des échantillons de la Senne collectés en amont de Bruxelles (stations Z1 et Z3), dans Bruxelles (Z5, Z7 et Z9) et en aval de Bruxelles (Z10 et Z12) (sept stations au total, visibles sur la Figure 1.4). Une campagne d'échantillonnage a été réalisée lors de chacune des quatre saisons de l'année (García-Armisen *et al.* 2014). De larges fluctuations des paramètres environnementaux (oxygène dissous, nutriments, matière organique) ont été constatées; celles-ci sont principalement causées par les déversements des effluents des stations d'épuration de Bruxelles. Une forte saisonnalité de la composition des

communautés bactériennes semblait être associée à l'activité bactérienne *in situ* (dégradation de la matière organique particulaire et dissoute associée à une consommation d'oxygène et une transformation de l'azote du milieu). Pour toutes les saisons, l'apport de souches allochtones provenant des rejets de stations d'épuration modifiait la composition des communautés, avec un impact plus prononcé durant les mois froids (automne et hiver) en raison d'une activité *in situ* plus faible que lors des saisons chaudes (printemps et été). Ces modifications se maintenaient en aval des rejets en été, automne et hiver ; en revanche, un retour rapide à une composition identique à celle de l'amont des rejets (phénomène de résilience) était observé au printemps.

De manière générale, les saisons froides offraient une plus grande richesse bactérienne, tant au niveau des phyla que des genres, alors qu'elle s'appauvissait durant les saisons chaudes. L'abondance bactérienne totale dans la rivière était comprise entre $2,2 \times 10^9$ et $2,3 \times 10^{10}$ cellules/litre, ce qui est dans la gamme haute des abondances bactériennes habituellement mesurées en eaux de rivières (Benner *et al.* 1995).

Une analyse de la diversité bactérienne à la station d'échantillonnage Z1 (Lembeek) a révélé certains genres abondants dans la communauté. Ces derniers furent comparés avec des données d'une autre campagne d'échantillonnage à Lembeek, menée en 2016 pour les quatre saisons également (Proia L., George I, communication personnelle). Dix genres étaient dominants (genres dont l'abondance relative moyenne sur les quatre saisons représentait plus de 0,5% de l'ensemble) et communs aux deux études : *Flavobacterium*, *Arcobacter*, *Rhodoferrax*, *Limnohabitans*, *Pseudomonas*, *Hydrogenophaga*, *Polynucleobacter*, *Acinetobacter*, *Dechloromonas*, *Candidatus Rhodoluna* (Figure 1.5). Seul le genre *Malikia* (*Betaproteobacteria*) représentait 10% de la composition moyenne en 2010 et était totalement absent en 2016.

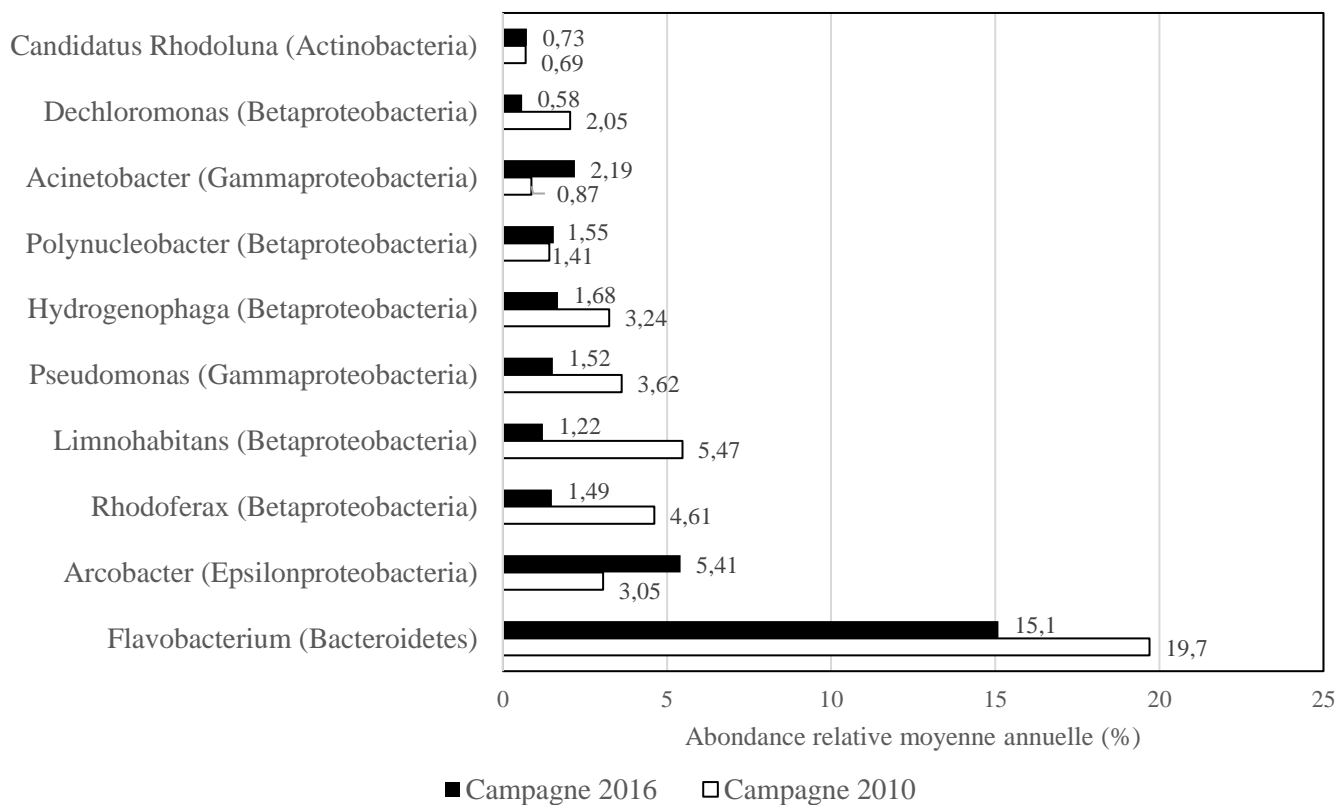


Figure 1-5 . Genres dominants (dont l'abondance relative moyenne annuelle représentait plus de 0,5% de celle de l'ensemble des genres) à la station Z1 (Lembeek) en 2010 et 2016.

Hormis pour une mesure (celle de l'été 2010), le genre *Flavobacterium* était de loin le plus abondant dans les échantillons des deux études. Le genre *Flavobacterium* est fréquemment rencontré dans les eaux douces et dans les sols. Trois de ses espèces sont des pathogènes importants pour les poissons (Starliper 2011). Notons que les résultats de la campagne de 2010 avaient été obtenus par pyroséquençage 454 sur la région V1-V3 du gène codant pour l'ARN16s tandis que ceux de la campagne menée en 2016 l'ont été par séquençage Illumina MiSeq de la région hypervariable V4. Malgré les biais moléculaires dus à des méthodes de séquençages et surtout des amorces différentes (Fouhy *et al.* 2016), les genres dominants étaient semblables entre les deux études, suggérant une certaine stabilité dans la composition de la communauté bactérienne.

1.4. Ecophysiologie de quelques taxons bactériens typiques des eaux douces

Au sein du plancton bactérien de rivière, on trouve différentes stratégies de survie. Les souches se différencient selon leur réponse à des variations de l'environnement ou encore selon leurs adaptations physiologiques à l'espace homogène et peu structuré que constitue la zone pélagique des rivières.

Aujourd'hui encore, la littérature contient peu d'informations sur l'écologie des taxons « typiques » des eaux douces, tels que les lignées acI (*Actinobacteria*) et LD12 (*Alphaproteobacteria*), et le groupe *Polynucleobacter* qu'on retrouve en abondance dans les zones aval des bassins hydrographiques (Ruiz-González, Niño-García and del Giorgio 2015; Savio *et al.* 2015).

Le plancton bactérien semble être majoritairement composé d'organismes hétérotrophes, mais comporte également des individus autotrophes. Le phylum *Cyanobacteria* est constitué de souches autotrophes réalisant la photosynthèse oxygénique ; certains des taxons de ce phylum produisent des toxines (cyanotoxines) présentant des risques de détérioration de la biodiversité et de santé publique (Carey *et al.* 2012). Parmi les autres autotrophes de rivières, les bactéries nitrifiantes telles que certaines espèces des genre *Nitrosomonas* et *Nitrobacter*, se sont révélés importants⁴ dans le bassin de la Seine (Paris) (Cébron, Berthe and Garnier 2003).

Parmi les organismes hétérotrophes, on trouve des groupes aux **adaptations défensives**, comme certains taxons de la classe acI, aussi appelés ultramicrobactéries en raison de leur petite taille cellulaire (<0,1µm de diamètre). Ces bactéries présentent de fortes abondances printanières en dépit de la présence de protozoaires prédateurs. Leur taille suboptimale engendre un faible rendement de broutage pour les prédateurs qui broutent préférentiellement des cellules plus grandes (Jezbera, Hornák and Šimek 2006). Cette relative protection au broutage par les protozoaires permettrait de parer à leur désavantage compétitif généralement observé face à des souches opportunistes à croissance rapide (Šimek *et al.* 2006).

En plus d'un avantage face aux prédateurs, la petite taille cellulaire peut constituer une adaptation aux **milieux oligotrophes**. En rivière, c'est le cas par exemple de la classe LD12 (*Alphaproteobacteria*) dont la petite taille, permise par une minimisation du génome, leur confère un avantage en milieu pauvre en ressources grâce à une optimisation du rapport

⁴ Les souches nitrifiantes représentaient moins de 1% de la composition totale de la communauté bactérienne

surface/volume leur permettant une meilleure assimilation des nutriments et substrats (Salcher, Pernthaler and Posch 2011).

Autre stratégie de vie: la **spécialisation** consiste en l'exploitation efficace d'une diversité de substrats restreinte. Par exemple, certaines espèces appartenant au genre *Polynucleobacter* présentent un génome fortement simplifié, les privant entre autres de la capacité à réguler leur expression génétique à l'aide du mécanisme de quorum sensing ou à se mouvoir, ce qui caractérise une stratégie de vie dite « passive ». Incapables d'exploiter l'hétérogénéité des substrats, ces espèces utilisent principalement des composés à faible poids moléculaire dérivés de la photo-oxydation des substances humiques (Hahn *et al.* 2012). A l'inverse de nombreuses autres espèces hétérotrophes, elles ne profitent donc pas des composés labiles libérés lors des blooms d'algues (tels que des carbohydrates) pour leur croissance.

Ces derniers sont exploités par des taxons dits **opportunistes (ou copiotrophes)** en raison de leur court temps de génération (haut taux de croissance) et d'assimilation des ressources. Par exemple, la classe *Flavobacteria (Bacteroidetes)* comporte des espèces de ce type, qui répondent rapidement à une augmentation de la concentration des exsudats algaux et autres produits dérivés, ce qui explique que leurs pics d'abondance cellulaire soient comparables à ceux des algues (Salcher 2013). Dans une moindre mesure, le genre *Limnohabitans*, omniprésent en eau douce, peut aussi être considéré comme un genre opportuniste (Hahn *et al.* 2010). Les variations de densité de population sont très importantes chez ces taxons, en raison de leur opportunisme intrinsèque mais également de la rapide déplétion des nutriments qu'ils exploitent et de leur vulnérabilité à la prédation.

La diversité de taxons mesurée dans les milieux lotiques est donc importante. Certains d'entre eux sont spécifiques de cet écosystème. Pourtant, l'écologie de ces souches 'typiques' d'eau douce reste peu caractérisée. Un challenge en microbiologie consiste à mieux comprendre comment ces souches coexistent et potentiellement interagissent entre elles au sein des communautés lotiques.

1.5. Les interactions interspécifiques

1.5.1. Types d'interactions

Dans les écosystèmes naturels, les microorganismes ne vivent pas isolément mais dans des larges communautés au sein desquelles peuvent se dérouler des interactions complexes et dynamiques. Plusieurs études ont révélé en effet l'existence de comportements sociaux complexes (coopération, répartition des tâches, communication,...) que l'on associait plus volontiers jusqu'alors aux communautés de macroorganismes (Crespi 2001). L'écrasante majorité des études sur les interactions bactériennes se sont focalisées sur les biofilms (Moons, Michiels and Aertsen 2009): lieux d'une forte densité cellulaire favorisant de tels comportements. Mais des études récentes ont rapporté l'existence de telles interactions au sein de communautés planctoniques, par exemple entre microalgues et bactéries marines (Cooper and Smith 2015; Ramanan *et al.* 2016).

En écologie, on classe les interactions interspécifiques selon leur effet positif (+), négatif (-) ou neutre (0) sur les espèces impliquées. Cet effet n'est pas forcément symétrique. Dès lors, ces interactions peuvent être bénéfiques pour les deux partenaires (mutualisme, ++) ou pour l'un des deux seulement (commensalisme, + 0), ou peuvent être préjudiciables aux deux partenaires (compétition, - -) ou pour l'un des deux seulement (amensalisme, - 0). Il se peut également qu'il n'y ait pas d'interaction entre les taxons (relation neutre 0 0) ou que les interactions soient bénéfiques pour l'un et préjudiciables pour l'autre (parasitisme et prédation, + -). Bien que cette classification binaire soit utile pour définir les différents types d'interactions, au sein d'une communauté microbienne, toutes ces interactions s'articulent le long d'un gradient allant du mutualisme aux relations compétitives. Elles se chevauchent aussi de sorte qu'il est parfois difficile de les étudier séparément. De plus, on ne retrouve pas forcément tous les types d'interactions au sein des communautés microbiennes. La prédation et le parasitisme sont rares car ces interactions impliquent généralement que le prédateur ou le parasite soit un eucaryote, bien que des exceptions existent (Huber *et al.* 2002; Davidov, Friedjung and Jurkevitch 2006). En conséquence, l'étude des interactions dans une communauté bactérienne s'articule principalement autour de deux types d'interactions : la coopération et la compétition.

La **compétition** s'opère de deux façons entre les microbes d'une communauté: de façon *passive* par exploitation d'une ou de plusieurs ressources communes, ou *active* par la production de molécules toxiques pour l'autre espèce (Figure 1.6A) (Ghoul and Mitri 2016).

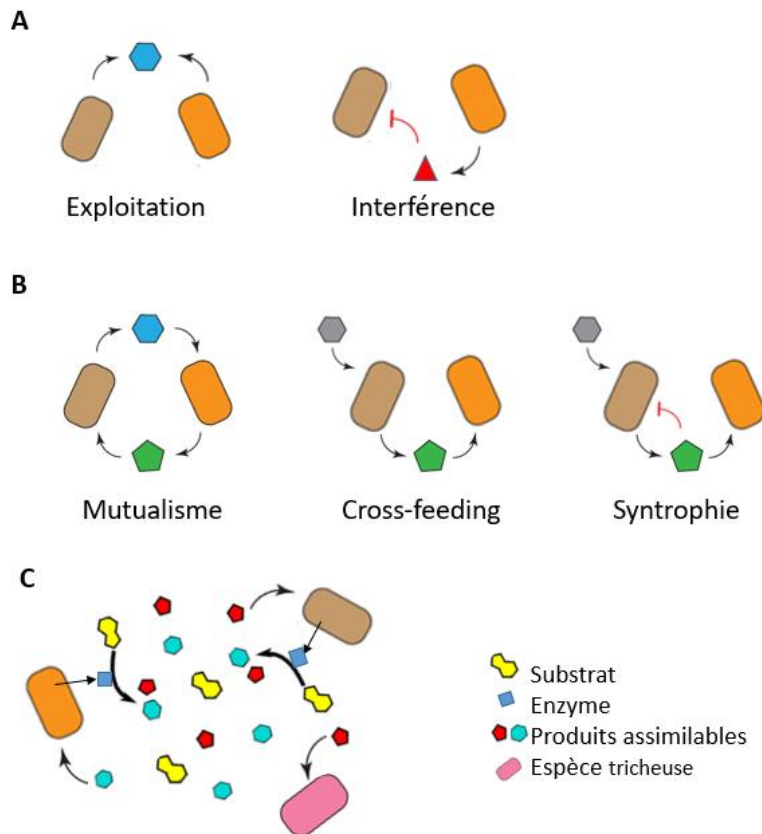


Figure 1-6 Types d'interactions de compétition (A), de coopération par échanges métaboliques (B) et par production de biens communs (C, exemple d'une enzyme de dégradation de substrat). D'après Cavaliere et al. (2017), avec modifications.

Les nutriments constituent une ressource indispensable au développement et au maintien des bactéries. Au fur et à mesure qu'un environnement est colonisé, l'espace (qui est une condition nécessaire au développement) s'amointrit et les nutriments peuvent devenir limitant. La compétition **par exploitation** implique la consommation d'une de ces ressources limitantes par une souche, la rendant moins disponible pour une autre. La souche exploitant le plus rapidement le substrat limitant prendra le dessus sur l'autre. L'issue d'une compétition entre les espèces A et B dépendra néanmoins de la concentration du substrat dans le milieu. En effet, le taux de croissance (la vitesse d'exploitation du substrat) des souches A et B dépend de cette concentration (Monod 1949). La Figure 1.7 illustre un exemple où la compétition est remportée par la souche B jusqu'à une concentration en substrat (C_s) tandis qu'elle sera remportée par la souche A au-delà de cette concentration. Dans un environnement comme l'intestin d'un être humain, la compétition pour les nutriments et l'espace est telle que les scientifiques la considèrent comme une barrière aux infections par des pathogènes (Guarner and Malagelada 2003).

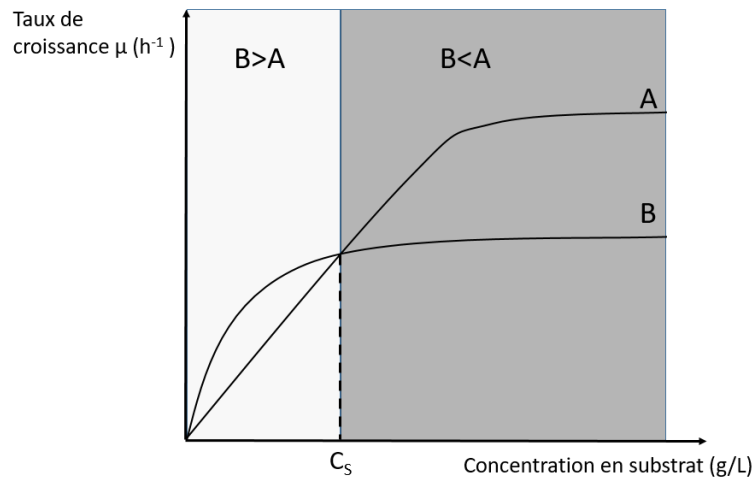


Figure 1-7 Evolution du taux de croissance (h^{-1}) des souches A et B en fonction de la concentration en substrat (g/L). Les zones grises claires et foncées représentent l'intervalle de concentration pour lequel la souche B (zone claire)/A (zone foncée) remporte la compétition.

La compétition **par interférence** consiste en une interaction antagoniste entre les compétiteurs, souvent exprimée en réponse à la compétition par exploitation. Le mécanisme de compétition par interférence, de loin le plus étudié, est la production de composés antimicrobiens par une souche qui inhibe ou tue une souche cible. La spécificité des cibles de ces composés reflète souvent la variété d'habitat et la diversité des autres espèces que la souche productrice est susceptible de rencontrer. Ainsi, une souche généraliste occupant une large gamme d'habitats tirera plus de bénéfice de la production d'antimicrobiens à large spectre tandis qu'un organisme hautement spécialisé pour un habitat donné serait plutôt susceptible de produire des composés à spectre étroit ciblant ses compétiteurs spécifiques (Hibbing *et al.* 2010). Par ailleurs, pour efficacement inhiber les compétiteurs, l'antibiotique doit être produit en quantités suffisantes, pouvant requérir une production généralisée au sein de l'espèce, ce qui explique pourquoi la production de ces composés est souvent régulée par le quorum sensing (Costa and Loper 1997; Pearson *et al.* 2000).

L'inhibition par interférence peut également être indirecte et indépendante de la production de molécules antibiotiques. Le quorum sensing étant régulateur de nombreuses réponses compétitives, une stratégie empruntée par certaines souches consisterait à interrompre les cascades de signalisation des souches avec lesquelles elles sont en compétition. Certains organismes sont capables de dégrader les acyl-homoserine lactones (AHLs, molécules typiquement impliquées dans les cascades de signalisation des bactéries Gram-négatives) via la production de AHL-lactonases et/ou de AHL-acylase et inhibent ainsi le quorum sensing des souches produisant les AHLs (Wang *et al.* 2004; Christiaen *et al.* 2011). Cette inhibition

présente un avantage compétitif dans le cas où cette signalisation régule la production de molécules antimicrobiennes ciblant la souche inhibitrice. Ces enzymes inhibitrices du quorum sensing présente un fort intérêt pharmaceutique dès lors qu'elles peuvent inhiber le développement de phénotypes pathogènes chez des bactéries infectieuses (Rémy *et al.* 2016).

La **coopération** réunit les interactions qui sont bénéfiques aux deux (mutualisme) ou à un seul des deux partenaires impliqués (commensalisme), certaines interactions peuvent être l'une ou l'autre selon le contexte (Little *et al.* 2008). La coopération peut être facultative, ou obligatoire, on parle alors de symbiose. Dans les communautés naturelles, deux processus clés sont à l'origine de la coopération : la production et/ou l'échange de métabolites secondaires et celle de « biens communs » (public goods) (Figure 1.6B). Les **échanges métaboliques** consistent en la production d'un métabolite par une espèce, qui est utilisé de manière spécifique par une autre comme source d'énergie. Ces sécrétions peuvent être dues à des pertes cellulaires, et/ou être activement excrétées par la souche en raison d'un quelconque bénéfice fonctionnel. On classe ces échanges selon qu'ils sont réciproques (mutualisme pur) ou unilatéraux (cross-feeding), correspondant alors à une sorte d'altruisme. Ces échanges peuvent parfois impliquer plusieurs partenaires et former une boucle coopérative (A donne à B, qui donne à C, qui donne à A) (Atlas and Bartha 1997). Dans certains cas, la consommation du métabolite par la souche partenaire peut profiter au producteur lorsque, par exemple, le métabolite provoque un effet inhibiteur sur ce dernier. On parle alors de syntrophie.

La coopération peut également se dérouler via la **production de biens communs** par le travail conjoint de quelques individus issus de la même espèce ou non, qui bénéficie à l'ensemble de la communauté. De nombreux composés sont concernés : sidérophores, vitamines, enzymes, ... La production d'enzymes extracellulaires permet ainsi de dégrader des substrats peu solubles du milieu en molécules plus simples assimilables par de nombreuses autres espèces (Figure 1.6C). Des enzymes de type cellobiose dehydrogénases qui clivent la cellulose, ou encore des amylases qui dégradent la liaison glucosidique de l'amidon peuvent constituer des biens communs et donc jouer un rôle important dans les communautés (Cavaliere *et al.* 2017).

Etant donné que la sécrétion de ces composés a un coût, ils sont susceptibles d'être exploités par des individus qui ne contribuent en rien à leur production, on appelle ces derniers « profiteurs » (cheaters) en écologie. Des mécanismes de régulation dépendant de la contribution fournie par le reste de la communauté ont toutefois été observés. C'est notamment le cas de *Pseudomonas aeruginosa*, dont la décision cellulaire de produire des sidérophores (le bien commun) est prise en fonction du nombre de cellules productrices environnantes. La règle

consiste à coopérer uniquement en présence de coopérateurs. Couplé au quorum sensing, ce mécanisme de réciprocité permet d'associer leur investissement et de réprimer les profiteurs (Allen *et al.* 2016).

1.5.2. Approches et limitations à l'étude des interactions microbiennes

L'étude des interactions se déroulant au sein d'une communauté microbienne est complexe. En particulier, les échanges de métabolites. Ils sont difficiles à caractériser dans les milieux naturels étant donné la grande diversité de molécules naturellement présentes en plus de celles sécrétées par les microorganismes. Ces dernières ne représentent qu'une part très faible de la quantité de molécules organiques présentes dans l'environnement. Il existe trois approches pour l'étude des interactions, considérant des échelles d'observations et limitations différentes : 1/ les réseaux de co-occurrence, 2/ les modèles métaboliques, 3/ les expériences en laboratoire.

Une première approche à l'étude des interactions microbiennes implique le recours aux **réseaux de co-occurrence**, qui permettent d'avoir un aperçu des interactions potentielles et des possibles mécanismes organisationnels des communautés. Les réseaux de co-occurrence sont issus de la comparaison de la structure (en termes d'abondance des différents taxons) de plusieurs communautés, et sont construits en détectant les co-occurrences significatives et non aléatoires de taxons. Les communautés comparées peuvent être issues de sites distincts (mais comparables entre eux), ou d'un même site échantillonné temporellement. Le réseau est construit selon les différences et similarités d'abondance des taxons à travers les communautés. Lorsque deux taxons présentent des motifs d'abondance similaires (si A augmente/diminue, B augmente/diminue), une relation positive leur est attribuée ; tandis que lorsque deux taxons montrent des motifs d'abondance inversement corrélés (si A augmente, B diminue et inversement), alors une relation négative est prédite (Faust and Raes 2012). Il en résulte un réseau au sein duquel les souches sont reliées entre elles selon qu'une interaction est présumée ou non (Figure 1.8A). Au sein des réseaux de co-occurrence, la distribution des connexions entre les nœuds n'est pas aléatoire (la courbe n'est pas en cloche, Figure 1.8B), au contraire, un petit nombre de nœuds sont extrêmement connectés tandis qu'un grand nombre le sont assez peu (Figure 1.8B). Cette structure, nommée «réseau invariant d'échelle » (scale-free network) est en fait observée dans de nombreux autres réseaux sur la planète (Barabási 2009; Servigne 2017). C'est notamment le cas des réseaux de l'Internet (réseaux de routeurs et d'ordinateurs connectés), des films communs entre acteurs ou encore des collaborations et de citations entre scientifiques : tous sont dotés de nombreux nœuds peu connectés et de supernœuds qui le sont beaucoup (Servigne 2017).

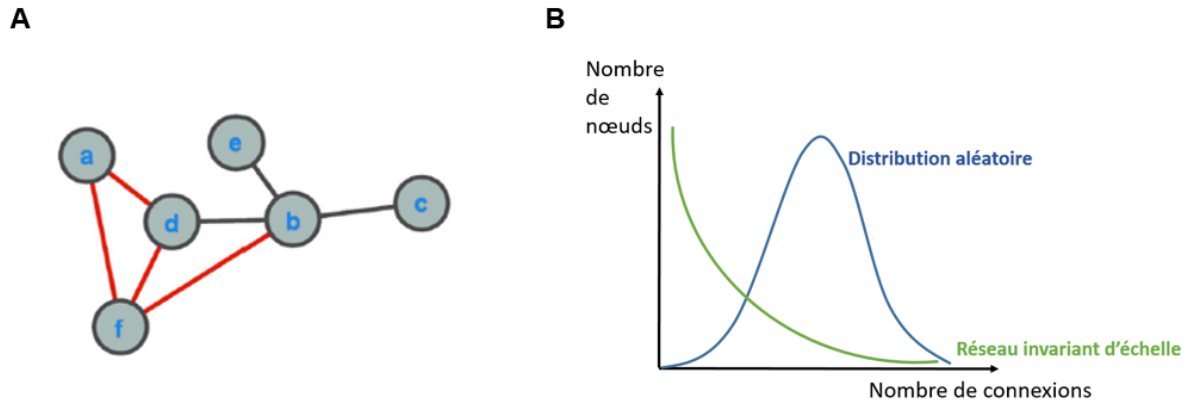


Figure 1-8 A) Exemple de réseau de co-occurrence. Les taxons, correspondant à des lettres, sont représentés par des nœuds, les interactions présumées par des arêtes les reliant en noir dans le cas de relation positive et rouge dans le cas de relation négative. D'après Berry and Widder (2014). B) Distribution des connexions entre les nœuds des réseaux invariants d'échelle en comparaison avec une distribution aléatoire.

Selon les communautés comparées et leur milieu, le réseau de co-occurrence peut être plus ou moins connecté (donc contenir plus ou moins d'interactions présumées). En effet, les variations des conditions et/ou les perturbations du milieu font varier l'abondance des taxons d'une communauté, engendrant des variations du réseau de co-occurrence dont l'ampleur dépend de la connectivité des taxons concernés. Un réseau invariable d'échelle est très résistant aux perturbations causant la perte de nœuds de manière aléatoires mais est en contrepartie vulnérable aux perturbations ciblant les nœuds hautement connectés (appelés « hub ») dont la perte peut provoquer une fragmentation (perte du nombre d'interactions) drastique au sein du réseau. En conséquence, l'ensemble des facteurs et perturbations responsables de ces variations d'abondance génèrent des patterns de co-occurrence.

Quelques équipes de recherche se sont penchées sur les patterns de co-occurrence de communautés bactériennes dans les rivières. Leurs études ont permis de mettre en évidence certains facteurs influençant ces patterns tels que des micropolluants, l'affectation des sols, ou encore la saisonnalité. Hu *et al.*, (2017) ont observé que des micropolluants, même en infimes concentrations, impactaient les patterns de co-occurrence observés le long de la rivière Jiulong (Chine) de manière plus importante que les facteurs physico-chimiques du milieu (pH, nutriments, T°). En particulier, les espèces centrales (très connectées) du réseau étaient fortement affectées par la présence de ces micropolluants. Dans l'hypothèse où ces taxons centraux sont importants dans la fonction et la structure de la communauté (Ma *et al.* 2016), cela révèle un impact potentiel important de ces micropolluants sur les services de l'écosystème. Une étude menée sur le ruisseau Parkers Creek (Etats-Unis) a permis de mettre en évidence

l'influence de l'urbanisation sur les communautés (Hosen *et al.* 2017). Les auteurs ont observé que les réseaux de co-occurrence de taxons bactériens planctoniques en zones urbanisées (dont les surfaces sont imperméabilisées) étaient plus petits et moins connectés que les réseaux obtenus dans le même ruisseau en zone forestière. Finalement, les variations saisonnières des conditions physico-chimiques de l'environnement (au printemps et en automne) et leurs influences sur ces réseaux ont été analysées sur le fleuve Bleu (Yang-Tsé-Kiang en Chine), au sein duquel un plus grand nombre de taxons co-occurents était observé durant l'automne, en raison d'une température moyenne plus élevée (Liu *et al.* 2018).

