

# THESE

PRESENTEE A

**L'UNIVERSITE BORDEAUX I**

**Par Stéphane Alain RIOU**

POUR OBTENIR LE GRADE DE

**DOCTEUR**

SPECIALITE : BIOGEOCHIMIE DE L'ENVIRONNEMENT

---

Cycle de l'azote à l'interface eau-sédiment dans le Bassin  
d'Arcachon : rôle des bactéries dans les processus de perte en  
azote (nitrification-dénitrification)

---

Soutenue le : 5 février 1999

Après avis de :

M. Rodney A. HERBERT, Professeur, Université de Dundee, Ecosse  
M. Pierluigi VIAROLI, Professeur, Université de Parme, Italie

Rapporteurs

Devant la commission d'examen formée de :

M. Patrick BUAT-MENARD, Directeur de Recherche CNRS, Bordeaux  
M. Rutger DE WIT, Chargé de Recherche CNRS, Bordeaux  
Mme Micheline BIANCHI, Directeur de Recherche CNRS, Marseille  
M. Pierre CHARDY, Professeur, Université Bordeaux I  
M. Rodney A. HERBERT, Professeur, Université de Dundee, Ecosse  
M. Alain MENESGUEN, Directeur de Recherche IFREMER, Brest  
M. Pierluigi VIAROLI, Professeur, Université de Parme, Italie

Président  
Rapporteur  
Examineurs

If...

*Si tu peux voir détruit l'ouvrage de ta vie  
Et sans un seul mot te mettre à rebâtir  
Ou perdre en un seul coup le gain de cent parties  
Sans un geste et sans un soupir  
Si tu peux être amant sans être fou d'amour  
Si tu peux être fort sans cesser d'être tendre  
Et, te sentant haï, sans haïr à ton tour  
Pourtant lutter et te défendre*

*Si tu peux supporter d'entendre tes paroles  
Travesties par des gueux pour exciter des sots  
Et d'entendre mentir sur toi leur bouches folles  
Sans mentir toi même d'un mot  
Si tu peux rester digne en étant populaire  
Si tu peux rester peuple en conseillant les rois  
Et si tu peux aimer tous tes amis en frère  
Sans qu'aucun d'eux soit tout pour toi*

*Si tu sais méditer, observer et connaître  
Sans jamais devenir sceptique ou destructeur  
Rêver, mais sans laisser ton rêve être ton maître  
Penser sans n'être qu'un penseur  
Si tu peux être dur sans jamais être en rage  
Si tu peux être brave et jamais imprudent  
Si tu sais être bon, si tu sais être sage  
Sans être moral ni pédant*

*Si tu peux rencontrer Triomphe après Défaite  
Et recevoir ces deux menteurs d'un même front  
Si tu peux conserver ton courage et ta tête  
Quand tous les autres les perdront  
Alors les Rois, les Dieux, la Chance et la Victoire  
Seront à jamais tes esclaves soumis  
Et, ce qui vaut mieux que les Rois et la Gloire  
Tu seras un homme, mon fils.*

*Rudyard Kipling*



## Remerciements

Je souhaiterais tout d'abord remercier l'ensemble des membres du jury de cette thèse : Patrick Buat-Ménard qui a présidé ce jury et qui a toujours suivi mes travaux avec bienveillance au sein de l'UMR 5805 ; Rod Herbert et Pierluigi Viaroli qui ont jugé ce travail comme rapporteurs et qui m'ont apporté leurs compétences scientifiques mais aussi leur amitié lors de nos nombreuses rencontres dans le cadre du programme européen ROBUST ; Pierre Chardy qui, depuis son arrivée au laboratoire, a dirigé la fin de mes travaux avec beaucoup de tact et de sympathie ; Alain Menesguen, mon « parrain » IFREMER, qui m'a toujours été de bon conseil durant toutes ces années ; Micheline Bianchi qui a mis ses compétences scientifiques reconnues au service de l'évaluation de ce travail ; et Rutger de Wit qui a initié, suivi, et soutenu ce travail, ainsi que pour m'avoir encouragé à partir à l'étranger soit pour me former soit pour faire connaître mes travaux.



Ces quelques années passées en Gascogne (pays du bon vin et du confit...) m'ont été rendues plus agréables grâce à Manu, Rémi, Olivier, Sophie, Evelyne, Isa, Elvire, Marisol, Xavier, Corinne, Isabelle, Françoise, Marie-Claude, Pierre-Jean, Thierry, Astrid, Nathalie, Guy, Henry, Relex, quelques étudiants de passage, les personnels du LOB et de la station IFREMER d'Arcachon...



Dans le cadre des différents programmes européens auxquels j'ai collaboré, j'ai particulièrement apprécié l'aide et l'amitié de Gwen, Dave, Marco, Gianmarco, Daniele, Lucas, Bart, Pepa, Andy, et tous les autres collègues et étudiants...



Mes séjours danois successifs m'ont permis d'accéder non-seulement à une science de qualité mais aussi de découvrir une culture jusqu'alors inconnue de moi, et ceci grâce à Nils R.-P., Lars O., Kai F., Sten P., Bente L., Lars-Peter N., et tous les autres...



Ce travail a été rendu possible grâce au soutien indéfectible de ma famille : mes parents Dona et C'han, mon frère Mich et sa famille Sandrine, Stéphanie, Yannick, Jean-Yves, Christophe, Elisa, mon frère Youenn et sa famille Anne, Guillaume, Louis, mon oncle Pierre. Mes amis et musiciens du Bagad ar Meilhoù Glaz (Moulin Vert - Quimper) m'ont permis de me divertir, de garder les pieds sur terre et de mieux connaître les ASF : Goulven, Arzel, Pypet, Mona, Ronan, Youenn, Cathy, Yannig, Yoyo, Ben, Steven, Bébert, tous les batteurs et bombardes, et puis Lannig, Marie-Hélène, Cathy et Philou.

*Last but not least !* Ton amitié, ton charisme, ta gentillesse et ta disponibilité ont été le ciment de cet édifice : merci Yann.

Les travaux de cette thèse ont été réalisés dans le cadre de l'Unité de Recherche Marine n°13 (Université Bordeaux 1 - CNRS UMR 5805 « EPOC » - IFREMER) et financés par :



CONSEIL REGIONAL



# *Sommaire*

<i>Introduction générale</i>	1
<b>Chapitre 1 : Denitrification rates in marine and freshwater sediments : a commented data-compilation</b>	
Avant-propos	8
Abstract	9
Introduction	10
Evaluation of the different methods	11
Procedure	15
Results	16
Importance of the methods	16
Histograms of frequencies	17
Mean calculations	20
Comparison of frequency distributions	21
Ecological considerations	21
Remarks	23
References	24
Appendix : Compilation of reported denitrification rates over the last 25 years	30
<b>Chapitre 2 : Matériels et méthodes</b>	
Avant-propos	39
Introduction	40
1. Dénombrements des bactéries nitrifiantes	41
1.1 Principe de la méthode du « Nombre le Plus Probable » ou NPP	41
1.2 Echantillonnage et protocole des dénombrements	42
2. Mesure de l'activité nitrifiante	45
2.1 Principe de la méthode et protocole	45
2.2 Calculs	46
3. Mesure de l'activité dénitrifiante	46
3.1 Principe de la méthode du « $^{15}\text{N}$ isotope pairing »	46
3.2 Protocole des incubations	47
3.3 Calculs	49
4. Protocoles des incubations pour la détermination des flux de $\text{O}_2$ , $\text{NO}_2^-$ , $\text{NO}_3^-$ et $\text{NH}_4^+$ entre la colonne d'eau et les sédiments avec les zostères	51
5. Analyses	51



5.1 Mesure de l'oxygène dissous	51
5.2 Mesure des nitrates et nitrites	52
5.3 Mesure de l'ammonium dans l'eau et les sédiments	53
5.4 Mesure de la chlorophylle	53
5.5 Mesure des teneurs en carbone total et organique	54
5.6 Porosité	54
Références bibliographiques	54

**Chapitre 3 : Benthic nitrification in the Bassin d'Arcachon (France) : bacterial populations and nitrification rates**

Avant-propos	57
Abstract	58
1. Introduction	59
2. Material and methods	62
2.1 Study area	62
2.2 Monitoring data on water column ammonium and nitrate concentrations	63
2.3 Enumeration of nitrifying bacteria	64
2.4 Nitrifying activities	65
2.5 Analytical procedures	65
2.6 Statistical analysis	66
3. Results	66
3.1 Monitoring of water column nitrate and ammonium concentrations	66
3.2 Bacterial enumerations	67
3.3 Nitrifying activities	71
4. Discussion	71
References	75

**Chapitre 4 : Annual rates of denitrification in a marine coastal lagoon (Arcachon bay, SW France) colonized by *Zostera noltii***

Avant-propos	82
Introduction	83
Materials and methods	85
Study area and sampling	85
Incubation procedure	86
Analytical procedures	87
Calculations	88
Results & Discussion	90
General description of the studied stations	90
Denitrification	96

Comparison of denitrification and fluxes	99
Conclusion	103
Literature cited	103

### *Synthèse & Conclusion*

Avant-propos	106
1. Synthèse des principaux résultats obtenus sur les processus bactériens dans le Bassin d'Arcachon	107
1.1 Généralités	107
1.2 La fixation d'azote	108
1.3 La nitrification	111
1.4 La dénitrification	114
2. Bilan de masse du cycle de l'azote dans le Bassin d'Arcachon	117
3. Conclusions	120
4. Perspectives	120
Références bibliographiques	122
Annexe : Calcul des taux de dénitrification dans le Bassin d'Arcachon	126





# *Introduction générale*

## ***Introduction générale :***

Situées à l'interface Continent-Océan, les zones côtières ont une importance capitale au niveau socio-économique (50 % de la population mondiale vit à moins de 50 km de l'océan). Depuis 20 ans, les environnements côtiers sont soumis à une augmentation de l'eutrophisation (Nixon & Pilson 1983) que Nixon (1995) définit comme « *l'augmentation du taux des apports en matière organique d'un écosystème* ». Les activités humaines ont profondément modifié le cycle global de l'azote, en particulier au niveau des nutriments qui contrôlent en partie la production primaire des écosystèmes aquatiques (Seitzinger 1990, Oviatt et al. 1995). Récemment, une synthèse des altérations humaines sur le cycle global de l'azote a été proposée par Vitousek et al. (1997) sous l'égide de l' « Ecological Society of America ». Ce travail montre qu'il existe un grand consensus dans la communauté scientifique nord-américaine sur les conséquences de ces perturbations au niveau global (Tableau 1).



**Tableau 1.** Conséquences des altérations d'origine anthropique du cycle global de l'azote d'après Vitousek et al. 1997

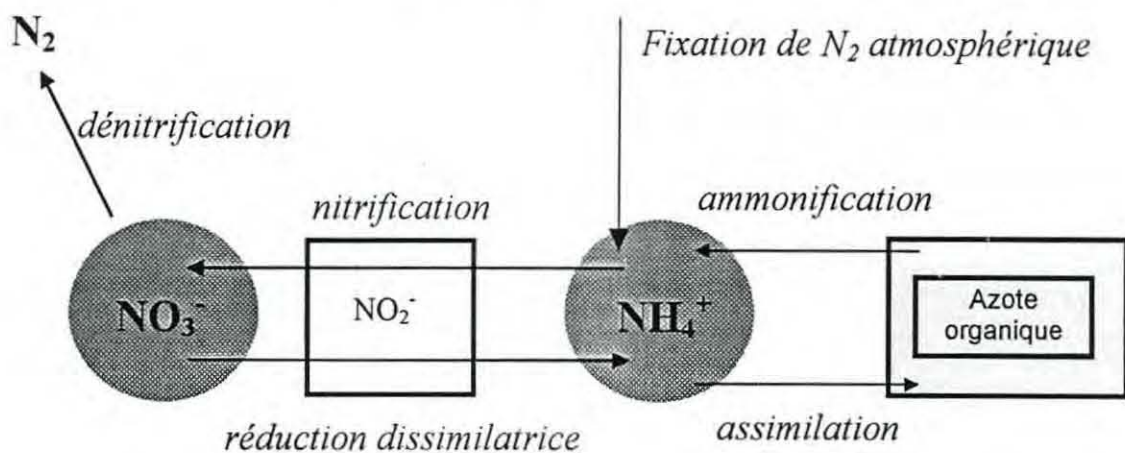
<p><b><i>Le groupe de travail considère qu'il existe suffisamment d'évidences scientifiques pour qu'on puisse conclure certainement que :</i></b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1) Doublement du taux des apports azotés dans le cycle terrestre de l'azote</li> <li>2) Augmentation des concentrations en oxyde nitreux N<sub>2</sub>O, gaz à effet de serre, et aussi de nombreux autres oxydes d'azote responsables de la formation d'un « brouillard photochimique » au dessus de larges régions de la planète</li> <li>3) Pertes en nutriments dans les sols, comme le calcium (Ca) ou le potassium (K), qui sont essentiels pour le maintien à long terme de la fertilité des sols</li> <li>4) Contribution substantielle à l'acidification des sols, rivières et lacs dans de nombreuses régions</li> <li>5) Augmentation significative des transferts d'azote des rivières vers les estuaires et les zones côtières</li> </ol> <p><b><i>Le groupe de travail considère que les évidences scientifiques sont suffisamment claires pour qu'on puisse conclure avec confiance que :</i></b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>6) Augmentation de la quantité de carbone organique conservée dans les écosystèmes terrestres</li> <li>7) Diminution de la diversité biologique, en particulier des plantes adaptées à l'utilisation efficace de l'azote ainsi que des animaux et micro-organismes associés</li> <li>8) Changements dans la composition et le fonctionnement des écosystèmes estuariens et côtiers et contribution à long terme au déclin des ressources halieutiques côtières</li> </ol>
--

