

# La stimulation racinaire de l'élimination de l'azote concerne-t-elle des zones limitées ou l'ensemble d'un marais artificiel ?

Christiane Münch <sup>a</sup>, Peter Kuschk <sup>b</sup>, Isolde Röske <sup>a</sup>

Les marais artificiels ont désormais une place reconnue à côté des techniques conventionnelles de traitement des eaux usées qui concernent non seulement l'élimination de la fraction carbonée de la matière organique et le phosphore mais également l'abattement de l'azote. Pour ce dernier objectif, deux processus malheureusement diamétralement opposés sont nécessaires. Premièrement, les sels ammoniacaux de l'eau usée doivent être oxydés et à cause des faibles échanges d'air dans le sol, ce processus est souvent limité par l'oxygène (Visser *et al.*, 2000). Deuxièmement, les nitrates produits doivent idéalement être réduits en azote moléculaire (Stefar *et al.*, 1994). Le processus de dénitrification nécessite des composés carbonés utilisables par les micro-organismes dénitrifiants. Puisque les nitrifiants sont autotrophes et croissent lentement, ils ne peuvent concourir avec les hétérotrophes si de fortes teneurs de carbone organique sont présentes. De ce fait, l'abattement du carbone doit intervenir avant que ne commence celui de l'azote et, par conséquent, la dénitrification est limitée par l'absence de carbone organique disponible.

Les racines des plantes dans les marais artificiels servent de supports pour la croissance de la biomasse fixée et peuvent en particulier, avoir une forte influence sur les bactéries nitrifiantes et dénitrifiantes. Cette influence est liée principalement à l'oxygène excrété (Brix, 1990 ; Calhoun et King, 1997) et à la rhizo-déposition (Martens, 1982 ; Kroer *et al.*, 1998). Les plantes aquatiques enracinées (hélrophytes) fournissent de l'oxygène

atmosphérique directement à leurs racines. Une partie de cet oxygène atteint la rhizosphère pour oxyder les composés toxiques qui peuvent se trouver dans l'environnement racinaire. La croissance des micro-organismes est ainsi stimulée par l'oxygène continuellement libéré et l'absence de composés toxiques. Cette oxygénation de la rhizosphère modifie également les potentiels d'oxydo-réduction des zones anoxiques et rend possible des processus d'oxydation comme la nitrification (Ward, 1996). La rhizo-déposition est le résultat du dépôt de matériel cellulaire mort ou d'exsudats autour des racines. Des composés tels les sucres et des acides aminés peuvent servir de substrats pour les micro-organismes, en particulier pour les bactéries dénitrifiantes qui peuvent y trouver des sources de carbone. Par conséquent, l'environnement immédiat des racines constitue un habitat spécial pour les bactéries avec ses propres propriétés.

Précédemment, la rhizosphère a souvent été examinée en vue de déterminer un éventuel effet rhizosphère ou pour quantifier quelques paramètres spécifiques comme le relargage d'oxygène par les racines. En revanche, rien n'a vraiment été entrepris pour quantifier l'amplitude géographique de cet effet rhizosphère. De ce fait, nos investigations ont été limitées à quelques millimètres de distance des racines car la stimulation de l'activité microbienne au seul niveau des racines a un faible effet sur le traitement des eaux usées. Pour cet objectif particulier, il est en effet plus intéressant d'examiner les stimulations induites par l'effet rhizosphère dans un espace

## Les contacts

a. Technical University  
Dresden, Institute for  
Microbiology,  
Mommensenstraße  
13, 01062 Dresden,  
Germany

b. UFZ Centre For  
Environmental  
Research Leipzig-Halle,  
Permoserstr.15,  
04318 Leipzig,  
Germany

plus vaste qui représente l'activité microbienne dans l'ensemble de l'environnement racinaire des plantes. L'objectif était alors de déterminer à quelles distances des racines la stimulation de la nitrification et de la dénitrification est détectable et de mettre en évidence son importance par rapport à l'ensemble du processus épuratoire dans les marais artificiels.