Enfin, l'étude la plus complète a été réalisée sur les réseaux de co-occurrence bactériens de 114 échantillons de biofilms collectés dans les ruisseaux du bassin de la rivière Ybbs (Autriche) (Widder *et al.* 2014). Ces auteurs ont observé une variation de la connectivité de ces réseaux selon la taille des ruisseaux considérés. Les petits et les grands ruisseaux présentaient des réseaux moins connectés que les ruisseaux de taille moyenne⁵. Leurs résultats suggèrent que les variations hydrologiques et la dynamique de la métacommunauté⁶ sont les principaux acteurs déterminants les patterns de co-occurrence le long d'un continuum rivière. En bref, les petits ruisseaux de l'amont subissent de grandes variations hydrologiques lors d'évènement pluvieux et la petite surface de leur bassin versant résulte en une limite de dispersion qui restreint la taille de leur métacommunauté. L'effet combiné de ces deux paramètres a pour conséquence que les communautés de petits ruisseaux se distinguent les unes des autres, provoquant un réseau hautement fragmenté. Au sein des ruisseaux de tailles moyennes, la taille des métacommunautés de l'amont augmente et l'assemblage des communautés locales se libère de la limite de dispersion. Les réseaux sont plus connectés (faible fragmentation) ce qui traduit soit des interactions biotiques fortes, soit une sélection par l'environnement (species sorting). Enfin, les plus grandes surfaces des bassins versant à l'aval augmentent l'apport et l'origine des métacommunautés. A cela s'ajoute la grande diversité microbienne transportée par les masses d'eau en amont dont la composition varie sensiblement avec la dynamique hydrologique. Ces contributions asynchrones de diversité microbienne affectent les communautés locales de l'aval et leur réseau de co-occurrence via un assemblage dirigé par des processus plus stochastiques et donc une haute fragmentation.

⁵ Les ruisseaux étaient classés selon la taille de leur bassin versant : les petits ruisseaux comprenaient les bassins versant variant de 0,1 à 3,2 km², les ruisseaux de taille moyenne de 3,6 à 8,3 km² et les grands ruisseaux de 8,3 à 20,4 km².

⁶ Qui comprend l'ensemble des communautés interconnectées du ruisseau

Bien que l'outil que constituent ces réseaux soit très utile, il faut rester prudent quant à la signification écologique de ces relations. En effet, des abondances similaires observées à travers les communautés peuvent, certes, être dues à une interaction positive entre les souches mais peuvent tout aussi bien résulter d'une réponse similaire aux changements de leur environnement liée à un recouvrement de leurs niches écologiques c'est-à-dire des valeurs de paramètres physico-chimiques caractérisant les milieux dans lesquelles les souches sont capables de vivre. Une validation expérimentale de ces relations potentielles est donc indispensable à l'interprétation écologique de ces réseaux.

Une deuxième approche de l'étude des réseaux interactions microbiennes implique des **modèles métaboliques**. En effet, les interactions compétitives et coopératives sont en grande parties issues du métabolisme et les modèles permettent une simulation de la croissance des souches pour différentes conditions imposées (Freilich *et al.* 2011). Toutefois, l'étude de ces modèles se base généralement sur la présence et l'absence de gènes sans prendre en compte si ces derniers sont exprimés ou non, une combinaison avec des études d'expression des gènes étudiés (transcriptomique) pourrait résoudre ce problème (Ghoul and Mitri 2016).

Au-delà de l'écosystème « rivière », une équipe de recherche allemande a analysé la composition de 800 communautés bactériennes naturelles de divers habitats (eaux, sols, intestins humains) (Zelezniak *et al.* 2015). Ensuite, ils ont prédit *in silico*⁷ l'importance de la compétition pour les ressources et des échanges métaboliques au sein de ces communautés, sur base du métabolisme potentiel des différentes espèces (dédduit de leur génome). Leurs conclusions sont intéressantes: bien que les relations de compétition pour les ressources dominant à l'échelle des communautés, ce n'est pas le cas pour les sous-communautés de taxons qui sont co-occurents dans les différents habitats échantillonnés. Pour ceux-là, les échanges métaboliques seraient un puissant moteur de structuration.

Enfin, une troisième et dernière approche à l'étude des interactions implique des **expériences en laboratoire**. Une étude expérimentale des interactions interspécifiques a été menée sur quelques 64 souches bactériennes isolées du sol (Vetsigian, Jajoo and Kishony 2011). Pour chacune d'elles, la mesure de l'influence d'une souche « productrice » de métabolites secondaires affectant (positivement ou négativement) une souche « indicatrice » a été réalisée en co-culture. Les résultats suggèrent que les relations entre bactéries provenant d'un même environnement sont majoritairement de type compétitif.

⁷ par reconstruction métabolique à l'échelle du génome

A l'inverse, des interactions nulles ou positives sont plus souvent observées après la phase d'acclimatation / de colonisation d'un nouveau milieu (Lawrence *et al.* 2012; Rakoff-Nahoum, Foster and Comstock 2016), et dans des communautés spatialement structurées (Kim *et al.* 2008; Mitri, Clarke and Foster 2016).

Cependant, la fréquence des interactions négatives est probablement surestimée en laboratoire par rapport à ce qui se passe dans les milieux naturels, car (i) les bactéries ont généralement été isolées dans les mêmes conditions et ont donc des besoins nutritionnels similaires et (ii) les différentes souches sont généralement incubées en laboratoire dans un environnement spatialement non/peu structuré (le bouillon de culture) permettant d'atteindre des densités cellulaires plus élevées que celles observées dans la nature (Ghoul and Mitri 2016).

Une équipe de recherche travaillant sur des communautés de bactéries telluriques (isolées à partir de petites dépressions remplies d'eau de pluie à proximité de racines de hêtre) a analysé les interactions se déroulant au sein de la communauté pour divers niveaux de richesse (1, 2, 4, 8 ou 16 espèces). Les interactions ont été déduites en comparant la productivité (respiration) des communautés avec celle des souches de la communauté en monocultures. Une interaction était positive lorsque la communauté présentait une productivité plus grande que la somme des productivités de ces souches en monoculture. Ils sont arrivés à la même conclusion que les études précitées: les relations de compétition dominent les interactions entre ces espèces cultivables (Foster and Bell 2012). Néanmoins, ils observèrent que ces interactions négatives tendaient à s'atténuer à mesure que les ressources facilement biodégradables devenaient limitantes dans des expériences en batch, jusqu'à atteindre un état neutre (pas d'interaction) au sein de la communauté (Rivett *et al.* 2016), confirmant ainsi le rôle crucial de la qualité des ressources dans les interactions interspécifiques.

1.6. Objectifs et plan de thèse

Afin de contribuer à l'étude des communautés bactériennes de la colonne d'eau de rivières, ce travail de recherche vise les deux objectifs principaux suivants (Figure 1.9) :

- Le premier objectif concerne le recensement de la diversité bactérienne globale rencontrée dans la zone pélagique de rivières et la construction d'une communauté 'modèle' simplifiée permettant leur étude en milieu contrôlé et reproductible.
- Le deuxième objectif considère l'étude de la réponse, en termes de performance et de diversité, de cette communauté face à des sources et des concentrations en carbone variées, et sa comparaison avec la communauté naturelle.

L'eau douce des rivières constitue un habitat pour la faune et la flore ainsi qu'une ressource majeure d'eau potabilisable pour l'être humain. A travers le monde, les eaux de rivières sont le milieu récepteur de nombreux déchets qui dégradent leur qualité. En particulier, les rivières traversant les villes réceptionnent les eaux usées domestiques et industrielles, introduisant de grandes quantités de matière organique et de nutriment dans l'écosystème. Ces perturbations anthropiques augmentent avec la démographie urbaine. Aujourd'hui, 55% de la population mondiale vit dans des villes. Des estimations prédisent que cette proportion atteindra les 68% d'ici 2050, en majorité dans des pays émergents où les stations d'épuration sont rares voire inexistantes (United Nations, 2018). Dans ce contexte de détérioration grandissante des rivières urbaines, les communautés microbiennes jouent un rôle clé. En effet, elles minéralisent la matière organique et les nutriments introduits en masse dans le milieu, réalisant ainsi une auto-épuration des eaux de rivières.

Ces communautés bactériennes sont soumises à des conditions physico-chimiques changeantes, pourtant certains taxons sont fréquemment observés et sont persistants dans ces communautés. Le maintien de ces taxons peut dépendre de phénomènes locaux (sélection par l'habitat), régionaux (dispersion) et biologiques (interactions interspécifiques). Afin d'appréhender les mécanismes permettant la coexistence de souches bactériennes au sein des communautés de rivières, nous avons exploré des processus tels que la complémentarité métabolique, la sélection par l'habitat et les potentielles interactions au sein d'une communauté de souches isolées de la colonne d'eau d'une rivière.

L'écosystème de référence dont les souches ont été isolées est la Senne, en amont de sa traversée de Bruxelles à Lembeek. Le **CHAPITRE 2** décrit la méthodologie suivie lors de la construction

de la communauté modèle. Les techniques d'isolement, de conservation et de caractérisation des souches y sont décrites ainsi que les arguments qui président à la sélection des souches qui composeront la communauté modèle. Cette dernière a été réalisée en se basant sur la littérature, disponible lors de la construction de la communauté, qui est synthétisée sous forme de minireview se trouvant dans l'introduction de cette thèse : « Census of the river microbiome » (Goetghebuer L, Servais P, George IF, *en préparation*).

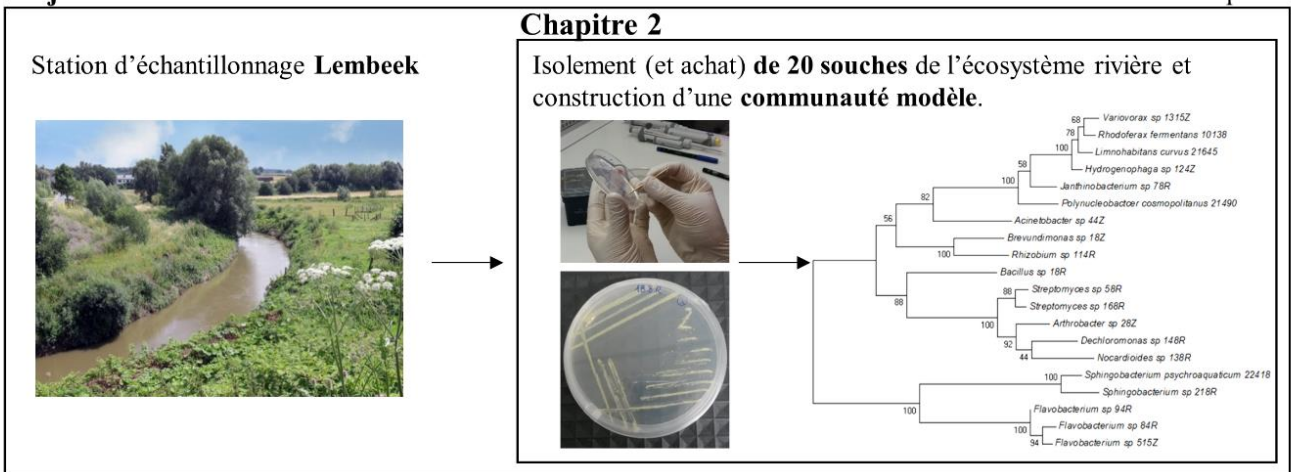
Le **CHAPITRE 3** étudie la performance de la communauté modèle et des souches la composant face à plus de 190 sources de carbone différentes. Les performances des souches individuelles, de la communauté modèle et de la communauté naturelle (issue de la Senne à Lembeek) y sont comparées. Les résultats de cette étude suggèrent des interactions interspécifiques au sein de la communauté face à des sources de carbone simples et ont fait l'objet d'une publication : « Carbon utilization profiles of river bacterial strains facing sole carbon sources suggest metabolic interactions » (Goetghebuer L, Servais P, George IF, *FEMS Microbiology Letters*, 2017, 364(10), fnx098).

Le **CHAPITRE 4** s'intéresse aux interactions suggérées dans le chapitre précédent. Afin d'appréhender la dynamique de la communauté au cours du temps, nous avons étudié son évolution dans deux milieux caractérisés par des concentrations en carbone très différentes. Sur une période de 27 jours, un suivi de la diversité bactérienne a été réalisé. Les résultats de cette étude ont révélé des successions bactériennes différentes dans les deux milieux au sein desquels la croissance de certaines souches semblait être améliorée en communauté en comparaison avec leur croissance en monoculture. Un article décrivant les résultats obtenus a été soumis à la revue *Microbial Ecology* : «Dynamic of a river model bacterial community in two different media reveals divergent succession and enhanced growth of most strains compared to monocultures » (Goetghebuer L, Bonal M, Faust K, Servais P, George IF, *soumis*).

Enfin, le **CHAPITRE 5** discutera des divers résultats obtenus, des difficultés expérimentales rencontrées et des perspectives qu'ouvre ce travail de thèse.

Ce travail de thèse a été réalisé dans le cadre du projet de recherche DYNAMO financé par le Fond National de la Recherche Scientifique (F.N.R.S).

Objectif 1: recensement de la diversité bactérienne de rivières et construction d'une communauté 'modèle' simplifiée



Objectif 2: étude de la réponse, en termes de performance et de diversité, de cette communauté et de la communauté naturelle face à des sources et des concentrations en carbone variées

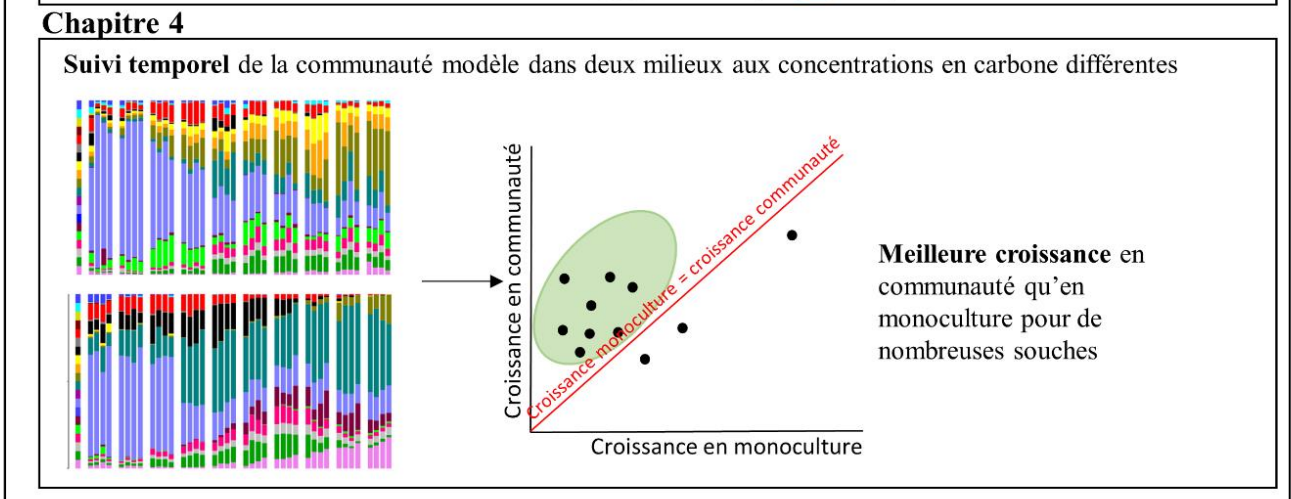
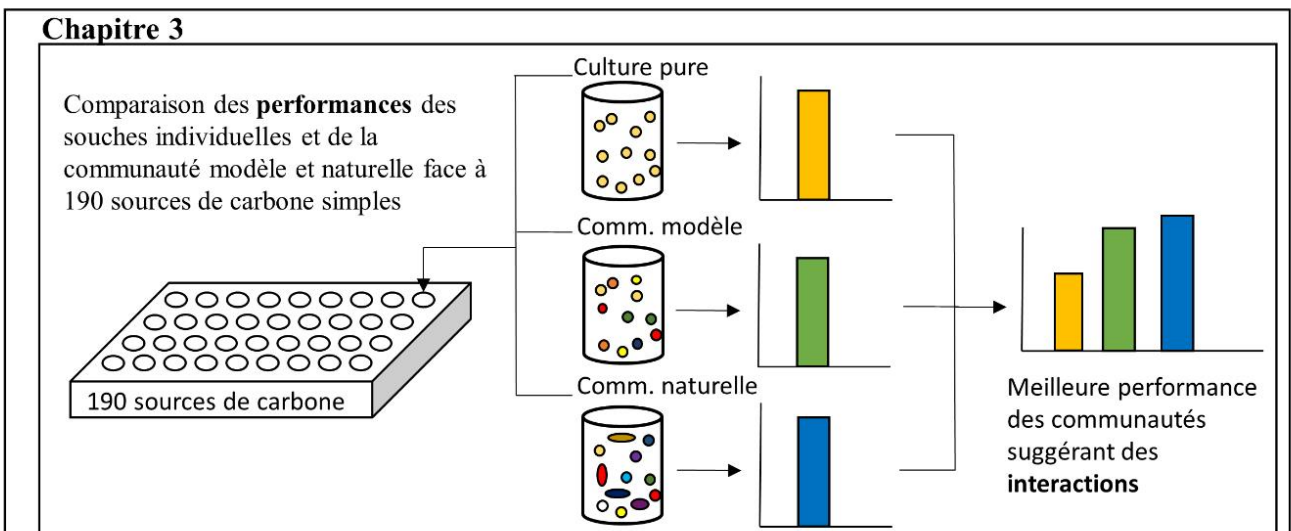


Figure 1-9 Schéma reprenant le plan de thèse suivi afin de répondre aux objectifs du travail et les principaux résultats.

CHAPITRE 2

CONSTRUCTION DE LA COMMUNAUTÉ MODÈLE

2. Construction de la communauté modèle

Etant donné la grande diversité des communautés naturelles, il est très difficile de déterminer (et vérifier) les taxons actifs et/ou performant des fonctions clés au sein de la communauté. De même, les facteurs influant la composition de la communauté varient à l'échelle spatiale et temporelle si bien que deux observations *in situ* ne sont jamais identiques. Dans ce contexte, les communautés modèles (ou synthétiques) permettent d'outrepasser ces difficultés rencontrées lors de l'étude de communautés naturelles. Cela consiste à créer un système artificiel qui reprend les principales particularités de son homologue naturel. Ce système constitue alors un modèle pour l'étude des caractéristiques écologiques, structurelles et fonctionnelles des communautés en conditions contrôlées (Großkopf and Soyer 2014). Par exemple, Canstein *et al.* (2002) ont mesuré une meilleure décontamination du Mercure associée à une augmentation de la diversité d'une communauté modèle peuplant le milieu contaminé, établissant un lien entre la fonction observée et la richesse des communautés.

Ce travail de thèse a donc commencé par la mise au point d'une communauté modèle, dont l'élaboration est décrite dans ce chapitre de méthodologie.

Deux milieux de culture ont principalement été utilisés : un milieu rivière dit 'Z' de notre confection, et le milieu commercialisé 'R2' (Melford, Ipswich, Royaume-Uni).

- Milieu Z (rivière) : En octobre 2014, 50 litres d'eau de surface furent prélevés à la station d'échantillonnage de la Senne (Figure 1.4., Lembeek, 50°42'34.56''N, 4°13'3.30''E). Cette eau fut filtrée sur des filtres de 0,2 µm de taille de pores (Millipore, Massachusetts, États-Unis) et autoclavée (20 minutes à 121°C). Ce volume d'eau de rivière constituera le milieu 'rivière' durant l'entièreté de la thèse. Il fut utilisé sous forme liquide ainsi que sous forme solide gélosée (par l'addition de 15 g/L d'agar avant autoclavage).
- Milieu R2 : Ce milieu est recommandé pour la mise en culture de bactéries isolées d'eau potable (Reasoner and Geldreich 1985). Il a été utilisé sous forme liquide (R2B ; 3,2 g/L dans de l'eau distillée) et sous forme solide (R2A ; 3,2 g/L additionné de 15 g/L d'agar dans de l'eau distillée). Composition : Proteose Peptone 0,5 g/L ; Magnesium Sulfate 7H₂O 0,1 g/L ; Sodium Pyruvate 0,3 g/L ; Casein Acid Hydrolysate 0,5 g/L ; Di-Potassium Phosphate 0,3 g/L ; Yeast extract 0,5 g/L ; soluble starch 0,5 g/L ; Glucose 0,5 g/L.

L'isolement des souches bactériennes fut réalisé à partir d'un prélèvement d'un petit volume d'eau de surface à Lembeek en novembre 2014. Les caractéristiques physico-chimiques majeures de l'eau échantillonnée sont reprises dans la Table 2.1. Le dénombrement bactérien a été réalisé par microscopie.

Table 2-1 Caractéristiques physico-chimiques de l'eau échantillonnée en novembre 2014

Température de l'eau (°C)	11,5
pH	6,5
Dénombrement bactérien (cellules/L)	1,39x10 ¹⁰
Matière particulaire en suspension (MES)(mg/L)	228
Carbone organique particulaire (mgC/L)	12,5
Carbone organique dissous (mgC/L)	7,9
PO₄ (mg/L)	0,59
NH₄ (mg/L)	1,07

Nous avons ensuite procédé à de nombreuses dilutions décimales (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6}) de l'eau récoltée dans une solution saline Ringer (Merck, Darmstadt, Allemagne). Cent μL des dilutions 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} ont été étalés sur les milieux gélosés R2A et Z, en triplicats. Les boîtes de Pétri ont été incubées à 20°C pendant 15 jours. Cette température d'incubation est restée la même durant tout le travail de thèse.

Un comptage des colonies a été réalisé au cours du temps pour chaque étalement. Pour toutes les dilutions, un plus grand nombre de colonies fut compté sur le milieu R2A en comparaison au milieu Z (Figure 2.1).

Comptage du nombre de colonies au cours du temps

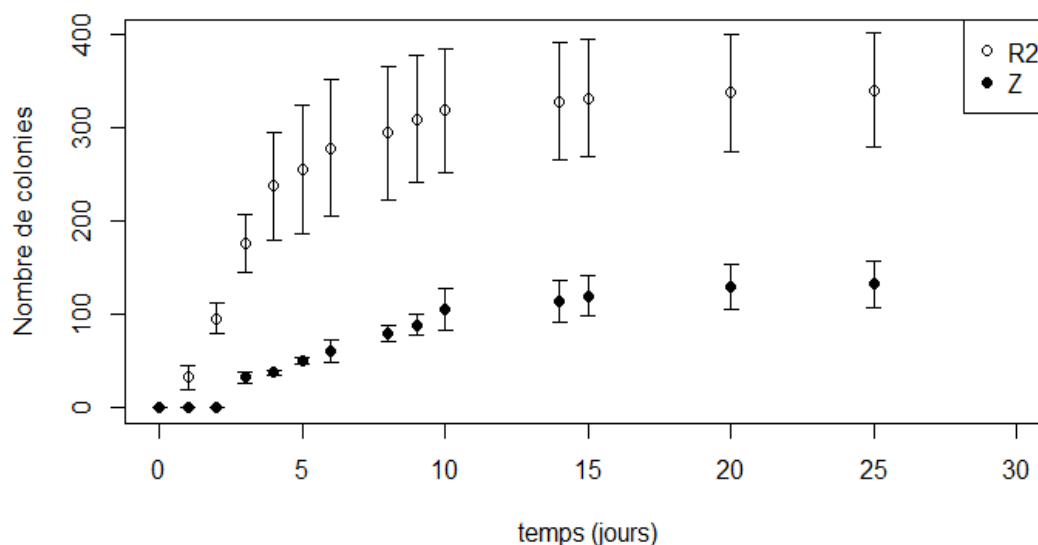


Figure 2-1 Nombre de colonies apparues au cours du temps sur les milieux gélosés R2A et Z pour la dilution décimale 10^{-3} avec l'écart type sur la moyenne sur les trois réplicats.

Des colonies différentes ont été sélectionnées en fonction de critères visuels tels que la couleur, la forme, la taille, la texture et la brillance. Des colonies ont été isolées après des temps d'incubation de 4 et 8 jours en milieu R2 et 4, 8 et 15 jours en milieu Z. Par cette approche, un maximum de colonies différentes a été sélectionné. Les colonies ont été ensuite numérotées selon leur milieu d'isolement (R pour R2A, ou Z) et le nombre de jours d'incubation. Par exemple, la souche 8.4.R est la 8^{ème} souche isolée après 4 jours d'incubation sur le milieu R2A.

L'isolement des souches a été réalisé en prélevant du matériel cellulaire des colonies sélectionnées et en l'étalant en stries afin d'obtenir des colonies isolées et en vérifier la pureté. Une petite quantité d'une colonie pure a été transférée dans 3mL de milieu nutritif R2B. Les fioles ont été agitées et incubées à 20°C pendant 24 à 48 heures.

Des stocks des bactéries sélectionnées ont été réalisés en ajoutant du DMSO à 5% de concentration finale (Gorman and Adley 2004). Le DMSO est un agent cryoprotecteur utilisé pour la congélation de souches à long terme. Les stocks ont été conservés à -80°C.

Enfin, les souches isolées ont été identifiées sur base de la séquence de leur gène codant pour l'ARNr16S. L'ADN fut extrait des colonies par lyse thermique des cellules et amplifié par PCR en présence des primers 27f et 1492r. Les produits PCR furent séquencés par une société externe (Macrogen, Amsterdam, Pays-Bas) avec les primers de séquençage 518F et 800R. L'identification des souches a été réalisée à l'aide de la base de données SILVA (<https://www.arb-silva.de/aligner/>). La base de données BLAST

(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) a été utilisée en cas de non identification par la base de données SILVA.

Un total de 94 souches bactériennes (50 sur milieu R2A et 44 sur milieu Z) ont été isolées de l'eau de rivière. Les souches appartenaient à 4 phylas : *Proteobacteria* (58%), *Bacteroidetes* (22%), *Actinobacteria* (14%) et *Firmicutes* (6%). Chaque phylum était représenté par un nombre variable de genre (Figure 2.2). Dix-sept genres du phylum *Proteobacteria* étaient représentés, 7 genres de *Bacteroidetes*, deux genres de *Firmicutes* et un seul genre d'*Actinobacteria*.

Sept genres⁸ (26%) ont été isolés sur les deux milieux nutritifs utilisés, 11 genres⁹ (41%) ont été isolés uniquement sur R2 et 9 genres¹⁰ (33%) uniquement sur Z. L'utilisation de deux milieux nutritifs différents permet donc d'isoler une plus grande diversité de genre qu'avec un seul de ces deux milieux.

⁸ *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Microbiacterium*, *Massilia*, *Brevundimonas*, *Janthinobacterium*

⁹ *Marisediminicola*, *Rheinheimera*, *Rhizobium*, *Paenibacillus*, *Bacillus*, *Streptomyces*, *Enhydrobacter*, *Delftia*, *Nocardioides*, *Dechloromonas*, *Brevibacterium*

¹⁰ *Comamonas*, *Rahnella*, *Hydrogenophaga*, *Arthrobacter*, *Pelomonas*, *Agromyces*, *Variovorax*, *Ottowia*, *Duganella*

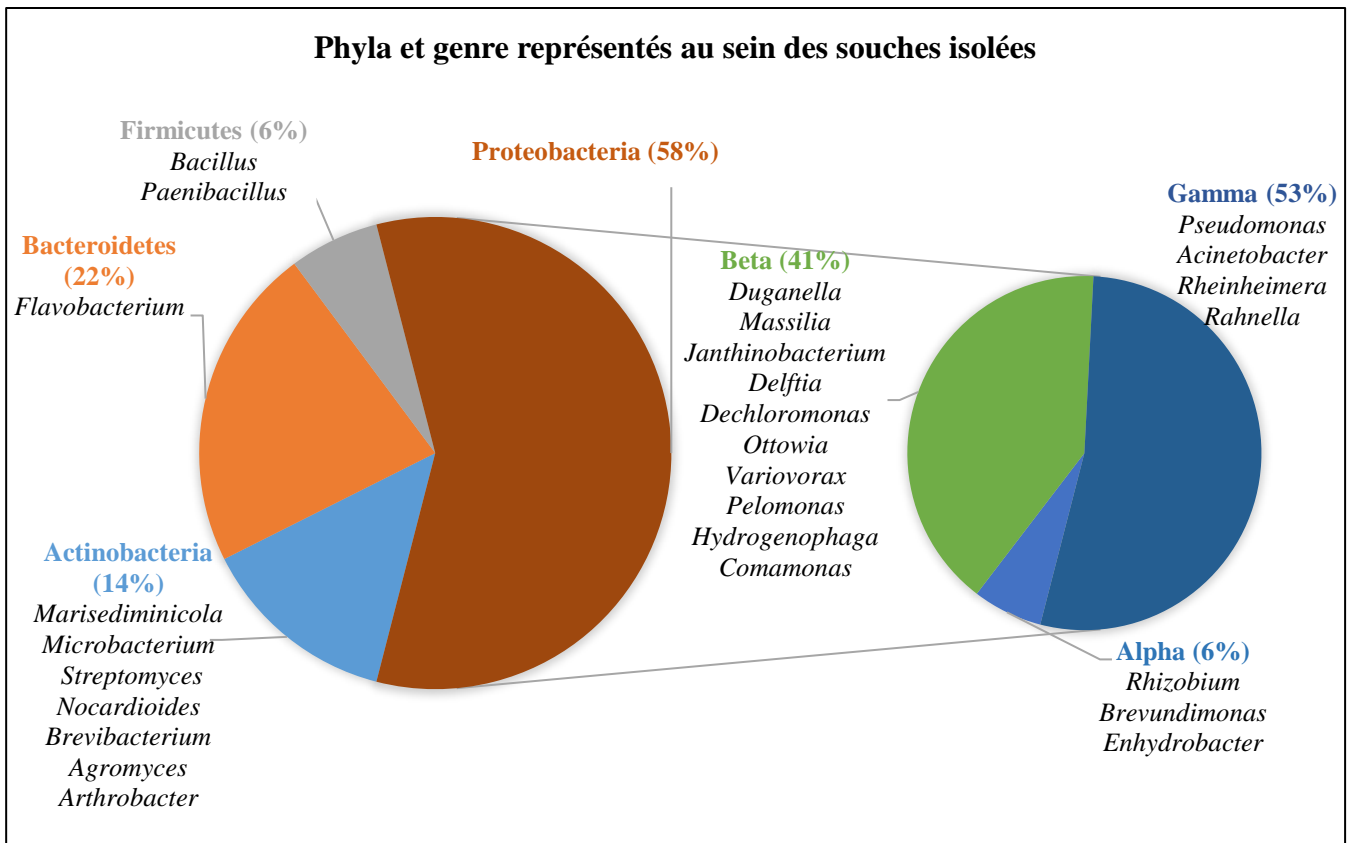


Figure 2-2 Proportion et répartition des phyla (et sous classes de Proteobacteria) et des genres représentés au sein des souches cultivables isolées à partir de l'échantillon collecté à Lembeek (Senne) en novembre 2014.