Les proliférations de macro-algues sur le littoral sont l'un des aspects les plus spectaculaires et médiatiques des phénomènes d'eutrophisation. Elles sont dues à l'augmentation des nutriments d'origine anthropique, particulièrement les sels azotés utilisés comme fertilisants agricoles (NO<sub>3</sub><sup>-</sup> et NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, principalement), et altèrent les écosystèmes par un découplage du pelagos et du benthos (Valiela et al. 1997). Durant les 20 dernières années, les apports en azote ont fortement augmenté dans le bassin d'Arcachon, suite au développement de l'agriculture intensive, et en particulier de la maïziculture sur le bassin versant de la Leyre. De manière concomitante, les apports en phosphore ont chuté en raison de l'établissement d'un réseau d'assainissement urbain et des modifications législatives relatives à l'utilisation des détergents. La résultante de ces deux facteurs est qu'aujourd'hui le rapport N/P excède largement le rapport de Redfield. La conséquence la plus spectaculaire de ce déséquilibre fût l'apparition, dans les années

90, de blooms de macro-algues vertes (*Monostroma obscuro*, *Enteromorpha sp.*) qui sont susceptibles d'interférer négativement avec l'herbier de zostères et les activités socio-économiques du bassin (Auby et al. 1994).

Les micro-organismes sont intrinsèquement impliqués dans la productivité de ces systèmes par leur participation active aux flux d'énergie et de matière dans les cycles biogéochimiques des éléments majeurs (C, N, P, S). L'interface « eau-sédiment » est un carrefour métabolique de première importance, en particulier pour les systèmes lagunaires, où le sédiment héberge toute une communauté biologique qui participe activement à la diagénèse précoce. La figure 1 résume les principaux processus bactériens du cycle de l'azote dans les sédiments marins côtiers.

**Figure 1.** Schéma simplifié du cycle bactérien de l'azote dans les sédiments marins côtiers



Ainsi la dénitrification représente un puits de nutriments par la production de  $N_2$  atmosphérique. C'est le seul processus biologique qui peut réduire potentiellement l'impact de l'augmentation des apports de nutriments par les fertilisants azotés dans l'environnement (Revsbech & Sørensen 1990). Les sédiments aquatiques côtiers et estuariens montrent généralement des taux de dénitrification élevés. En effet, ils représentent un milieu favorable à la



dénitrification car : i) ils contiennent généralement de fortes quantités de matière organique, ii) ils sont souvent le théâtre d'une forte minéralisation aboutissant à un relargage d'ammonium qui peut ensuite être nitrifié et ainsi augmenter le pool de nitrates, iii) la zone anoxique se situe généralement à quelques millimètres de l'interface eau-sédiment, et par conséquent, les distances de diffusion des nitrates de la colonne d'eau vers les sites de dénitrification sont courtes (Seitzinger 1988, 1990). La première partie de ce travail a consisté à établir un état de l'art des méthodes de mesures de la dénitrification. Puis, les données publiées ces 25 dernières années ont été compilées dans l'optique de fournir un taux de dénitrification caractéristique pour chaque type d'environnement aquatique (rivières, lacs, environnements côtiers, plateau continental et sédiments profonds) (*Chapitre 1*).

Les nitrates alimentant la dénitrification proviennent soit de la diffusion à partir de la colonne d'eau vers le sédiment, soit de la production par les bactéries nitrifiantes dans la zone oxygène du sédiment (Figure 1). Aussi, quand les concentrations en nitrates de la colonne d'eau sont faibles, la dénitrification est complètement dépendante de la nitrification (Jenkins & Kemp 1984). Le régime hydrologique du bassin d'Arcachon présente schématiquement deux situations : une période estivale (avril-novembre) où les apports fluviaux et atmosphériques sont faibles et peu concentrés en nutriments, et, à l'inverse, une période hivernale (décembre-mars) caractérisée par de forts apports atmosphériques et fluviaux dont les eaux contiennent des concentrations élevées en nutriments azotés ( $\text{NO}_3^- = 60-100 \mu\text{M}$ ) (Robert et al. 1987, Auby et al. 1994). Aussi, la deuxième partie de ce travail s'est focalisée sur l'estimation de l'activité nitrifiante dans les sédiments du bassin d'Arcachon. En effet, il était intéressant de déterminer si l'activité nitrifiante pouvait constituer une source importante de nitrates pour la dénitrification (*Chapitres 2 et 3*).

Le bassin d'Arcachon héberge le plus grand herbier de zostères naines (*Zostera noltii* Hornem.) d'Europe occidentale, couvrant quasiment la moitié de la baie (70 km<sup>2</sup>) (Auby et al. 1994, Castel et al. 1996). Les macrophytes peuvent relarguer de l'oxygène au niveau du rhizome et des racines ce qui stimule la nitrification et, consécutivement, peut augmenter la dénitrification. De plus, la présence de phanérogames marines augmente, dans les sédiments, la quantité de matière organique facilement dégradable, par piégeage des débris organiques provenant de la colonne d'eau et relargage de carbone organique dissous par les racines (Christensen & Sørensen 1986, 1988). Le Bassin d'Arcachon possède aussi 110 km<sup>2</sup> de zone intertidale avec de nombreux estrans vaseux où le microphytobenthos est dominé par les diatomées. Ces algues microphytobenthiques peuvent diminuer la dénitrification par la production d'oxygène photosynthétique (Andersen et al. 1984, Christensen & Sørensen 1986, Henriksen & Kemp 1988, Caffrey & Kemp 1990). Cependant, la dégradation du microphytobenthos peut stimuler la dénitrification par apport de carbone organique dans le sédiment (Seitzinger 1990). La troisième partie de ce travail concerne la mesure des taux de dénitrification totale, de dénitrification liée à la diffusion des nitrates de la colonne d'eau et des nitrates produits par la nitrification. En été et en hiver, les taux ont été mesurés dans les herbiers de *Z. noltii*, des estrans colonisés par des algues microphytobenthiques et les chenaux subtidiaux du bassin (*Chapitres 2 et 4*).

Enfin, en dernier lieu, nous avons regroupé et synthétisé les travaux menés ces dernières années sur le cycle de l'azote et la production primaire dans le bassin d'Arcachon afin d'établir un bilan des processus internes et externes de cet écosystème (*Chapitre 5*).



**Références bibliographiques**

- Andersen TK, Jensen MH, Sørensen J (1984) Diurnal variation of nitrogen cycling in coastal, marine sediments. I. Denitrification. *Mar Biol* 83:171-176
- Auby I, Manaud F, Maurer D, Trut G (1994) Etude de la prolifération des algues vertes dans le Bassin d'Arcachon. Rapport IFREMER - CEMAGREF - SABARC, 163 p
- Caffrey JM, Kemp WM (1990) Nitrogen cycling in sediments with estuarine population of *Potamogeton perfoliatus* and *Zostera marina*. *Mar Ecol Prog Ser* 66:147-160
- Castel J, Caumette P, Herbert R (1996) Eutrophication gradients in coastal lagoons as exemplified by the Bassin d'Arcachon and the Etang du Prévost. *Hydrobiol* 329 :ix-xxviii
- Christensen PB, Sørensen J (1986) Temporal variation of denitrification activity in plant-covered littoral sediment from lake Hampen, Denmark. *Appl Environ Microbiol* 51:1174-1179
- Christensen PB, Sørensen J (1988) Denitrification in sediment of lowland streams: regional and seasonal variations in Gelbaek and Rabis baek, Denmark. *FEMS Microbiol Ecol* 53:335-344
- Henriksen K, Kemp WM (1988) Nitrification in estuarine and coastal marine sediments. In : Blackburn TH, Sørensen J (ed) Nitrogen cycling in coastal marine environments. Wiley J and Sons, New York, p 207-249
- Jenkins MC, Kemp WM (1984) The coupling of nitrification and denitrification in two estuarine sediments. *Limnol Oceanogr* 29 :609-619
- Nixon SW (1995) Coastal marine eutrophication : a definition, social causes, and future concerns. *Ophelia* 41 :199-219
- Nixon SW, Pilson MEQ (1983) Nitrogen in estuarine and coastal marine ecosystems. In : Carpenter EJ, Capone DC (ed) Nitrogen in the marine environment. Academic Press, New York, p 565-648



- Oviatt C, Doering P, Nowicki B, Reed L, Cole J, Frithsen J (1995) An ecosystem level experiment on nutrient limitation in temperate coastal marine environments. *Mar Ecol Prog Ser* 116 :171-179
- Revsbech NP, Sørensen J (1990) Denitrification in soil and sediment. Plenum Press, New York
- Robert R, Guillocheau N, Collos Y (1987) Hydrobiological parameters during an annual cycle in the Arcachon Basin. *Mar Biol* 95 :631-640
- Seitzinger SP (1988) Denitrification in freshwater and coastal marine ecosystems: Ecological and geochemical significance. *Limnol Oceanogr* 33:702-724
- Seitzinger SP (1990) Denitrification in aquatic sediments. In: Revsbech NP, Sørensen J (ed) Denitrification in soil and sediment. Plenum Press, New York, p 301-322
- Valiela I, McClelland J, Hauxwell J, Behr PJ, Hersh D, Foreman K (1997) Macroalgal blooms in shallow estuaries : Controls and ecophysiological and ecosystem consequences. *Limnol Oceanogr* 42 :1105-1118
- Vitousek PM, Aber JD, Howarth RW, Likens GE, Matson PA, Schindler DW, Schlesinger WH, Tilman DG (1997) Human alteration of the global nitrogen cycle : sources and consequences. *Ecological Applications* 7 :737-750



# *Chapitre 1*

*Denitrification rates in freshwater  
and marine sediments :  
a commented data-compilation*

## *Avant-propos*

*Il existe de nombreuses méthodes de mesure de la dénitrification, lesquelles ont été appliquées dans les écosystèmes aquatiques majeurs.*

*Dans ce chapitre, nous avons compilé les travaux de 96 études parues entre 1971 et 1997. Nous avons répertorié les méthodes les plus utilisées en rappelant les principes sur lesquels elle sont fondées, et en discutant leurs avantages et inconvénients.*

*De plus, nous avons relevé 221 taux de dénitrification benthique que nous avons groupé selon leur appartenance à l'un des 5 environnements aquatiques suivants : rivières, lacs, environnements marins côtiers, plateaux continentaux, et sédiments marins profonds. L'analyse statistique nous montre que, globalement, les taux associés à chaque type d'environnement sont différents (seule la différence entre lacs et environnements marins côtiers est non significative). Les moyennes diminuent de la façon suivante : rivières, lacs, environnements marins côtiers, plateau continental et sédiments marins profonds.*



## *Chapitre 1 :*

# « Denitrification rates in marine and freshwater sediments : a commented data-compilation »

Stéphane A. RIOU, Rutger DE WIT

*This chapter is in preparation for submission to Biogeochemistry.*

### **ABSTRACT**

We have compiled 221 benthic denitrification rates reported in 96 scientific articles published between 1971 and 1997. The reported observations are evaluated as representing 5 major environmental types, *i.e.* rivers and streams, lakes, coastal marine environments (*e.g.* marine estuaries, coastal areas, lagoons, salt marshes), continental shelf, and deep sea sediments. After a brief description, we have evaluated the advantages and pitfalls of the used methods. Non-parametric statistics indicate that in the current data base the large differences between sites overrule the methodological differences, therefore, all the data have been considered in the analyses. The arithmetic means  $\pm$  SD of the denitrification rates are  $306.9 \pm 452.0$ ,  $67.9 \pm 92.9$ ,  $116.6 \pm 288.3$ ,  $25.8 \pm 50.7$  and  $3.9 \pm 8.1 \mu\text{mol m}^{-2} \text{h}^{-1}$  for rivers, lakes, coastal marine environments, continental shelf and deep sea sediments, respectively. We discuss this progressive decrease of the benthic denitrification rates from rivers and lakes to the marine environment itself

going from the coast, the continental shelf into the deep sea sediments from an ecological point of view.