## Matériel et méthodes

### Le réacteur

Les observations ont été conduites dans deux réacteurs de laboratoire de 12 litres chacun qui représentent une petite section rectangulaire d'un marais artificiel. Ils étaient tous deux remplis de sable ayant une perméabilité  $k_f = 1 \cdot 10^{-3} \text{ ms}^{-1}$ . Un de ces réacteurs a été planté de roseaux (*Phragmites australis* [Cav.] Trin ex Steudel). Une bande de ce réacteur était séparée par une gaze (100  $\mu\text{m}$  d'ouverture) pour y éviter la croissance des racines sans gêner les échanges microbiens et moléculaires. Le réacteur non planté constituait le témoin. Les deux réacteurs étaient alimentés avec une eau usée reconstituée enrichie en ammonium (100 mg/l) et en carbone organique à faible concentration (15 mg/l). Le matériau est saturé, les mesures et échantillonnages ont démarré après 6 semaines d'alimentation et pendant tout ce temps, les niveaux d'eau et les concentrations en nutriments ont été maintenus constants.

### Paramètres indicateurs de la biomasse et nombre total de bactéries

Des échantillons ont été prélevés à intervalles de 10 mm au-delà de la gaze à une profondeur de 10 cm. Le biofilm a été extrait du sable par agitation dans une solution à 3 % de Tween 80<sup>2</sup> pendant 2 heures à 22 °C, à la suite d'un traitement par ultra-sons (30 s ; 157,5  $\mu\text{m}$  ; 0,5 sec de pause et 0,5 sec de travail ; Bandelin Sonoplus). Une fixation des échantillons avec du paraformaldehyde (concentration finale 3,5 %) suivait en vue du comptage bactérien. Les bactéries ont été colorées avec du Sytox<sup>®</sup> bleu (Molecular Probes), un colorant ayant une forte affinité pour l'acide nucléique qui pénètre aisément les cellules mortes de tailles comprises entre 1 et 2,5  $\mu\text{m}$ .

La biomasse bactérienne totale dans le système a été déterminée *via* la quantité d'ADN comme décrit par Obst (1995) à partir de 2 g d'échantillons de matériaux frais.

### Activités enzymatiques

L'activité nitrifiante a été déterminée *via* l'oxydation des ions ammonium selon une méthode décrite par Remde (1998). Quatre grammes de sédiment humide sont agités pendant 3 h (180 t/mn ; 28 °C) dans une solution tampon (0,04 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  ; 0,02 g  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  ; 0,5 g NaCl ; 10 ml  $\text{FeSO}_4$  dans une solution d'EDTA ; 10 ml de tampon phosphate pH 7,6) avec du substrat en solution ( $\text{NH}_4\text{Cl}$  ; 250  $\text{mg l}^{-1}$   $\text{NH}_4\text{-N}$ ) additionné de  $\text{KClO}_3$  pour inhiber l'activité bactérienne oxydante sur les nitrites. Dans des sous-échantillons séparés, l'oxydation des ions ammonium a été détectée en ajoutant du sulfanilamide et du dihydrochlorure de N-(1-naphtyl)éthylène diamine pour vérifier la présence de nitrites (Bendschneider, 1952).

L'activité dénitrifiante a été mesurée par la méthode d'inhibition à l'acétylène selon Remde (1998). Dans des flacons de 15 ml contenant 4 g de sédiment frais et 4 g du mélange constitué des éléments suivants (en g/l) :  $\text{KNO}_3$ , 0,72 ;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0,14 ;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,027 ; NaAcetat, 2,4. Ces flacons ont été purgés de leur air trois fois pendant 10 mn avec de l'azote gazeux à la pression de 20 kPa. Après addition d'acétylène gazeux sous une pression également de 20 kPa, les flacons ont été mis en incubation en position horizontale dans un agitateur (180 t/mn ; 20 °C). La production de protoxyde d'azote ( $\text{N}_2\text{O}_0$ ) a été mesurée par chromatographie en phase gazeuse (Shimadzu GC-17A) avec un détecteur ECD et une colonne Porapak N pour la séparation des gaz. L'activité dénitrifiante a été calculée à partir de la pente de la progression, toujours linéaire, de la concentration en  $\text{N}_2\text{O}_0$  en 4 h d'incubation.

### Paramètres physico-chimiques

L'oxygène a été mesuré *in situ* dans le sédiment intact à une profondeur de 10 cm avec une sonde miniaturisée sous forme d'électrode de Clark fabriquée par l'Institut Kurt Schwabe à Meinsberg.