La croissance de chacune des souches identifiées a ensuite été mesurée en microplaque par suivi de la densité optique à 600nm au cours du temps. Pour chaque souche, le temps de croissance et le plateau atteint en phase stationnaire ont été relevés (données non présentées). Les profils de croissance étaient variés et comprenaient des souches avec une croissance très rapide, d'autres plus lentes avec des valeurs de plateaux diverses.

Afin de construire la communauté modèle, des souches ont été sélectionnées parmi le pool de souches isolées. Les critères de sélection étaient basés sur i) la diversité des genres dans la Senne à la station Lembeek (García-Armisen *et al.* 2014), ii) la diversité des genres cités dans la littérature sur les rivières à travers le monde (Ghai *et al.* 2011; Schultz, Kovatch and Anneken 2013; Read *et al.* 2014) ainsi que les métagénomés disponibles sur le serveur MG-RAST (<https://www.mg-rast.org/>), iii) les profils de croissance des souches (taux de croissance et plateau). Avec cette approche, une communauté la plus représentative possible a été construite contenant des genres importants dans la Senne (et dans d'autres rivières du globe) et présentant des profils de croissance variés.

Pour construire une communauté de 20 souches, 16 souches ont été sélectionnées parmi celles isolées et identifiées. Quatre genres supplémentaires, qui étaient importants dans les données de séquençage mais pas identifiés parmi nos souches isolées, ont été achetés auprès de la société DSMZ (Braunschweig, Allemagne). Ces quatre souches sont *Sphingobacterium psychroaquaticum* (numéro de référence dans le catalogue DSMZ 22418), *Rhodoferax fermentans* (10138), *Limnohabitans curvus* (21645), *Polynucleobacter cosmopolitanus* (21490).

La Table 2.2 présente les 20 souches composant la communauté modèle avec laquelle nous avons travaillé dans la suite de la thèse. La communauté modèle est composée de 50% de *Proteobacteria* (dont 35% de *Beta*-, 10% d'*Alpha* et 5% de *Gamma*-), 25% de *Bacteroidetes*, 20% d'*Actinobacteria* et 5% de *Firmicutes*.

Table 2-2 Table des souches composant la communauté modèle

Souches sélectionnées parmi les souches isolées		
Numéro de souche	Phylum	Genre
94R	<i>Bacteroidetes</i>	<i>Flavobacterium</i>
515Z	<i>Bacteroidetes</i>	<i>Flavobacterium</i>
12.4.Z	<i>β-Proteobacteria</i>	<i>Hydrogenophaga</i>
14.8.R	<i>β-Proteobacteria</i>	<i>Dechloromonas</i>
4.4.Z	<i>γ-Proteobacteria</i>	<i>Acinetobacter</i>
8.4.R	<i>Bacteroidetes</i>	<i>Flavobacterium</i>
16.8.R	<i>Actinobacteria</i>	<i>Streptomyces</i>
5.8.R	<i>Actinobacteria</i>	<i>Streptomyces</i>
2.8.Z	<i>Actinobacteria</i>	<i>Arthrobacter</i>
13.8.R	<i>Actinobacteria</i>	<i>Nocardioïdes</i>
13.15.Z	<i>β-Proteobacteria</i>	<i>Variovorax</i>
1.8.R	<i>Firmicutes</i>	<i>Bacillus</i>
78R	<i>β-Proteobacteria</i>	<i>Janthinobacterium</i>
11.4.R	<i>α-Proteobacteria</i>	<i>Rhizobium</i>
1.8.Z	<i>α-Proteobacteria</i>	<i>Brevundimonas</i>
21.8.R	<i>Bacteroidetes</i>	<i>Paenibacillus</i>
Souches achetées pour compléter la collection		
22418	<i>Bacteroidetes</i>	<i>Sphingobacterium psychroaquaticum</i>
10138	<i>β-Proteobacteria</i>	<i>Rhodoferrax fermentans</i>
21645	<i>β-Proteobacteria</i>	<i>Limnohabitans curvus</i>
21490	<i>β-Proteobacteria</i>	<i>Polynucleobacter cosmopolitanus</i>

CHAPITRE 3

LES PROFILS D'UTILISATION DE CARBONE DE BACTÉRIES DE RIVIÈRES SOUMISES À DES SOURCES UNIQUES DE CARBONE SUGGÈRENT DES INTERACTIONS MÉTABOLIQUES

3. Les profils d'utilisation de carbone de bactéries de rivières soumises à des sources uniques de carbone suggèrent des interactions métaboliques

Les bactéries hétérotrophes sont responsables d'une large fraction de la respiration et de la production secondaire dans les environnements aquatiques (Benner *et al.* 1995; Del Giorgio and Cole 1998). Par la minéralisation de la matière organique, elles exercent une forte influence sur la composition du carbone organique dissous (COD) et particulaire dans les rivières. Le COD constitue une grande source d'énergie pour les microorganismes dans les écosystèmes aquatiques et, étant donné son rapide taux de renouvellement, il ne tend pas à s'accumuler dans ce milieu (Fisher and Likens 1973). Le COD est présent sous de nombreuses formes dans les eaux ; les molécules formant le COD peuvent se caractériser par leur poids moléculaire, leur aromaticité et leur origine (algale, terrestre, végétale, anthropique...) (Fisher *et al.* 2000; Guillemette and Giorgio 2011). Cette hétérogénéité des sources et des types de composés formant le COD en rivières induit des grandes variations dans la vitesse de consommation par les bactéries hétérotrophes. Par simplification on classe souvent les composés formant le COD en trois classes de biodégradabilité : labile, semi-labile et récalcitrant.

Les espèces bactériennes présentent divers profils d'utilisation de carbone et varient selon leur degré de spécialisation. Certaines souches, dites généralistes, sont capables de cataboliser un grand nombre de sources de carbone tandis que d'autres, dites spécialistes, en catabolisent un nombre plus restreint (Gravel *et al.* 2011). Certaines sont très adaptées à la consommation des sources du compartiment labile tandis que d'autres sont capables de cataboliser les sources plus réticentes à la biodégradation.

Malgré l'hétérogénéité des sources de COD, de nombreuses études expérimentales ont été conduites sur l'assimilation du glucose comme source de carbone de référence. Pour cette raison, nous avons décidé d'étudier le profil de croissance des 20 souches de la communauté modèle en les testant sur plus de 190 sources de carbone différentes. Les résultats de ces essais ont fait l'objet d'une publication présentée dans ce chapitre : « Carbon utilization profiles of river bacterial strains facing sole carbon sources suggest metabolic interactions » (Goetghebuer L, Servais P, George IF, *FEMS Microbiology Letters*, 2017, 364(10), fnx098).

Résumé

Les communautés bactériennes de rivières jouent un rôle clé dans l'auto-épuration des eaux. Elles sont le principal moteur des cycles biogéochimiques des éléments biogènes et du fonctionnement des écosystèmes. Pourtant, ces communautés restent, à ce jour, peu caractérisées. Afin de comprendre la relation diversité-activité hétérotrophe face à des sources de carbone seules, nous avons assemblé une communauté modèle composée de 20 souches d'espèces bactériennes 'typiques' d'eau douce principalement isolées dans la rivière Senne (Belgique). Les profils d'utilisation de carbone de chaque souche individuelle ainsi que de la communauté modèle furent mesurés dans des microplaques Biolog Phenotype Microarray PM1 et PM2 qui permettent de tester 190 sources de carbone différentes. Nos résultats suggèrent fortement des interactions se déroulant entre les espèces formant notre communauté modèle. En effet, cette dernière présentait des propriétés métaboliques qui n'étaient présentes chez aucune des souches individuelles la composant. Enfin, la performance catabolique de la communauté modèle fut comparée avec celle de la communauté naturelle à la station d'échantillonnage (Lembeek). La communauté modèle présentait un comportement relativement similaire à la communauté naturelle, ce qui nous assure d'une bonne représentativité à l'égard de la consommation de sources de carbone.

Carbon utilization profiles of river bacterial strains facing sole carbon sources suggest metabolic interactions

L. Goetghebuer, P. Servais, I. George

Corresponding author: lise.goetghebuer@ulb.ac.be, mailing address: Ecology of Aquatic Systems, Université Libre de Bruxelles, Campus de la Plaine, Brussels, Belgium

One sentence summary: This paper focuses on the catabolic performances of 20 strains commonly found in rivers in pure and mixed cultures facing over 190 carbon sources.

Abstract- Microbial communities play a key role in water self-purification. They are primary drivers of biogenic element cycles and ecosystem processes. However, these communities remain largely uncharacterized. In order to understand the diversity-heterotrophic activity relationship facing sole carbon sources, we assembled a synthetic community composed of 20 ‘typical’ freshwater bacterial species mainly isolated from the Zenne River (Belgium). The carbon source utilization profiles of each individual strain and of the mixed community were measured in Biolog Phenotype MicroArrays PM1 and PM2A microplates that allowed testing 190 different carbon sources. Our results strongly suggest interactions occurring between our planktonic strains as our synthetic community showed metabolic properties that were not displayed by its single components. Finally, the catabolic performances of the synthetic community and a natural community from the same sampling site were compared. The synthetic community behaved like the natural one and was therefore representative of the latter in regard to carbon source consumption.

Introduction

Bacteria are primary drivers of the recycling of organic matter in river ecosystems (Amon and Benner 1996; Cole *et al.* 2007). This natural self-purification of running waters is assumed to depend on the structure of microbial communities and its dynamics although the relationship between diversity and heterotrophic activity remains poorly understood (Bell *et al.* 2005; Berga, Székely and Langenheder 2012; Logue *et al.* 2016).

Until the mid-2000’s, microbial diversity of running waters was studied through cultivation techniques, PCR-DGGE, FISH and clone libraries (Sekiguchi *et al.* 2002; Zwart *et al.* 2002; Cottrell *et al.* 2005; Crump and Hobbie 2005). Since then and thanks to advances and cost reduction in sequencing technologies, a small number of studies have been published on the thorough characterization of phylogenetic microbial diversity in rivers all over the world (Ghai *et al.* 2011; García-Armisen *et al.* 2014; de Oliveira and Margis 2015; Savio *et al.* 2015).

The characterization of natural river communities is complicated due to their inherent diversity that prevents easy discrimination of species performing key functions, and due to rapidly changing abiotic conditions possibly driving their makeup (e.g. pH, temperature, dissolved oxygen, nutrient concentration, dissolved organic carbon etc.) (Bai *et al.* 2013; Staley *et al.* 2013; Read *et al.* 2014).

Nevertheless, some taxa are commonly found in rivers, such as *Proteobacteria* (mostly the *Beta* subclass), *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Verrucomicrobia* and *Firmicutes* (Bai *et al.* 2013; Schultz, Kovatch and Anneken 2013; Kolmakova *et al.* 2014; Read *et al.* 2014). The structure of microbial communities is more and more studied through co-occurrence networks. Widder *et al.* (2014) focused on stream biofilm communities. Their results suggested the existence of positive and negative interactions between some taxa. Yet those interactions are hardly ever verified, and their influence on community function (organic carbon degradation in our case) has been little studied to date.

In this work, the metabolic performance of twenty strains commonly found in rivers was studied in pure and mixed cultures. The goal was to assess the degree of functional redundancy between heterotrophic planktonic bacteria, the relationship between phylogenetic distance and differences in substrate utilization patterns and the possibility that unique metabolic properties can emerge from the community compared to its single components.

Metabolic performance was measured in defined conditions through both productivity and carbon source utilization profile using the Biolog Phenotype Microarray (PM) technology. PM assays measure the utilization of 190 carbon sources (C sources) through the reduction of a redox dye that reveals cell respiration. Finally, the performances of this synthetic community and a natural community from the same sampling site were compared to assess whether our synthetic community behaved like the natural one in regard to carbon substrate utilization.

Material and methods

Isolation and selection of bacterial strains

A total of 94 bacterial strains were isolated from the water column of the Zenne River (Belgium) in November 2014. This river located in the Scheldt drainage network is 103km long and its watershed (991km²) is characterized by agricultural activities in its upstream part and by a heavily urbanized area (Brussels area) in its downstream part (Brion *et al.* 2015). The sampling site was located upstream from Brussels (Lembeek, 50°42'34.56"N, 4°13'3.30"E). The river water was serially 10-fold diluted, inoculated in replicates on two different agar media, R2A (Melford, Ipswich, UK) (Reasoner and Geldreich 1985) and a medium named Z consisting of water from the sampling site filtered on 0.2µm pore-size membranes (Whatman, Maidstone, UK) and supplemented with 15g/L of agar (VWR, Radnor, USA). The plates were incubated for up to 15 days at 20°C. Most bacteria were isolated after 4, 8 and 15 days of incubation, purified and

kept in R2B medium supplemented by 5% DMSO (vol/vol) at -80°C. Phylogenetic affiliation of the strains was performed by amplifying their 16S rRNA gene(s) using primers 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') and 1492R (5'-GGYTACCTTGTTACGACTT-3'). Amplicons were sequenced using primer 338F (5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3'). Sequences were compared to the reference SILVA database (<http://www.arb-silva.de>). Of these 94 strains, 16 were chosen to build up a synthetic river bacterial community based on bacterial community composition measured *in situ* at the same sampling station by Garcia-Armisen et al (2014) (by 454 pyrosequencing of 16S rRNA gene fragments) and/or mentioned in other studies on riverine bacterial community composition (Schultz *et al* 2013, Read *et al*, 2014, Ghai *et al*, 2011, Kolmakova *et al*, 2014; MG-Rast datasets 4510359.3, 4556434.3, 4498070.3, 4511246.3 and 4533663.3). The selected strains belonged to ubiquitous genera representing more than 1% of the community composition in at least one of the aforementioned datasets. Four taxa (*Sphingobacterium psychroaquaticum* 22418, *Rhodoferrax fermentans* 10138, *Limnohabitans curvus* 21645, *Polynucleobacter cosmopolitanus* 21490) were purchased from the DSMZ culture collection, as they were also abundant in river ecosystems (including the Zenne River) but could not be isolated using our experimental procedure. The phylogenetic diversity of our synthetic community is presented in Figure 3.1.

Performances of the mixed community and individual strains in R2B

First, the 20 strains were grown in pure cultures in R2B medium. At mid-exponential phase, 50µL of each culture was inoculated in 4 ml of R2B medium. To prepare the mixed community, the 20 strains were grown in pure cultures in R2B medium for 48 hours. Then the cultures were diluted to an OD_{600nm} of 0.1 and mixed in equal volume. Fifty µL of the mixed community was inoculated in 4 ml of R2B medium.

Pure strains and the mixed community were grown in R2B medium in quadruplicate at 20°C. Performance (biomass increase) was defined as the final OD_{600nm} measured at the stationary phase in an absorbance microplate reader (SpectraMax Plus 384, Molecular Devices). It was compared with individual strain performance. A Paired Student's t-test (0.05 confidence level, n=4) was applied to test whether differences were significant or not.

Phenotype microarray

The carbon utilization profiles of the 20 pure strains, the mixed community and the natural community were characterized using the PM microplates PM1 and PM2A (Biolog, Inc) that test the catabolism of 190 different carbon sources. Each well of the PM plates contained a specific C source. Procedures were performed as recommended by the manufacturer. Briefly, wells were inoculated with cells, all necessary nutrients except C sources (as stated by the manufacturer) and a redox dye. Cells were preliminary grown on R2A separately, then added to the PM medium in pure or in mixed

culture to reach the same initial absorbance in every test ($OD_{600nm}=0.1$). To analyze the carbon utilization profile of the natural community, water from the sampling station was filtered and bacteria retained on the 0.2 μm pore-size membrane were resuspended in a small volume of that same water to get the same initial absorbance as for the pure strains and mixed synthetic community. In each well, catabolism of the C source was measured as purple color development (CD), as this change in color was due to the reduction of a colorless tetrazolium dye by NADH molecules produced by the catabolic activity. CD was measured after 48h (corresponding to the stationary phase) at 20°C in an absorbance microplate reader at the optical density OD_{590nm} (after subtraction of reading at

OD_{750nm} following the manufacturer's instructions). We set the optical density threshold value at 0.06 determined as the mean background value. Only strains with a CD max exceeding this threshold were considered positive for the studied C source. For the latter, results for the negative control well A1 containing no C source were subtracted from the other data. The results obtained with the pure strains, the mixed community and the natural community were further compared and the same threshold value was used. We checked that the number of positive wells was reproducible for the mixed community, five pure strains and the natural community in duplicates or triplicates (data not shown).

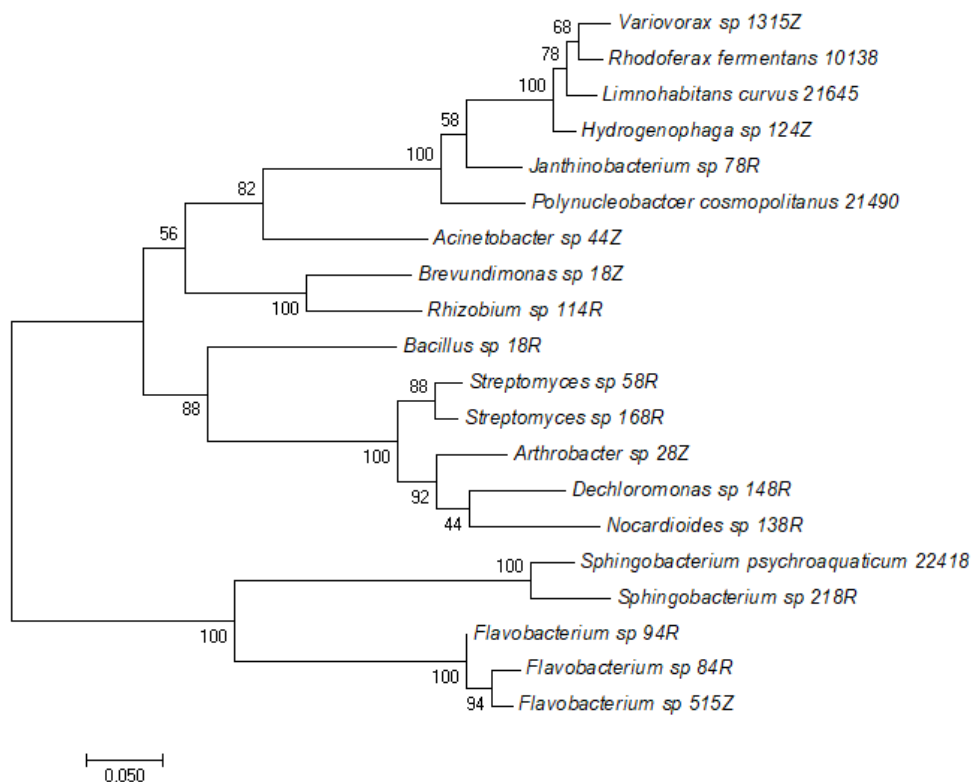


Figure 3-1 Phylogenetic tree of the 20 strains' 16S rRNA gene sequence. The evolutionary tree was inferred in MEGA7 by the maximum-likelihood method based on the Kimura 2-parameter model. Bootstrap values are shown on internal nodes (500 bootstraps).

Results and discussion

Pure strains, mixed and natural community's performance

First, the productivity (defined as the final bacterial biomass produced) of the 20 strains was measured in R2B medium (Figure 3.2). Although this medium is recommended for subcultures of fastidious strains isolated from potable water samples (Reasoner and Geldreich 1985), strong differences of performance were observed. The maximum absorbance values measured for pure strains at 600 nm ranged from (0.054 ± 0.004) for *P. cosmopolitanus* to (0.752 ± 0.075) for *Nocardioides sp.* That suggests that strains are not perfectly functionally redundant. In fact, if our strains were perfectly functionally redundant, all the strains should behave similarly when facing the same nutrient medium as long as they would utilize the same resources at the same rate (Allison and Martiny 2008). Nevertheless, some strains showed similar performance, as well as the natural and our synthetic community suggesting a comparable behavior in the R2B nutrient medium.

Second, the mix of 20 strains had greater performance in R2B than 18 out of 20 pure strains (Figure 3.2). The productivity-diversity relationship is one of the most studied issues in biology. Lots of experiments have demonstrated that community richness enhances productivity (Bell *et al.* 2005; Balvanera *et al.* 2006; Cardinale *et al.* 2006; Berga, Székely and Langenheder 2012). This positive productivity-richness relationship can be explained by two processes: the higher

probability to select strains that are highly productive, or a complementarity in the use of limiting resources. The latter ecological concept is known as niche partitioning; the medium is better exploited, resulting in an enhanced productivity (Loreau and Hector 2001). This way, richness regulates the efficiency by which resources are consumed and converted into biomass. As an extreme example with a richness jumping from 1 to 20 strains, the majority of our results support this theory, as only 2 strains performed better alone than the synthetic community

Single C source utilization

R2B medium is uncharacterized and includes a large variety of carbon and energy sources at a low concentration that would easily explain niche partitioning among microbes. Therefore, the carbon utilization profile of the 20 pure strains was further investigated with the PM method.

Figure 3.3 shows the number of C sources metabolized by each strain in the conditions recommended by the manufacturer. They all showed different carbon utilization profiles, confirming the lack of functional redundancy suggested above. After 48 hours, strains catabolized between 20 and 110 C sources individually. Big variations in the number of C sources utilized were observed between strains from different genera as well as within strains from the same genera (i.e. *Flavobacterium* 515Z and 94R respectively catabolized 20 and 46 C sources). According to the classification of (Gravel *et al.* 2011), 3 strains (94R, 124Z, 18Z) using less than 15% of the C sources could be

considered as specialists, while other using a larger range of C sources were more adapted to environmental heterogeneity and could be considered as generalists. Interestingly, the number of C sources catabolized was not related to the strain's performance in R2B (Figure 3.2), as strains catabolizing a large range of C sources

were not necessarily the most performant ones and vice versa. That can be due to the fact that R2B medium includes other C sources than the ones tested in the PM plates and/or to the unsuitable composition of the inoculation medium (provided with the PM plates) for the growth of some strains.

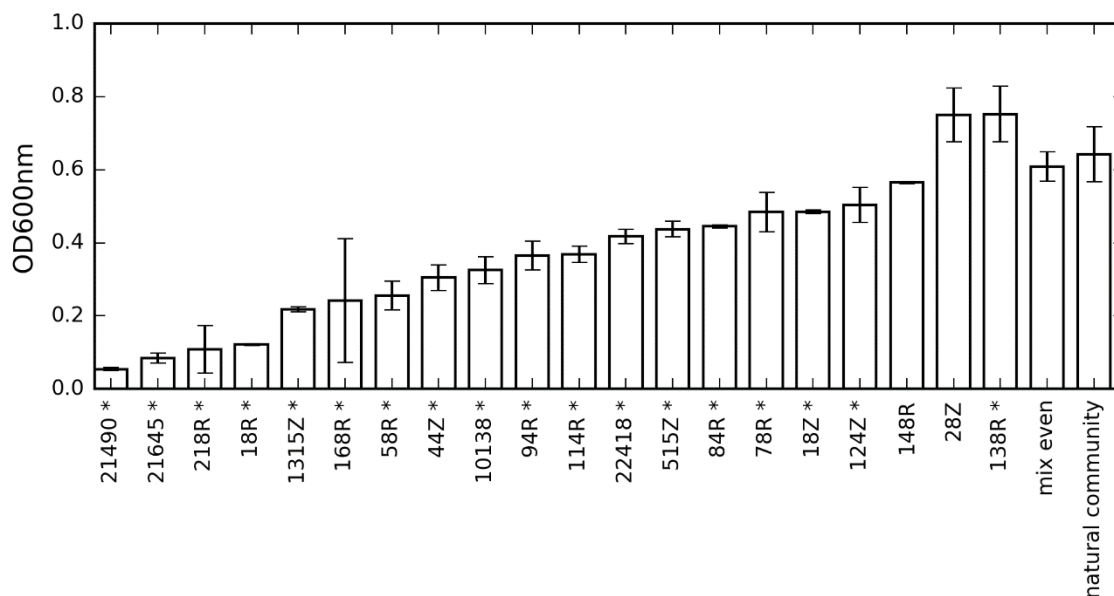


Figure 3-2 Comparison of the final OD600nm of pure strains, the initially even community mix and the natural community in R2B medium (n = 3). An asterisk indicates that the performances of the pure strains and the initially even community are significantly different (P < 0.05).

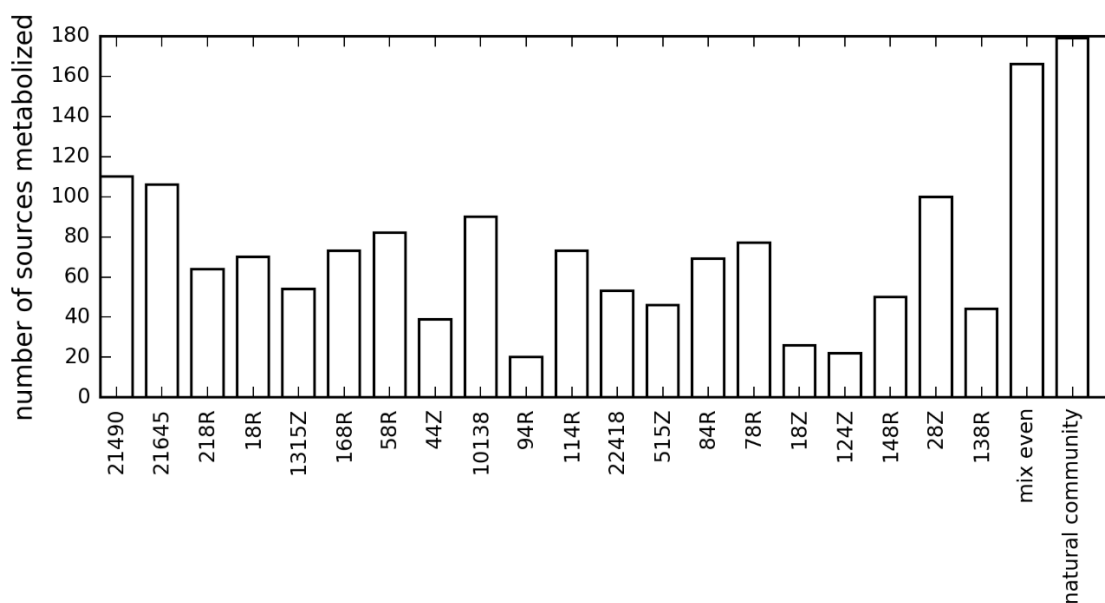


Figure 3-3 Number of C sources catabolized by each strain in Biolog plates.

Carbon utilization profile of the mixed and natural community

A total of 173 out of the 190 (91%) C sources were catabolized by at least one strain. The final CD measured in each well ranged from 0.06 to 1.39 (see supplementary data). The PM plates were then carried out with the mix of 20 strains. For each C source, the final color development (CD) obtained with the mix and the best performing pure strain for that C source (Figure 3.4a) were compared, as well as with the natural community (Figure 3.4b). A difference was significant when it exceeded the threshold set (see Material and Methods).

A great part of the C sources were better (41%) or only (2%) catabolized by the mixed community than by the best performing single strain (Figure 3.4a). In other words, the mixed community performed better than single strains for 43% of the C sources. A lower number of C sources were similarly used by the mixed community and the best performing single strains (15%). Other C sources were better (26%) or only (9%) used by single strains. Finally, 7% of the C sources were not utilized at all, neither by the mixed community nor by single strains¹¹.

When the mixed community performed weaker than the best performing strain, it is likely due to strong competition in the disadvantage of the best performing strain. That is, the increasing diversity induces a direct competition regarding

the resource first, often leading to an indirect competition through the production of toxins having antagonism impacts on other strains. Both direct and indirect competitions can cause the downfall of the performance resulting in a 'negative complementarity effect' (Becker *et al.* 2012). As an example, if 17 (9%) C sources were only degraded by one or several strains and not by the mix containing all strains, it is likely because the former were not competitive in the mix and therefore their growth was inhibited.

When a C source was better or only catabolized by the community, it cannot be explained by complementarity (niche partitioning) towards various C sources anymore, but it is likely due to metabolic complementarity in the catabolism of that C source. Such cooperative interactions in carbon source consumption were reported to occur through cross-feeding of co-factors, for example when a strain B is feeding on the waste(s) of a strain A (Freilich *et al.* 2011). Among the 190 C sources tested in the PM1 and PM2 plates, the ones that were better or only catabolized by the mix comprised numerous fatty acids, peptides, amino acids, nucleotides and dicarboxylic acids. The C sources tested were not complex compounds requiring rare catabolic pathways, but, it has been shown that consortia degrading simple C sources can also exhibit good degradation performances in the presence of challenging and complex

¹¹ Those sources were : D-Galactonic Acid- γ -Lactone ; 1,2-Propanediol ; D-Threonine ; Glycolic Acid ; Glyoxylic Acid ; 2-Aminoethanol ; D-Fucose ; L-Glucose ; N-Acetyl-DGlucosaminitol ; 2-Hydroxy Benzoic

Acid ; Itaconic Acid ; Oxalic Acid ; L-Homoserine ; 2,3-Butanone

compounds such as pollutants (Horemans, Smolders and Springael 2013). In further experiments, analysis of temporal shift in BCC would allow to identify the interacting players in the community.