**KEY-WORDS:** Acetylene inhibition technique, Denitrification,  $N_2$  production measurements,  $^{15}N$  isotope pairing,  $^{15}N$  tracer techniques, Sediment

## INTRODUCTION

Denitrification is the bacterial process by which nitrate and nitrite are reduced to dinitrogen gases,  $N_2O$  and  $N_2$  (Tiedje 1988). Denitrifiers are generally heterotrophic facultative anaerobic bacteria. During oxidation of organic matter, they utilize nitrite or nitrate as terminal electron acceptor producing nitric oxide, nitrous oxide or dinitrogen. Denitrification is one of the major processes in the regulation of the global N-cycle. The major effects of denitrification processes are i) the loss of inorganic N, which leads to primary production limitation, ii) the production of  $N_2O$  gas which results in a greenhouse effect and also undergoes stratospheric reactions interfering with ozone cycling (Knowles 1982 ; Seitzinger 1988 ; Schlesinger 1997 ; Fenchel et al. 1998). For all these reasons denitrification is considered as a major metabolic meeting point of the benthic nitrogen cycle. A large and extensive literature covering all the aquatic environments is available including previous reviews by Payne 1973 ; Focht & Verstraete 1977 ; Knowles 1982, 1990 ; Seitzinger 1988, 1990, 1993 ; Koike & Sørensen 1988 ; Tiedje 1988 and Revsbech & Sørensen 1990a amongst others. Recently, an exhaustive review about the cell biology of denitrifiers has been published by Zumft (1997).

The objective of this study was to elaborate a comprehensive compilation of measured denitrification rates covering all types of aquatic sediments, and to study variability and systematic

differences among the five major groups of aquatic environments. However, because denitrification rates have been measured by different methods, caution must be taken to make comparisons. Therefore, we have critically evaluated the relevant methodological issues reported in the literature and we have statistically tested whether the comparisons within and among groups are sensitive to bias caused by use of different methods.

## EVALUATION OF THE DIFFERENT METHODS

The so-called N mass balance approach has been applied on lakes, rivers and estuaries. It assumes that denitrification rates can be inferred directly from the difference between the inputs (streams, seepage, precipitation, N<sub>2</sub> fixation, groundwater, etc...) and outputs (runoff, burial, etc...) (Knowles 1982). The most important limiting factor of the N mass balance method is the difficulty in estimating the total nitrogen-budget in a system (Knowles 1982). Moreover, the method is unable to describe the spatial distribution of denitrification activities in the system (Seitzinger 1988). Nevertheless, similar values of annual N-conversion have been obtained using the <sup>15</sup>N isotope pairing method and a 2-dimensional hydrodynamic model of mass balances (Nielsen et al. 1995).

Others basic methods are based on measurements of NO<sub>3</sub><sup>-</sup> consumption in combination with diagenetic models of pore water profiles. The disappearance of nitrates or nitrites in water in sediment cores gives an estimate of the denitrification rate. Modified methods combine kinetic assays (denitrification vs NO<sub>3</sub><sup>-</sup> concentrations) with measured pore water nutrients profiles. Hence, the kinetic information is fitted according to a Michaelis-Menten equation and the pore water data are used to calculate the denitrification rates (Seitzinger 1988). Diffusion-advection



models have been used for deep sea sediments, and, recently, the use of high resolution reaction-diffusion models has become more prevalent (Blackburn 1990). Measuring the disappearance of nitrates or nitrites implies an overestimation of the denitrification rate because of the dissimilatory nitrate reduction to ammonium ; thus  $\text{NO}_3^-$  or  $\text{NO}_2^-$  are not exclusively reduced to  $\text{N}_2\text{O}$  or  $\text{N}_2$  (Koike & Hattori 1978 ; Knowles 1982). Furthermore, nitrates can be assimilated into organic matter (Seitzinger 1988). The complication of the kinetic approaches is that the relation between denitrification rate vs  $\text{NO}_3^-$  concentrations varies with the depth of the denitrification zone in the sediment (Kaspar 1983 ; Kaspar et al. 1985). Simultaneously, diffusion coefficients for  $\text{NO}_3^-$  are difficult to measure in biologically active substrates (Revsbech & Sørensen 1990b).

The acetylene block technique is based on the inhibition of  $\text{N}_2\text{O}$ -reductase activity by acetylene (Balderston et al. 1976). Accordingly, the rate of denitrification is determined as increased rates of  $\text{N}_2\text{O}$  accumulation in  $\text{C}_2\text{H}_2$  amended samples with respect to non-amended control samples.  $\text{N}_2\text{O}$  is conveniently assayed by gas chromatography with an electron capture detector (ECD) (Yoshinari & Knowles 1976 ; Sørensen 1978). The acetylene block technique is simple, sensitive and inexpensive but there is a lack of inhibitory effect at low concentrations of nitrates (1 to 10  $\mu\text{M}$  in marine sediments) (Seitzinger 1988 ; Knowles 1990) and acetylene inhibits nitrification (ammonium to hydroxylamine) (Walter et al. 1979). This process is more sensitive to acetylene than denitrification (Knowles 1990) which would result in an underestimation of the total denitrification rate. Furthermore, incomplete inhibition of denitrification by acetylene can underestimate the denitrification rate of  $\text{NO}_3^-$  which diffuses from the water column by 30 to 50% (Seitzinger et al. 1993 ; Lohse et al. 1996). The metabolism of acetylene in anaerobic sediments produces formic, acetic, propionic and butyric acids which might be utilized by micro-organisms, and particularly denitrifiers as an organic carbon source (Seitzinger 1988 ; Knowles 1990). In marine sediments, sulfides reverse the acetylene block of  $\text{N}_2\text{O}$ -reductase activity (Seitzinger

1988 ; Knowles 1990), inhibit the reduction of gaseous N-oxides (Knowles 1990), the dissimilatory reduction of nitrate to ammonium (Knowles 1990 ; Brunet & Garcia-Gil 1996), and inhibit nitrification (Joye & Hollibaugh 1995).

An alternative approach is the direct measurement of N<sub>2</sub> production in gas-tight chambers. However, this method copes with the problem of a high background level of N<sub>2</sub> and is therefore often very insensitive. The background N<sub>2</sub> level can be lowered by sparging the water and gas phase with a mixture of 21% O<sub>2</sub>, 0.03% CO<sub>2</sub> in Helium, but it requires a long period to re-equilibrate between dissolved gas levels in water and sediment (Kaplan et al. 1979 ; Seitzinger et al. 1980). Some adaptations of this basic method have been described by Devol (1991) and Nowicki (1994). A new analytical method consists of measuring both dissolved nitrogen and argon by membrane-inlet mass spectrometry. This results in increased sensitivity, because argon can be used as a conservative internal standard and the ratio of nitrogen to argon can be measured with an order of magnitude higher precision than nitrogen alone (Kana et al. 1994). The advantage of N<sub>2</sub> production measurements is that it is a direct method. But a mean of 9 days incubation is generally required in order to deplete the N<sub>2</sub>-background. This long incubation time could change the sediment quality. Recently, a modified method using both incubation times of less than 4 days and anoxic control cores to correct for pore-water de-gassing fluxes has been proposed. However, reduced rates of N<sub>2</sub> pore-water exchanges due to reduced bioturbation activities could result in an underestimation of denitrification rates (Nowicki 1994). In fact, the major problem is the possible N<sub>2</sub> contamination from the atmosphere (Seitzinger 1988 ; Koike & Sørensen 1988 ; Seitzinger et al. 1993). Furthermore, the detection limit excludes the application of this method to aquatic sediments exhibiting low denitrification activities (Lohse et al. 1996).



Several isotopic methods exist using  $^{15}\text{N}$ , which is a stable isotope. The use of  $^{15}\text{N}$  as a tracer relies therefore on analyses by sensitive mass spectrometry. Accordingly, denitrification rates can be measured  $^{15}\text{N}_2\text{O}$  (M=46) or  $^{15}\text{N}_2$  (M=30) produced following addition of  $^{15}\text{NO}_3^-$  to the overlying water of sediment cores or slurries (Koike & Hattori 1978). A modified method has been developed for measuring *in situ* denitrification rates, using continuous flow incubated cores with  $^{15}\text{NO}_3^-$  or  $^{15}\text{NH}_4^+$  (which diffuse to the sediment and are denitrified to  $^{15}\text{N}_2$  or nitrified to  $^{15}\text{NO}_3^-$ , respectively) (Nishio et al. 1983 ; Jenkins & Kemp 1984).  $^{15}\text{N}$ -tracer techniques can be coupled with mathematical modeling (Koike 1990). Recently, Nielsen (1992) has developed a novel approach, *i.e.* the so-called  $^{15}\text{N}$  isotope pairing method. Accordingly, intact cores with an overlying water are isolated, closed, and 2 ml of water are replaced with nitrogen-free air (21%  $\text{O}_2$  in He) in order to lowered the  $\text{N}_2$  background. Then,  $^{15}\text{NO}_3^-$  is injected to an initially  $\text{NO}_3^-$  free water column. The method is based on the fact that denitrification of  $^{15}\text{NO}_3^-$  and  $^{14}\text{NO}_3^-$  results in the formation of  $^{14}\text{N}_2$  (M=28),  $^{14}\text{N}^{15}\text{N}$  (M=29) and  $^{15}\text{N}_2$  (M=30). Production of  $^{14}\text{N}^{14}\text{N}$  is not measurable directly, because of the high background. However, the production of  $^{14}\text{N}_2$  (M=28) can be inferred from  $^{14}\text{N}^{15}\text{N}$  (M=29) and  $^{15}\text{N}_2$  (M=30), assuming that the ratio of  $^{14}\text{NO}_3^-$  to  $^{15}\text{NO}_3^-$  is uniform throughout the denitrification zone and that the two species are reduced proportionally to their mole fraction (no isotopic discrimination). When the relative abundance of  $^{15}\text{NO}_3^-$  in the water column is known, it is possible to quantify both the denitrification of  $\text{NO}_3^-$  diffusing from the water column ( $D_w$ ) and the coupled nitrification-denitrification ( $D_n$ ). Several modifications of this basic method have been used *e.g.* Rysgaard et al. 1993 ; Sloth et al. 1995 ; Nielsen & Glud 1996 ; Jensen et al. 1996. Isotopic methods are the most powerful methods, however, experimental conditions need to be carefully controlled. For example, continuous flow incubations using  $^{15}\text{NO}_3^-$  induce a problem of underestimation since nitrifying activity is not measured (Seitzinger 1988 ; Knowles 1990). For the  $^{15}\text{N}$  isotope pairing technique, the main problem is to be sure of the uniform mixing of the added  $^{15}\text{NO}_3^-$ , especially in sediments where the nitrification



and denitrification zones are well separated (Nielsen 1992). A mathematical model simulation study demonstrated the power of this method, but also re-examined the significance of the  $D_n$  term which represents the denitrification supported by the  $\text{NO}_3^-$  produced by nitrification in sediments (Middelburg et al. 1996).

More recently, microsensors have been developed to measure denitrification. Use of acetylene and combined  $\text{O}_2/\text{N}_2\text{O}$  electrodes allows the determination of the denitrification zone in sediments with a spatial resolution of less than 0.1 mm (Revsbech & Sørensen 1990b ; Binnerup et al. 1992 ; Jensen et al. 1994). Denitrification rates have been also calculated from  $\text{NO}_3^-$  profiles using a  $\text{NO}_3^-$  microsensor (Revsbech & Sørensen 1990b ; Larsen et al. 1996).

Finally, several miscellaneous methods can be found in Knowles 1982 ; Tiedje 1988 ; Revsbech & Sørensen 1990a ; Raymond et al. 1992 and Bodelier et al. 1996.

## PROCEDURE

This study compiles 221 benthic denitrification rates reported in 96 scientific articles published between 1971 and 1997. The reported observations are evaluated as representing 5 major environmental types, *i.e.* rivers and streams, lakes, coastal marine environments (*e.g.* marine estuaries, coastal areas, lagoons, salt marshes), continental shelf, and deep sea sediments (cf. Appendix). When they were available we selected the mean rates given by the authors. Whenever a range was presented we have considered the arithmetic mean value.

The groups have been described in terms of their basic descriptive statistics and comparisons among groups were based on both frequency distributions and the use of non-

parametric statistics as Kruskal-Wallis and Kolmogorov-Smirnov tests (Sokal & Rohlf 1995). The calculations were performed on a PC using the STATISTICA software package.

## RESULTS

Reported denitrification rates in aquatic sediments range in values by more than 4 orders of magnitude. The highest denitrification rate ( $2250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{h}^{-1}$ ) has been observed in a marsh of the Newport river estuary by Currin et al. (1996) and the lowest positive rate ( $0.03 \mu\text{mol m}^{-2} \text{h}^{-1}$ ) measured in deep-sea sediments of the East Equatorial Atlantic ocean by Goloway & Bender 1982 cited by Seitzinger 1990. This last value indicates that the detection limit for benthic denitrification measurements is currently above  $0.01 \mu\text{mol m}^{-2} \text{h}^{-1}$ . The major descriptive parameters are listed in Table 1. The arithmetic mean values for the five different groups range by 2 orders of magnitude.