Le carbone organique dissous (COD)<sup>3</sup> a été mesuré dans l'eau filtrée (0,45  $\mu\text{m}$ ) avec un analyseur DC-190, Rosemount Analytical Dohrmann.

### Statistiques

Les calculs statistiques ont été réalisés avec le logiciel Statistica<sup>®</sup> version 5.0 (StatSoft, Inc.). La normalité de toutes les données a été testée par le

1. Ce qui correspond environ à un sable ayant un  $d_{10}$  d'environ 0,25 mm et moins de 3 % de fines < 80  $\mu\text{m}$  en masse (N.D.T. : note du traducteur).

2. Solution neutralisante utilisée couramment pour le traitement de prélèvements bactériens (N.D.T.).

3. En anglais, DOC pour *Dissolved Organic Carbon*.

test de Kolmogoroff-Smirnoff et l'homogénéité des variances avec  $F_{\max}$ -test. Toutes les comparaisons ont été calculées avec un niveau de probabilité à 95 %. Les corrélations ont été déterminées avec le coefficient de corrélation de Pearson.

## Résultats

### Paramètres physico-chimiques

Comme le montre la figure 1, la concentration d'oxygène change en fonction de l'éloignement des racines. À proximité immédiate des racines, la concentration d'oxygène est deux fois plus élevée que dans le bac de référence non planté, ce qui confirme le relargage par les plantes. Cependant, les valeurs varient beaucoup, traduisant une certaine hétérogénéité entre des micro zones dans le sol. Le changement de concentrations dans le sol est élevé en raison de l'importante demande en oxygène liée à la nitrification. Par conséquent, l'apport d'oxygène par les racines des plantes est probablement plus élevé que celui mesuré. La concentration d'oxygène dans le réacteur témoin non planté est comparable aux conditions prévalant dans le réacteur planté à une distance de 40 mm par rapport aux racines. Au-delà, aucun changement significatif ne peut être constaté. Le COD dans l'entourage immédiat des racines est plus élevé que lorsqu'on s'en éloigne. La décroissance n'est cependant pas significative, mais reflète une tendance à l'exception notable du point situé à 10 mm des racines qui est significativement plus élevé que tous les autres points et indique l'influence de la rhizo-déposition déjà mentionnée. En revanche, aucun changement significatif ne peut être distingué dans le témoin non planté.

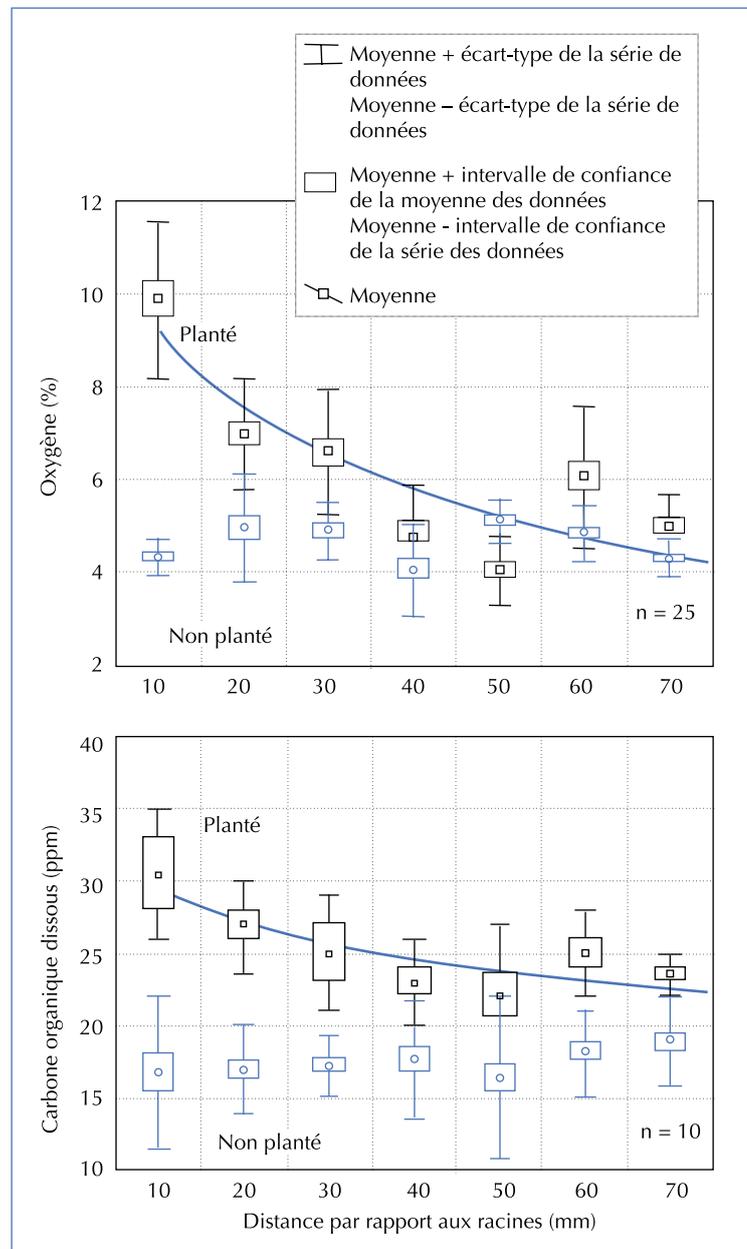
### Concentrations en ADN et nombre total de bactéries