Although the carbon utilization profiles observed in the conditions used here are not expected to be identical in the river habitat, the same kind of interactions are possibly occurring in the latter. We therefore focused on the performance of the natural community facing the same C sources. Figure 3.4b shows the comparison of the mixed community performance with the one of the natural community. Although the intensity of the performance was variable (See supplementary data), 99% of the C sources catabolized by our synthetic community was also catabolized by the natural community. This suggests that our community was representative of the natural community in regard to consumption of simple

C sources. Yet, 12% of the C sources (included in very diverse substrate subclasses) were only used by the natural community. Even though the strains composing the natural community are probably not all active, its richness is assumed to be much higher than the mixed community one (in average several thousands of OTUs) (Savio *et al.* 2015), and so are the possible interactions. It is also likely to contain genera able to catabolize C sources that weren't used by our pure strains nor by the mixed community.

To the best of our knowledge, this study is the first using PM technology to characterize the physiological profile of riverine heterotrophic bacteria. We could observe that our synthetic community showed physiological properties which were not displayed by the pure strains composing it and seemed to be representative of a much more complex natural community.

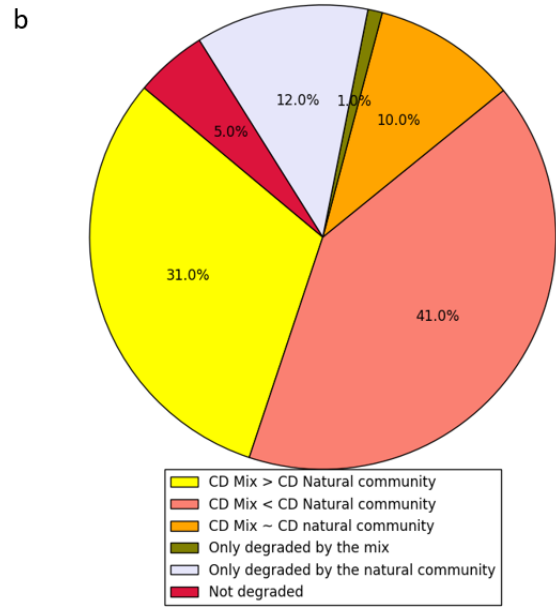
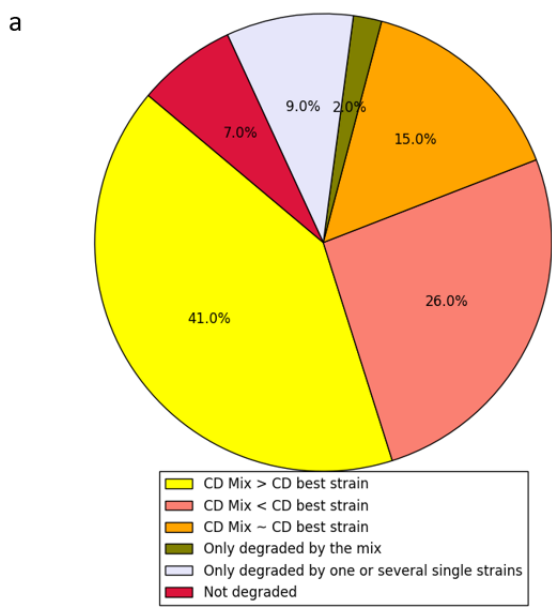
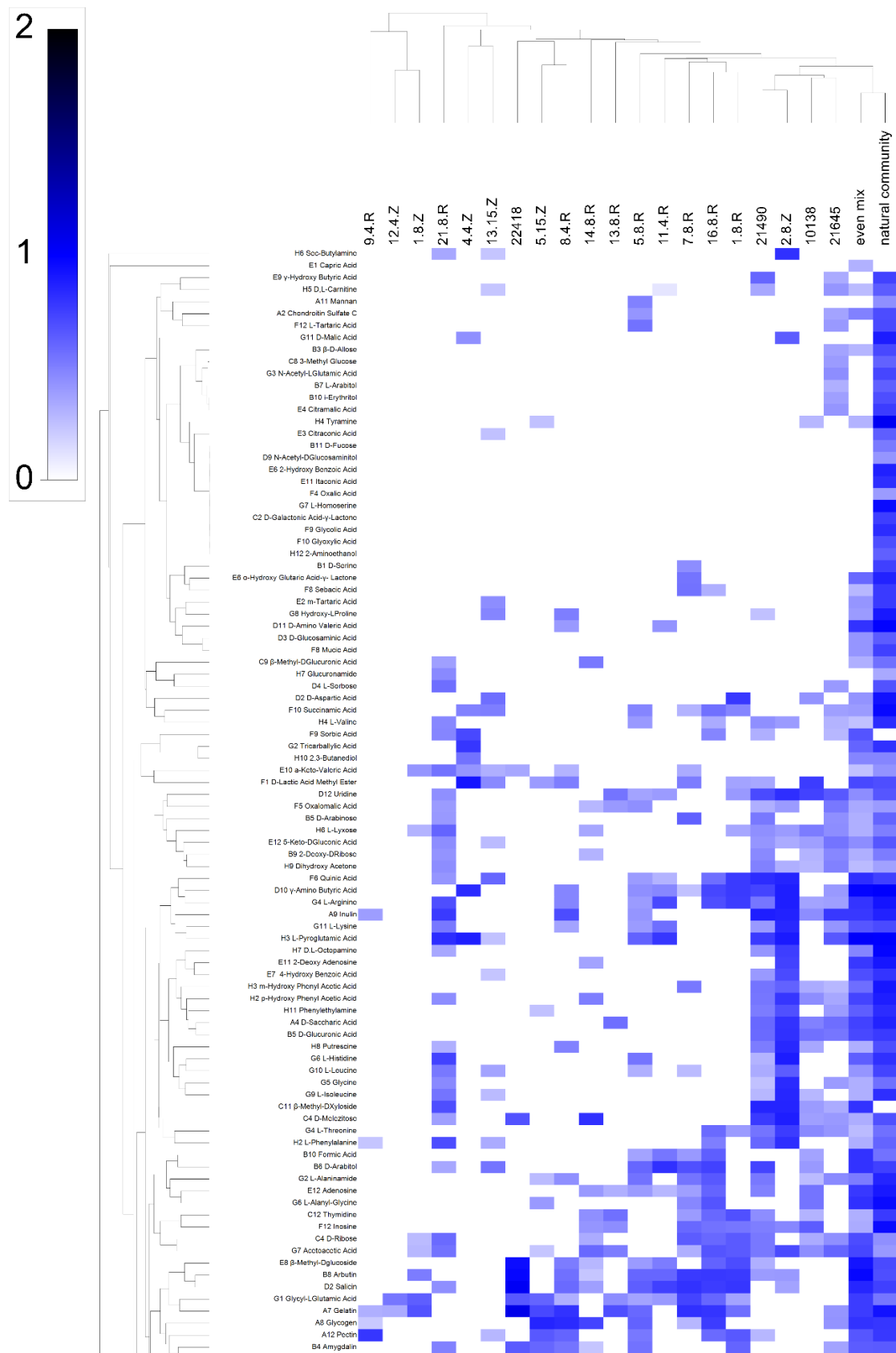
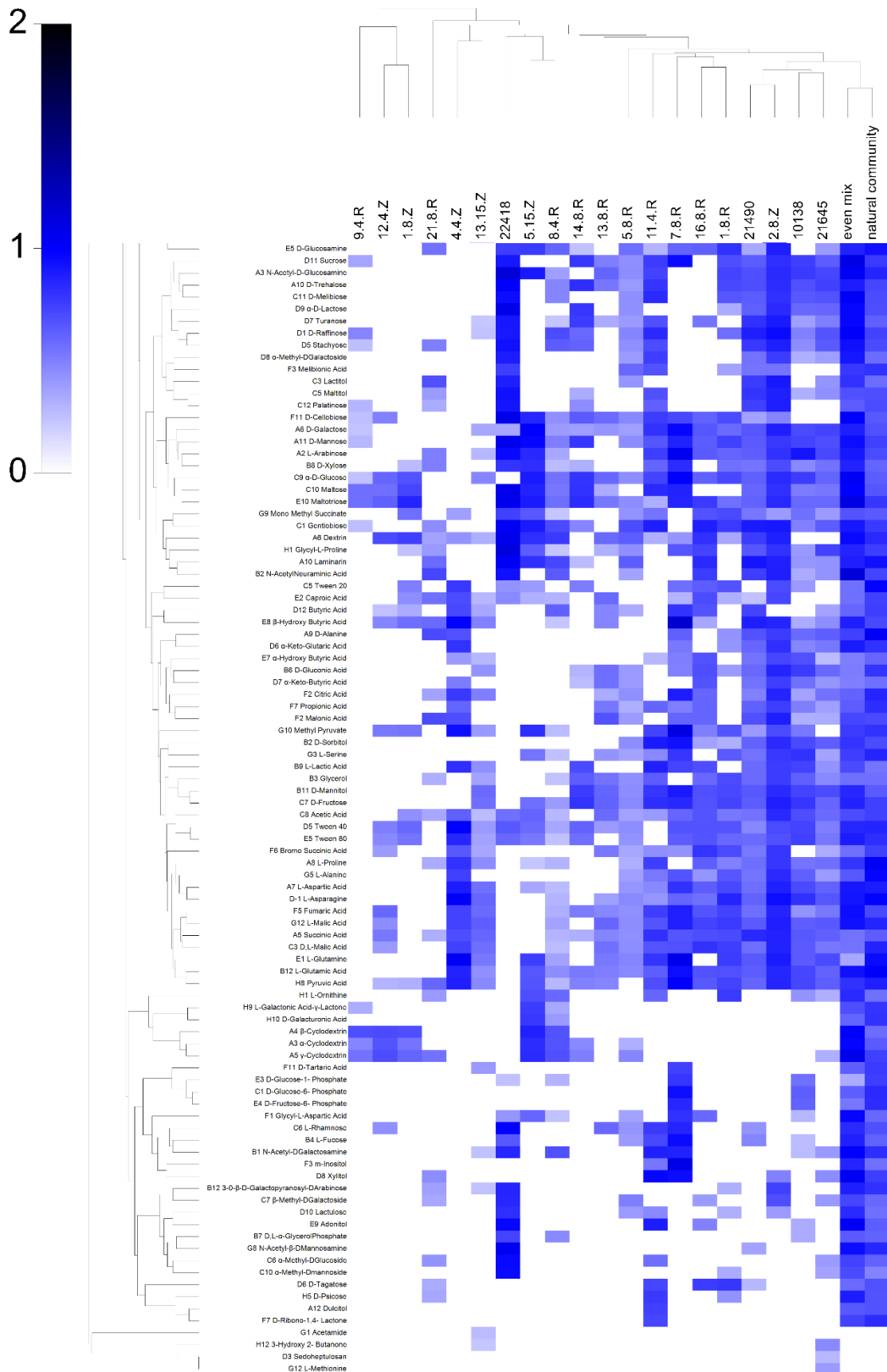


Figure 3-4 Comparison of the intensity of carbon catabolism (CD measured in PM microplate) by the mixed community (20 strains) with (a) the best-performing strain for each of the 190 C sources tested and (b) the natural community performance.

Supplementary data



Supp 3-1 Carbon utilization profiles of the 20 pure strains, the even mixed community and the natural community. The intensity of the blue color represents the CD after 48 hours (partie 1)



Supp 3-1 Carbon utilization profiles of the 20 pure strains, the even mixed community and the natural community. The intensity of the blue color represents the CD after 48 hours (partie 2)

Funding

This work was supported by Fonds National de la Recherche Scientifique in the scope of the project “DYNAMO” [T.1037.14]

References

- Allison SD, Martiny JBH. Resistance, resilience, and redundancy in microbial communities. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;**105**:11512–9.
- Amon RMW, Benner R. Bacterial utilization of different size classes of dissolved organic matter. *Limnol Oceanogr* 1996;**41**:41–51.
- Bai Y, Qi W, Liang J *et al.* Using high-throughput sequencing to assess the impacts of treated and untreated wastewater discharge on prokaryotic communities in an urban river. *Appl Microbiol Biotechnol* 2013;**98**:1841–51.
- Balvanera P, Pfisterer AB, Buchmann N *et al.* Quantifying the evidence for biodiversity effects on ecosystem functioning and services. *Ecol Lett* 2006;**9**:1146–56.
- Becker J, Eisenhauer N, Scheu S *et al.* Increasing antagonistic interactions cause bacterial communities to collapse at high diversity. *Ecol Lett* 2012;**15**:468–74.
- Bell T, A. Newman J, W. Silverman B *et al.* The contribution of species richness and composition to bacterial services. *Nature* 2005;**436**:1157–60.
- Berga M, Székely AJ, Langenheder S. Effects of Disturbance Intensity and Frequency on Bacterial Community Composition and Function. *PLoS ONE* 2012;**7**:e36959.
- Brion N, Verbanck MA, Bauwens W *et al.* Assessing the impacts of wastewater treatment implementation on the water quality of a small urban river over the past 40 years. *Environ Sci Pollut Res* 2015;**22**:12720–36.
- Cardinale BJ, Srivastava DS, Emmett Duffy J *et al.* Effects of biodiversity on the functioning of trophic groups and ecosystems. *Nature* 2006;**443**:989–92.
- Cole JJ, Prairie YT, Caraco NF *et al.* Plumbing the Global Carbon Cycle: Integrating Inland Waters into the Terrestrial Carbon Budget. *Ecosystems* 2007;**10**:171–84.
- Cottrell MT, Waidner LA, Yu L *et al.* Bacterial diversity of metagenomic and PCR libraries from the Delaware River. *Environ Microbiol* 2005;**7**:1883–95.
- Crump BC, Hobbie JE. Synchrony and seasonality in bacterioplankton communities of two temperate rivers. *Limnol Oceanogr* 2005;**50**:1718–29.
- Freilich S, Zarecki R, Eilam O *et al.* Competitive and cooperative metabolic interactions in bacterial communities. *Nat Commun* 2011;**2**:589.
- García-Armisen T, Inceoğlu Ö, Ouattara NK *et al.* Seasonal Variations and Resilience of Bacterial Communities in a Sewage Polluted Urban River. *PLoS ONE* 2014;**9**:e92579.
- Ghai R, Rodriguez-Valera F, McMahon KD *et al.* Metagenomics of the Water Column in the Pristine Upper Course of the Amazon River. *PLoS ONE* 2011;**6**:e23785.
- Gravel D, Bell T, Barbera C *et al.* Experimental niche evolution alters the strength of the diversity-productivity relationship. *Nature* 2011;**469**:89–92.
- Horemans B, Smolders E, Springael D. Carbon source utilization profiles suggest additional metabolic interactions in a synergistic linuron-degrading bacterial consortium. *FEMS Microbiol Ecol* 2013;**84**:24–34.
- Kolmakova OV, Gladyshev MI, Rozanov AS *et al.* Spatial biodiversity of bacteria along the largest Arctic river determined by next-generation

- sequencing. *FEMS Microbiol Ecol* 2014;**89**:442–50.
- Logue JB, Stedmon CA, Kellerman AM *et al.* Experimental insights into the importance of aquatic bacterial community composition to the degradation of dissolved organic matter. *ISME J* 2016;**10**:533–45.
- Loreau M, Hector A. Partitioning selection and complementarity in biodiversity experiments. *Nature* 2001;**412**:72–6.
- de Oliveira LFV, Margis R. The Source of the River as a Nursery for Microbial Diversity. *PLoS ONE* 2015;**10**:e0120608.
- Read DS, Gweon HS, Bowes MJ *et al.* Catchment-scale biogeography of riverine bacterioplankton. *ISME J* 2014, DOI: 10.1038/ismej.2014.166.
- Reasoner DJ, Geldreich EE. A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water. *Appl Environ Microbiol* 1985;**49**:1–7.
- Savio D, Sinclair L, Ijaz UZ *et al.* Bacterial diversity along a 2 600 km river continuum. *bioRxiv* 2015:010041.
- Schultz GE, Kovatch JJ, Anneken EM. Bacterial diversity in a large, temperate, heavily modified river, as determined by pyrosequencing. *Aquat Microb Ecol* 2013;**70**:169–79.
- Sekiguchi H, Watanabe M, Nakahara T *et al.* Succession of Bacterial Community Structure along the Changjiang River Determined by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis and Clone Library Analysis. *Appl Environ Microbiol* 2002;**68**:5142–50.
- Staley C, Unno T, Gould T j. *et al.* Application of Illumina next-generation sequencing to characterize the bacterial community of the Upper Mississippi River. *J Appl Microbiol* 2013;**115**:1147–58.
- Widder S, Besemer K, Singer GA *et al.* Fluvial network organization imprints on microbial co-occurrence networks. *Proc Natl Acad Sci* 2014;**111**:12799–804.
- Zwart G, Crump BC, Agterveld MPK *et al.* Typical freshwater bacteria: an analysis of available 16S rRNA gene sequences from plankton of lakes and rivers. *Aquat Microb Ecol* 2002;**28**:141–55.

3.1. Production de substances antagonistes par les bactéries de la communauté

Les résultats de nos manipulations menées en microplaques Biolog suggèrent l'existence d'interactions au sein de la communauté. Une meilleure performance de dégradation des sources simples par la communauté indiquait l'existence d'interactions positives tandis qu'une moins bonne dégradation supputait de potentielles interactions négatives.

L'étude des interactions microbiennes au sein des communautés est complexe. Mais il existe quelques manipulations simples permettant d'étudier les interactions probables entre souches bactériennes. Par exemple, les interactions négatives, dites d'antagonisme, entre deux souches peuvent être facilement mesurées via des tests d'antagonisme en double couche gélosée. Le test a été réalisé comme décrit dans *Marinho et al.* (2009) avec quelques modifications et est schématisé à la Figure 3.5. Brièvement, le test consiste en l'ensemencement de gouttes de culture liquide des souches potentiellement productrices de substances antimicrobiennes sur un milieu gélosé R2A. Après 48 heures d'incubation à 20°C et obtention de colonies denses, les souches sont tuées par exposition aux vapeurs de chloroforme pendant 30 minutes. Ensuite, l'ensemencement d'une souche indicatrice de la production de composés antagonistes est réalisé par le versement d'un milieu semi-solide (R2B additionné de 7,5g/L d'agar) par-dessus les souches productrices tuées. Après une nouvelle incubation de 48 heures à 20°C, une mesure de l'inhibition de la souche indicatrice par la souche productrice peut être vérifiée. En effet, un antagonisme est mesuré lorsqu'une zone d'inhibition de la souche indicatrice apparaît au niveau de la colonie d'une souche productrice.

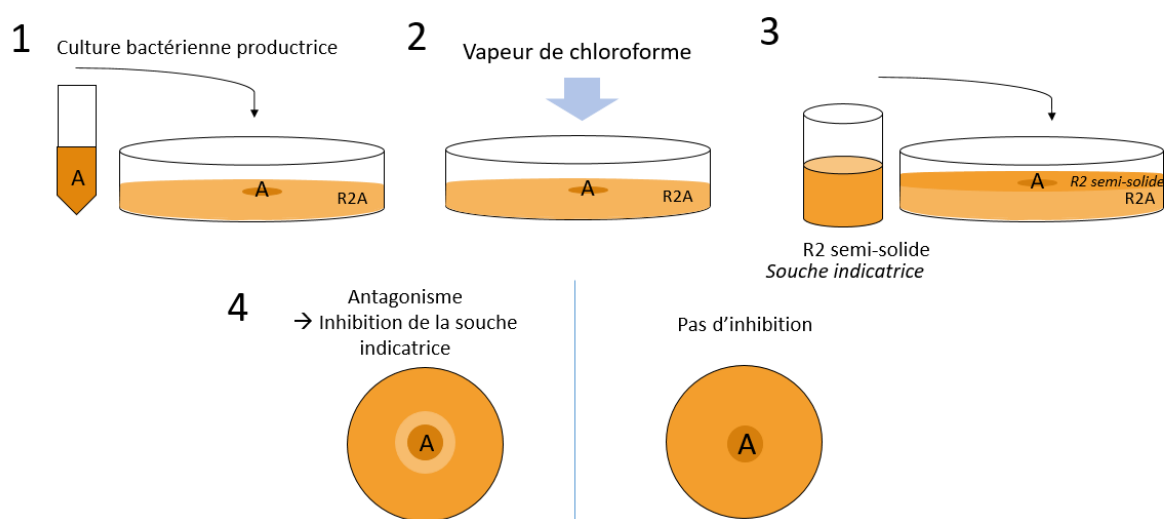


Figure 3-5 Description du test d'antagonisme en double couche gélosée

Un rapport d'inhibition peut être calculé par le rapport du diamètre d'inhibition de la souche indicatrice sur le diamètre de la colonie productrice (Figure 3.6).

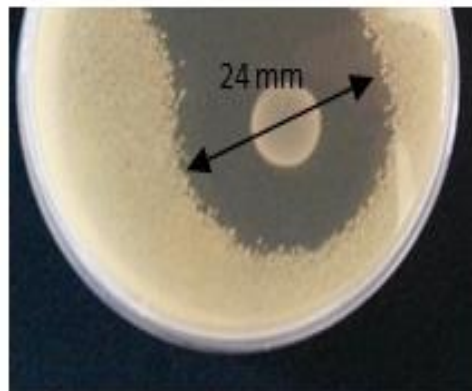


Figure 3-6 Exemple de relation antagoniste entre la souche productrice (colonie au centre) et la souche indicatrice (versée par-dessus la colonie après avoir tué cette dernière). Le diamètre d'inhibition est indiqué.

Ce test a été réalisé pour chacune des 20 souches de la communauté, elles furent toutes testées comme souche productrice et indicatrice. Les résultats sont présentés à l'aide du programme Cytoscape (version 3.4.0) qui permet une représentation graphique des résultats positifs des tests d'antagonisme, sous forme de réseau. Chaque nœud du réseau est une des 20 souches et les flèches les reliant représentent une relation antagoniste (la souche indicatrice étant pointée par la flèche) (Figure 3.7). Parmi les 20 souches, 18 d'entre elles étaient productrices de composé(s) antimicrobien(s) affectant au moins une des autres souches et toutes étaient sensibles à au moins un composé antimicrobien produit par une autre souche de la communauté. Sur la Figure 3.7, la largeur des nœuds du réseau est proportionnelle au nombre de souches cibles affectées par les composés antimicrobiens produits par la souche associée au nœud. Cinq souches produisaient des composés antimicrobiens affectant plus de 70% de la communauté : 14.8.R, 7.8.R, 21645, 16.8.R et 1.8.R. Enfin, la largeur et la couleur des traits sont proportionnelles au rapport d'inhibition, plus un trait est large et foncé, plus le rapport d'inhibition est élevé.

Au total, 111 relations antagonistes ont été mesurées. Il est important de préciser que la production de substance(s) antimicrobienne(s) responsable(s) des relations antagonistes se fait en absence de tout contact entre la souche productrice et la souche indicatrice (la souche productrice étant tuée avant le versement de la souche indicatrice). Cet antagonisme n'est donc pas un mécanisme induit par la présence de la souche indicatrice. De plus, le test étant mené

uniquement sur milieu solide, il n'y a aucune garantie que ces substances antimicrobiennes soient produites en milieu liquide. Malgré les limitations liées à la méthode, cette expérience démontre l'existence de la production de substances antimicrobiennes au sein des souches composant la communauté modèle, qui peuvent expliquer les interactions négatives suggérées dans l'article « Carbon utilization profiles of river bacterial strains facing sole carbon sources suggest metabolic interactions » (Goetghebuer L, Servais P, George IF, *FEMS Microbiology Letters*, 2017, 364(10), fnx098).

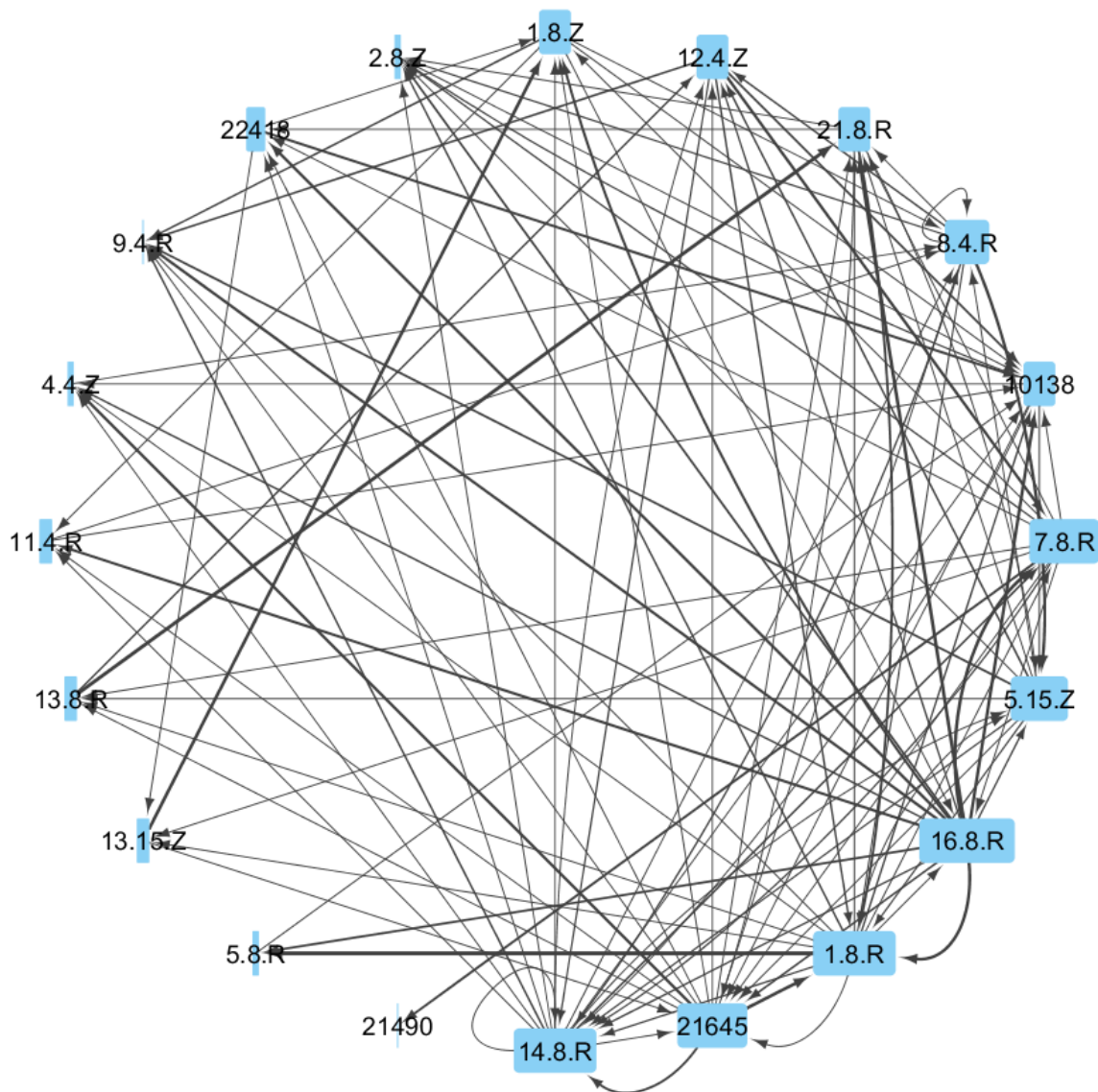


Figure 3-7 Représentation schématique établie à l'aide du logiciel Cytoscape des 111 résultats positifs des tests d'antagonisme. La largeur des nœuds est proportionnelle au nombre de souches affectées par les composés antimicrobiens produits par la souche du nœud. La largeur et la couleur des traits sont proportionnelles à l'intensité (le rapport) de l'inhibition.

CHAPITRE 4

LA DYNAMIQUE D'UNE COMMUNAUTÉ
BACTÉRIENNE MODÈLE DE RIVIÈRE DANS DEUX
MILIEUX DIFFÉRENTS RÉVÈLE DES SUCCESSIONS
DIVERGENTES ET UNE CROISSANCE AMÉLIORÉE
POUR LA PLUPART DES SOUCHES EN COMPARAISON
AUX MONOCULTURES

4. La dynamique d'une communauté bactérienne modèle de rivière dans deux milieux différents révèle des successions divergentes et une croissance améliorée pour la plupart des souches en comparaison aux monocultures

Les résultats obtenus jusqu'à présent ont mis en évidence, pour la communauté modèle, des performances métaboliques différentes de celles observées pour les souches qui la composent.

Des questions se sont ensuite posées : Une souche prend-elle le dessus sur les 19 autres ? Les 20 souches se maintiennent-elles dans la communauté ?

Afin de découvrir l'évolution de l'abondance de chacune des souches au cours du temps, nous avons procédé à un suivi de la composition de notre communauté bactérienne au cours du temps. En effet, il est difficile de répondre à la question « Qui fait quoi ? » sans savoir au préalable « Qui est là ? ».

Un suivi temporel de l'abondance bactérienne ainsi que de la composition de la communauté modèle a été réalisé sur une période de 27 jours dans deux milieux de cultures différents (R2B et Z). Complétés par un suivi de l'abondance bactérienne des 20 souches en monoculture, les résultats de cette expérience ont fait l'objet d'une publication soumise à la revue *Microbial Ecology* : «Dynamic of a river model bacterial community in two different media reveals divergent succession and enhanced growth of most strains compared to monocultures » (Goetghebuer L, Bonal M, Faust K, Servais P, George IF, *soumis*).

Durant cette expérience, le suivi de la communauté modèle fut réalisé en bouteille de deux litres pour accueillir un volume de culture d'un litre. Pour chaque milieu, 5 réplicats biologiques ont été lancés, de sorte que le suivi fut effectué sur 10 bouteilles simultanément. Afin de minimiser les risques de contamination, les prélèvements nécessaires à la mesure d'abondance cellulaire (300 μ L) étaient réalisés à l'aide de seringues plantées dans le bouchon des bouteilles et reliées à un tube en plastique stérile pour atteindre le fond de la bouteille (Figure 4.0).

Sur une telle manipulation expérimentale, les risques de contamination sont extrêmement élevés. Chaque mesure et manipulation représentent un risque : l'incubation étant en milieu non stérile, les bouteilles devaient être transportées sous hotte à flux laminaire. De plus, l'ouverture

des bouteilles était nécessaire pour le prélèvement du volume (50mL) sur lequel la composition de la communauté bactérienne était mesurée.