*Importance of the methods* - Over the whole period, the acetylene block technique represents 35 % of the total studies, whilst  $\text{N}_2$  fluxes,  $^{15}\text{N}$ -tracer techniques and the  $^{15}\text{N}$  isotope pairing technique represent 13, 10 and 15 %, respectively. However, over the last 5 years the  $^{15}\text{N}$  isotope pairing method has become the preferred technique for measuring denitrification since it is not subject to the difficulties encountered with the acetylene block method (~ 33 % isotope pairing, ~ 31 % acetylene block).

We used the 116 data of the coastal marine environments to evaluate whether any systematic bias could be detected according the method used for the denitrification rate measurements. The Kruskal-Wallis and two ways Kolmogorov-Smirnov tests were applied on data of coastal marine environments to test differences in denitrification rates according to the

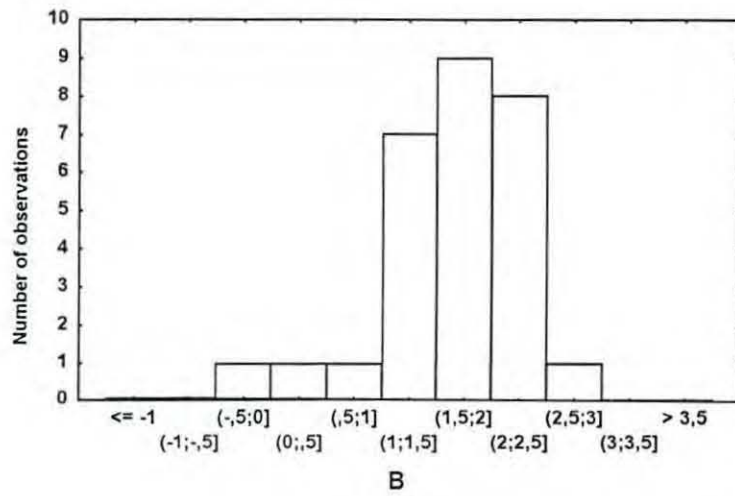
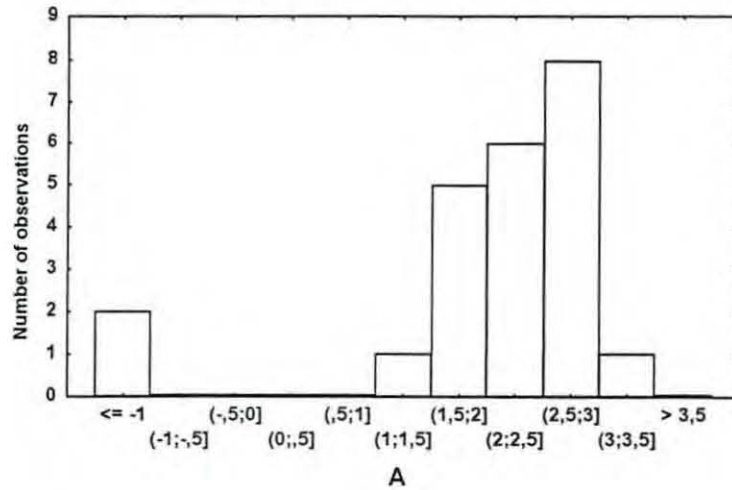


methods used (e.g. acetylene block, N<sub>2</sub> flux, <sup>15</sup>N, <sup>15</sup>N isotope pairing and « others »). No statistical significant differences were found using both Kruskal-Wallis (p = 0.189) and Kolmogorov-Smirnov (data not shown). This indicates that there is no statistical reasons to reject the null-hypothesis assuming that no systematic bias was introduced by either of the methods. This means that in the current data base, the large differences between sites mask the methodological differences described above (see EVALUATION OF THE DIFFERENT METHODS). Therefore, we have maintained all the reported values in the data base for our analyses, despite the different methods used.

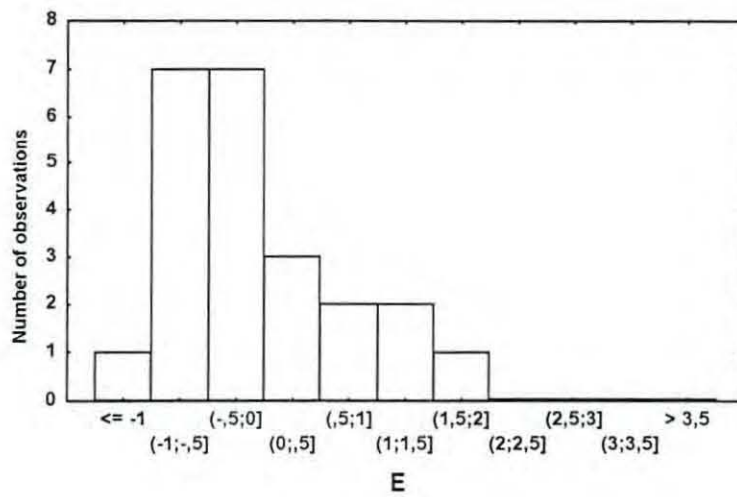
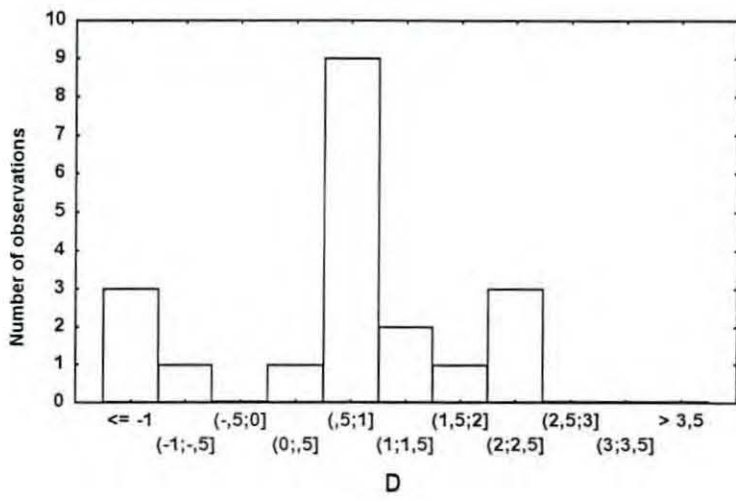
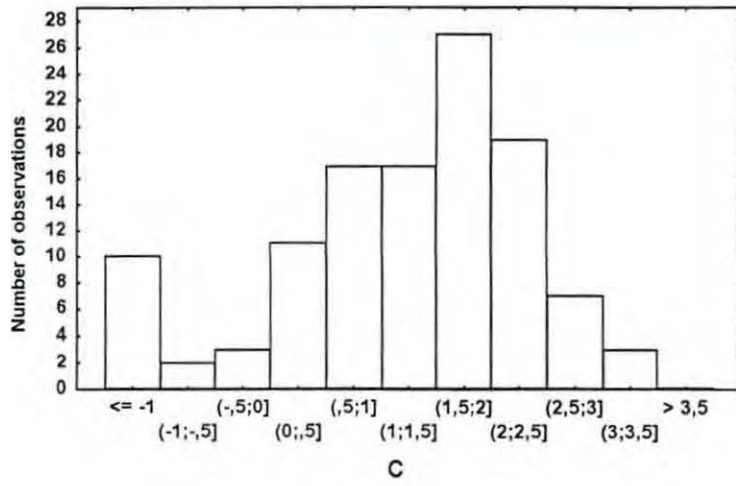
*Histograms of frequencies* - The rates of denitrifying activities were logarithmically transformed, in order to cope with values that ranged by more than 4 orders of magnitude. The actual transformation was  $\log(x + 0.1)$ , because of zero values found in the data base. The distributions of frequencies of the  $\log(\text{rates} + 0.1)$  of rivers, coastal marine environments, and continental shelf sediments show a bimodal distribution (Fig. 1A, 1C, 1D). The first class comprises the values that were reported as zero or below the detection limit (*i.e.*  $\log(0.1) = -1$ ). Lakes and deep sea sediments show an unimodal distribution of frequency (Fig. 1B, 1E). The frequencies of the whole log-transformed data show a bimodal distribution (Fig. 2).

**Figure 1.**

Distribution of the frequencies of the log-transformed denitrification rates (X-axis) for rivers and streams (A), lakes (B), coastal marine environments (C), continental shelf (D) and deep sea (E) sediments.

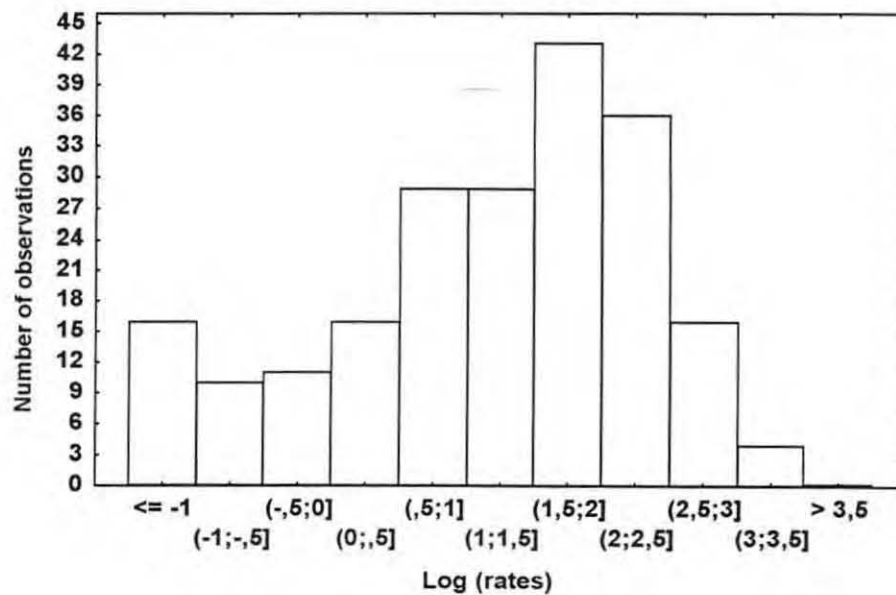






**Figure 2.**

Distribution of the frequencies of the whole log-transformed denitrification rates.



*Mean calculations* - A statistical description of the denitrification rates *e.g.* arithmetic mean, median, standard deviation, coefficient of variation and geometric mean are presented in the Table 1. Globally, denitrification rates measured in rivers were four-fold and three-fold higher than in lakes and coastal marine environments, respectively. Benthic rates determined on the continental shelf and in the deep-sea show the lowest activities (Table 1).

**Table 1.**

Statistical description of the compiled-data. Rates are in  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{h}^{-1}$ .

	Rivers and Streams	Lakes	Coastal marine environments	Continental shelf sediments	Deep sea sediments
Arithmetic mean	306.9	67.9	116.6	25.8	3.9
SD	452.0	92.9	288.3	50.7	8.1
Coefficient of variation (%)	147	137	247	196	208
Median	188.5	39.5	16.7	6.8	0.4
Geometric mean	97.7	37.1	17.0	4.9	0.8



*Comparison of frequency distributions* - The arithmetic data showed coefficients of variation much above 100 % (see Table 2). Therefore, non-parametric statistics have been applied to analyze the dispersion patterns, which included the Kruskal-Wallis (analysis of variance of ranks) and Kolmogorov-Smirnov tests. The result of the Kruskal-Wallis test is significant at  $p \leq 0.05$ , meaning that the distribution patterns from the different environments do not belong to the same population. The pairwise Kolmogorov-Smirnov test demonstrates that there is significant statistical differences between the different environments (Table 2) except between lakes and coastal marine environments ( $p = 0.189$ ).

**Table 2.**

Statistical results of the non-parametric two ways Kolmogorov-Smirnov test. \* =  $p < 0.05$ , \*\* =  $p < 0.01$ , \*\*\* =  $p < 0.001$ , ns = no significant.