L'effet stimulant des racines dans la rhizosphère est évident comme on peut le voir grâce aux paramètres microbiologiques : nombre total de bactéries et quantités d'ADN, comme cela est visible sur la figure 2 (page 8) et notons la différence d'échelle supérieure à un facteur 10 dans le réacteur planté (à gauche).  $3,2 \cdot 10^9$  bactéries par gramme de sol (masse sèche) ont été trouvées aux abords immédiats des racines, ce qui est du même ordre de grandeur que le nombre trouvé dans des stations d'épuration des eaux usées (Ballinger et al., 1998). Le nombre total de bactéries décroît jusqu'à  $2,5 \cdot 10^9$  cellules en fonction de la distance

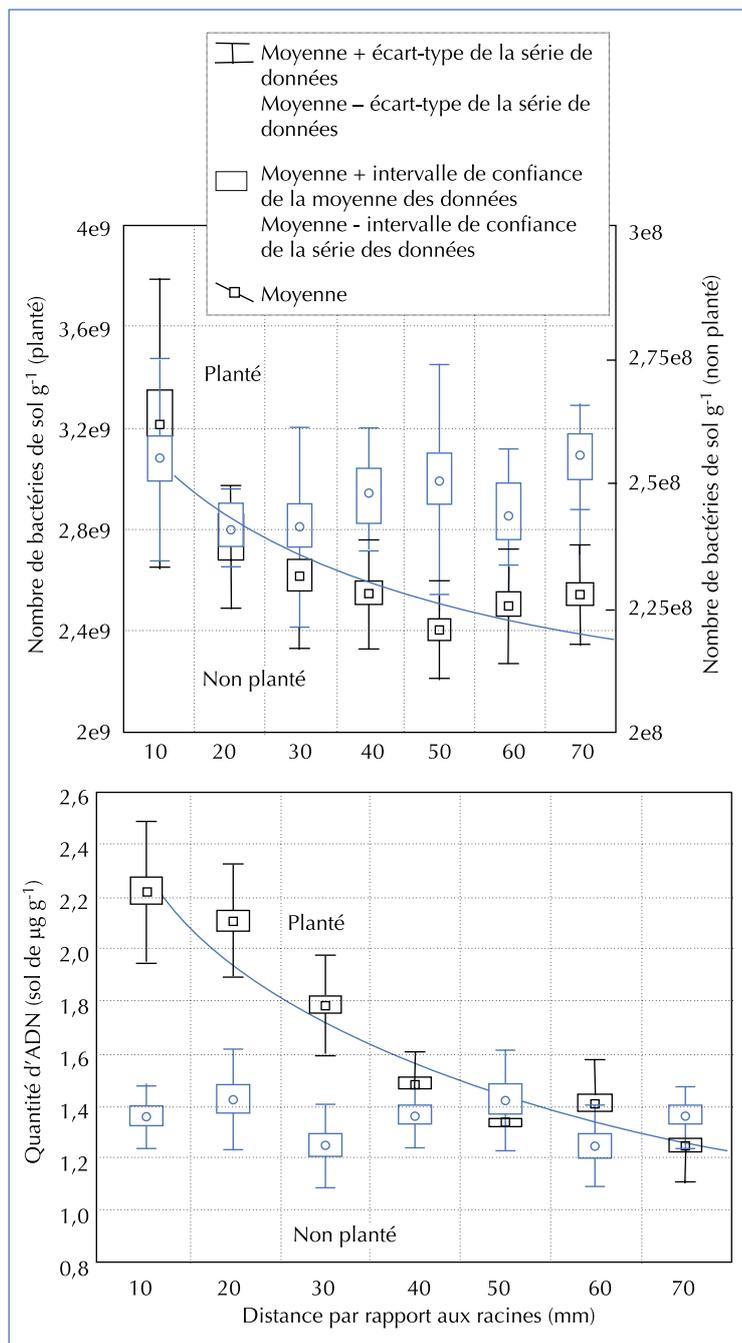
aux racines, mais même à 70 mm, leur nombre est significativement plus élevé que dans le témoin non planté où l'on ne trouve que  $2,5 \cdot 10^8$  cellules par gramme de sédiment sec.