Afin de s'assurer de la validité de notre expérience, un des cinq réplicats a été utilisé seulement dans le but de vérifier une non-contamination aux divers temps d'incubation. Ce dernier a été manipulé exactement de la même manière que les autres réplicats tout au long de l'expérience. Après y avoir vérifié l'absence de souche bactérienne non introduite au départ de l'expérience, l'ensemble des extractions ADN des 4 autres bouteilles a pu être envoyé au séquençage illumina (voir *DNA extraction and Illumina sequencing* dans l'article ci-dessous). C'est pourquoi l'article ne fait référence qu'à quatre réplicats biologiques.



Figure 4-0 Photo illustrant la mise en place du suivi temporel de la communauté dans deux milieux différents (Z à gauche, R2B à droite), ainsi que de la seringue traversant le bouchon et le tube permettant d'échantillonner la communauté.

Résumé

La dynamique d'une communauté modèle de 20 souches bactériennes isolées d'eau de rivière a été suivie pendant 27 jours en système batch dans deux milieux nutritifs différents : un milieu R2 et un milieu d'eau de rivière filtrée et autoclavée. Au début de l'incubation, une souche spécialiste à la croissance rapide, *Acinetobacter* sp, dominait la communauté dans les deux milieux. Par la suite, la composition de la communauté divergea dans les deux milieux, mais toujours de façon très reproductible entre les réplicats d'un même milieu. Dans le milieu R2, plusieurs souches déjà rapportées pour la dégradation de nombreuses sources de carbone simple prédominèrent. En revanche, dans le milieu d'eau de rivière autoclavée, la communauté fut plus équivalente et dominée par des souches poussant mieux ou exclusivement dans ce milieu. Ces dernières avaient été précédemment rapportées comme dégradant des composés complexes. Ces souches affichèrent en communauté un taux de croissance 1,5 à 7 fois supérieur que celui mesuré en monoculture. De plus, elles se développèrent simultanément dans la communauté. Ensemble, nos résultats suggèrent l'existence d'interactions coopératives au sein de la communauté incubée en eau de rivière autoclavée.

Dynamic of a river model bacterial community in two different media reveals divergent succession and enhanced growth of most strains compared to monocultures

Lise Goetghebuer¹, Mathias Bonal¹, Karoline Faust², Pierre Servais¹, Isabelle F. George^{1*}

¹ Ecology of Aquatic Systems, Université libre de Bruxelles, Campus Plaine, CP 221, 1050 Brussels, Belgium

² Laboratory of Molecular Bacteriology (Rega Institute), Katholieke Universiteit Leuven, Herestraat 49, 3000 Leuven, Belgium

Abstract- The dynamic of a community of 20 bacterial strains isolated from river water was followed in R2 broth and autoclaved river water medium for 27 days in batch experiments. At an early stage of incubation, a fast-growing specialist strain, *Acinetobacter* sp., dominated the community in both media. Later on, community composition in both media diverged but was highly reproducible across replicates. In R2, several strains previously reported to degrade multiple simple carbon sources prevailed. In autoclaved river water, the community was more even and became dominated by several strains growing better or exclusively in that medium. Those strains were reported in the literature to degrade complex compounds. They displayed a 1.5 to 7-fold greater growth rate in the community compared to the one in monoculture and developed simultaneously in that community. Altogether, our results suggest the existence of cooperative interactions within the community incubated in autoclaved river water.

Keywords : river, bacteria, model community, growth rate, interactions

Introduction

Freshwater environments are essential on earth and among them, rivers provide a large number of ecosystem services [1]. As open systems, rivers are particularly exposed to anthropogenic stresses and risks of degradation. When flowing through cities, they receive domestic and industrial wastewaters, which bring high loads of organic substances and micro-organisms and therefore strongly modify not only rivers' physico-chemical properties but also their microbial communities [2–4].

Compared to other bacterial communities (in soils, oceans, the human gut...), river ones remain largely uncharacterized [5]. However, 16S rRNA surveys published to date show that river bacterioplankton is dominated by the same phyla as lake bacterioplankton, i. e. *Proteobacteria* (mostly the Beta and Gamma subclasses), *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Verrucomicrobia*, *Cyanobacteria* and *Firmicutes* [6–8]. Their relative abundance fluctuates among rivers, so that there is no major lineage showing an equally dominating distribution [9]. Some longitudinal studies of river ecosystems revealed that shifts in the

bacterial community composition (BCC) often occur along the river course [10–12]. Those spatio-temporal changes in composition result from two major processes: dispersal (due to regional factors) and species sorting (due to local factors). Dispersal refers to the transport of taxa within the lotic habitat and to the input through tributaries convergences or wastewater discharges. Those inputs can lead to the emergence of novel taxa, which can modify permanently, temporary (resilience) or not at all (resistance) the BCC [13, 14]. The maintenance of immigrant taxa depends on local conditions and their environmental preferences compared to resident strains, resulting in selection, that is species sorting [15, 16]. Temperature, dissolved oxygen, pH, particulate organic carbon (POC), dissolved organic carbon (DOC), grazing and others are all important local factors driving the BCC [17–19]. Finally, the survival of some strains can also depend on direct interactions with other species composing the community. Bacterial cells can exclude or promote other cells' growth through secretion of enzymes, molecules and/or the emission of signals resulting in positive or negative interactions [20, 21]. In addition, some bacterial taxa present streamlined genomes and are auxotrophic for some essential metabolites, their survival in the community is therefore dependent of their metabolic partners whose compensate their lost metabolic function [22, 23].

In rivers, DOC is the primary substrate supporting bacterial growth and respiration [24], and is therefore a focal point of microbial interactions. In this context, metabolic interactions such as competition, cross-feeding

and syntrophy are all inextricably modifying the fate of microbes in a community [25, 26].

It is highly likely that microbial interactions play a crucial role in community dynamics and ecosystem functioning [27, 28]. Consequently, the deciphering of interactions in microbial communities has become a major focus in microbial ecology. Models analyzing non-random patterns of taxonomic distribution among multiple samples of microbial communities enable the prediction of potential microbial relationships [29, 30]. For example, using such tools, Widder et al. suggested the existence of positive and negative interactions occurring between the species composing biofilm communities of more than 114 streams in Austria [31]. Though, the experimental validation of those interactions remains scarce. Mixed cultures can be used as model communities in order to study ecological interactions among microorganisms under controlled and reproducible conditions [22]. In this study, we worked with a model riverine microbial community composed of 20 strains belonging to genera commonly found in rivers, which were mainly isolated from the Zenne River (Belgium). The carbon source utilization profile of each strain and of the 20-strain community was determined in a previous study [32], whose results suggested interspecific interactions occurring in that community. In this study, we further analyzed the dynamic of the 20-strain community in two complex media: R2, a common medium used to isolate and study freshwater bacteria; and a medium Z made of autoclaved, filtered river water. Bacterial abundance and community structure were

measured over a period of 27 days, and the growth of the 20 strains was compared in monoculture and in the community to assess the impact of species on each other.

Methods

Community composition and carbon source utilization profiles

In a previous study [32], a model river bacterial community composed of 20 strains (Table 1) was built. Sixteen strains were isolated from the water column of the Zenne River (Belgium). This river is located in the Scheldt drainage network and is 103km long; its watershed (991km²) is characterized by agricultural activities in its upstream part and by a heavily urbanized area (Brussels area) in its downstream part [33]. The sampling site was located upstream from Brussels (Lembeek, 50°42'34.56"N, 4°13'3.30"E). A total of 94 strains were isolated on two different media: R2A (Melford, Ipswich, UK) and a medium named Z consisting of water from the sampling site filtered on 0.2- μ m pore-size membranes (Whatman, Maidstone, UK) and autoclaved (20 minutes at 121°C), mixed with 15 g/L of agar (VWR, Radnor, USA). The plates were incubated for up to 15 days at 20°C, a temperature usually reached in the Zenne River during summer [4]. Most bacteria were isolated after 4, 8 and 15 days of incubation. Of these 94 strains, 16 were chosen to build up a synthetic river bacterial community based on bacterial community composition measured in situ at the same sampling station [4], and/or mentioned in other studies on riverine bacterial community

composition [7, 10, 14, 34]. The selected strains belonged to ubiquitous genera representing more than 1% of the community composition in at least one of the aforementioned datasets. In addition, four taxa frequently detected in river water (*Sphingobacterium psychroaquaticum* 22418, *Rhodoferax fermentans* 10138, *Limnohabitans curvus* 21645, *Polynucleobacter cosmopolitanus* 21490) were purchased from the DSMZ (Braunschweig, Germany) culture collection. The carbon source utilization profile of each individual strain and of the mixed community was measured by Goetghebuer, Servais and George [32] in Phenotype MicroArrays PM1 and PM2A microplates (Biolog, Hayward, USA) that allowed testing 190 different carbon sources.

Experimental design

The growth of our model community was followed in batch experiments incubated at 20°C using two media: R2 broth (Melford, Ipswich, UK) and the medium Z. First, each of the 20 strains composing the community was grown in Z medium separately. After 48 hours, cell concentration was measured by flow cytometry (following the flow cytometry protocol described below). Each monoculture was then diluted (in Z medium) to a concentration of 5.0×10^4 cells/mL and all monocultures were mixed together in equal volume. At time zero of the experiment, a volume of 10mL of the equi-abundant mix was inoculated in bottles containing 1L of the medium Z or R2 to reach an initial concentration of 5.0×10^2 cells/mL. For both media, four replicates named a, b, c, d in R2 and

e, f, g, h in Z were run in parallel (i.e. 8 bottles in total). A fifth uninoculated replicate in R2 and in Z was monitored as negative control. No contamination was detected during the course of the experiment. The bottles were incubated at 20°C and agitated at 250 rpm for up to 662.5 hours, corresponding to 27 days. For the first 72 hours, the batch experiments were sampled every hour for flow cytometry measurements, then a longer time period was allowed between samplings. Cellular concentrations in each sample were measured by flow cytometry in triplicate. Aliquots (25 to 50mL) of each bottle were collected at 11 sampling times (0h, 10h, 19h, 35.5h, 47.5h, 60.5h, 72.5h, 186.5h, 331h, 519.5h, 662.5h) to assess community composition. At the last four sampling times, 50mL of fresh sterile medium was added to the batch experiment to keep a final volume superior to 500mL.

Bacterial enumeration by flow cytometry

Samples (300µL) were fixed with paraformaldehyde (3% final concentration), left for 15 minutes at 4°C and then stored frozen at -20°C. Prior to analysis, samples were serially 10-fold diluted in 0.22µm-filtered Phosphate Buffered Saline preheated at 37°C and cell counting was performed on two dilutions to target an ideal rate of 200 to 2000 cells/s. Flow cytometry analysis was performed according to the procedure described in Van Nevel et al. [35] with modifications. Cells were stained with SYBR GREEN I (10,000-fold diluted from stock; Amresco, Solon, USA) in addition to Na₂EDTA (5mM final concentration) to improve outer membrane permeabilization [36].

This was followed by a 13-min incubation in the dark at 37°C. Stained samples were inoculated in triplicate in a microplate and analyzed using an Accuri C6 flow cytometer (BD, Franklin Lakes, US), equipped with an autoloader. Bacterial abundance (BA, cells/mL) was calculated by counting fluorescent events in 25µL after gating plots on green (FL1) vs red (FL3) fluorescence. Growth curves of replicates in both media were built from the mean of the BA calculated in triplicate at each sampling time.

DNA extraction and Illumina sequencing

Aliquots (25 to 50mL) of each bottle were collected and bacterial biomass was concentrated by filtration through a 0.2µm pore-size, 47mm diameter polycarbonate filter (Millipore, MA). All filters were stored at -20°C until use. Genomic DNA extraction was performed with the DNeasy PowerWater Kit (Qiagen, Hilden, Germany) following the manufacturer's protocol. The concentration and purity of the extracts were estimated using a Nanodrop ND-2000 UV-Vis spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, US). The V4 region of the 16SrRNA gene was amplified with primers 515F (GTGCCAGCMGCCGCGGTAA) [37] and 806bR (GGACTACNVGGGTWTCTAAT) [38] (<http://www.earthmicrobiome.org/>), and sequenced on an Illumina MiSeq at StarSEQ laboratory (Mainz, Germany) following a paired-end approach. Sequences were trimmed at 240 bp and then used for downstream analysis with the open-source software program MOTHUR (<http://www.mothur.org>) [39]. Reads were assembled into contigs, and contigs

shorter than 275 bp or containing ambiguous bases were removed from our data set (see Supp 4-0). Remaining contigs were aligned against the silva.nr_v132.align file trimmed to the V4 region, preclustered to decrease the number of uniques, and screened for chimeras using the vsearch program. Remaining sequences (contigs) were classified using a homemade database consisting of the whole 16S rRNA gene sequence of the 20 strains. The latter were obtained by Sanger sequencing following a protocol detailed in Goetghebuer, Servais and George [32]. Relative abundance of a given taxon was set as the number of sequences affiliated with that taxon divided by the total number of sequences per sample. A correction factor was calculated for each strain based on the difference at time zero between the theoretical relative abundance of that strain (1/20) and the observed relative abundance in the Illumina dataset. This correction factor was further applied to all samples. Finally, absolute abundance of a given taxon corresponded to its relative abundance multiplied by the total BA in the relevant sample.

Growth rates

To estimate their growth rate, the 20 strains were grown in pure culture in R2 and Z media separately. At mid-exponential phase, a volume of each culture was inoculated in 20mL of R2 and Z media so that the initial concentration was close to 5.0×10^2 cells/mL as in the follow-up of the community growth. Monocultures were incubated at 20°C and 250rpm for 72 hours. Samples of 300µL were collected and processed for flow cytometry analysis as explained above.

$\ln(\text{BA})$ was plotted versus time; growth rate (μ) was obtained by calculating the slope of the straight line fitting the data in the exponential phase. Then, individual growth rate of a given taxon in the community was obtained with the same calculation as for monoculture using its absolute abundance as BA.

Statistical analysis

Absolute abundances were square-root transformed before calculating a Bray-Curtis similarity matrix. The compositional similarity between samples was visualized by a non-metric multidimensional scaling (NMDS) analysis using PRIMER 7 [40]. NMDS plots represent relative distances among samples in relation to the rank order of their relative similarities. A Pearson correlation test was used to identify the strains best correlated with the Bray-Curtis similarity indexes in the NMDS plot. Similarity percentage (SIMPER) was used to determine which strain contributed most to the dissimilarity between sampling times. For alpha diversity analysis, Pielou's evenness index [41] was calculated for each replicate, and means of the four replicates were compared between media. Finally, for both media, the means of the community composition's dissimilarity across replicates at each sampling time (Bray-Curtis dissimilarity) were compared.

Results

Growth rates

Table 4.1 displays the growth rates of the strains composing the community. Individual growth rates in monoculture ranged from 0.09 to 0.95

h^{-1} in the R2 medium and from 0.03 to 0.26 h^{-1} in the Z medium. For both media, the lower and the higher growth rates differed by a factor of about 10. In any case, growth rates were smaller in Z than R2 or equal. In both media, the same strain reached the highest maximal bacterial abundance: *Hydrogenophaga* sp 124Z (data not shown). The ratio of growth rates in both media (μ_Z/μ_{R2}) enabled to distinguish strains showing similar growth rates in both media

from those with different ones. Some strains had no medium preference: *Nocardioides* sp 138R, *Arthrobacter* sp 28Z, *Limnohabitans curvus* 21645. All other strains grew faster in R2 than in Z. The community growth rate in R2 (0.73 h^{-1}) was greater than the growth rate of individual strains except two. On the other hand, the community growth rate in Z (0.47 h^{-1}) was much higher than any of the growth rate of individual strains in monocultures.

Table 4-1 Identification of the strains composing the synthetic community, their individual growth rates in R2 and Z media and their growth rate ratio (μ_Z/μ_{R2}). The growth rates of the 20-strain community are given in the last line of the table. ND=not determined

Growth rate $\mu(h^{-1})$				
Strain number	Identification	μ_{R2}	μ_Z	Ratio μ_Z/μ_{R2}
2.8.Z	<i>Arthrobacter sp</i>	0.26	0.26	1.00
13.8.R	<i>Nocardioides sp</i>	0.18	0.17	0.94
16.8.R	<i>Streptomyces sp</i>	0.17	ND	ND
5.8.R	<i>Streptomyces sp</i>	ND	ND	ND
5.15.Z	<i>Flavobacterium sp</i>	0.42	0.19	0.45
9.4.R	<i>Flavobacterium sp</i>	0.34	0.23	0.68
1.8.R	<i>Bacillus sp</i>	0.39	0.03	0.08
1.8.Z	<i>Brevundimonas sp</i>	0.47	0.03	0.06
12.4.Z	<i>Hydrogenophaga sp</i>	0.33	0.14	0.42
11.4.R	<i>Rhizobium sp</i>	0.2	0.16	0.8
7.8.R	<i>Janthinobacterium sp</i>	0.95	0.2	0.21
21645	<i>Limnohabitans curvus</i>	0.09	0.09	1
21490	<i>Polynucleobacter cosmopolitanus</i>	0.19	0.07	0.37
10138	<i>Rhodoferrax fermentans</i>	0.24	0.15	0.63
13.15.Z	<i>Variovorax sp</i>	0.38	0.14	0.37
4.4.Z	<i>Acinetobacter sp</i>	0.8	0.26	0.32
14.8.R	<i>Dechloromonas sp</i>	0.14	0.03	0.21
21.8.R	<i>Sphingobacterium sp</i>	0.16	ND	ND
8.4.R	<i>Flavobacterium sp</i>	0.4	0.24	0.6
22418	<i>Sphingobacterium psychroaquaticum</i>	0.27	0.11	0.41
	<i>20-strain community</i>	0.73	0.47	0.64

Bacterial abundances

In monocultures, maximal bacterial abundances (cells/mL) ranged from 8.0×10^7 to 5.8×10^9 in R2 and from 5.0×10^4 to 5.5×10^6 in Z (data not shown). The growth curves of the community were rather similar in the four replicates (Figure 4.1 and Supp 4.1). In R2, the maximal BA ranging from 1.9×10^9 to 3.1×10^9 cells/mL (mean = 2.6×10^9 cells/mL, n=4) was reached after 162 hours and fell within the range

observed for individual strains. Whereas in Z, a maximal BA ranging from 7.8×10^6 to 1.1×10^7 cells/mL (mean = 9.1×10^6 cells/mL, n=4) was reached after 233 hours and was greater than the one observed for individual strains. The BA was maintained until 400 hours and then slightly decreased at the end of the experiment. In both media, BA measurements across replicates seemed to converge as the coefficient of variation decreased over time (data not shown).

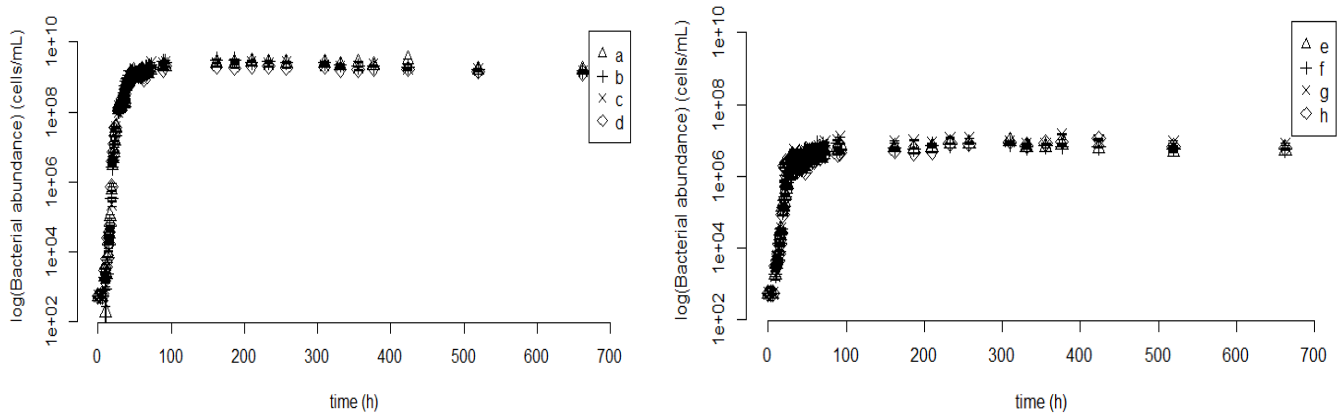


Figure 4-1 Logarithm of the bacterial abundances (cells/mL) of the community in 4 biological replicates during a 27-day incubation period (20°C) in R2 (left, replicates a,b,c,d,) and Z (right, replicates e,f,g,h) medium measured by flow cytometry. Values are the mean of triplicates and error bars represent standard deviation.

NMDS

Composition similarity between samples across replicates and time was visualized by a NMDS analysis (Figure 4.2). In both plots, the first sampling times (10h in R2, 10 and 19h in Z) were strongly correlated with the absolute abundance of the strain 44Z. Three and two temporal clusters could be observed in R2 and Z respectively.

In R2, the composition seemed to stabilize after 47.5 hours but a third cluster encompassing the two last sampling times appeared to result from the growth of strains 22418 and 114R (Figure 4.2A). Whereas in Z, the first four sampling times were quite scattered, the community composition began to stabilize from 60.5 hours until the end of the experiment (Figure 4.2B).

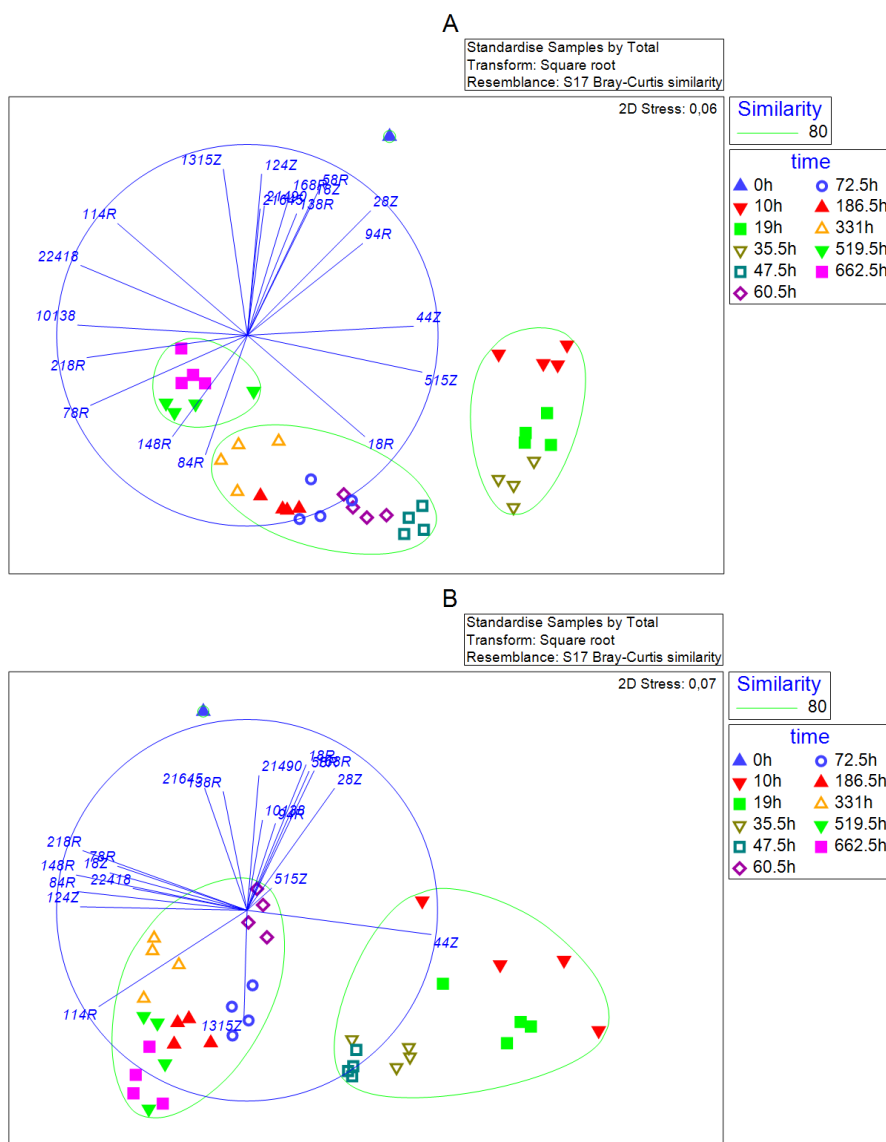


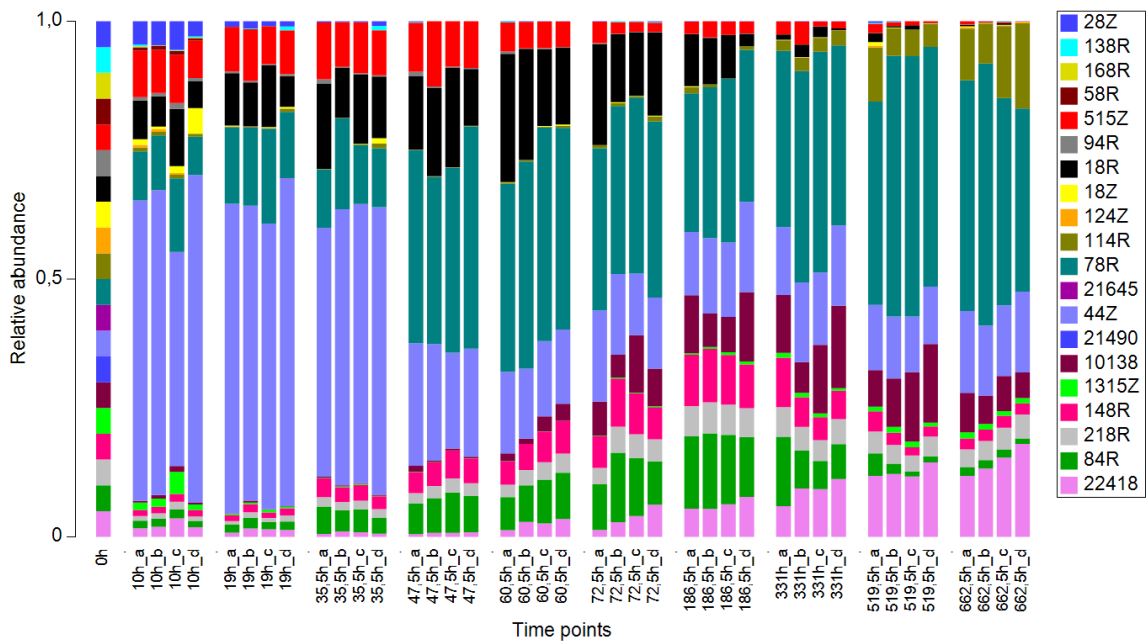
Figure 4-2 Non-metric multidimensional scaling plot of the compositional dissimilarities between replicates over time (Bray-Curtis dissimilarities) in R2 (A) and Z (B) media. Taxa's absolute abundance are plotted as correlation with the samples. The overlaid contours are based on results from group-average cluster analysis (similarity threshold set at 80).

Community composition across time and replicates

Analysis of community composition over time confirmed that in each medium, the community evolved in a similar way in the four different bottles over 27 days (Figure 4.3). Most of the strains grew in absolute abundance (Supp 4.2), although strains 21490, 168R and 21645 in R2 and 21490 in Z disappeared rapidly. In both media, the relative abundance of strain 44Z (*Acinetobacter* sp) strongly increased since the first sampling time and stayed dominant in the community until 35.5 hours in R2 and 47.5 hours in Z. After 47.5 hours of incubation in R2, the strains with the greatest relative abundance in the community corresponded to strains with a high growth rate in monoculture (i.e. 78R, 44Z, 18R, 515Z, 84R). This matching was not observed in the Z medium. Over the entire course of the experiment, the strains whose relative abundance raised transiently (and then declined) or progressively (until the end of the

experiment) in R2 were 515Z, 18R, 114R, 78R, 44Z, 10138, 148R, 218R, 84R and 22418 (Figure 4.3A). In Z, they were strains 515Z, 18Z, 124Z, 114R, 78R, 44Z, 1315Z, 148R, 218R, 84R and 22418 (Figure 4.3B). The growth rate of those strains in the community was then calculated based on their individual absolute abundance in the community, and it was compared to their growth rate in monoculture (Figure 4.4). Interestingly, many of those strains displayed a growth rate that was greater in the community than in monoculture in R2, and all of them did in Z. In the latter, growth rates in community were 1 to 7.3-fold greater in community than in monoculture, whereas this multiplying factor did not exceed 2-fold in R2. Finally, the progressive growth of many strains was concomitant in Z (e.g. 18Z, 124Z, 114R, 1315Z, 148R and 84R). Among these, strains 18Z, 124Z, 114R and 1315Z grew better -or exclusively- in the community in Z than in the community in R2.

A:



B:

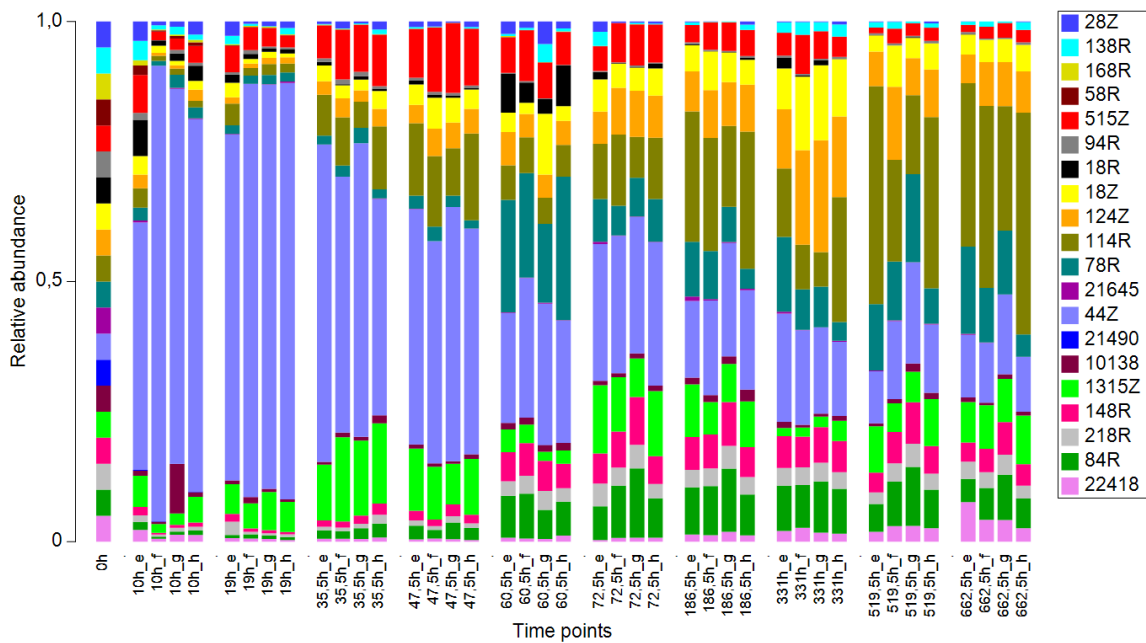


Figure 4-3 Relative abundances of the 20 bacterial strains forming the community at the different sampling times in R2 medium (a) and Z medium (b). For each time points, there are 4 replicates (a,b,c,d in R2 and e,f,g,h in Z). Colors refers to strain's numbers indicated in Table 4.1.