ENVIRONMENTS	Rivers and streams	Lakes	Coastal marine environments	Continental shelf sediments	Deep sea sediments
Rivers and streams					
Lakes	**				
Coastal marine environments	**	ns ( $p=0.189$ )			
Continental shelf sediments	***	**	*		
Deep sea sediments	***	***	***	**	

## ECOLOGICAL CONSIDERATIONS

Denitrification rates in rivers are the highest (*cf.* Table 1, and Appendix) because they receive high amounts of nutrients (including  $\text{NO}_3^-$ ) and organic matter. The residence time of the waters in rivers is usually short enough to prevent a complete depletion of  $\text{NO}_3^-$ . Rivers are

normally well oxygenated and anaerobic processes are confined to the sediments. An exception may be found in the highly polluted rivers that turn anoxic, because of high nutrient load, and develop denitrification in the water column. In rivers, the coupling of nitrification with denitrification is particularly important in compact benthic biofilms which are favored by the availability of nutrients, light and oxygen. The flow current in the rivers contributes to an efficient transfer of substrates to these compact biofilms. Lakes are often nutrient limited systems (N and/or P). Under N-limited situations, most of the nitrate will be efficiently assimilated by *e.g.* planktonic algae and consequently, less will be available for the dissimilatory denitrification pathways. This may explain the overall lower denitrification activities reported in lakes as compared to rivers. Nevertheless, many rivers and lakes are confronted to rising nitrate levels due to agricultural eutrophication. Accordingly, in Northern America and in Western Europe, nitrate concentrations have increased 3 to 10 fold since the turn of the century, whereas an average twofold increase in nitrate has been observed in Norwegian lakes in less than a decade (data cited in Vitousek et al. 1997).

Generally, nutrient loadings are lower in marine sediments than in rivers, because of dilution with nutrient poorer sea water. Therefore, denitrification rates of coastal marine environments are on average lower than in rivers. Also in coastal sediments, a strong link exists between nitrification and denitrification, because of the steep physicochemical gradients and the resulting compactness of the microbial communities. This contributes to an efficient exchange of solutes between the oxic and anoxic layers of the sediment. Nevertheless, nitrification rates may be inhibited in coastal sediments by free sulfides produced by marine sulfate-reducing bacteria. The complexity of the inter-relationships linking infauna, macrophytes and benthic algae in rivers, lakes, and coastal marine environments, might explain the higher denitrification activity compared to continental shelf and deep-sea sediments. More importantly, in continental shelf and deep sea sediments, the benthic C-mineralization rates are lower because most of the carbon is mineralized



in the water column. Consequently, oxygen penetrates deeper, and this increases the distance for nitrate diffusion from the water column to the anoxic denitrification niches. Furthermore, in these marine sediments, nitrification and denitrification operate in spatially distinct zones and the coupling between the two processes may be inefficient. In the oligotrophic sites of the deep sea sediments, denitrification is C-limited and nitrification is ammonium limited resulting in very low denitrification rates. Hence, benthic denitrification rates decrease progressively in the marine environments going from the coast, the continental shelf into the deep sea.

## REMARKS

This data compilation amalgamates drastically different sampling conditions, analytical methods, time-scales, places and environments. Whilst this could be seen as a limiting factor of this study, the statistically significant differences found between the dispersion patterns permit a global comparison between denitrification rates and aquatic environmental types.

In complex ecosystems, the main problem is to give an ecological interpretation of the results which are closely related to the precision of the methods (*e.g.* the « 50% rule » of Seitzinger 1988 revised by Nixon et al. 1996). Attending new methods, the best is to use combined studies.

## ACKNOWLEDGMENTS

Stéphane A. Riou is supported by a grant from IFREMER (*Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la MER*) and the *Région Aquitaine*. We wish to thank Xavier



de Montaudouin and Pierre Chardy for their help in statistics, Rodney A. Herbert, Nils Risgaard-Petersen and David T. Welsh for stimulating discussions and linguistic corrections, and Jack Middelburg for his help in collecting deep-sea sediments denitrification rates. This work is a contribution to the *Unité de Recherche Marine n°13* (cooperation of the CNRS-Université Bordeaux 1 and IFREMER) and to the European Union ELOISE Program (ELOISE No. ---) in the framework of the ROBUST project carried out under contract ENV4-CT96-0218.

## REFERENCES

- Balderston WL, Sherr B & Payne WJ (1976) Blockage by acetylene of nitrous oxide reduction in *Pseudomonas perfectomarinus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 31 : 504-508
- Binnerup SJ, Jensen K, Revsbech NP, Jensen MH & Sørensen J (1992) Denitrification, dissimilatory reduction of nitrate to ammonium, and nitrification in a bioturbated estuarine sediment as measured with <sup>15</sup>N and microsensor techniques. *Appl. Environ. Microbiol.* 58 : 303-313
- Blackburn TH (1990) Denitrification model for marine sediment. In: Revsbech NP & Sørensen J (Ed) *Denitrification in soil and sediment* (pp 323-331). Plenum Press, New York
- Bodelier PLE, Libochant JA, Blom CWPM & Laanbroek HJ (1996) Dynamics of nitrification and denitrification in root-oxygenated sediments and adaptation of ammonia-oxidizing bacteria to low-oxygen or anoxic habitats. *Appl. Environ. Microbiol.* 62 : 4100-4107
- Brunet RC & Garcia-Gil LJ (1996) Sulfide-induced dissimilatory nitrate reduction to ammonia in anaerobic freshwater sediments. *FEMS Microbiol. Ecol.* 21 : 121-130

- Currin CA, Joye SB & Paerl HW (1996) Diel rates of N<sub>2</sub>-fixation and denitrification in a transplanted *Spartina alterniflora* marsh: implications for N-flux dynamics. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 42 : 597-616
- Devol AH (1991) Direct measurement of nitrogen gas fluxes from continental shelf sediments. *Nature* 349 : 319-321
- Fenchel T, King GM, Blackburn TH (1998) Bacterial biogeochemistry : the ecophysiology of mineral cycling. 2<sup>nd</sup> edition. Academic Press, San Diego, 307p
- Focht DD & Verstraete W (1977) Biochemical ecology of nitrification and denitrification. *Adv. Microb. Ecol.* 1 : 135-214
- Jenkins MC & Kemp WM (1984) The coupling of nitrification and denitrification in two estuarine sediments. *Limnol. Oceanogr.* 29 : 609-619
- Jensen K, Sloth NP, Risgaard-Petersen N, Rysgaard S & Revsbech NP (1994) Estimation of nitrification and denitrification from microprofiles of oxygen and nitrate in model sediment system. *Appl. Environ. Microbiol.* 60 : 2094-2100
- Jensen KM, Jensen MH & Kristensen E (1996) Nitrification and denitrification in Wadden sea sediments (Königshafen, Island of Sylt, Germany) as measured by nitrogen isotope pairing and isotope dilution. *Aquat. Microb. Ecol.* 11 : 181-191
- Joye SB & Hollibaugh JT (1995) Influence of sulfide inhibition of nitrification on nitrogen regeneration in sediments. *Science* 270 : 623-625
- Kana TM, Darkangelo C, Hunt MD, Oldham JB, Bennett GE & Cornwell JC (1994) Membrane inlet mass spectrometer for rapid high-precision determination of N<sub>2</sub>, O<sub>2</sub>, and Ar in environmental water samples. *Anal. Chem.* 66 : 4166-4170
- Kaplan WA, Valiela I & Teal JM (1979) Denitrification in a marsh ecosystem. *Limnol. Oceanogr.* 24 : 726-740

- Kaspar HF (1983) Denitrification, nitrate reduction to ammonium, and inorganic nitrogen pools in intertidal sediments. *Mar. Biol.* 74 : 133-139
- Kaspar HF, Asher RA & Boyer IC (1985) Microbial nitrogen transformations in sediments and inorganic nitrogen fluxes across the sediment/water interface on the South Island West coast, New Zealand. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 21 : 245-255
- Knowles R (1982) Denitrification. *Microbiol. Rev.* 46 : 43-70
- Knowles R (1990) Acetylene inhibition technique: development, advantages, and potential problems. In: Revsbech NP & Sørensen J (Ed) *Denitrification in soil and sediment* (pp 151-166). Plenum Press, New York
- Koike I (1990) Measurement of sediment denitrification using  $^{15}\text{N}$  tracer method. In: Revsbech NP & Sørensen J (Ed) *Denitrification in soil and sediment* (pp 291-300). Plenum Press, New York
- Koike I & Hattori A (1978) Denitrification and ammonia formation in anaerobic coastal sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 35 : 278-282
- Koike I & Sørensen J (1988) Nitrate reduction and denitrification in marine sediments. In: Blackburn TH & Sørensen J (Ed) *Nitrogen cycling in coastal marine environments* (pp 251-273). Wiley J & Sons Press, New York
- Larsen LH, Revsbech NP & Binnerup SJ (1996) A microsensor for nitrate based on immobilized denitrifying bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 62 : 1248-1251
- Lohse L, Kloosterhuis HT, van Raaphorst W & Helder W (1996) Denitrification rates as measured by the isotope pairing method and by the acetylene inhibition technique in continental shelf sediments of the North Sea. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 132 : 169-179
- Middelburg JJ, Soetaert K & Herman PMJ (1996) Evaluation of the nitrogen isotope-pairing method for measuring benthic denitrification: A simulation analysis. *Limnol. Oceanogr.* 41 : 1839-1844



- Nielsen K, Nielsen LP & Rasmussen P (1995) Estuarine nitrogen retention independently estimated by the denitrification rate and mass balance methods: a study of Norsminde Fjord, Denmark. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 119 : 275-283
- Nielsen LP (1992) Denitrification in sediment determined from nitrogen isotope pairing. *FEMS Microbiol. Ecol.* 86 : 357-362
- Nielsen LP & Glud RN (1996) Denitrification in a coastal sediment measured *in situ* by the nitrogen isotope pairing technique applied to a benthic flux chamber. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 137 : 181-186
- Nishio T, Koike I & Hattori A (1983) Estimates of denitrification and nitrification in coastal and estuarine sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 45 : 444-450
- Nixon SW, Ammerman JW, Atkinson LP, Berounsky VM, Billen G, Boicourt WC, Boynton WR, Church TM, Ditoro DM, Elmgren R, Garber JH, Giblin AE, Jahnke RA, Owens NJP, Pilson MEQ, Seitzinger SP (1996) The fate of nitrogen and phosphorus at the land-sea margin of the North Atlantic Ocean. *Biogeochemistry* 35 : 141-180
- Nowicki BL (1994) The effect of temperature, oxygen, salinity, and nutrient enrichment on estuarine denitrification rates measured with a modified nitrogen gas flux technique. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 38 : 137-156
- Payne WJ (1973) Reduction of nitrogenous oxides by micro-organisms. *Bacteriol. Rev.* 37 : 409-452
- Raymond N, Bonin P & Bertrand JC (1992) Comparison of methods for measuring denitrifying activity in marine sediments from the Western Mediterranean coast. *Oceanol. Acta* 15 : 137-143
- Revsbech NP & Sørensen J (1990a) Denitrification in soil and sediment. Plenum Press, New York

- Revsbech NP & Sørensen J (1990b) Combined use of the acetylene inhibition technique and microsensors for quantification of denitrification in sediments and biofilms. In: Revsbech NP & Sørensen J (Ed) Denitrification in soil and sediment (pp 259-275). Plenum Press, New York
- Rysgaard S, Risgaard-Petersen N, Nielsen LP & Revsbech NP (1993) Nitrification and denitrification in lake and estuarine sediments measured by the  $^{15}\text{N}$  technique and isotope pairing. *Appl. Environ. Microbiol.* 59 : 2093-2098
- Schlesinger WH (1997) Biogeochemistry. An analysis of global changes. Academic Press, San Diego, 588p
- Seitzinger SP (1988) Denitrification in freshwater and coastal marine ecosystems: Ecological and geochemical significance. *Limnol. Oceanogr.* 33 : 702-724
- Seitzinger S (1990) Denitrification in aquatic sediments. In: Revsbech NP & Sørensen J (Ed) Denitrification in soil and sediment (pp 301-322). Plenum Press, New York
- Seitzinger SP (1993) Denitrification and nitrification rates in aquatic sediments. In: Kemp PF (Ed) Handbook of methods in aquatic microbial ecology (pp 633-641). Lewis Publishers, USA
- Seitzinger SP, Nielsen LP, Caffrey J & Christensen PB (1993) Denitrification measurements in aquatic sediments: a comparison of three methods. *Biogeochem.* 23 : 147-167
- Seitzinger S, Nixon SW, Pilson ME & Burke S (1980) Denitrification and  $\text{N}_2\text{O}$  production in a coastal marine ecosystem. *Limnol. Oceanogr.* 29 : 73-83
- Sloth NP, Blackburn TH, Hansen LS, Risgaard-Petersen N & Lomstein BA (1995) Nitrogen cycling in sediments with different organic loading. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 116 : 163-170
- Sokal RR & Rohlf FJ (1995) Biometry. Third edition, Freeman and Company, San Francisco
- Sørensen J (1978) Denitrification rates in a marine sediment as measured by the acetylene inhibition technique. *Appl. Environ. Microbiol.* 36 : 139-143

- Tiedje JM (1988) Ecology of denitrification and dissimilatory nitrate reduction to ammonium. In: Zehnder AJB (Ed) *Biology of anaerobic microorganisms* (pp 179-244). Wiley J & Sons Press, New York
- Vitousek PM, Aber JD, Howarth RW, Likens GE, Matson PA, Schindler DW, Schlesinger WH, & Tilman DG (1997) Human alteration of the global nitrogen cycle : sources and consequences. *Ecological Applications* 7 :737-750
- Walter HM, Keeney DR & Fillery IR (1979) Inhibition of nitrification by acetylene. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 43 : 195-196
- Yoshinari T & Knowles R (1976) Acetylene inhibition of nitrous oxide reduction by denitrifying bacteria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 69 : 705-710
- Zumft WG (1997) Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61 : 533-616



## APPENDIX

Compilation of reported denitrification rates over the last 25 years. Several data have been recalculated as  $\mu\text{mol N m}^{-2} \text{h}^{-1}$ .