Les résultats des concentrations en ADN par rapport à la distance aux racines sont similaires (figure 2). Une influence significative des racines

▼ Figure 1 – Concentrations en oxygène et en carbone organique dissous en fonction de l'éloignement par rapport aux racines dans le réacteur planté et le témoin non planté.



est également observée pour ce paramètre. On notera la diminution très visible de l'écart type des paramètres microbiologiques par rapport aux mesures de COD et d'oxygène.



▲ Figure 2 – Nombre total de bactéries et quantités d'ADN par rapport à la distance aux racines dans le réacteur planté et le témoin non planté.

## Activités enzymatiques

Si l'on en juge par l'activité enzymatique, il est évident que la nitrification et la dénitrification sont stimulées par les racines (figure 3). L'allure de la nitrification est comparable à celle de la concentration en oxygène. Les deux paramètres décroissent quand la distance par rapport aux racines s'accroît. La relativement forte décroissance pour les points à 20 et 30 mm des racines est caractéristique. La dénitrification décroît en revanche de façon régulière en fonction de l'éloignement des racines. Les deux processus de nitrification et dénitrification sont sensiblement plus faibles dans les témoins non plantés. Ce constat digne d'attention peut être attribué aux conditions défavorables, respectivement limitation d'oxygène pour la nitrification et de carbone pour la dénitrification.