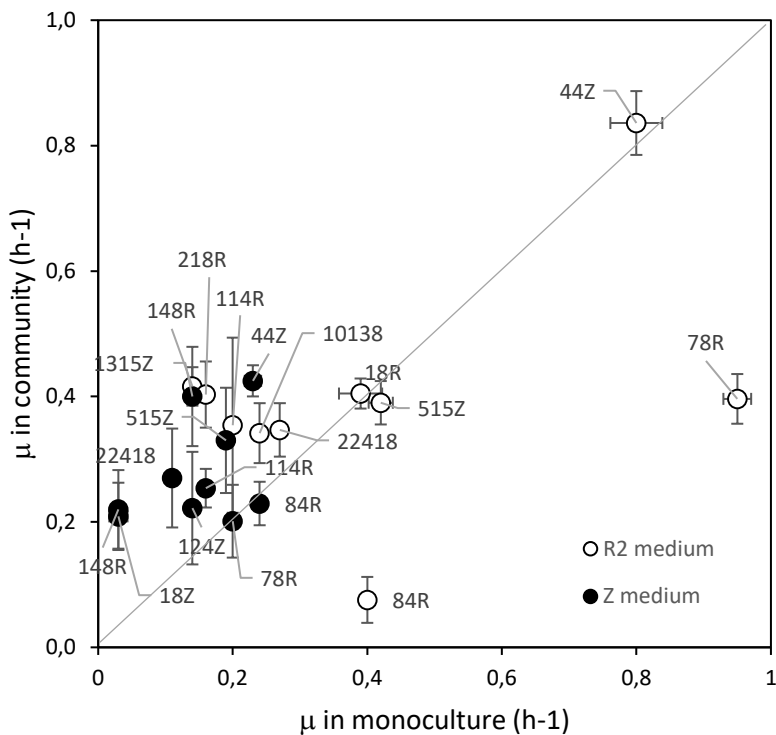


Figure 4-4 Growth rate of strains showing transient or progressive growth in the community (h^{-1}) on Fig.4-3 as a function of their growth rate measured in monoculture (h^{-1}) in R2 medium (open circles) and Z medium (full circles). The diagonal represent an identical growth rate in community and monoculture. The data point representing 218R in Z medium is missing because its growth rate in monoculture was not measured (see Table 4.1).

Alpha and beta diversity

The Pielou's evenness index (Figure 4.5) and the mean of the Bray Curtis dissimilarity between replicates (Figure 4.6) were calculated over time. For both media, Pielou's index began at 1 as the initial community was equi-abundant (Figure 4.5). Then, its value sharply dropped for the two first sampling times, and finally increased until it reached a plateau which was higher in Z

than R2. The mean of community composition's dissimilarity (Bray-Curtis) across replicates slightly decreased over time only in R2 (Figure 4.6), but in both cases the variability between replicates decreased. In other words, for both media, community composition converged across the different replicates.

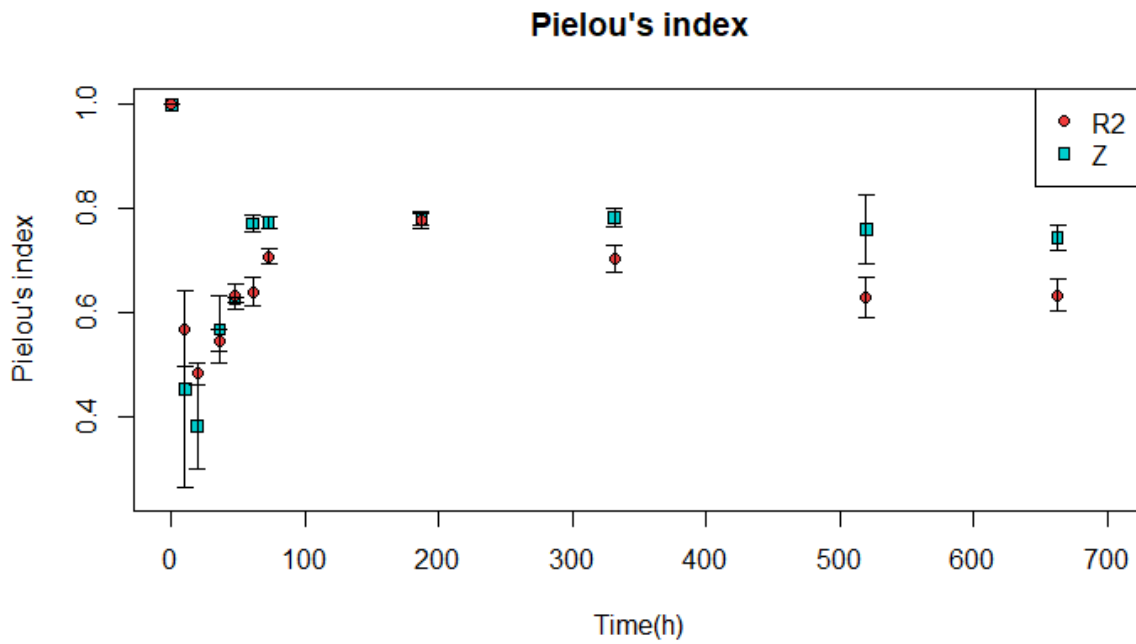


Figure 4-5 Temporal development of Pielou's evenness in R2 and Z media. An index was calculated for each replicate, the value on the graph corresponds to the mean of it

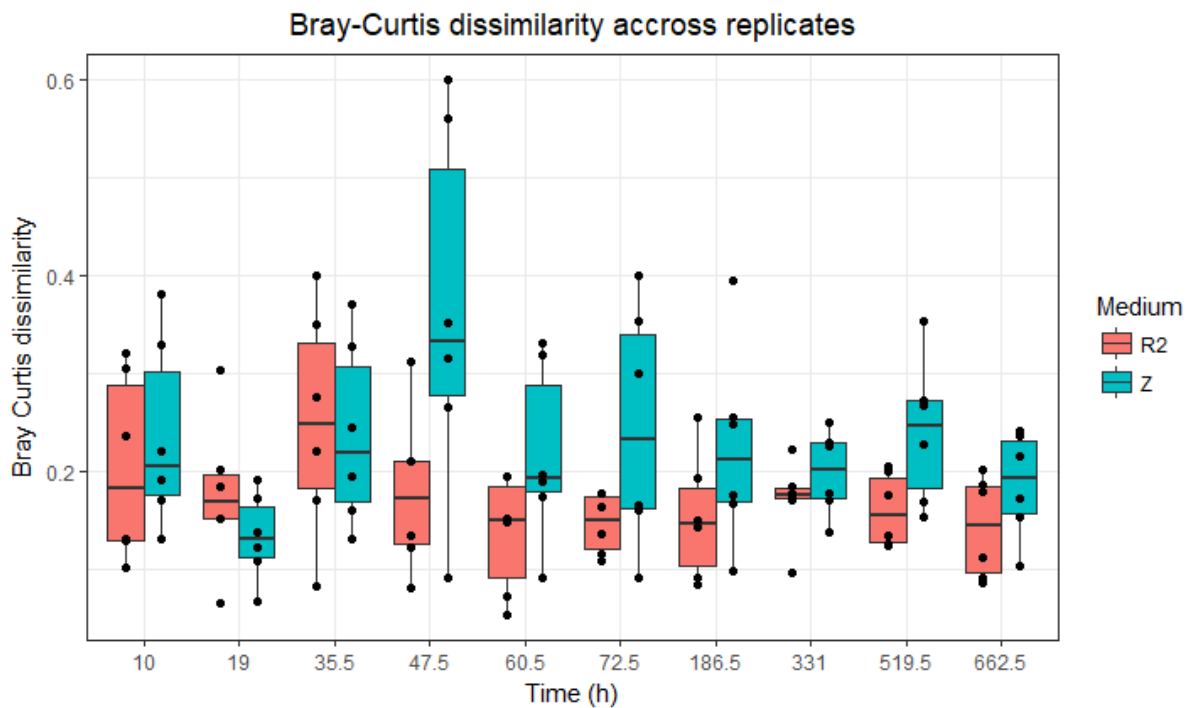


Figure 4-6 Mean of the community composition's dissimilarity across replicates for each time point (Bray-Curtis dissimilarity) for R2 (pink) and Z (blue) media.

Discussion

The individual growth rates of our strains in monoculture in Z medium (Table 1) were mostly consistent with rates measured on major bacterioplankton groups in freshwater habitats in the same range of temperature [42]. The 10-fold difference in individual growth rates between the slowest and the fastest growing strains is not surprising, as previous studies reported that *in situ* growth rates vary greatly within and between the major phylogenetic groups of bacteria found in aquatic systems [43, 44]. In addition, the ability of some strains to grow fast in monoculture allowed them to dominate the community in the beginning of the experiment in the R2 community, but not necessarily later on. As expected, most strains grew faster in R2 than in Z. But some strains were similarly growing in both media which means that the amount of substrate assimilable by those strains in Z was great enough to sustain maximal growth rate at 20°C.

When the 20 strains were grown in community in R2 (Figure 4.1), the average community growth rate (0.73h^{-1}) measured was consistent with previous maximal growth rates (at saturating carbon concentrations) measured at 20°C on a natural riverine community [45]. On the contrary, the community growth rate measured in Z (0.47h^{-1}) was much higher than previous observations of *in situ* growth rates of riverine bacterial communities (estimated as the ratio between bacterial production and biomass) at the same temperature [44, 46]. This could be due to a greater carbon availability in the Zenne River water than in other rivers [33]. Indeed,

DOC values in the sampling station of the Zenne River fluctuate between 6 and 8 mgC/L over a year [4], values which are a little greater than the median DOC values in world rivers (5 mgC/L) as mentioned in the review by Meybeck [47]. Comparison of the mean maximal abundances in R2 and in Z revealed a factor 284 between those values, which can be explained by the amount of biodegradable organic carbon available. Indeed, dissolved organic matter in both media was estimated through the chemical oxygen demand (COD) test according to standard procedure (HACH, Loveland, CO). The COD in R2 and Z were respectively 2710 and 16 mgO₂/L, which correspond to DOC of 1016 and 6 mgC/L (when considering that 1 mole of oxygen is necessary to biodegrade 1 mole of carbon). The ratio (COD_{R2}/COD_Z) was thus 169. If we consider that all the dissolved organic carbon is biodegradable in R2 and around 50% of it in the Zenne River water (Servais, unpublished results), the ratio of the biodegradable organic carbon between both media is about 338. This latter ratio is in the same range as the maximal community BA ratio (284) confirming that maximal bacterial abundances reached in these batch experiments were controlled by the biodegradable organic carbon, as usually observed for heterotrophic aquatic bacteria [48].

Although the batch experiments began with an initial abundance identical for each taxon (time 0 in Figure 4.3), their community composition shifted several times in both media leading to different clusters in the NMDS plots (Figure 4.2). In both media, the early dominance of

strain 44Z (*Acinetobacter* sp), a γ -proteobacterium, is probably explained by its high growth rate: 0.8 h^{-1} and 0.26 h^{-1} in R2 and Z, respectively. When looking at its carbon utilization profile, this strain could be classified as a specialist, since it efficiently catabolized a small number of the carbon sources tested in PM microplates [32]. The strain *Acinetobacter* sp likely stopped increasing concomitantly with a depletion of such carbon sources (see absolute abundance in Supp 4.2). In parallel, an increase of strains all displaying a more complex carbon utilization profile (in term of the number of carbon sources catabolized in PM microplates) could be observed. All those shifts occurred at the same time within the replicate bottles. In both media, community composition showed great convergence among replicates over the entire experiment (Figure 4.6), meaning that the factors driving it were stable and reproducible.

The individuals composing the community were all heterotrophic strains originating from a river water environment. The quantity and quality of organic matter have been shown to impact abundance, diversity and activity of heterotrophic microbial communities [48–50]. In that respect, our media displayed strong carbon supply differences. The R2 medium contains a high concentration of dissolved organic carbon (DOC) including mainly easily biodegradable compounds such as dextrose, peptone and yeast extract. The four strains growing better in R2 than Z, 18R (*Bacillus* sp), 78R (*Janthinobacterium* sp), 22418 (*Sphingomonas psychroaquaticum*), and 10138 (*Rhodoferrax fermentans*), strongly degraded

almost all simple carbon sources (monosaccharides, disaccharides) tested in the PM plates in Goetghebuer, Servais and George [32]. The ability of strains 22418 and 10138 to use simple carbon sources was previously reported [51, 52]. Those strains were therefore probably more competitive regarding easily biodegradable organic carbon compounds than the other strains.

On the other hand, river water's DOC is usually composed of a complex mixture of organic compounds differing by their bioavailability: from labile DOC (easily degraded by microbes) to recalcitrant DOC (refractory to degradation) [24]. We hypothesize that during the experiment, the more labile DOC was preferentially consumed, and therefore the less biodegradable part relatively increased. This probably explains why the strains 114R (*Rhizobium* sp), 124Z (*Hydrogenophaga* sp), 18Z (*Brevundimonas* sp) and 1315Z (*Variovorax* sp) which all grew better or exclusively in the community incubated in Z compared to the one incubated in R2 medium, also belonged to genera reported for their ability to degrade phenolic compounds [53–56]. Another study even mentioned a *Variovorax* sp. as part of a cooperative pesticide-degrading consortium [57]. Recently, Rivett et al. [58] observed in batch experiments that changes in resource utilization (from labile substrate to more recalcitrant substrate use), were associated with a shift in microbial interactions from strongly negative interactions to a more neutral state. Moreover, as the labile DOC was consumed the secretion of metabolic by-

products increased, which are suspected to be a dominant source of cross-feeding in microbial communities [59].

In our case, the surprisingly high growth rate and final BA achieved by the community in the Z medium as well as the identity of the dominant strains in that community are all strong arguments suggesting that cooperative interactions occurred. The assumption of positive intracommunity relationships is strengthened by the fact that the calculated growth rate of individual strains in the community was often greater than the one measured in monoculture (Figure 4.4). Although this was true for many strains in both media, the increase in strains' growth rate in the community compared to monocultures was particularly spectacular in Z, including for the four strains which grew better (or exclusively) and simultaneously in that medium: 114R, 124Z, 18Z and 1315Z (1.6 to 7-fold increase). Such an enhanced growth was likely caused by an interdependency between some (or all) of those strains. Finally, the greater community evenness observed in Z (Figure 4.5) also supports the assumption of cooperative interactions in that community.

The DOC quality and quantity is known to be a driver of communities' structure. Here, our results suggest that competitive and/or cooperative interactions occurred depending on the quantity (and probably quality) of this DOC. Species sorting in the river water medium selected several dominant strains among which four are potentially cooperative strains degrading complex compounds. Our future work will focus on the dynamics of those strains as a potential consortium.

Acknowledgments

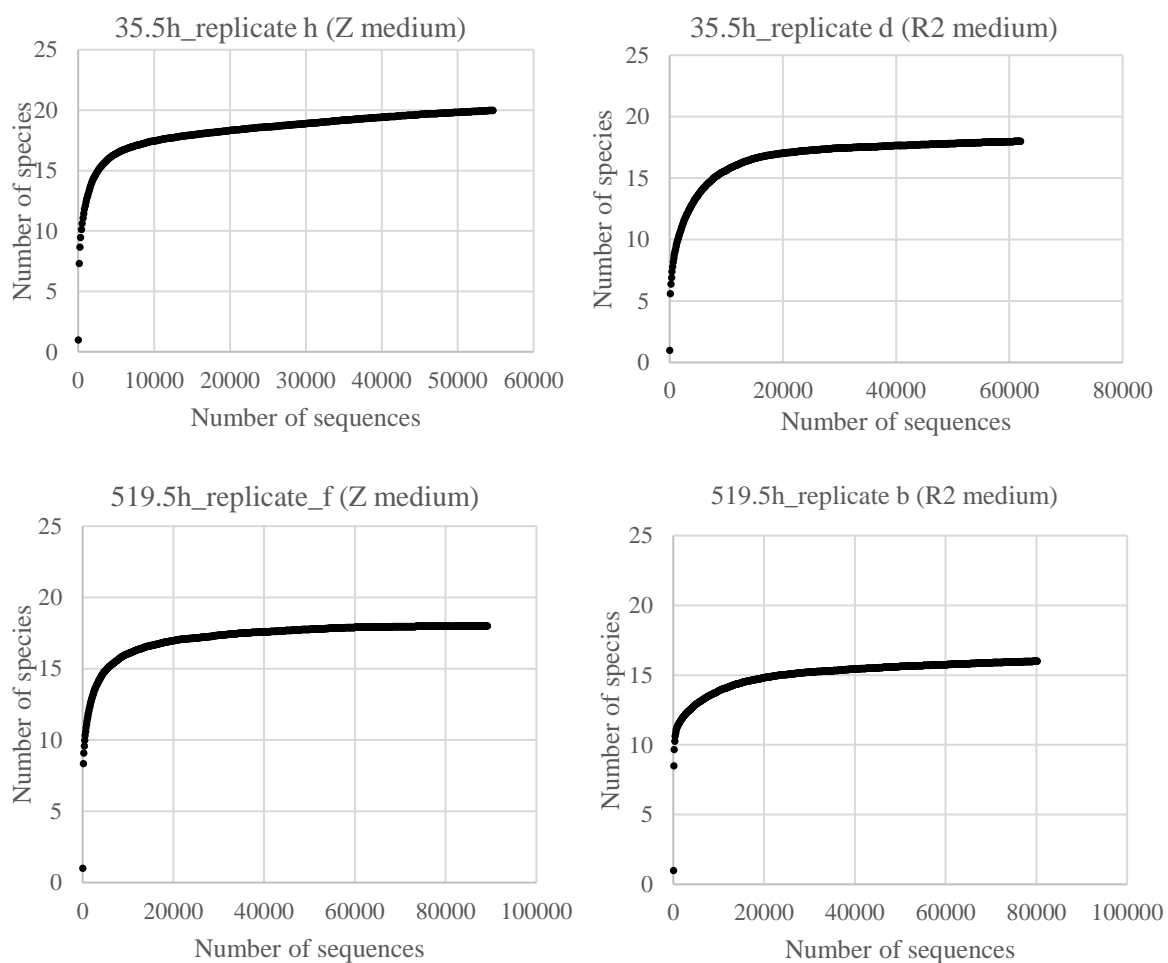
This work was supported by Fonds National de la Recherche Scientifique FRS-FNRS in the scope of the project 'DYNAMO' [T.1037.14]. The authors thank Adriana Anzil for her contribution to the experimental work.

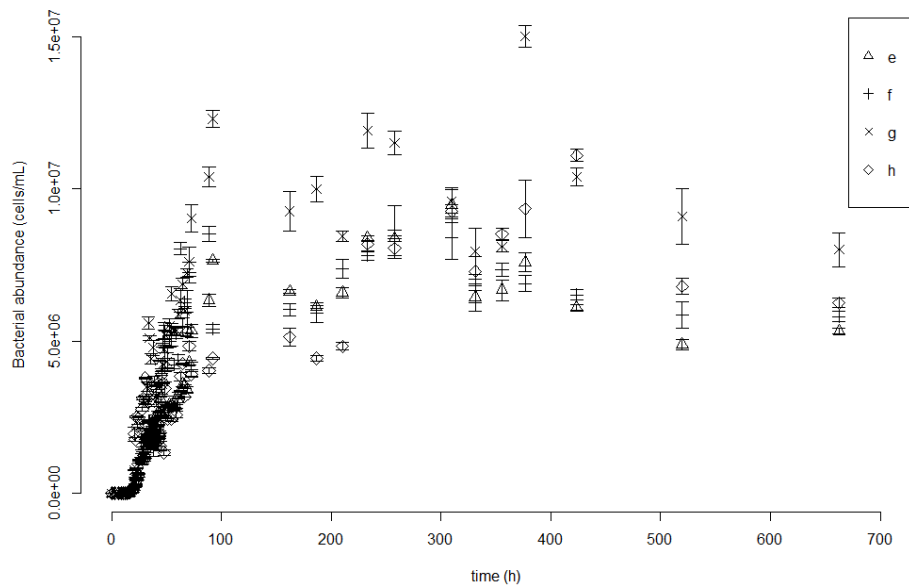
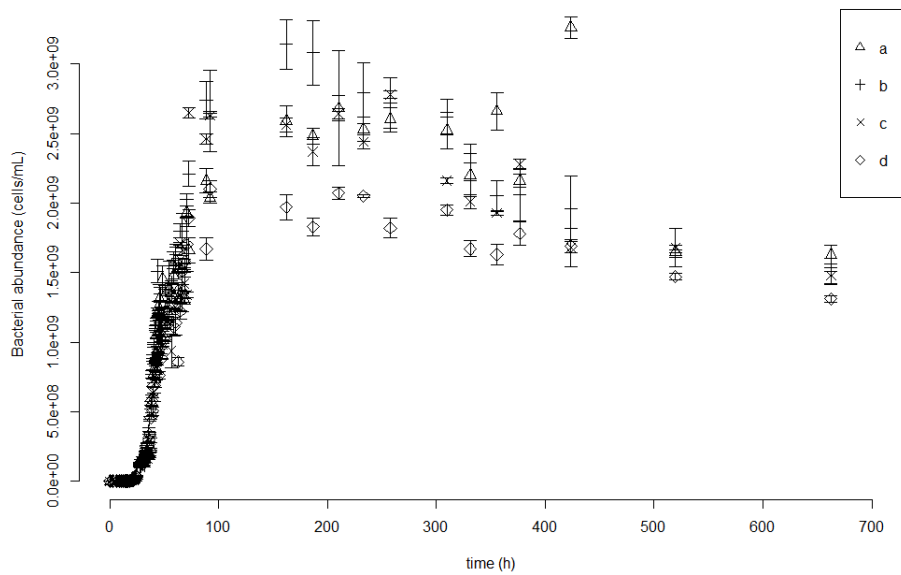
Supplementary data

Supp 4-0 1 Summary of reads analysis with Mothur and rarefaction curves

Mothur command with main criteria	Remaining total # of seqs	Remaining # of unique seqs
Make.contig	11549627	
Screen.seqs(maxambig=0, maxlength=275)	7821787	584928
Align on V4 region screen.seqs(start=1968, end=11550)	7816046	580045
pre.cluster(diffs=2)	7816046	224434
Chimera.vsearch	7594362	205808

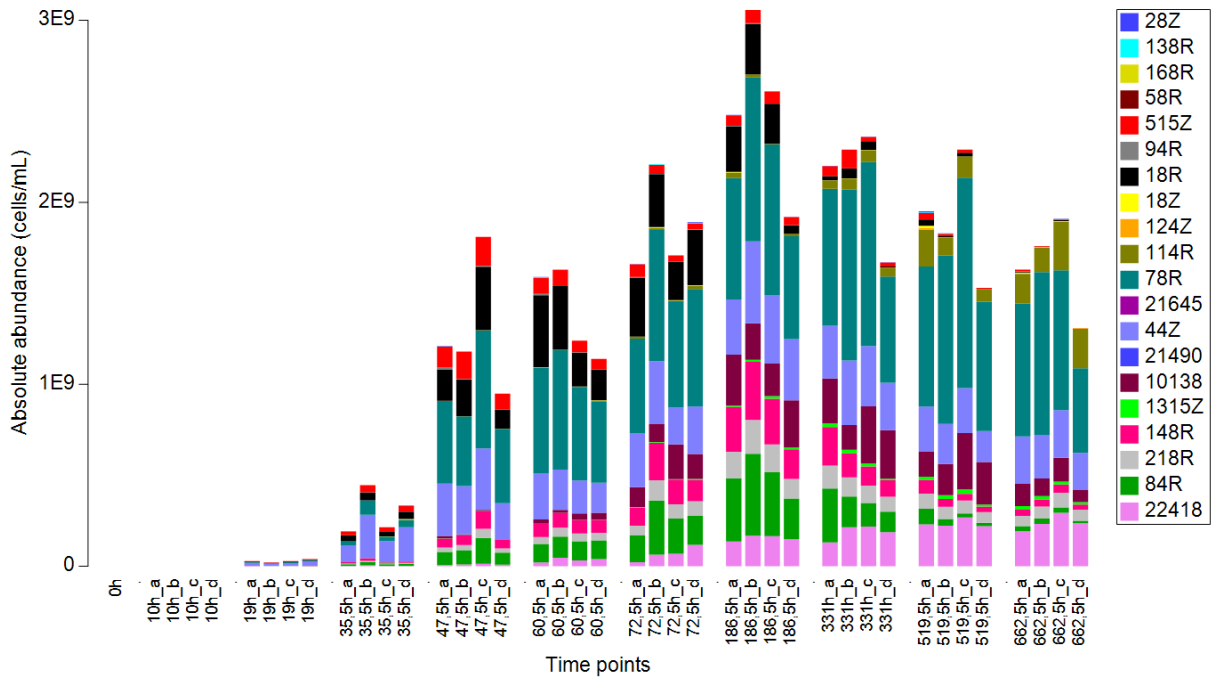
For most of the samples, a plateau was reached. Below, four examples for both media and different replicates.



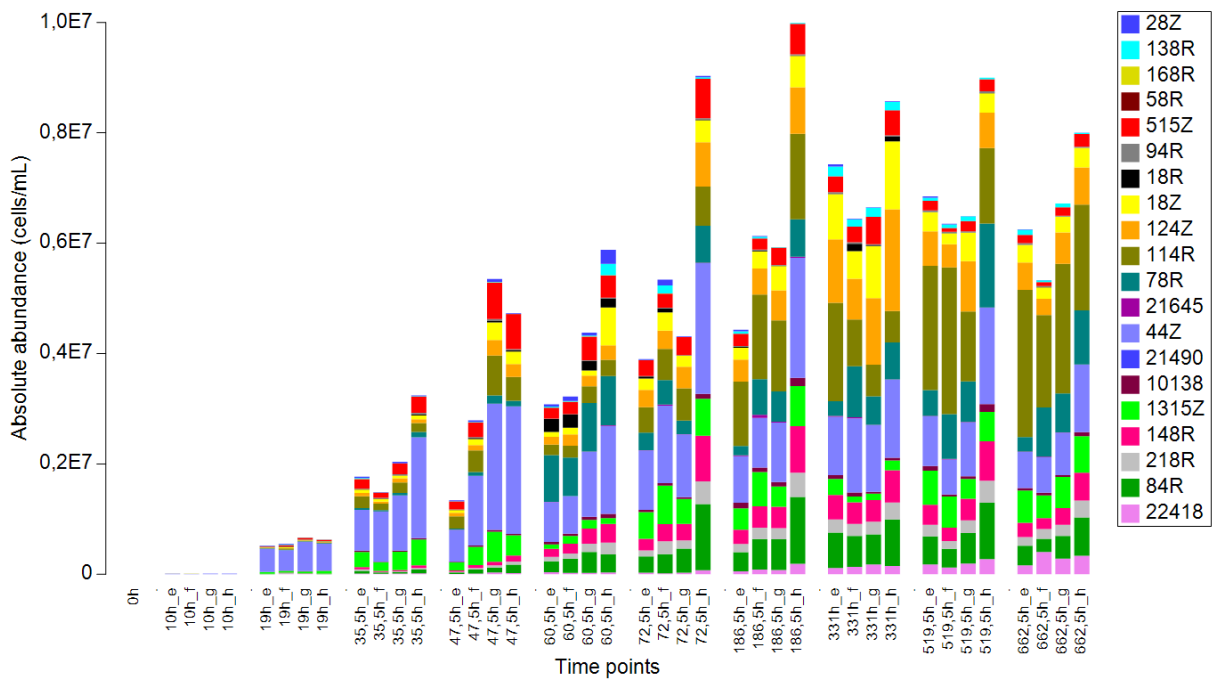


Supp 4-1 Bacterial abundances (cells/mL) of the community in 4 biological replicates during a 27-day incubation period (20°C) in R2 (upper, replicates a,b,c,d,) and Z (low, replicates e,f,g,h) medium measured by flow cytometry. Values are the mean of triplicates and error bars represent standard deviation.

A:



B:



Supp 4-2 Absolute abundances (cells/mL) of the 20 bacterial strains forming the community at the different sampling times in R2 medium (A) and Z medium (B). For each time points, there are 4 replicates (a,b,c,d in R2 and e,f,g,h in Z). Colors refers to strain's numbers indicated in Table 4.1.