Location	Rate ( $\mu\text{mol-N m}^{-2} \text{h}^{-1}$ )	Method	References
<b>RIVERS/STREAMS</b>			
			<i>a: in Seitzinger 1990</i>
			<i>b: in Koike &amp; Sorensen 1988</i>
Purukohukohu Stream, forested basin	14-364	acetylene block	Cooper & Cooke 1984 <i>a</i>
Purukohukohu Stream, agricultural basin	364-2121	acetylene block	Cooper & Cooke 1984 <i>a</i>
San Francisquito Creek, USA	54	acetylene block	Duff et al. 1984 <i>a</i>
Little Lost Man Creek, USA	0	acetylene block	Duff et al. 1984 <i>a</i>
Gelbaek, DK	42-375	acetylene block	Christensen & Sorensen 1986
Rabis Baek, unvegetated, DK	42-167	acetylene block	Christensen & Sorensen 1986
Rabis Baek, vegetated, DK	42-458	acetylene block	Christensen & Sorensen 1986
Gudena, DK	900	acetylene block	Christensen et al. 1989 <i>a</i>
Aarhus Aa, DK	400	acetylene block	Christensen et al. 1989 <i>a</i>
Sycamore Creek, USA	0.3-10.7	acetylene block	Holmes et al. 1996
Potomac River, USA	210-235	N <sub>2</sub> flux	Seitzinger 1987 <i>a</i>
Delaware River, USA	166-345	N <sub>2</sub> flux	Seitzinger 1987 <i>a</i>
Salten Aa, DK	35-105	<sup>15</sup> N isotope-pairing	Nielsen 1992
Gelbaek, DK	0-708	<sup>15</sup> N isotope-pairing	Pind et al. 1997
Swift Brook, CAN	121-302	NO <sub>3</sub> uptake	Robinson et al. 1979 <i>a</i>
<b>LAKES</b>			
<i>Oligotrophic/Mesotrophic</i>			
Lake Titicaca, PE	0.3	acetylene block	Vincent et al. 1985 <i>a</i>
Hampen, DK	5-50	acetylene block	Christensen & Sorensen 1986
Michigan, USA	12-51	N <sub>2</sub> flux	Gardner et al. 1987
Lacawac, USA	50	N <sub>2</sub> flux	Seitzinger, unpubl. data <i>a</i>
Ernest, USA	56	N <sub>2</sub> flux	Seitzinger, unpubl. data <i>a</i>
Ontario Lakes, CAN	0.4-7.5	Mass balance (210Pb method)	Molot & Dillon 1993
Ontario Lakes, CAN	6.3-9.8	Mass balance (N/P ratio method)	Molot & Dillon 1993
<i>Moderately Eutrophic</i>			
Okeechobee	2-25	acetylene block	Messer & Brezonik 1983 <i>a</i>
Camaleao lake, BR	12-73	acetylene block	Kern et al. 1996
Toolik Lake, USA	131	acetylene block	Klingensmith & Alexander 1983
Mendota, USA	10	<sup>15</sup> N	Keeney et al. 1971 <i>a</i>
Arreso, DK	11	<sup>15</sup> N	Madsen 1979 <i>a</i>
Vechten	11-55	pore water NO <sub>3</sub> profile	Sweerts & deBeer 1989 <i>a</i>
<i>Eutrophic</i>			
Lake Erie, USA	20-292	N <sub>2</sub> pore water profile	Fendinger & Adams 1987 <i>a</i>
ELA Lake 227	42-58	<sup>15</sup> N	Chan & Campbell 1980 <i>a</i>
Vilhelmsborg So, DK	101-181	<sup>15</sup> N isotope-pairing	Rysgaard et al. 1993
Vilhelmsborg So, with benthic microphytes, DK	37-107	<sup>15</sup> N isotope-pairing	Risgaard-Petersen et al. 1994a
Vilhelmsborg So, model sediment, DK	160-380	microsensor technique	Jensen et al. 1994
Bryrup Langso, DK	171	NO <sub>3</sub> uptake	Andersen 1977 <i>a</i>
Kvind So, DK	102	NO <sub>3</sub> uptake	Andersen 1977 <i>a</i>
<b>COASTAL MARINE ENVIRONMENTS</b>			
Randers Fjord, DK	6-42	acetylene block	Sorensen 1978
Kysing Fjord, DK	1-330	acetylene block	Sorensen 1978
Delaware Inlet, NZ	6-12	acetylene block	Kaspar 1983
Lendrup Vig, DK	12-213	acetylene block	Andersen et al. 1984
San Francisco Bay, USA	0.8-1.2	acetylene block	Oremland et al. 1984
Kenepuru Sound, NZ	6-35	acetylene block	Kaspar et al. 1985
W. Coast, NZ	0.4-141	acetylene block	Kaspar et al. 1985
Four League Bay, USA	2-74	acetylene block	Smith et al. 1985 <i>a</i>

Great Bay, Long Island, USA	3-16	acetylene block	Slater & Capone 1987	a
Aarhus Bight, DK	<2-42	acetylene block	Jensen et al. 1988	
Norsminde Fjord, DK	83-417	acetylene block	Jorgensen & Sorensen 1988	
Joyuda Lagoon, mangrove, Puerto Rico	5	acetylene block	Morell & Corredor 1993	
Newport River Estuary, marsh, USA	10-2250	acetylene block	Currin et al. 1996	
Newport River Estuary, natural marsh, USA	4.2-12.5	acetylene block	Thompson et al. 1995	
Newport River Estuary, restored marsh, USA	0-1	acetylene block	Thompson et al. 1995	
Tomales Bay, USA	0-375	acetylene block	Joye & Paerl 1993a	
Tomales Bay, mudflat USA	3-30	acetylene block	Joye & Paerl 1994	
Tomales Bay, intertidal USA	0.1-1.6	acetylene block	Joye & Paerl 1993b	
Tomales Bay, subtidal USA	4.2-29.2	acetylene block	Joye & Paerl 1993b	
Torrige River Estuary, UK, mudflat	0.5-5.8	acetylene block	Koch et al. 1992	
Torrige River Estuary, UK, marsh	2.5-59.0	acetylene block	Koch et al. 1992	
Chesapeake Bay, <i>P. perfoliatus</i> , USA	10-638	acetylene block	Caffrey & Kemp 1990	
Chesapeake Bay, <i>Z. marina</i> , USA	67-209	acetylene block	Caffrey & Kemp 1990	
Chesapeake Bay, without plants, USA	6-220	acetylene block	Caffrey & Kemp 1990	
Mediterranean coast, F	0-24	acetylene block	Raymond et al. 1992	
Texel, Wadden Sea, NL	1-55	acetylene block	Kieskamp et al. 1991	
Narragansett Bay, USA	39-109	N <sub>2</sub> flux	Seitzinger et al. 1984	a,b
MERL mesocosms	305-888	N <sub>2</sub> flux	Seitzinger & Nixon 1985	a
Ochlockonee Bay, USA	0-210	N <sub>2</sub> flux	Seitzinger 1987	a
Narragansett Bay, USA	10-60	N <sub>2</sub> flux	Nowicki & Oviatt 1990	
Tejo Estuary, P	107-1067	N <sub>2</sub> flux	Seitzinger unpubl. data	a
Delaware Bay, USA	0-260	N <sub>2</sub> flux	Seitzinger unpubl. data	a
Nueces Estuary, USA	4.0-71.1	N <sub>2</sub> flux	Yoon & Benner 1992	
Guadalupe Estuary, USA	4.6-34.7	N <sub>2</sub> flux	Yoon & Benner 1992	
Galveston Bay, USA	0-47	N <sub>2</sub> flux	Zimmerman & Benner 1994	
Pawcatuck Estuary, USA	0-37	N <sub>2</sub> flux	Nowicki 1994	
Boston Harbour, USA	24-97	N <sub>2</sub> flux	Nowicki 1994	
Narragansett Bay, USA	15-195	N <sub>2</sub> flux	Nowicki 1994	
Waquoit Bay, USA	0-712	N <sub>2</sub> flux	Lamontagne & Valiela 1995	
Kysing Fjord, DK	7	<sup>15</sup> N	Oren & Blackburn 1979	a,b
Izembok Lagoon, Alaska, USA	3.5-34.5	<sup>15</sup> N	Iisumi et al. 1980	a
Tokyo Bay, JP	16-33	<sup>15</sup> N	Nishio et al. 1982	a,b
Tama Estuary, JP	145-594	<sup>15</sup> N	Nishio et al. 1983	
Odawa Bay, JP	37	<sup>15</sup> N	Nishio et al. 1983	
Patuxent R. Estuary, USA	77-89	<sup>15</sup> N	Jenkins & Kemp 1984	
Terminos lagoon, mangrove, MX	0.08-9.4	<sup>15</sup> N	Rivera-Monroy & Twilley 1996	
Colne Point saltmarsh, UK	4-13	<sup>15</sup> N	Abd. Aziz & Nedwell 1986	
Norsminde Fjord, DK	161-212	<sup>15</sup> N isotope-pairing	Rysgaard et al. 1993	
Norsminde Fjord, bioturbated, DK	3-300	<sup>15</sup> N isotope-pairing	Pelegri et al. 1994	
Norsminde Fjord, DK	89-217	<sup>15</sup> N isotope-pairing	Risgaard-Petersen et al. 1994a	
Arcachon Bay, F	0-17.5	<sup>15</sup> N isotope-pairing	Risgaard-Petersen et al. 1994b	
Etang de Prévost, F	2-45.7	<sup>15</sup> N isotope-pairing	Risgaard-Petersen et al. 1994b	
Kertinge Nor Estuary, DK	0-75	<sup>15</sup> N isotope-pairing	Rysgaard et al. 1995	
Limfjorden, DK	6.25	<sup>15</sup> N isotope-pairing	Sloth et al. 1995	
Aarhus Bay, DK	12-21	<sup>15</sup> N isotope-pairing	Nielsen & Glud 1996	
Konigshafen, G	8-48	<sup>15</sup> N isotope-pairing	Jensen et al. 1996	
Norsminde Fjord, DK	150-1417	<sup>15</sup> N isotope-pairing & microsensor	Binnerup et al. 1992	
Norsminde Fjord, DK	4.2-66.7	<sup>15</sup> N isotope-pairing & mass balance method	Nielsen K. et al. 1995	
Experimental basin, F	8.3-114.2	calculated from nitrification and NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Gouleau et al. 1996	
Microcosms	67-371	calculated from nitrification and NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Caffrey et al. 1993	
Roskilde Fjord, DK	200	mass balance method	Kamp-Nielsen 1992	
Coastal North Sea	0-84	model pore water profile	Billen 1978	a
Princess Louisa Inlet, USA	216	model water column prof.	Smethie 1987	a
<b>CONTINENTAL SHELF</b>				
Bering Sea	9	acetylene block	Koike & Hattori 1979	a,b
Bering Sea, Shelikof Strait	2.1	acetylene block	Haines et al. 1981	a,b
North Sea	0-8	acetylene block	Lohse et al. 1993	
	5.4-7.3	acetylene block	Lohse et al. 1996	
	0.02-6.25	acetylene block	Law & Owens 1990	
	9.8-13.2	<sup>15</sup> N isotope-pairing	Lohse et al. 1996	
North Sea, Svalbard, NO	0-5.6	<sup>15</sup> N isotope-pairing	Blakburn et al. 1996	
Gulf of Maine, USA	3.5	model pore water profile	Christensen et al. 1987	a