## Discussion

### L'ampleur de l'influence détectable des racines

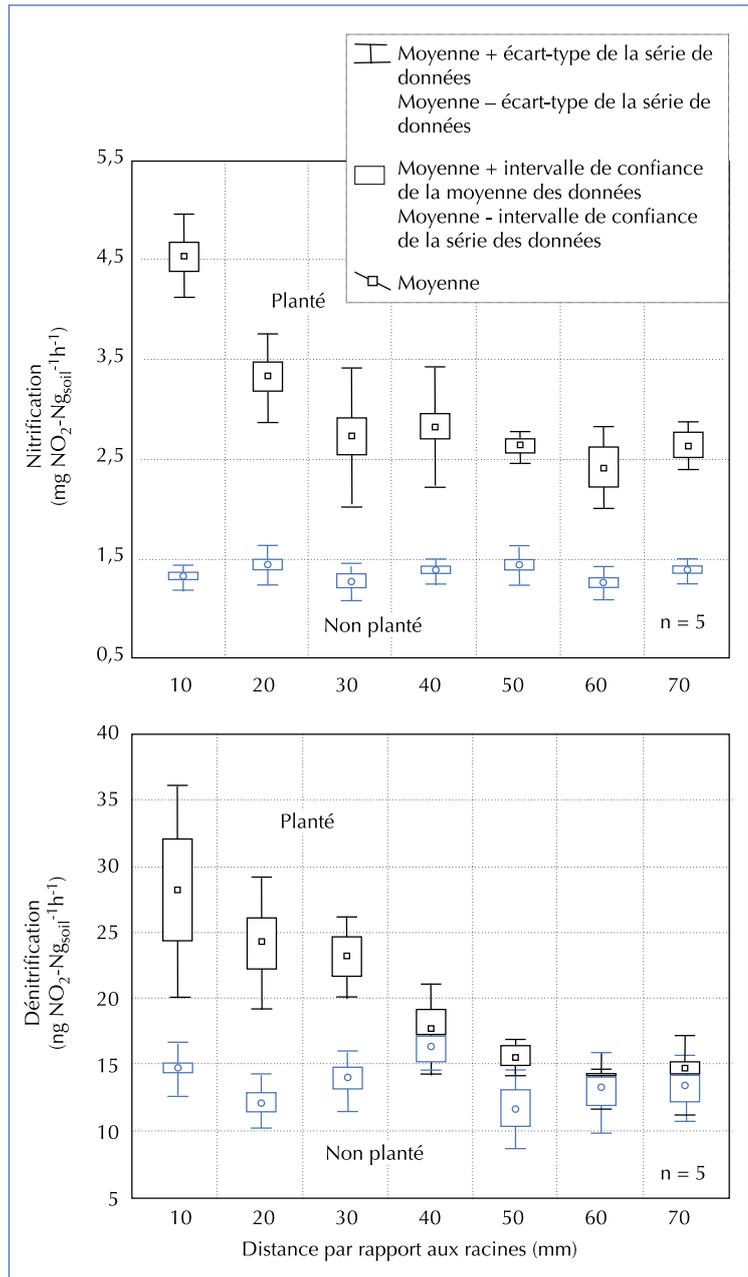
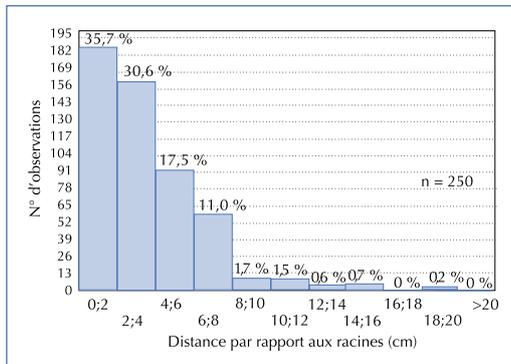
Pour tous les paramètres, on note une influence croissante ou décroissante des racines jusqu'à une distance spécifique. Au-delà de ce point, aucun changement significatif à une probabilité de 95 % n'apparaît. Cependant, l'ampleur de cette influence détectable varie selon les divers paramètres mesurés. Les quantités d'oxygène et de carbone organique dissous ne diffèrent pas sensiblement aux environs de 20-30 mm. Malgré la forte activité dénitrifiante, une augmentation de la fourniture de carbone au voisinage immédiat des racines, causée par la rhizodéposition, est détectable. Ceci suppose que seule une petite partie de ce carbone « excrété » est détectable au regard de la limitation de ce paramètre dans tous les processus hétérotrophes.

Les paramètres microbiologiques sont intégrateurs des conditions prévalant dans le milieu au-delà de courtes périodes, tandis que les paramètres chimiques et physiques comme l'oxygène et le carbone organique dissous sont sujets à des variations plus rapides. Par conséquent, des paramètres tels que le nombre total de bactéries et la quantité d'ADN sont influencés jusqu'à une distance de 50 mm. Ces résultats semblent contradictoires avec les précédentes investigations réalisées qui limitaient l'effet rhizosphère à une échelle de l'ordre du millimètre (Bodelier *et al.*, 1996 ; Kowalchuk *et al.*, 1998). Le nombre total de bactéries correspond

étroitement à la concentration d'ADN. En raison de la teneur relativement constante d'ADN dans la matière sèche microbienne (environ 3-4 %), ce paramètre est approprié pour déterminer la biomasse vivante (Brock *et al.*, 1994).

À propos de la nitrification et de la dénitrification, une différence significative jusqu'à 30 et 40 mm est respectivement observée, confirmant ainsi que l'effet rhizosphère stimule directement les transformations de l'azote. Au regard des conditions contradictoires qui les influencent, la stimulation de ces deux processus confirme la théorie d'une grande hétérogénéité dans la rhizosphère. Elle est le fait d'un micro zonage aérobie et anaérobie qui se met en place de façon contiguë.