References

1. Sarukhan J (ed), Whyte A (ed), Hassan R (ed), et al (2005) Millenium Ecosystem Assessment: Ecosystems and human well-being. Island Press
2. Drury B, Rosi-Marshall E, Kelly JJ (2013) Wastewater Treatment Effluent Reduces the Abundance and Diversity of Benthic Bacterial Communities in Urban and Suburban Rivers. *Appl Environ Microbiol* 79:1897–1905. <https://doi.org/10.1128/AEM.03527-12>
3. Gao Y, Wang C, Zhang W, et al (2017) Vertical and horizontal assemblage patterns of bacterial communities in a eutrophic river receiving domestic wastewater in southeast China. *Environ Pollut* 230:469–478. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.06.081>
4. García-Armisen T, Inceoğlu Ö, Ouattara NK, et al (2014) Seasonal Variations and Resilience of Bacterial Communities in a Sewage Polluted Urban River. *PLoS ONE* 9:e92579. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0092579>
5. de Oliveira LFV, Margis R (2015) The Source of the River as a Nursery for Microbial Diversity. *PLoS ONE* 10:e0120608. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0120608>
6. Kaevska M, Videnska P, Sedlar K, Slana I (2016) Seasonal changes in microbial community composition in river water studied using 454-pyrosequencing. *SpringerPlus* 5:409. <https://doi.org/10.1186/s40064-016-2043-6>
7. Kolmakova OV, Gladyshev MI, Rozanov AS, et al (2014) Spatial biodiversity of bacteria along the largest Arctic river determined by next-generation sequencing. *FEMS Microbiol Ecol* 89:442–450. <https://doi.org/10.1111/1574-6941.12355>
8. Niño-García JP, Ruiz-González C, Giorgio PA del (2016) Interactions between hydrology and water chemistry shape bacterioplankton biogeography across boreal freshwater networks. *ISME J* 10:1755–1766. <https://doi.org/10.1038/ismej.2015.226>
9. Logue JB, Lindström ES (2008) Biogeography of Bacterioplankton in Inland Waters. *Freshw Rev* 1:99–114. <https://doi.org/10.1608/FRJ-1.1.9>
10. Read DS, Gweon HS, Bowes MJ, et al (2014) Catchment-scale biogeography of riverine bacterioplankton. *ISME J* 9:516–526. <https://doi.org/10.1038/ismej.2014.166>
11. Savio D, Sinclair L, Ijaz UZ, et al (2015) Bacterial diversity along a 2 600 km river continuum. *bioRxiv* 010041. <https://doi.org/10.1101/010041>
12. Staley C, Unno T, Gould T j., et al (2013) Application of Illumina next-generation sequencing to characterize the bacterial community of the Upper Mississippi River. *J Appl Microbiol* 115:1147–1158. <https://doi.org/10.1111/jam.12323>
13. Allison SD, Martiny JBH (2008) Resistance, resilience, and redundancy in microbial communities. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:11512–11519. <https://doi.org/10.1073/pnas.0801925105>
14. Schultz GE, Kovatch JJ, Anneken EM (2013) Bacterial diversity in a large, temperate, heavily modified river, as determined by pyrosequencing. *Aquat Microb Ecol* 70:169–179. <https://doi.org/10.3354/ame01646>
15. Lindström ES, Langenheder S (2012) Local and regional factors influencing bacterial community assembly. *Environ Microbiol Rep* 4:1–9. <https://doi.org/10.1111/j.1758-2229.2011.00257.x>
16. Székely AJ, Berga M, Langenheder S (2013) Mechanisms determining the fate of dispersed bacterial communities in new environments. *ISME J* 7:61–71. <https://doi.org/10.1038/ismej.2012.80>
17. Portillo MC, Anderson SP, Fierer N (2012) Temporal variability in the diversity and composition of stream bacterioplankton communities. *Environ Microbiol* 14:2417–2428. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2012.02785.x>
18. Xia N, Xia X, Liu T, et al (2014) Characteristics of bacterial community in the water and surface sediment of the Yellow River, China, the largest turbid river in the world. *J*

- Soils Sediments 14:1894–1904.
<https://doi.org/10.1007/s11368-014-0974-5>
19. Zeglin LH (2015) Stream microbial diversity in response to environmental changes: review and synthesis of existing research. *Aquat Microbiol* 6:454–469.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00454>
 20. Foster KR, Bell T (2012) Competition, not cooperation, dominates interactions among culturable microbial species. *Curr Biol CB* 22:1845–1850.
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.08.005>
 21. Little AEF, Robinson CJ, Peterson SB, et al (2008) Rules of Engagement: Interspecies Interactions that Regulate Microbial Communities. *Annu Rev Microbiol* 62:375–401.
<https://doi.org/10.1146/annurev.micro.030608.101423>
 22. Garcia SL (2016) Mixed cultures as model communities: hunting for ubiquitous microorganisms, their partners, and interactions. *Aquat Microb Ecol* 77:79–85.
<https://doi.org/10.3354/ame01789>
 23. Morris JJ, Lenski RE, Zinser ER (2012) The Black Queen Hypothesis: Evolution of Dependencies through Adaptive Gene Loss. *mBio* 3:e00036-12.
<https://doi.org/10.1128/mBio.00036-12>
 24. Benner R (2003) 5 - Molecular Indicators of the Bioavailability of Dissolved Organic Matter. In: Findlay SEG, Sinsabaugh RL (eds) *Aquatic Ecosystems*. Academic Press, Burlington, pp 121–137
 25. Seth EC, Taga ME (2014) Nutrient cross-feeding in the microbial world. *Front Microbiol* 5:350–356.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00350>
 26. Stubbendieck RM, Vargas-Bautista C, Straight PD (2016) Bacterial Communities: Interactions to Scale. *Front Microbiol* 7:1234–1253.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01234>
 27. Jousset A, Schmid B, Scheu S, Eisenhauer N (2011) Genotypic richness and dissimilarity opposingly affect ecosystem functioning. *Ecol Lett* 14:537–545.
<https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2011.01613.x>
 28. Hug LA, Co R (2018) It Takes a Village: Microbial Communities Thrive through Interactions and Metabolic Handoffs. *mSystems* 3:e00152-17.
<https://doi.org/10.1128/mSystems.00152-17>
 29. Faust K, Raes J (2012) Microbial interactions: from networks to models. *Nat Rev Microbiol* 10:538–550.
<https://doi.org/10.1038/nrmicro2832>
 30. Fisher CK, Mehta P (2014) Identifying Keystone Species in the Human Gut Microbiome from Metagenomic Timeseries Using Sparse Linear Regression. *PLOS ONE* 9:e102451.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0102451>
 31. Widder S, Besemer K, Singer GA, et al (2014) Fluvial network organization imprints on microbial co-occurrence networks. *Proc Natl Acad Sci* 111:12799–12804.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1411723111>
 32. Goetghebuer L, Servais P, George IF (2017) Carbon utilization profiles of river bacterial strains facing sole carbon sources suggest metabolic interactions. *FEMS Microbiol Lett* 364:1–6.
<https://doi.org/10.1093/femsle/fnx098>
 33. Brion N, Verbanck MA, Bauwens W, et al (2015) Assessing the impacts of wastewater treatment implementation on the water quality of a small urban river over the past 40 years. *Environ Sci Pollut Res* 22:12720–12736.
<https://doi.org/10.1007/s11356-015-4493-8>
 34. Ghai R, Rodriguez-Valera F, McMahon KD, et al (2011) Metagenomics of the Water Column in the Pristine Upper Course of the Amazon River. *PLoS ONE* 6:e23785.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023785>
 35. Van Nevel S, Buyschaert B, De Roy K, et al (2017) Flow cytometry for immediate follow-up of drinking water networks after maintenance. *Water Res* 111:66–73.
<https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.12.040>

36. De Roy K, Clement L, Thas O, et al (2012) Flow cytometry for fast microbial community fingerprinting. *Water Res* 46:907–919. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.11.076>
37. Caporaso JG, Lauber CL, Walters WA, et al (2011) Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:4516–4522. <https://doi.org/10.1073/pnas.1000080107>
38. Apprill A, McNally S, Parsons R, Weber L (2015) Minor revision to V4 region SSU rRNA 806R gene primer greatly increases detection of SAR11 bacterioplankton. *Aquat Microb Ecol* 75:129–137. <https://doi.org/10.3354/ame01753>
39. Schloss PD, Westcott SL, Ryabin T, et al (2009) Introducing mothur: Open-Source, Platform-Independent, Community-Supported Software for Describing and Comparing Microbial Communities. *Appl Environ Microbiol* 75:7537–7541. <https://doi.org/10.1128/AEM.01541-09>
40. Clarke K, Gorley R (2006) PRIMER v7: User Manual/Tutorial. PRIMER-E
41. Pielou EC (1966) The measurement of diversity in different types of biological collections. *J Theor Biol* 13:131–144. [https://doi.org/10.1016/0022-5193\(66\)90013-0](https://doi.org/10.1016/0022-5193(66)90013-0)
42. Šimek K, Hornák K, Jezbera J, et al (2006) Maximum growth rates and possible life strategies of different bacterioplankton groups in relation to phosphorus availability in a freshwater reservoir. *Environ Microbiol* 8:1613–1624. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2006.01053.x>
43. Cottrell MT, Kirchman DL (2004) Single-cell analysis of bacterial growth, cell size, and community structure in the Delaware estuary. *Aquat Microb Ecol* 34:139–149. <https://doi.org/10.3354/ame034139>
44. Yokokawa T, Nagata T, Cottrell MT, Kirchman DL (2004) Growth rate of the major phylogenetic bacterial groups in the Delaware estuary. *Limnol Oceanogr* 49:1620–1629. <https://doi.org/10.4319/lo.2004.49.5.1620>
45. Billen G, Servais P (1989) Modélisation des processus de dégradation bactérienne de la matière organique en milieu aquatique. In: Bianchi M, Marty D, Bertrand J-C, et al (eds) *Micro-organismes dans les écosystèmes océaniques*. Masson, pp 219–245
46. Billen G, Servais P, Fontigny A (1988) Growth and mortality in bacterial populations dynamics of aquatic environments. *Ergeb Limnol* 31:173–183
47. Meybeck M (1982) Carbon, nitrogen, and phosphorus transport by world rivers. *Am J Sci* 282:401–450. <https://doi.org/10.2475/ajs.282.4.401>
48. Eiler A, Langenheder S, Bertilsson S, Tranvik LJ (2003) Heterotrophic Bacterial Growth Efficiency and Community Structure at Different Natural Organic Carbon Concentrations. *Appl Environ Microbiol* 69:3701–3709. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.7.3701-3709.2003>
49. Kirchman DL, Dittel AI, Findlay SEG, Fischer D (2004) Changes in bacterial activity and community structure in response to dissolved organic matter in the Hudson River, New York. *Aquat Microb Ecol* 35:243–257. <https://doi.org/10.3354/ame035243>
50. Langenheder S, Prosser JI (2008) Resource availability influences the diversity of a functional group of heterotrophic soil bacteria. *Environ Microbiol* 10:2245–2256. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2008.01647.x>
51. Hiraishi A, Hoshino Y, Satoh T (1991) *Rhodoferrax fermentans* gen. nov., sp. nov., a phototrophic purple nonsulfur bacterium previously referred to as the “*Rhodocyclus gelatinosus*-like” group. *Arch Microbiol* 155:330–336. <https://doi.org/10.1007/BF00243451>
52. Albert RA, Waas NE, Pavlons SC, et al (2013) *Sphingobacterium psychroaquaticum* sp. nov., a psychrophilic bacterium isolated from Lake Michigan water. *Int J Syst Evol Microbiol* 63:952–958. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.043844-0>

53. Dejonghe W, Berteloot E, Goris J, et al (2003) Synergistic Degradation of Linuron by a Bacterial Consortium and Isolation of a Single Linuron-Degrading *Variovorax* Strain. *Appl Environ Microbiol* 69:1532–1541. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.3.1532-1541.2003>
54. Lambo AJ, Patel TR Isolation and characterization of a biphenyl-utilizing psychrotrophic bacterium, *Hydrogenophaga taeniospiralis* IA3-A, that cometabolize dichlorobiphenyls and polychlorinated biphenyl congeners in Aroclor 1221. *J Basic Microbiol* 46:94–107. <https://doi.org/10.1002/jobm.200510006>
55. Parales RE, Harwood CS (2002) Bacterial chemotaxis to pollutants and plant-derived aromatic molecules. *Curr Opin Microbiol* 5:266–273. [https://doi.org/10.1016/S1369-5274\(02\)00320-X](https://doi.org/10.1016/S1369-5274(02)00320-X)
56. Wang Z, Yang Y, Sun W, et al (2014) Nonylphenol biodegradation in river sediment and associated shifts in community structures of bacteria and ammonia-oxidizing microorganisms. *Ecotoxicol Environ Saf* 106:1–5. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.04.019>
57. Breugelmans P, Horemans B, Hofkens J, Springael D (2010) Response to mixed substrate feeds of the structure and activity of a linuron-degrading triple-species biofilm. *Res Microbiol* 161:660–666. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2010.06.006>
58. Rivett DW, Scheuerl T, Culbert CT, et al (2016) Resource-dependent attenuation of species interactions during bacterial succession. *ISME J* 9:2259–68. <https://doi.org/10.1038/ismej.2016.11>
59. Goldford JE, Lu N, Bajić D, et al (2018) Emergent simplicity in microbial community assembly. *Science* 361:469–474. <https://doi.org/10.1126/science.aat1168>

CHAPITRE 5

DISCUSSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

5. Discussion générale et perspectives

5.1. Mise au point et caractérisation des souches composant la communauté modèle.

Le premier volet de ce travail de thèse consista en la mise au point d'une communauté modèle, la plus représentative possible de la communauté naturelle. Cette approche permet d'outrepasser les difficultés expérimentales associées à l'étude des communautés dans leurs milieux naturels, liées aux variations des conditions environnementales qui complexifient la comparaison d'observations *in situ*. Les communautés modèles constituent des systèmes simplifiés, pour lesquels les conditions sont contrôlées et les expériences reproductibles (Großkopf and Soyer 2014).

Notre communauté modèle, composée de 20 souches a été construite selon plusieurs critères : la diversité de genres observés à la station d'échantillonnage de l'écosystème Senne ; la diversité de genres observés dans d'autres rivières dans le monde ; et les profils de croissance mesurés pour les 94 souches isolées à la station d'échantillonnage (afin d'obtenir des souches présentant des taux de croissance et plateaux variés). En octobre 2014, lors de la construction de la communauté, le nombre d'études ayant pour objectif de caractériser la diversité bactérienne d'eaux de rivières par séquençage à haut débit était limité et peu d'entre elles présentaient des résultats de séquençage au niveau du genre. Depuis, de nombreuses études traitant le sujet ont été publiées et l'information disponible sur la diversité des genres s'est multipliée (voir Table 1.1).

Par ailleurs, lors de la construction de cette communauté modèle, nous avons fait le choix arbitraire de sélectionner des genres représentant plusieurs pourcents de la communauté naturelle en proportion relative. Bien que permettant d'éviter la sélection de genre mal identifiés en raison d'erreurs de séquençage, ce choix a potentiellement diminué la représentativité de notre communauté modèle. Pourtant, les taxons rares, définis comme représentant de 0,1 à 1% de la communauté, mériteraient parfois autant d'attention que les dominants. En effet, parmi les taxons inactifs et/ou en voie d'extinction dans la colonne d'eau, une majorité des taxons composant la 'biosphère rare' formerait un réservoir de microbes en l'attente de conditions environnementales favorables (« seeding bank ») (Fuhrman 2009; Caporaso *et al.* 2012). Certains d'entre eux, par leur réponse rapide aux changements environnementaux, peuvent dès lors devenir temporairement abondants dans la communauté. Une étude menée sur plus de 3237

échantillons issus de neuf écosystèmes différents (incluant des eaux douces) a montré que ces taxons occasionnellement abondants contribuaient alors aux variations de la composition de manière disproportionnée par rapport à leur abondance durant ces « blooms » (Shade *et al.* 2014).

En conséquence, la représentativité de la communauté modèle pourrait être améliorée grâce aux données publiées à ce jour et à la sélection de taxons rares. Néanmoins, notre communauté modèle présente des proportions de phyla similaires aux médianes obtenues dans la minireview (Figure 1.1). De plus, lors d'une comparaison des performances (en termes d'abondances cellulaires) des communautés modèle et naturelle en milieu R2 (Figure 3.2) ainsi qu'en présence de plus de 190 sources individuelles de carbone (Supp 3.1), les performances étaient très similaires. Cela indique que notre communauté est relativement représentative à l'égard de la consommation de carbone, le principal facteur étudié lors de ce travail de thèse.

5.2. Caractérisation de la communauté modèle

Les 20 souches sélectionnées pour former la communauté furent ensuite caractérisées vis-à-vis de leur utilisation du carbone. Le carbone constitue le plus gros apport des rejets de stations d'épuration dans les rivières sous pression anthropique. Sous sa forme dissoute dans les eaux, il est un facteur influant fortement la composition de la communauté bactérienne de l'écosystème Senne (García-Armisen *et al.* 2014) de même que celles de nombreuses rivières à travers le monde (Portillo, Anderson and Fierer 2012; Fortunato *et al.* 2013; Fagervold *et al.* 2014; Jackson *et al.* 2014; Xia *et al.* 2014; Kaevska *et al.* 2016; Gao *et al.* 2017; Payne *et al.* 2017). Les profils d'utilisation des 190 sources de carbone testées dans les microplaques variaient fortement entre les souches de la communauté. Aucun profil, même pour les souches taxonomiquement proches, n'était identique à un autre. Pourtant, une plus grande similarité des profils aurait pu être attendue car les souches avaient été isolées sur seulement deux milieux gélosés différents. Par ailleurs, les souches isolées sur un même milieu ne présentaient pas des profils similaires. Des souches isolées sur les mêmes milieux de cultures sont pourtant plus susceptibles de présenter des besoins nutritifs semblables.

Les souches testées différaient donc par le nombre ainsi que la nature des sources de carbone qu'elles étaient capables de cataboliser (Figure 3.3). Les souches qui catabolisaient un grand nombre de sources de carbone furent classées comme généralistes. Seules trois souches (9.4.R, 12.4.Z, 1.8.Z) exploitaient moins de 15% des sources testées et furent considérées comme spécialistes pour cette raison (Gravel *et al.* 2011). Un tel taux de souches généralistes vis-à-vis

du carbone peut indiquer une limitation de ce dernier dans le milieu. En effet, dans les milieux oligotrophes, les bactéries ont développé deux stratégies pour survivre dans des conditions limitantes en carbone : la diminution des besoins cellulaires et le généralisme vis-à-vis des ressources.

La première stratégie consiste en la minimisation du génome et des besoins de maintenance de la cellule (force proton motrice, osmorégulation, dégradation de macromolécules, régulation des voies métaboliques) (Kempes *et al.* 2017). Cette stratégie peut engendrer des dépendances physiologiques entre les organismes. C'est notamment le cas des souches de la lignée acI des *Actinobacteria* qui ont subi de telles simplifications génomiques qu'aucune monoculture viable n'a pour le moment été obtenue (Garcia *et al.* 2018). Malgré les nombreuses études sur le sujet et une bonne compréhension des processus cellulaires, il n'y a toujours pas de théorie explicite permettant de calculer ou d'estimer la part d'énergie consacrée à la maintenance d'une cellule, cette stratégie reste donc peu caractérisée.

La deuxième stratégie se traduit par l'adaptation d'un mode de vie généraliste, en métabolisant un grand nombre de substrats simultanément, permettant une bonne croissance, même en condition limitante pour chacun de ces substrats (Egli 2010). Bien que les concentrations de carbone mesurées à la station d'échantillonnage¹² soient plus élevées que celles observées en milieu oligotrophe, la majorité des souches isolées semblent présenter une stratégie de vie adaptée au milieu limité en carbone.

Par ailleurs, une caractérisation des souches vis-à-vis d'autres ressources tels que les nutriments (phosphore et azote) serait intéressante étant donné l'influence de leur concentration et qualité sur la composition et la structure des communautés bactériennes de milieux lotiques, y compris dans la Senne (García-Armisen *et al.* 2014; Read *et al.* 2014; Savio *et al.* 2015; Henson *et al.* 2018).

La diversité du nombre et du type de sources de carbone individuellement catabolisées par les 20 souches résulta en une forte complémentarité de celles-ci pour l'utilisation des ressources en milieu R2B. En effet, la communauté y dévoila une meilleure performance (en termes de biomasse cellulaire) que 18 des 20 souches individuelles (Figure 3.2), probablement en raison d'une complémentarité de leurs niches écologiques et/ou à l'existence d'interactions positives

¹² A Lembeek, au cours de l'année 2010 les concentrations en carbone organique dissous variaient de 6 à 8mgC/L et lors de la campagne d'échantillonnage d'octobre 2014 la concentration mesurée était de 7,9mgC/L (Table 2.1).

entre souches. Pour deux souches (2.8.Z et 13.8.R), la performance individuelle était plus grande que celle de la communauté. Il est intéressant de constater que lors du suivi de la communauté en R2B, l'abondance relative de ces deux souches était minime par rapport à celle des autres souches de la communauté (Figure 4.3A). Leur diminution peut être liée à de l'antagonisme, dès lors que les souches 13.8.R et 2.8.Z montraient une sensibilité aux substances produites par 4 et 8 souches de la communauté respectivement (Figure 3.7).

Le profil d'utilisation des sources de carbone de la communauté composée des 20 souches ensemble a ensuite été étudié. Sa comparaison avec le profil des sources individuelles a révélé une meilleure utilisation de 41% des sources de carbones testées dans les microplaques Biolog (Figure 3.4A). Face à des sources individuelles de carbone, la complémentarité vis-à-vis de ces sources n'est plus possible et l'augmentation du catabolisme par la communauté suggère l'existence d'interactions positives.

Au sein des communautés bactériennes, les interactions sont omniprésentes. Si bien que les définitions des termes « interaction » et « communauté » sont parfois associées. Fauth *et al.* (1996) définit une communauté comme une « *collection d'espèces présentes au même endroit, au même moment* », tandis que Konopka (2009) propose de la définir comme « *un assemblage de plusieurs espèces, dans lequel les organismes vivent en contact étroit et interagissent entre eux* ». L'étude des interactions biotiques au sein des écosystèmes aquatiques a fait l'objet de nombreuses recherches, notamment concernant les relations entre bactéries et organismes supérieurs tels que les algues (Allen 1971; Cooper and Smith 2015). Grâce aux avancées technologiques dans le domaine du séquençage et de l'émergence de la métabolomique, l'étude des interactions au sein des communautés bactériennes s'est imposée comme une thématique incontournable au cours de la dernière décennie. En effet, la prise en compte des interactions entre les taxons de communautés diverses et complexes permet de mieux comprendre leur rôle fonctionnel et/ou les niches écologiques occupées par ces organismes, souvent non cultivables.

Les profils métaboliques de la communauté modèle et naturelle étaient très semblables. Les 20 souches composant notre communauté étaient capables d'utiliser la majorité des sources de carbone en commun avec la communauté naturelle. Néanmoins, 12% des sources testées n'étaient catabolisées que par la communauté naturelle, ce qui confirme l'importance de la richesse et probablement des taxons rares dans la fonction de la communauté.

Suite aux interactions suggérées par la comparaison des profils d'utilisation de carbone, un suivi temporel de notre communauté modèle nous est apparu nécessaire. Les performances mesurées

jusqu'à présent étaient des mesures ponctuelles, sans indication sur la dynamique de la communauté et des souches qui la composent. De plus, nous n'avions pas information quant à l'évolution de la diversité de la communauté au cours du temps, et n'avions donc aucun moyen de déterminer les taxons clé dans le fonctionnement de notre communauté.

5.3. Etude temporelle de la communauté modèle

Le deuxième volet de ce travail de thèse consista donc en un suivi temporel de l'abondance cellulaire et de la composition de la communauté sur une période de temps de 27 jours, dans deux milieux nutritifs différents : R2B et Z. Deux principales observations ont été faites lors de cette expérience. Premièrement, bien que l'inoculum de départ fût identique pour les deux milieux, la dynamique des communautés divergea rapidement. Ensuite, l'étude des taux de croissance au sein de la communauté révéla une croissance améliorée de certaines souches en communauté, en particulier pour celles qui dominaient en fin d'expérience la communauté incubée en milieu rivière Z, indiquant un consortium potentiel de souches interdépendantes. Après 60,5 heures, la composition semblait être stabilisée en milieu Z tandis qu'un dernier shift était observé en milieu R2 après 519,5 heures, indiquant que la dynamique ne semblait pas terminée dans ce milieu. Un temps plus long d'incubation aurait donc pu révéler une succession supplémentaire dans ce dernier milieu.

Les successions dans les deux milieux sont le résultat d'interactions interspécifiques et des conditions physico-chimiques des milieux de culture utilisés. Le milieu R2 entraîna la sélection de souches dégradant efficacement des composés simples, tandis que le milieu Z sélectionna des souches impliquées dans la dégradation de molécules plus complexes. Un avantage de l'utilisation de communautés modèles réside dans le fait qu'il est possible de contrôler l'environnement pour en étudier les caractéristiques écologiques isolément les unes des autres. Dans cette expérience, nous avons donc étudié l'effet des facteurs locaux de l'habitat, en faisant abstraction d'autres facteurs pourtant importants en rivière tels que la dispersion et la prédation. Nos résultats montrent que malgré un assemblage imposé et artificiel, sur une période de 27 jours, les milieux sélectionnèrent des souches aux propriétés très différentes. Cette sélection peut être liée à la qualité et/ou à la quantité des ressources dans le milieu. Une perspective intéressante de ce travail serait de diluer le milieu R2 aux concentrations en carbone et nutriments équivalentes au milieu Z et d'analyser la succession de la communauté associée à ce nouveau milieu. Les souches sélectionnées sont-elles plutôt celles du milieu R2 ou du milieu

Z ? Cette approche permettrait de déterminer l'importance de la quantité par rapport à la qualité de carbone dans la sélection des souches.

La représentativité d'une communauté modèle présente des limites. A titre d'exemple, les souches sélectionnées par les conditions en milieu Z n'appartenaient pas forcément aux genres dominant les communautés de rivières. Le genre *Limnohabitans*, pourtant référencé comme une souche invasive (Hornák and Corno 2012), ne se maintenait pas dans la communauté. De même, le genre *Flavobacterium*, qui représentait une abondance relative moyenne annuelle de 20% à la station Lembeek de la Senne (García-Armisen *et al.* 2014), ne faisait pas partie des genres dominant le milieu Z. Enfin, le genre *Polynucleobacter*, supposé omniprésent et souvent très abondant dans les eaux de rivières disparaissait rapidement du mélange (Köchling *et al.* 2017). Bien sûr, les conditions en laboratoire ne sont pas les mêmes qu'en milieu naturel et le système simplifié ne mime pas les conditions naturelles. Par exemple, le genre *Flavobacterium* est un genre spécialisé dans l'utilisation des exsudats algaux. L'absence d'algues dans notre milieu simplifié pourrait donc expliquer la plus faible abondance de ce genre. Lors de notre expérience, il eut été intéressant de mesurer l'évolution de la communauté naturelle dans ces deux milieux, afin d'en comparer les taxons sélectionnés en conditions imposées, avec ceux de la communauté modèle.

De façon intéressante, les successions observées à travers les quatre répliques furent sensiblement similaires pour les deux milieux de culture. Cela indique que les processus déterministes dirigeant la succession, c'est-à-dire les interactions et/ou la sélection par l'habitat, étaient dominants et reproductibles. Pourtant, il a été démontré en milieu d'eau douce que les interactions peuvent être non spécifiques et versatiles. En effet, une étude menée sur les interactions des souches acI (Actinobacteria), un des taxons les plus abondants d'eaux douces (Newton *et al.* 2011), a montré que les souches appartenant à cette lignée avaient la capacité d'interagir avec un grand nombre d'espèces différentes (Garcia *et al.* 2018). L'influence des facteurs stochastiques sur l'assemblage et la succession de la composition des communautés a été mise en évidence par une autre équipe de recherche. Malgré une communauté source inoculée et des conditions physico-chimiques identiques, la composition de 14 biofilms¹³ divergeait drastiquement après 50 jours d'expérience (Zhou *et al.* 2013).

Ensemble, nos résultats suggèrent l'existence d'interactions structurant la composition de la communauté modèle, aussi bien dans des milieux contenant une seule source de carbone que

¹³ formés par la colonisation de bactéries d'eaux usées de l'anode de cellules d'électrolyse microbienne

dans des milieux complexes comme R2 et Z. Les conditions étaient pourtant loin d'être idéales pour l'observation d'interactions positives : milieu homogène, riche (pour le R2) et planctonique. La vérification de ces interactions est très compliquée. A l'aide de tests d'antagonisme réalisés entre les 20 souches deux à deux sur R2A, nous avons pu démontrer la production de métabolites secondaires antibiotiques par la majorité de nos souches. Dans ces tests, la souche productrice n'était pas en contact avec la souche indicatrice (cible) lors de la production de molécules antibiotiques. Par conséquent, ces tests ne renseignent pas sur une interaction réciproque entre souches ni en présence de toutes les souches de la communauté simultanément. Néanmoins, ce test a permis de montrer qu'un antagonisme est physiologiquement possible. Les relations antagonistes sont très fréquentes dans les environnements structurés densément peuplés tels que les sols et les biofilms. Une production en milieu aquatique naturel « homogène » est plus surprenante. En effet, les souches antagonistes des environnements aquatiques font face au problème de diffusion de la substance produite loin de la souche productrice, ce qui engendre chez celle-ci une production continue coûteuse pour maintenir une concentration suffisante de la substance autour de ses cellules (Aguirre-von-Wobeser *et al.* 2015).

En ce qui concerne les interactions positives et autres interactions négatives telles que la compétition, leur vérification constitue un vrai challenge en microbiologie. Une méthode permet d'évaluer les interactions positives et négatives entre deux espèces, en comparant les productivités (respiration, taux de croissance ou production de biomasse) des souches individuellement et ensemble (Freilich *et al.* 2011; Foster and Bell 2012; de Vos *et al.* 2017). S'il n'y a pas d'interactions entre les deux souches, la productivité du mélange est supposée correspondre à la somme des productivités individuelles. En revanche, s'il y a une interaction positive/négative, le mélange aura une productivité plus grande/plus petite que la somme des productivités en monocultures. Bien qu'elle permette de discriminer les interactions globalement positives des négatives, cette méthode ne déterminera pas les interactions positives pour une seule des deux souches et neutres ou négatives pour l'autre. Pour distinguer ces interactions, un suivi individuel des deux souches dans la co-culture est nécessaire et réalisable via qPCR, FISH, marquage par GFP, ou encore par suivi des unités formant colonies (UFC) pour les souches présentant des phénotypes différenciables. Toutefois, les interactions supposées entre paires de souches sont susceptibles de changer en présence d'autres taxons. Une solution pour l'étude des interactions microbiennes réside probablement dans l'utilisation

de ces tests expérimentaux en parallèle avec l'étude des réseaux de co-occurrence renseignant sur les interactions potentielles.