Mexican Shelf, USA	5.4	model pore water profile	Christensen et al. 1987	a
Washington Shelf, USA	20.5	model pore water profile	Christensen et al. 1987	a
	133.2	N <sub>2</sub> flux	Devol 1991	
	34.5-198	N <sub>2</sub> flux	Devol & Christensen 1993	
East China Sea	0-54	NH <sub>4</sub> production-DIN efflux	Aller et al. 1985	a
<b>DEEP SEA SEDIMENTS</b>				
E Equatorial Atlantic	0.03	acetylene block	Goloway & Bender 1982	a
N E Atlantic	0.42	N <sub>2</sub> pore water profile	Wilson 1978	a,b
E Equatorial Atlantic	0.15-0.33	model pore water profile	Bender et al. 1977	a
E Equatorial Atlantic	0.11-0.39	model pore water profile	Sorensen et al. 1984	a,b
E Equatorial Atlantic Gyre	0.6	model pore water profile	Bender & Heggie 1984	
N W Atlantic	0.33-0.37	model pore water profile	Christensen & Rowe 1984	a
Middle Atlantic Bight	0.1-21	model pore water profile	Anderson et al. 1994	
E Equatorial Pacific	0.06-2.40	model pore water profile	Goloway & Bender 1982	a
E Equatorial Pacific	0-1	model pore water profile	Bender & Heggie 1984	
Central California	24.32	model pore water profile	Reimers et al. 1992	
Bermuda Rise	0.5	model pore water profile	Heggie et al. 1987	
Hatteras Continental slope	3.2	model pore water profile	Heggie et al. 1987	
Hatteras Continental rise	1.52	model pore water profile	Heggie et al. 1987	
Hatteras Abyssal plain	0.06	model pore water profile	Heggie et al. 1987	
Indian Ocean	7	model pore water profile	Helder 1989	
Savu Basin	26.4	model pore water profile	Helder 1989	
Santa Barbara Basin	0.17	model pore water profile	Barnes et al. 1975, Hattori 1983	b

## LITERATURE CITED

- Abd. Aziz SA & Nedwell DB (1986) The nitrogen cycle of an east coast, U.K. saltmarsh: II. Nitrogen fixation, nitrification, denitrification, tidal exchange. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 22 : 689-704
- Andersen TK, Jensen MH & Sørensen J (1984) Diurnal variation of nitrogen cycling in coastal, marine sediments. I. Denitrification. *Mar. Biol.* 83 : 171-176
- Anderson RF, Rowe GT, Kemp PF, Trumbore S, & Biscaye PE (1994) Carbon budget for the mid-slope depocenter of the Middle Atlantic Bight. *Deep-sea Res.* II 41 : 669-703
- Bender ML & Heggie DT (1984) Fate of organic carbon reaching the deep sea floor : a status report. *Geochim. Cosmochim. Acta* 48 : 977-986
- Binnerup SJ, Jensen K, Revsbech NP, Jensen MH & Sørensen J (1992) Denitrification, dissimilatory reduction of nitrate to ammonium, and nitrification in a bioturbated estuarine sediment as measured with <sup>15</sup>N and microsensor techniques. *Appl. Environ. Microbiol.* 58 : 303-313



- Blackburn TH, Hall POJ, Hulth S & Landen A (1996) Organic-N loss by efflux and burial associated with a low efflux of inorganic N and with nitrate assimilation in Arctic sediments (Svalbard, Norway). *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 141 : 283-293
- Caffrey JM & Kemp WM (1990) Nitrogen cycling in sediments with estuarine population of *Potamogeton perfoliatus* and *Zostera marina*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 66 : 147-160
- Caffrey JM, Sloth NP, Kaspar HF & Blackburn TH (1993) Effect of organic loading on nitrification and denitrification in a marine sediment microcosm. *FEMS Microbiol. Ecol.* 12 : 159-167
- Christensen PB & Sørensen J (1986) Temporal variation of denitrification activity in plant-covered littoral sediment from lake Hampen, Denmark. *Appl. Environ. Microbiol.* 51 : 1174-1179
- Currin CA, Joye SB & Paerl HW (1996) Diel rates of N<sub>2</sub>-fixation and denitrification in a transplanted *Spartina alterniflora* marsh: implications for N-flux dynamics. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 42 : 597-616
- Devol AH & Christensen JP (1993) Benthic fluxes and nitrogen cycling in sediments of the continental margin of the Eastern North Pacific. *J. Mar. Res.* 51 : 345-372
- Devol AH (1991) Direct measurement of nitrogen gas fluxes from continental shelf sediments. *Nature* 349 : 319-321
- Gardner WS, Nalepa TF & Malczyk JM (1987) Nitrogen mineralization and denitrification in lake Michigan sediments. *Limnol. Oceanogr.* 32 : 1226-1238
- Gouleau D, Feuillet-Girard M, Germaneau J & Robert S (1996) Effets de l'assèchement des bassins ostréicoles sur le cycle biogéochimique de nutriments azotés: ammonification préférentielle. *Oceanol. Acta* 19 : 101-115
- Heggie D, Maris C, Hudson A, Dymond J, Beach R & Cullen J (1987) Organic carbon oxidation and preservation in NW Atlantic continental margin sediments. In : Weaver PPE & Thomson J

- (Ed) *Geology and Geochemistry of Abyssal Plains* (pp 215-236). Geological Society Special publication n° 31
- Helder W (1989) Early diagenesis and sediment-water exchange in the Savu Basin (Eastern Indonesia). *Neth. J. Sea Res.* 24 : 555-572
- Holmes RM, Jones JBJr, Fisher SG & Grimm NB (1996) Denitrification in a nitrogen-limited stream ecosystem. *Biogeochem.* 33 : 125-146
- Jenkins MC & Kemp WM (1984) The coupling of nitrification and denitrification in two estuarine sediments. *Limnol. Oceanogr.* 29 : 609-619
- Jensen K, Sloth NP, Risgaard-Petersen N, Rysgaard S & Revsbech NP (1994) Estimation of nitrification and denitrification from microprofiles of oxygen and nitrate in model sediment system. *Appl. Environ. Microbiol.* 60 : 2094-2100
- Jensen KM, Jensen MH & Kristensen E (1996) Nitrification and denitrification in Wadden sea sediments (Königshafen, Island of Sylt, Germany) as measured by nitrogen isotope pairing and isotope dilution. *Aquat. Microb. Ecol.* 11 : 181-191
- Jensen MH, Andersen TK & Sørensen J (1988) Denitrification in coastal bay sediment: regional and seasonal variation in Aarhus Bight, Denmark. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 48 : 155-162
- Jørgensen KS & Sørensen J (1988) Two annual maxima of nitrate reduction and denitrification in estuarine sediment (Norsminde Fjord, Denmark). *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 48 : 147-154
- Joye SB & Paerl HW (1993a) Contemporaneous nitrogen fixation and denitrification in intertidal microbial mats: rapid response to runoff events. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 94 : 267-274
- Joye SB & Paerl HW (1993b) Nitrogen fixation and denitrification in the intertidal and subtidal environments of Tomales Bay, California. In: Oremland RS (Ed) *The biogeochemistry of global change* (pp 633-653). Blackwell Scientific Press, New York
- Joye SB & Paerl HW (1994) Nitrogen cycling in microbial mats: rates and patterns of denitrification and nitrogen fixation. *Mar. Biol.* 119 : 285-295



- Kamp-Nielsen L (1992) Benthic-pelagic coupling of nutrient metabolism along an estuarine eutrophication gradient. *Hydrobiologia* 235/236 : 457-470
- Kaspar HF (1983) Denitrification, nitrate reduction to ammonium, and inorganic nitrogen pools in intertidal sediments. *Mar. Biol.* 74 : 133-139
- Kaspar HF, Asher RA & Boyer IC (1985) Microbial nitrogen transformations in sediments and inorganic nitrogen fluxes across the sediment/water interface on the South Island West coast, New Zealand. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 21 : 245-255
- Kern J, Darwich A, Furch K & Junk WJ (1996) Seasonal denitrification in flooded and exposed sediments from the amazon floodplain at Lago Camaleao. *Microb. Ecol.* 32 : 47-57
- Kieskamp WM, Lohse L, Epping E & Helder W (1991) Seasonal variation in denitrification rates and nitrous oxide fluxes in intertidal sediments of the western Wadden Sea. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 72 : 145-151
- Klingensmith KM & Alexander V (1983) Sediment nitrification, denitrification and nitrous oxide production in a deep arctic lake. *Appl. Environ. Microbiol.* 46 : 1084-1092
- Koch MS, Maltby E, Oliver GA & Bakker SA (1992) Factors controlling denitrification rates of tidal mudflats and fringing salt marshes in South-West England. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 34 : 471-485
- Koike I & Sørensen J (1988) Nitrate reduction and denitrification in marine sediments. In: Blackburn TH & Sørensen J (Ed) *Nitrogen cycling in coastal marine environments* (pp 251-273). Wiley J & Sons Press, New York
- Lamontagne MG & Valiela I (1995) Denitrification measured by a direct N<sub>2</sub> flux method in sediments of Waquoit bay, MA. *Biogeochem.* 31 : 63-83
- Law CS & Owens NJP (1990) Denitrification and nitrous oxide in the North sea. *Neth. J. Sea Res.* 25 : 65-74



- Lohse L, Kloosterhuis HT, van Raaphorst W & Helder W (1996) Denitrification rates as measured by the isotope pairing method and by the acetylene inhibition technique in continental shelf sediments of the North Sea. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 132 : 169-179
- Lohse L, Malschaert JFP, Slomp CP, Helder W & van Raaphorst W (1993) Nitrogen cycling in the North Sea sediments: interaction of denitrification and nitrification in offshore and coastal areas. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 101 : 283-296
- Molot LA & Dillon PJ (1993) Nitrogen mass balances and denitrification rates in central Ontario Lakes. *Biogeochem.* 20 : 195-212
- Morell JM & Corredor JE (1993) Sediment nitrogen trapping in a mangrove lagoon. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 37 : 203-212
- Nielsen K, Nielsen LP & Rasmussen P (1995) Estuarine nitrogen retention independently estimated by the denitrification rate and mass balance methods: a study of Norsminde Fjord, Denmark. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 119 : 275-283
- Nielsen LP & Glud RN (1996) Denitrification in a coastal sediment measured *in situ* by the nitrogen isotope pairing technique applied to a benthic flux chamber. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 137 : 181-186
- Nielsen LP (1992) Denitrification in sediment determined from nitrogen isotope pairing. *FEMS Microbiol. Ecol.* 86 : 357-362
- Nishio T, Koike I & Hattori A (1983) Estimates of denitrification and nitrification in coastal and estuarine sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 45 : 444-450
- Nowicki BL & Oviatt CA (1990) Are estuaries traps for anthropogenic nutrients? Evidence from estuarine mesocosms. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 66 : 131-146
- Nowicki BL (1994) The effect of temperature, oxygen, salinity, and nutrient enrichment on estuarine denitrification rates measured with a modified nitrogen gas flux technique. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 38 : 137-156

- Oremland RS, Umberger C, Culbertson CW & Smith RL (1984) Denitrification in San Francisco Bay intertidal sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 47 : 1106-1112
- Pelegri SP, Nielsen LP & Blackburn TH (1994) Denitrification in estuarine sediment stimulated by the irrigation activity of the amphipod *Corophium volutator*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 105 : 285-290
- Pind A, Risgaard-Petersen N & Revsbech NP (1997) Denitrification and microphytobenthic  $\text{NO}_3^-$  consumption in a Danish lowland stream : diurnal and seasonal variation. *Aquat. Microb. Ecol.* 12 : 275-284
- Raymond N, Bonin P & Bertrand JC (1992) Comparison of methods for measuring denitrifying activity in marine sediments from the Western Mediterranean coast. *Oceanol. Acta* 15 : 137-143
- Reimers CE, Jahnke RA & McCorkle DC (1992) Carbon fluxes and burial rates over the continental slope and rise off Central California with implications for the global carbon cycle. *Global Biogeochem. Cycles* 6 : 199-224
- Risgaard-Petersen N, Rysgaard S, Nielsen LP & Revsbech NP (1994a) Diurnal variation of denitrification and nitrification in sediments colonized by benthic microphytes. *Limnol. Oceanogr.* 39 : 573-579
- Risgaard-Petersen N, Rysgaard S, Sloth NP & Pelegri SP (1994b) Nitrification, denitrification, and nitrate ammonification in sediments of two coastal lagoons in Southern France. In: Rodriguez-Valera F & Caumette P (Ed) Proceedings of the CEC Workshop CLEAN: Coastal Lagoon Eutrophication and ANaerobic processes, Progress Report, Part II. Ferrara (Italy), 1-3 December 1994, p 255-285
- Rivera-Monroy VH & Twilley RR (1996) The relative role of denitrification and immobilization in the fate of inorganic nitrogen in mangrove sediments (Terminos Lagoon, Mexico). *Limnol. Oceanogr.* 41 : 284-296

- Rysgaard S, Christensen PB & Nielsen LP (1995) Seasonal variation in nitrification and denitrification in estuarine sediment colonized by benthic microalgae and bioturbating infauna. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 126 : 111-121
- Rysgaard S, Risgaard-Petersen N, Nielsen LP & Revsbech NP (1993) Nitrification and denitrification in lake and estuarine sediments measured by the  $^{15}\text{N}$  technique and isotope pairing. *Appl. Environ. Microbiol.* 59 : 2093-2098
- Seitzinger S (1990) Denitrification in aquatic sediments. In: Revsbech NP & Sørensen J (Ed) *Denitrification in soil and sediment* (pp 301-322). Plenum Press, New York
- Sloth NP, Blackburn TH, Hansen LS, Risgaard-Petersen N & Lomstein BA (1995) Nitrogen cycling in sediments with different organic loading. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 116 : 163-170
- Sørensen J (1978) Denitrification rates in a marine sediment as measured by the acetylene inhibition technique. *Appl. Environ. Microbiol.* 36 : 139-143
- Thompson SP, Paerl HW & Go MC (1995) Seasonal patterns of nitrification and denitrification in a natural and restored salt marsh. *Estuaries* 18 : 399-408
- Yoon WB & Benner R, (1992) Denitrification and oxygen consumption in sediments of two South Texas estuaries. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 90 : 157-167
- Zimmerman AR & Benner R (1994) Denitrification, nutrient regeneration and carbon mineralization in sediments of Galveston Bay, Texas, USA. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 114 : 275-288





# *Chapitre 2*

*Matériels et méthodes*

## *Avant-propos*

*Depuis plusieurs décennies, l'écologie microbienne a développé des méthodes spécifiques, souvent en étroite relation avec la biogéochimie et les activités des micro-organismes.*

*Dans ce chapitre sont répertoriés et décrits les protocoles des méthodes utilisées durant cette étude. De plus, pour chacune d'elles, on a brièvement rappelé les principes sur lesquels elles sont fondées.*

## Chapitre 2 :

### « Matériels et méthodes »

#### Introduction

L'étude a été menée sur 6 stations du bassin d'Arcachon, une lagune maritime macrotidale de la côte atlantique située au sud-ouest de Bordeaux (Fig. 1). Le Tableau 1 regroupe quelques informations générales sur les sites étudiés, sachant qu'une description des stations de prélèvement est disponible dans la section « Material and Methods » de chaque chapitre. Pour plus de renseignements, on peut se référer aux travaux de Castel et al. (1996) ainsi qu'à l'étude intégrée réalisée par l'IFREMER (1997).