En examinant l'ensemble des mesures réalisées, on peut noter un effet stimulant clair entre 20 et 50 mm de distance des racines. La valeur moyenne dans cette fourchette est de 30 mm. Il s'agit d'une indication intéressante qui montre que la stimulation de la nitrification et/ou dénitrification est aussi possible dans l'environnement étendu des racines. Afin de pouvoir établir l'importance de cette stimulation pour le traitement des eaux usées, il est nécessaire de comparer l'importance de cette stimulation à la distance entre racines dans ce sol sableux. Comme le montre la figure 4, plus de 65 % des racines de roseaux ne sont distantes que de 40 mm l'une de l'autre (Kutschera, 1968). La distance moyenne entre 2 racines est 35 mm. En considérant le fait que la distance entre 2 racines pourrait être de 2 fois 30 mm pour ressentir l'influence de ces dernières, il est évident que 84 % de l'ensemble des racines de roseaux dans le sol participent à l'effet stimulant.



▲ Figure 3 – Potentiel de nitrification et de dénitrification en fonction de la distance aux racines dans le réacteur planté et le témoin non planté.

◀ Figure 4 – Fréquence de distance racine à racine dans un sol sableux (jusqu'à 1,5 m de profondeur).

## Conclusion

Au regard de l'ampleur de l'influence des racines pour les paramètres mesurés et de la distance entre racines des roseaux, l'espace stimulé par les racines peut être étendu à l'ensemble du marais artificiel colonisé par les racines. Par

conséquent, l'influence des racines n'est pas seulement locale mais peut concerner l'ensemble des processus microbiens impliqués dans le traitement des eaux usées.



## Résumé

Les plantes des marais artificiels servent de supports de croissance pour des micro-organismes fixés. Elles transfèrent principalement de l'oxygène, en quantités limitées, vers la zone racinaire et excrètent des métabolites, ce qui conduit à une zone, appelé la rhizosphère, où la croissance bactérienne est stimulée par la présence des racines. L'objet de notre étude était de déterminer si la stimulation de la biocénose microbienne a seulement un effet local sur le système racinaire ou si sa présence a également une incidence sur les processus d'épuration des eaux dans cette zone. Les essais ont eu lieu au laboratoire dans deux bacs remplis de sable dont un planté avec des roseaux (*Phragmites australis*), l'autre non planté. Un petit secteur du bac planté était isolé à l'aide d'une gaze fine de façon à éviter la croissance de racines vers cette zone. L'alimentation s'effectuait par bâchées. Les réacteurs étaient remplis d'eaux usées synthétiques avec une concentration élevée d'azote ammoniacal. Les prélèvements pris dans le bac planté se situaient à des intervalles de 10 mm sur un axe s'éloignant de la gaze. Les caractéristiques physiques et chimiques dans les sections du « sol-sable » et l'activité enzymatique liée aux processus de nitrification de dénitrification ont été caractérisées.

Une influence détectable pour plusieurs paramètres a pu être mise en évidence jusqu'à une certaine distance des racines. Des paramètres indirects comme le nombre total de bactéries et la teneur en ADN (acide désoxyribonucléique) semblent être influencés jusqu'à 50 mm des racines, tandis que les teneurs en oxygène et en carbone organique dissous ne sont plus influencées au-delà d'une distance de 20 à 30 mm. Ceci indique qu'une élimination renforcée de l'azote serait également possible à une distance plus éloignée de la rhizosphère. Considérant une distance moyenne entre les racines de 35 mm, on peut avancer que la zone influencée par les racines concerne l'ensemble du massif et pas seulement des zones restreintes proches de racines. L'influence des racines sur les populations bactériennes ne se limite donc pas à un effet local mais joue probablement un rôle dans les processus d'épuration à l'œuvre dans l'ensemble d'un marais artificiel.