Enfin, la dynamique de la composition de la communauté en milieu Z suggérait l'existence d'un consortium de quatre souches. Une expérience intéressante consisterait en la mise en culture de ces quatre souches ensemble en milieu Z afin d'en comparer la performance (après 27 jours) avec celle de la communauté entière. La performance est-elle la même ? Si oui, les quatre souches seules suffiraient au maintien du plateau. Le cas contraire, cela signifie que d'autres souches sont importantes dans le maintien de la performance. Une façon (chronophage) de vérifier lesquelles, pourrait être de comparer la performance de la communauté après 27 jours (en termes d'abondance cellulaire et de taux de croissance) en y enlevant progressivement une souche à la fois. On testerait donc 20 mélanges avec 19 souches plutôt que 20. Ensuite, pour les mélanges de 19 souches présentant les mêmes performances que le mix de 20 souches, on retirerait à nouveau une souche, pour tester quelles sont les mélanges de 18 souches qui permettent de maintenir la performance des 20 ensemble. Et ainsi de suite. La suppression progressive de souches permettrait de déterminer les souches indispensables au maintien de la performance observée lors de notre expérience avec 20 souches.

En définitive, si une meilleure performance peut être maintenue en présence de seulement quelques-unes des souches de la communauté, il ne faut néanmoins pas perdre de vue l'importance de la diversité des communautés. En milieu naturel, la richesse permettra de surmonter les conditions changeantes du milieu et le maintien de la communauté, là où une communauté moins riche pourrait disparaître. Ce concept d'« assurance écologique » est essentiel dans le contexte actuel d'extinction massive de la biodiversité globale.

5.4. Les difficultés et biais expérimentaux

Les difficultés et biais expérimentaux furent nombreux tout au long de ce travail de recherche. L'étude de l'évolution et de la réponse des communautés aquatiques de rivières aux variations spatiotemporelles de l'environnement, est difficile dans un milieu laboratoire.

Deux difficultés pratiques majeures furent rencontrées.

Premièrement, les concentrations de carbone dans les eaux de rivières génèrent des abondances bactériennes de l'ordre de 10^5 à 10^7 cellules/mL (Egli 2010; García-Armisen *et al.* 2014). Ces concentrations ne permettent pas la mesure de la biomasse bactérienne en densité optique à 600nm en raison de la limite de détection des spectrophotomètres. Or, les spectrophotomètres

permettent un suivi automatisé en microplaque (la plaque reste dans l'appareil). En conséquence, tous les suivis temporels effectués lors de cette thèse ont dû être analysés par cytométrie en flux, demandant des mesures ponctuelles. Néanmoins les mesures réalisées par cytométrie sont plus fiables que celles en densité optique dès lors que nous avons observé que des cultures bactériennes présentaient des abondances cellulaires différentes pour une même densité optique à 600nm. Les croissances bactériennes étant rapides, des mesures étaient nécessaires à intervalles serrés (toutes les heures ou toutes les deux heures). Les suivis temporels ont donc exigé de nombreuses nuits d'analyses au laboratoire.

Deuxièmement, les conditions physico-chimiques d'une rivière varient de l'amont à l'aval en raison des perturbations (rejets de stations d'épuration, ruissellements, affluents...) qui provoquent des variations de la concentration en carbone et en nutriments, de la température, du débit, etc. Nos expériences ont été réalisées en système fermé (réacteurs batch), qui ne permet pas le contrôle de la composition du milieu de croissance. Dans ce type de système, celle-ci varie et la concentration en ressources diminue au cours du temps à mesure qu'elles sont consommées, mais aucune ressource n'est ajoutée. En réalité, en milieu rivière, l'origine et la qualité des différentes ressources au sein d'une masse d'eau varient longitudinalement (Guillemette and Giorgio 2011), ce qui provoque des changements inimitables en réacteurs batch. Le seul système pouvant imiter une masse d'eau se déplaçant de l'amont vers l'aval est un chémostat, traversé par un flux de milieu changeant et imitant les variations physico-chimiques de l'eau de rivière. Le recours à un tel système demande de difficiles mises au point. Par exemple, comment choisir le taux de dilution ? Un débit de milieu trop rapide par rapport au volume du réacteur engendrerait la perte des souches à la croissance lente. Un débit trop lent risquerait d'affamer les souches, et/ou de permettre une colonisation des tubes d'alimentation du chémostat. Par ailleurs, les risques de contamination sont également plus élevés avec un milieu ouvert (chémostat) qu'avec un milieu fermé (réacteur batch). Une autre solution expérimentale pourrait être d'utiliser un réacteur à écoulement piston (plug flow reactor) qui imite le continuum longitudinal naturel, c'est à dire un long réseau de tubes avec un débit fixé, au sein duquel des perturbations de type « pulse » (ponctuelles) ou « press » (continues dans le temps) pourraient être appliquées et des échantillonnages longitudinaux réalisés. Toutefois, ces systèmes expérimentaux ne peuvent pas imiter les apports diffus (de bactéries et de ressources) dans la masse d'eau de rivière provenant du lessivage des sols, et les flux hyporhéiques qui sont probablement non négligeables dans les petits cours d'eau.

Ensuite, trois biais majeurs doivent être pris en compte.

Le premier est lié à la décision de travailler avec une communauté modèle de souches cultivables, ce qui nous a confronté à un important dilemme à l'heure du choix des souches. Les souches cultivables ne représentent que 1% des microorganismes présents (Staley and Konopka 1985). De plus, les communautés bactériennes de rivières comportent de nombreux taxons, pour lesquels il n'y a aucun représentant cultivable. Toutefois, les genres isolés au sein de ces 1% nous ont quand même permis de construire une communauté composée de genres 'typiques' d'eau douce.

Le deuxième biais concerne les méthodes de séquençage. De nombreuses études ont mis en évidence les biais liés aux méthodes d'extraction de l'ADN, au choix des amorces pour amplifier le gène codant pour l'ARNr16S, au nombre de copies variable de ce gène chez différentes espèces et à la méthode de séquençage. Par exemple, Fouhy *et al.* (2016) ont testé différents choix de paires d'amorces et deux techniques de séquençage (Ion PGM et Illumina) sur une communauté artificielle composée de 20 espèces bactériennes équi-abondantes. Peu importe les amorces et la méthode de séquençage utilisées, il y avait plus d'espèces détectées que d'espèces réellement présentes dans la communauté artificielle. Les rapports d'abondance différaient fortement selon les scénarios. Dans cette thèse, toutes les analyses phylogénétiques ont été effectuées suivant le protocole expérimental préconisé dans le Earth Microbiome Project, c'est-à-dire une combinaison d'amorces (515F-806bR) ciblant la région V4-V5 et un séquençage Illumina Miseq. Heureusement, ce protocole donnait le résultat le plus représentatif de la communauté artificielle dans l'article mentionné ci-dessus.

Rappelons enfin que le séquençage de l'ADN ne permet pas de distinguer les taxons métaboliquement actifs dans la communauté. Lors de nos échantillonnages rapprochés pendant 27 jours, il se peut que nous ayons détecté des taxons inactifs parmi ceux qui ne montraient pas ou ne montraient plus de croissance. Une solution consisterait à séquencer les fragments d'ARN ribosomal plutôt que les gènes codant pour ceux-ci, afin de discriminer les taxons actifs des taxons en dormance. La plupart des études utilisant cette technique ont constaté des différences entre les taxons actifs et totaux des communautés notamment dans les océans (Frias-Lopez *et al.* 2008; Belstrøm *et al.* 2017) et les lacs (İnceoğlu *et al.* 2015).

L'écologie microbienne des environnements naturels repose fortement sur l'analyse des gènes codant pour l'ARNr16S. Pourtant, la composition taxonomique ne permet pas toujours de comprendre les processus microbiens à l'échelle de l'écosystème. A titre d'exemple, la composition taxonomique d'une communauté peut changer en réponse à des perturbations physico-chimiques tout en conservant une fonctionnalité identique, résultant en une nouvelle

communauté fonctionnellement redondante (Allison and Martiny 2008). D'autres facteurs tels que la dormance d'une partie des cellules bactériennes et les transferts latéraux de gènes engendrent une dissociation de la composition et de la fonction d'une communauté (Boon *et al.* 2014). L'étude de la performance d'une communauté nécessite donc souvent d'aller au-delà de l'analyse taxonomique, vers une exploration des propriétés fonctionnelles. Une approche basée sur des traits fonctionnels et leurs variations au sein de la communauté, en combinaison avec des analyses taxonomiques, pourrait aider à faire le lien entre taxonomie et fonctionnement de l'écosystème. Il a, par exemple, été observé que le gradient de qualité (biodégradabilité) du carbone organique dissous dans des rivières et lacs boréaux dirigeait la biogéographie fonctionnelle de la communauté bactérienne tandis que certains facteurs environnementaux (pH, T° et temps de résidence) dirigeaient la biogéographie taxonomique (Ruiz-González, Niño-García and del Giorgio 2015). En conclusion, à l'heure où la grande majorité des études environnementales ont recours au séquençage, il faut rester critique quant à l'interprétation écologique des résultats. Un séquençage des génomes et des transcriptomes de nos souches dans les deux milieux nutritifs (R2 et Z) pourrait aider à faire un lien entre la taxonomie et la fonction de notre communauté.

En conclusion, durant ce travail de thèse nous avons voulu aller au-delà d'une description taxonomique des communautés d'eau de rivière et de ses corrélations avec les conditions environnementales du milieu. Ici, nous avons choisi une approche opposée, en essayant de comprendre la dynamique d'une communauté simplifiée en conditions contrôlées, c'est-à-dire en s'affranchissant des variations de la plupart des paramètres environnementaux à l'exception de la quantité et de la qualité des sources de carbone. Malgré les lourdes complications expérimentales dues, entre autres, au nombre de souches avec lequel nous avons travaillé, aux faibles concentrations de carbone qu'impose l'étude en eau de rivière, et aux méthodes de séquençage, cette thèse alimente la recherche sur les interactions potentielles au sein des communautés microbiennes (d'un point de vue des résultats ainsi que de l'approche expérimentale) et aborde les moyens d'étudier une communauté modèle de rivière en laboratoire.

Références

- Aguirre-von-Wobeser E, Eguiarte LE, Souza V *et al.* Theoretical analysis of the cost of antagonistic activity for aquatic bacteria in oligotrophic environments. *Front Microbiol* 2015;**6**:490–8.
- Allen HL. Primary Productivity, Chemo-organotrophy, and Nutritional Interactions of Epiphytic Algae and Bacteria on Macrophytes in the Littoral of a Lake. *Ecol Monogr* 1971;**41**:97–127.
- Allen RC, McNally L, Popat R *et al.* Quorum sensing protects bacterial co-operation from exploitation by cheats. *ISME J* 2016;**10**:1706–16.
- Allison SD, Martiny JBH. Resistance, resilience, and redundancy in microbial communities. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;**105**:11512–9.
- Atlas RM, Bartha R. *Microbial Ecology: Fundamentals and Applications*. 4 edition. Menlo Park, Calif: Benjamin Cummings, 1997.
- Barabási A-L. Scale-Free Networks: A Decade and Beyond. *Science* 2009;**325**:412–3.
- Belstrøm D, Constancias F, Liu Y *et al.* Metagenomic and metatranscriptomic analysis of saliva reveals disease-associated microbiota in patients with periodontitis and dental caries. *NPJ Biofilms Microbiomes* 2017;**3**:23–31.
- Benner R, Opsahl S, Chin-Leo G *et al.* Bacterial carbon metabolism in the Amazon River system. *Limnol Oceanogr* 1995;**40**:1262–70.
- Berry D, Widder S. Deciphering microbial interactions and detecting keystone species with co-occurrence networks. *Microb Symbioses* 2014;**5**:219.
- Boon E, Meehan CJ, Whidden C *et al.* Interactions in the microbiome: communities of organisms and communities of genes. *Fems Microbiol Rev* 2014;**38**:90–118.
- Brion N, Verbanck MA, Bauwens W *et al.* Assessing the impacts of wastewater treatment implementation on the water quality of a small urban river over the past 40 years. *Environ Sci Pollut Res* 2015;**22**:12720–36.
- Canstein H von, Kelly S, Li Y *et al.* Species Diversity Improves the Efficiency of Mercury-Reducing Biofilms under Changing Environmental Conditions. *Appl Env Microbiol* 2002;**68**:2829–37.
- Caporaso JG, Paszkiewicz K, Field D *et al.* The Western English Channel contains a persistent microbial seed bank. *ISME J* 2012;**6**:1089–93.
- Carey CC, Ibelings BW, Hoffmann EP *et al.* Eco-physiological adaptations that favour freshwater cyanobacteria in a changing climate. *Water Res* 2012;**46**:1394–407.
- Cavaliere M, Feng S, Soyer OS *et al.* Cooperation in microbial communities and their biotechnological applications. *Environ Microbiol* 2017;**19**:2949–63.

- Cébron A, Berthe T, Garnier J. Nitrification and Nitrifying Bacteria in the Lower Seine River and Estuary (France). *Appl Environ Microbiol* 2003;**69**:7091–100.
- Christiaen SEA, Brackman G, Nelis HJ *et al.* Isolation and identification of quorum quenching bacteria from environmental samples. *J Microbiol Methods* 2011;**87**:213–9.
- Cooper MB, Smith AG. Exploring mutualistic interactions between microalgae and bacteria in the omics age. *Curr Opin Plant Biol* 2015;**26**:147–53.
- Costa JM, Loper JE. EcbI and EcbR: homologs of LuxI and LuxR affecting antibiotic and exoenzyme production by *Erwinia carotovora* subsp. *betavasculorum*. *Can J Microbiol* 1997;**43**:1164–71.
- Crespi BJ. The evolution of social behavior in microorganisms. *Trends Ecol Evol* 2001;**16**:178–83.
- Curtis TP, Sloan WT. Microbiology. Exploring microbial diversity--a vast below. *Science* 2005;**309**:1331–3.
- Davidov Y, Friedjung A, Jurkevitch E. Structure analysis of a soil community of predatory bacteria using culture-dependent and culture-independent methods reveals a hitherto undetected diversity of *Bdellovibrio*-and-like organisms. *Environ Microbiol* 2006;**8**:1667–73.
- Del Giorgio PA, Cole JJ. Bacterial Growth Efficiency in Natural Aquatic Systems. *Annu Rev Ecol Syst* 1998;**29**:503–41.
- Egli T. How to live at very low substrate concentration. *Water Res* 2010;**44**:4826–37.
- Fagervold SK, Bourgeois S, Pruski AM *et al.* River organic matter shapes microbial communities in the sediment of the Rhône prodelta. *ISME J* 2014;**8**:2327–38.
- Faust K, Raes J. Microbial interactions: from networks to models. *Nat Rev Microbiol* 2012;**10**:538–50.
- Fauth JE, Bernardo J, Camara M *et al.* Simplifying the Jargon of Community Ecology: A Conceptual Approach. *Am Nat* 1996;**147**:282–6.
- Fisher MM, Klug JL, Lauster G *et al.* Effects of Resources and Trophic Interactions on Freshwater Bacterioplankton Diversity. *Microb Ecol* 2000;**40**:125–38.
- Fisher SG, Likens GE. Energy Flow in Bear Brook, New Hampshire: An Integrative Approach to Stream Ecosystem Metabolism. *Ecol Monogr* 1973;**43**:421–39.
- Fortunato CS, Eiler A, Herfort L *et al.* Determining indicator taxa across spatial and seasonal gradients in the Columbia River coastal margin. *ISME J* 2013;**7**:1899–911.
- Foster KR, Bell T. Competition, Not Cooperation, Dominates Interactions among Culturable Microbial Species. *Curr Biol* 2012;**22**:1845–50.

- Fouhy F, Clooney AG, Stanton C *et al.* 16S rRNA gene sequencing of mock microbial populations- impact of DNA extraction method, primer choice and sequencing platform. *BMC Microbiol* 2016;**16**:123–36.
- Freilich S, Zarecki R, Eilam O *et al.* Competitive and cooperative metabolic interactions in bacterial communities. *Nat Commun* 2011;**2**:589.
- Frias-Lopez J, Shi Y, Tyson GW *et al.* Microbial community gene expression in ocean surface waters. *Proc Natl Acad Sci* 2008;**105**:3805–10.
- Fuhrman JA. Microbial community structure and its functional implications. *Nature* 2009;**459**:193.
- Gao Y, Wang C, Zhang W *et al.* Vertical and horizontal assemblage patterns of bacterial communities in a eutrophic river receiving domestic wastewater in southeast China. *Environ Pollut* 2017;**230**:469–78.
- Garcia SL, Buck M, Hamilton JJ *et al.* Model Communities Hint at Promiscuous Metabolic Linkages between Ubiquitous Free-Living Freshwater Bacteria. *mSphere* 2018;**3**:e00202-18.
- García-Armisen T, Inceoğlu Ö, Ouattara NK *et al.* Seasonal Variations and Resilience of Bacterial Communities in a Sewage Polluted Urban River. *PLoS ONE* 2014;**9**:e92579.
- Gasperi J, Garnaud S, Rocher V *et al.* Priority pollutants in surface waters and settleable particles within a densely urbanised area: Case study of Paris (France). *Sci Total Environ* 2009;**407**:2900–8.
- Ghai R, Rodriguez-Valera F, McMahon KD *et al.* Metagenomics of the Water Column in the Pristine Upper Course of the Amazon River. *PLoS ONE* 2011;**6**:e23785.
- Ghoul M, Mitri S. The Ecology and Evolution of Microbial Competition. *Trends Microbiol* 2016;**24**:833–45.
- Gorman R, Adley CC. An evaluation of five preservation techniques and conventional freezing temperatures of -20 degrees C and -85 degrees C for long-term preservation of *Campylobacter jejuni*. *Lett Appl Microbiol* 2004;**38**:306–10.
- Gravel D, Bell T, Barbera C *et al.* Experimental niche evolution alters the strength of the diversity-productivity relationship. *Nature* 2011;**469**:89–92.
- Großkopf T, Soyer OS. Synthetic microbial communities. *Curr Opin Microbiol* 2014;**18**:72–7.
- Guarner F, Malagelada J-R. Gut flora in health and disease. *THE LANCET* 2003;**360**:8.
- Guillemette F, Giorgio PA del. Reconstructing the various facets of dissolved organic carbon bioavailability in freshwater ecosystems. *Limnol Oceanogr* 2011;**56**:734–48.
- Hahn MW, Kasalický V, Jezbera J *et al.* *Limnohabitans Curvus* Gen. Nov., Sp. Nov., a Planktonic Bacterium Isolated from a Freshwater Lake. *Int J Syst Evol Microbiol* 2010;**60**:1358–65.

- Hahn MW, Scheuerl T, Jezberová J *et al.* The Passive Yet Successful Way of Planktonic Life: Genomic and Experimental Analysis of the Ecology of a Free-Living Polynucleobacter Population. *PLOS ONE* 2012;**7**:e32772.
- Hanson CA, Fuhrman JA, Horner-Devine MC *et al.* Beyond biogeographic patterns: processes shaping the microbial landscape. *Nat Rev Microbiol* 2012;**10**:497–506.
- Henson MW, Hanssen J, Spooner G *et al.* Nutrient dynamics and stream order influence microbial community patterns along a 2914 kilometer transect of the Mississippi River. *Limnol Oceanogr* 2018;**0**:00–00.
- Hibbing ME, Fuqua C, Parsek MR *et al.* Bacterial competition: surviving and thriving in the microbial jungle. *Nat Rev Microbiol* 2010;**8**:15–25.
- Horňák K, Corno G. Every Coin Has a Back Side: Invasion by Limnohabitans planktonicus Promotes the Maintenance of Species Diversity in Bacterial Communities. *PLOS ONE* 2012;**7**:e51576.
- Hosen JD, Febria CM, Crump BC *et al.* Watershed Urbanization Linked to Differences in Stream Bacterial Community Composition. *Front Microbiol* 2017;**8**:1452–69.
- Hu A, Ju F, Hou L *et al.* Strong impact of anthropogenic contamination on the co-occurrence patterns of a riverine microbial community. *Environ Microbiol* 2017;**19**:4993–5009.
- Huber H, Hohn MJ, Rachel R *et al.* A new phylum of Archaea represented by a nanosized hyperthermophilic symbiont. *Nature* 2002;**417**:63–7.
- İnceoğlu Ö, Llíros M, Crowe SA *et al.* Vertical Distribution of Functional Potential and Active Microbial Communities in Meromictic Lake Kivu. *Microb Ecol* 2015;**70**:596–611.
- Jackson CR, Millar JJ, Payne JT *et al.* Free-Living and Particle-Associated Bacterioplankton in Large Rivers of the Mississippi River Basin Demonstrate Biogeographic Patterns. *Appl Environ Microbiol* 2014;**80**:7186–95.
- Jezbera J, Horňák K, Šimek K. Prey selectivity of bacterivorous protists in different size fractions of reservoir water amended with nutrients. *Environ Microbiol* 2006;**8**:1330–9.
- Kaevska M, Videnska P, Sedlar K *et al.* Seasonal changes in microbial community composition in river water studied using 454-pyrosequencing. *SpringerPlus* 2016;**5**:409.
- Kempes CP, van Bodegom PM, Wolpert D *et al.* Drivers of Bacterial Maintenance and Minimal Energy Requirements. *Front Microbiol* 2017;**8**:31–41.
- Kim HJ, Boedicker JQ, Choi JW *et al.* Defined spatial structure stabilizes a synthetic multispecies bacterial community. *Proc Natl Acad Sci* 2008;**105**:18188–93.
- Köchling T, Sanz JL, Galdino L *et al.* Impact of pollution on the microbial diversity of a tropical river in an urbanized region of northeastern Brazil. *Int Microbiol Off J Span Soc Microbiol* 2017;**20**:11–24.
- Konopka A. What is microbial community ecology? *ISME J* 2009;**3**:1223–30.

- Lawrence D, Fiegna F, Behrends V *et al.* Species Interactions Alter Evolutionary Responses to a Novel Environment. *PLOS Biol* 2012;**10**:e1001330.
- Lindström ES, Langenheder S. Local and regional factors influencing bacterial community assembly. *Environ Microbiol Rep* 2012;**4**:1–9.
- Little AEF, Robinson CJ, Peterson SB *et al.* Rules of Engagement: Interspecies Interactions that Regulate Microbial Communities. *Annu Rev Microbiol* 2008;**62**:375–401.
- Liu T, Zhang AN, Wang J *et al.* Integrated biogeography of planktonic and sedimentary bacterial communities in the Yangtze River. *Microbiome* 2018;**6**:16–30.
- Locey KJ, Lennon JT. Scaling laws predict global microbial diversity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2016;**113**:5970–5.
- Ma L, Mao G, Liu J *et al.* Spatial-Temporal Changes of Bacterioplankton Community along an Exhorheic River. *Front Microbiol* 2016;**7**:250–62.
- Marinho PR, Moreira APB, Pellegrino FLPC *et al.* Marine *Pseudomonas putida*: a potential source of antimicrobial substances against antibiotic-resistant bacteria. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2009;**104**:678–82.
- Mitri S, Clarke E, Foster KR. Resource limitation drives spatial organization in microbial groups. *ISME J* 2016;**10**:1471–82.
- Monod J. The Growth of Bacterial Cultures. *Annu Rev Microbiol* 1949;**3**:371–94.
- Moons P, Michiels CW, Aertsen A. Bacterial interactions in biofilms. *Crit Rev Microbiol* 2009;**35**:157–68.
- Newton RJ, Jones SE, Eiler A *et al.* A Guide to the Natural History of Freshwater Lake Bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* 2011;**75**:14–49.
- Niño-García JP, Ruiz-González C, Giorgio PA del. Interactions between hydrology and water chemistry shape bacterioplankton biogeography across boreal freshwater networks. *ISME J* 2016;**10**:1755–66.
- Ouattara NK, Garcia-Armisen T, Anzil A *et al.* Impact of Wastewater Release on the Faecal Contamination of a Small Urban River: The Zenne River in Brussels (Belgium). *Water Air Soil Pollut* 2014;**225**:2043.
- Payne JT, Millar JJ, Jackson CR *et al.* Patterns of variation in diversity of the Mississippi river microbiome over 1,300 kilometers. *PLOS ONE* 2017;**12**:e0174890.
- Pearson JP, Feldman M, Iglewski BH *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* Cell-to-Cell Signaling Is Required for Virulence in a Model of Acute Pulmonary Infection. *Infect Immun* 2000;**68**:4331–4.
- Portillo MC, Anderson SP, Fierer N. Temporal variability in the diversity and composition of stream bacterioplankton communities. *Environ Microbiol* 2012;**14**:2417–28.

- Rakoff-Nahoum S, Foster KR, Comstock LE. The evolution of cooperation within the gut microbiota. *Nature* 2016;**533**:255–9.
- Ramanan R, Kim B-H, Cho D-H *et al.* Algae–bacteria interactions: Evolution, ecology and emerging applications. *Biotechnol Adv* 2016;**34**:14–29.
- Raymond PA, Hartmann J, Lauerwald R *et al.* Global carbon dioxide emissions from inland waters. *Nature* 2013;**503**:355–9.
- Read DS, Gweon HS, Bowes MJ *et al.* Catchment-scale biogeography of riverine bacterioplankton. *ISME J* 2014;**9**:516–26.
- Reasoner DJ, Geldreich EE. A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water. *Appl Environ Microbiol* 1985;**49**:1–7.
- Rémy B, Plener L, Elias M *et al.* Des enzymes pour bloquer la communication bactérienne, une alternative aux antibiotiques ? *Ann Pharm Fr* 2016;**74**:413–20.
- Rivett DW, Scheuerl T, Culbert CT *et al.* Resource-dependent attenuation of species interactions during bacterial succession. *ISME J* 2016;**9**:2259–68.
- Ruiz-González C, Niño-García JP, del Giorgio PA. Terrestrial origin of bacterial communities in complex boreal freshwater networks. *Ecol Lett* 2015;**18**:1198–206.
- Salcher MM. Same same but different: ecological niche partitioning of planktonic freshwater prokaryotes. *J Limnol* 2013;**73**:74–86.
- Salcher MM, Pernthaler J, Posch T. Seasonal bloom dynamics and ecophysiology of the freshwater sister clade of SAR11 bacteria ‘that rule the waves’ (LD12). *ISME J* 2011;**5**:1242–52.
- Sarukhan J (ed), Whyte A (ed), Hassan R (ed) *et al.* *Millenium Ecosystem Assessment: Ecosystems and Human Well-Being*. Island Press, 2005.
- Savio D, Sinclair L, Ijaz UZ *et al.* Bacterial diversity along a 2 600 km river continuum. *bioRxiv* 2015:010041.
- Schultz GE, Kovatch JJ, Anneken EM. Bacterial diversity in a large, temperate, heavily modified river, as determined by pyrosequencing. *Aquat Microb Ecol* 2013;**70**:169–79.
- Schwarzenbach RP, Egli T, Hofstetter TB *et al.* Global Water Pollution and Human Health. *Annu Rev Environ Resour* 2010;**35**:109–36.
- Servigne P. Des réseaux, partout. *Imagine Demain Monde* 2017;**123**:44–5.
- Shade A, Jones SE, Caporaso JG *et al.* Conditionally Rare Taxa Disproportionately Contribute to Temporal Changes in Microbial Diversity. *mBio* 2014;**5**:e01371-14.
- Shiklomanov I. World Water Resources at the Beginning of the Twenty-First Century. *Camb Univ Press* 2003.

- Šimek K, Hornák K, Jezbera J *et al.* Maximum growth rates and possible life strategies of different bacterioplankton groups in relation to phosphorus availability in a freshwater reservoir. *Environ Microbiol* 2006;**8**:1613–24.
- Staley C, Unno T, Gould T j. *et al.* Application of Illumina next-generation sequencing to characterize the bacterial community of the Upper Mississippi River. *J Appl Microbiol* 2013;**115**:1147–58.
- Staley JT, Konopka and A. Measurement of in Situ Activities of Nonphotosynthetic Microorganisms in Aquatic and Terrestrial Habitats. *Annu Rev Microbiol* 1985;**39**:321–46.
- Starliper CE. Bacterial coldwater disease of fishes caused by *Flavobacterium psychrophilum*. *J Adv Res* 2011;**2**:97–108.
- Székely AJ, Berga M, Langenheder S. Mechanisms determining the fate of dispersed bacterial communities in new environments. *ISME J* 2013;**7**:61–71.
- United N. Revision of World Urbanization Prospects. *U N Dep Econ Soc Aff* 2018.
- Vannote RL, Minshall GW, Cummins KW *et al.* The River Continuum Concept. *Can J Fish Aquat Sci* 1980;**37**:130–7.
- Vetsigian K, Jajoo R, Kishony R. Structure and Evolution of Streptomyces Interaction Networks in Soil and In Silico. *PLOS Biol* 2011;**9**:e1001184.
- Vörösmarty CJ, McIntyre PB, Gessner MO *et al.* Global threats to human water security and river biodiversity. *Nature* 2010;**467**:555–61.
- de Vos MGJ, Zagorski M, McNally A *et al.* Interaction networks, ecological stability, and collective antibiotic tolerance in polymicrobial infections. *Proc Natl Acad Sci* 2017;**114**:10666–71.
- Wang L-H, Weng L-X, Dong Y-H *et al.* Specificity and Enzyme Kinetics of the Quorum-quenching N-Acyl Homoserine Lactone Lactonase (AHL-lactonase). *J Biol Chem* 2004;**279**:13645–51.
- Widder S, Besemer K, Singer GA *et al.* Fluvial network organization imprints on microbial co-occurrence networks. *Proc Natl Acad Sci* 2014;**111**:12799–804.
- Xia N, Xia X, Liu T *et al.* Characteristics of bacterial community in the water and surface sediment of the Yellow River, China, the largest turbid river in the world. *J Soils Sediments* 2014;**14**:1894–904.
- Zeglin LH. Stream microbial diversity in response to environmental changes: review and synthesis of existing research. *Aquat Microbiol* 2015;**6**:454–69.
- Zelezniak A, Andrejev S, Ponomarova O *et al.* Metabolic dependencies drive species co-occurrence in diverse microbial communities. *Proc Natl Acad Sci* 2015;**112**:6449–54.
- Zhou J, Liu W, Deng Y *et al.* Stochastic Assembly Leads to Alternative Communities with Distinct Functions in a Bioreactor Microbial Community. *mBio* 2013;**4**:e00584-12.