## Abstract

Plants in constructed wetlands serve as carriers for attached microbial growth. They mainly to some extent transfer oxygen and release exsudates to the root zone. In consequence of this an area around the roots, called rhizosphere exists, in which bacteria are stimulated by root growth. The goals were to ascertain whether stimulating the microbial cenosis only has a local effect on the rhizosphere, and to establish the importance of this stimulation for the water purification process in the root zone. Observations were carried out in a laboratory batch reactor filled with sand and planted with reeds (*Phragmites australis*). A small section was separated with gauze to avoid root growth outside this zone. The reactor was incubated with an artificial waste water containing a high concentration of ammonium. Samples were taken at intervals of 10 mm away from the gauze. The chemical and physical conditions and enzyme activities in soil sections at different distances from the roots affecting the efficiency of nitrogen removal were characterized.

An influence was detectable by several parameters up to a specific root distance. Indirect parameters such as the total bacterial number and the DNA amount seem to be affected up to a distance of 50 mm from the root whereas the oxygen amount and DOC are unaffected at a distance exceeding 20-30 mm. This is an initial indication that improved nitrogen removal is also possible in the wider root surroundings. In view of the average root-to-root distance of 35 mm, the root-influenced area could therefore be expanded to the whole rooted zone in a constructed wetland. The influence on bacteria by roots is not just a local effect but may also play an important role in the whole purification process.

## Bibliographie

- BALLINGER, S.J., EAD, I.-M., CURTIS, T.-P., GODLEY, A.-R., 1998, Molecular Microbial Ecology of nitrification in an activated sludge process treating wastewater, *Water Science Technology*, 37, p. 4-5.
- BENDSCHNEIDER, K., ROBINSON, R.-J., 1952, A new spectrophotometric method for the determination of nitrite in sea water, *Journal of Marine Research*, 11, p. 87-96.
- BRIX, H., 1990, Gas-exchange through the soil atmosphere interphase and through dead culms of *Phragmites australis* in a constructed reed bed receiving domestic sewage, *Water Research*, 24 (2), p. 259-266.
- BROCK, T.-D., MADIGAN, M.-T., MARTINKO, J.-M., PARKER, J., 1994, *Biology of Microorganisms*, Prentice-Hall Inc., New Jersey, 7<sup>e</sup> edition.
- CALHOUN, A., KING, G.-M., 1997, Regulation of root-associated methanotrophy by oxygen availability in the rhizosphere of two aquatic macrophytes, *Applied and Environmental Microbiology*, 63, p. 3051-3058.
- KOWALCHUK, G.-A., BODELIER, P.-L., HEILIG, H.-J., STEPHEN, J.-R., 1998, Community analysis of ammonia-oxidizing bacteria, in relation to oxygen availability in soil and root-oxygenated sediments, using PCR, DGGE and oligonucleotide probe hybridization, *FEMS Microbiology Ecology*, 27 (4), p. 339-350.
- KROER, N., BARKAY, T., SOERENSEN, S., WEBER, D., 1998, Effect of root exudates and bacterial metabolic activity on conjugal gene transfer in the rhizosphere of a marsh plant, *FEMS Microbiology Ecology*, 25 (4), p. 375-384.
- KUTSCHERA, L., 1968, *Bewurzelung von Pflanzen in den verschiedenen Lebensräumen*, DLG-Verlags GmbH.
- MARTENS, R., 1982, Apparatus to study the quantitative relationship between root exudates and microbial population in the rhizosphere, *Soil. Biol. Biochem.*, 14, p. 315-317.
- OBST, U., 1995, *Enzymatische Test für die Wasseranalytik*, Oldenbourg Verlag, München.
- Remde, A., TIPPMANN, P., 1998, *Mikrobiologische Charakterisierung aquatischer Sedimente*, Oldenbourg Verlag, München.
- STEFAR, E.-B., WEISNER, S.-E.-B., ERIKSSON, P.-G., GRANÉLI, W., 1994, Influence of macrophytes on nitrate removal in wetlands, *Ambio*, 23 (6), p. 363-366.
- VISSER, E.-J.-W., COLMER, T.-D., BLOM, C.-W.-P.-M., VOESENEK, L.-A., CA, J., 2000, Changes in growth, porosity, and radial oxygen loss from adventitious roots of selected mono- and dicotyledonous wetland species with contrasting types of aerenchyma, *Plant, Cell and Environment*, 23, p. 1237-1245.
- WARD, B.-B., 1996, Nitrification and denitrification : Probing in the nitrogen cycle in aquatic environments, *Microb. Ecol.*, 32, p. 247-261.