Paramètres	Courant	Courbey	Station A	Station B	Graveyron	Tuiles
Salinité (‰)	25 - 35	25 - 35	25 - 35	9 - 34	0 - 20	0 - 20
Température (°C)	7 - 21	7 - 21	7 - 21	5 - 24	5 - 24	5 - 24
Prof. (m)	3 - 5	6 - 8				0.5
Type de sédiment	subtidal sablo-vaseux	subtidal sablo-vaseux	intertidal sablo-vaseux	intertidal sablo-vaseux	intertidal sables	sablo-vaseux
Producteurs primaires dominants	Microphyto -benthos	Microphyto -benthos	<i>Zostera noltii</i>	<i>Zostera noltii</i>	Microphyto -benthos	Microphyto -benthos

Tableau 1 : Principales caractéristiques des stations étudiées.



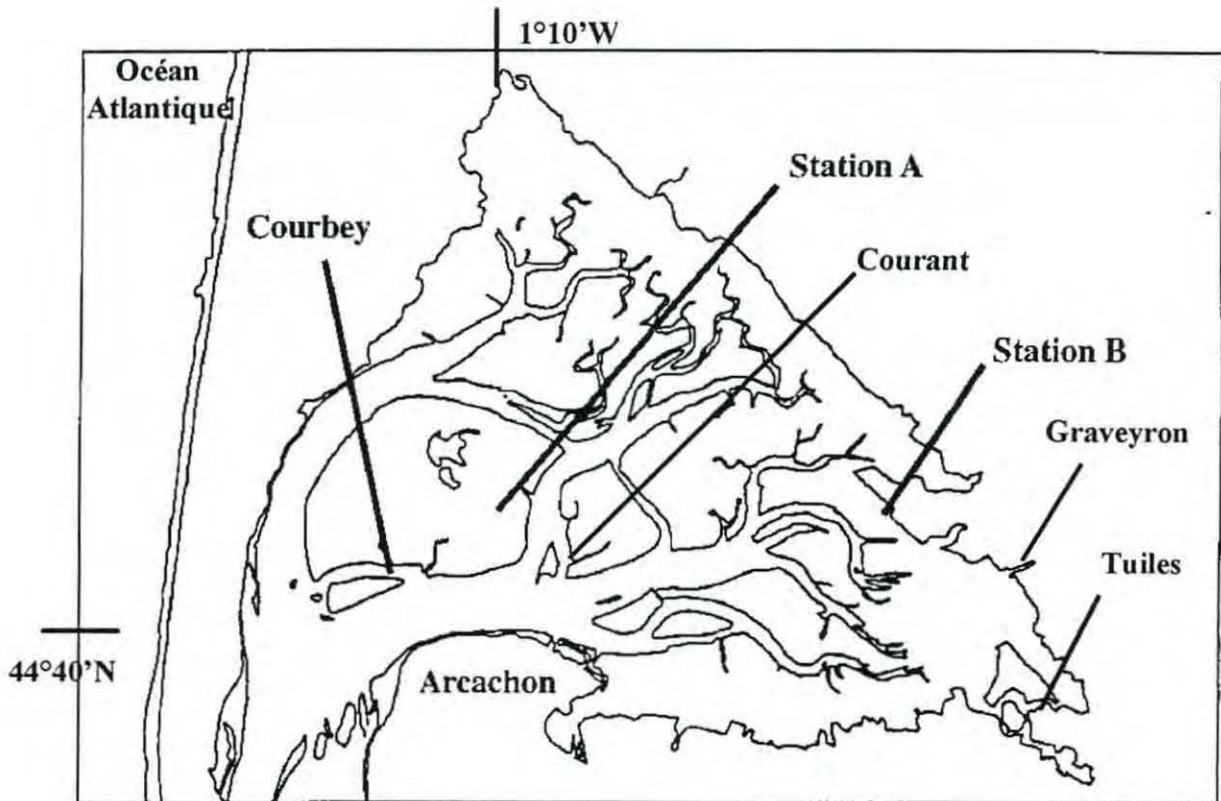


Figure 1 : Localisation géographique des stations de prélèvement de l'étude

## 1. Dénombrements des bactéries nitrifiantes

### 1.1 Principe de la méthode du « Nombre le Plus Probable » ou NPP

Le dénombrement des bactéries nitrosantes ( $\text{NH}_4^+ \rightarrow \text{NO}_2^-$ ) et nitratantes ( $\text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO}_3^-$ ) est réalisé selon la technique du « Nombre le Plus Probable » ou NPP plus connue sous sa dénomination anglaise « *Most Probable Number* » ou MPN (Mac Crady, 1915). Le dénombrement est réalisé de manière indirecte par la mise en culture d'une série de dilutions (ou gamme de dilutions) préparée à partir d'un échantillon de sédiment sur un milieu de culture liquide spécifique. La méthode est basée sur deux hypothèses fondamentales : i) les micro-organismes sont parfaitement distribués « au hasard » dans l'inoculum à analyser, et ii) chaque sous-échantillon obtenu lors des dilutions successives de l'inoculum montre une croissance

positive lorsqu'il contient un ou plusieurs micro-organismes (Cochran, 1950 ; Herbert, 1990 ; Bourguès, 1996). Après la mise en culture des différents sous-échantillons inoculés, sont comptabilisés ceux dits positifs qui montrent une croissance des organismes recherchés. Ce nombre caractéristique permet, par l'utilisation de tables statistiques, d'obtenir la densité des micro-organismes par unité de volume (Mac Crady, 1918 ; Woodward, 1957). Nous avons utilisé la technique de dénombrement sur microplaques décrite par Rowe et al. (1977). Les densités bactériennes ont été obtenues grâce au programme informatique mis au point par Clarke & Owens (1983).

### *1.2 Echantillonnage et protocole des dénombrements*

La Figure 2 résume et schématise la procédure utilisée pour le dénombrement des bactéries nitrifiantes. Les carottes de sédiment sont prélevées à la main à basse mer sur les sites d'étude puis ramenées au laboratoire pour être découpées en sections de 1 cm (de 0 à 5 cm pour la station du Courbey, et de 0 à 2 cm pour les stations A et B). Chaque tranche est ensuite homogénéisée dans une boîte de Pétri stérile. Chaque section est analysée en triplicat. Une partie aliquote de 2 ml de sédiment est prélevée de l' « homogénat » et transférée dans un tube contenant 5 ml d'eau de mer stérile. Cet « homogénat » est fortement agité mécaniquement avec un vortex durant 5 min. Un prélèvement est ensuite effectué à l'aide d'une pipette multicanaux possédant 8 cônes stériles remplis chacun d'une part aliquote de 150 µl de cet « homogénat » qui est transférée sur une microplaque stérile contenant 8 x 12 puits de 300 µl remplis aseptiquement de 150 µl du milieu de culture spécifique stérile. De proche en proche, une double dilution est ainsi réalisée de 1/10ème dans le premier puits jusqu'à 1/20480ème dans le douzième puits. Les microplaques sont ensuite mises en culture à l'obscurité, à 24 - 26 °C et couvertes de papier aluminium (afin d'éviter la dessiccation) pendant 4 et 5 semaines pour le dénombrement des bactéries nitrosantes et nitratantes, respectivement.



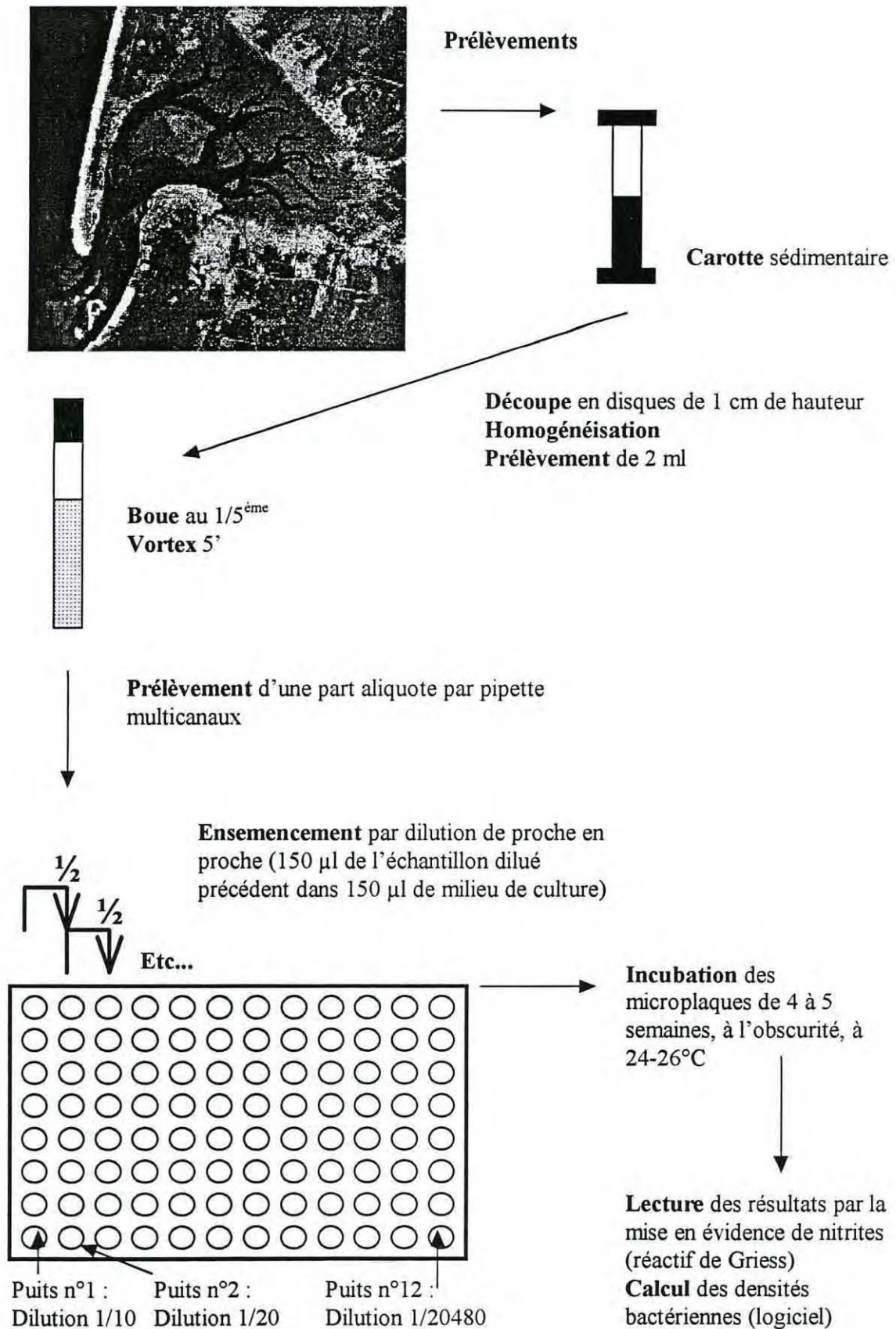


Figure 2 : Protocole des dénombrements de densités bactériennes par NPP sur microplaques



A l'issue de l'incubation, la présence (bactéries nitrosantes) ou l'absence (bactéries nitrifiantes) de nitrites est déterminée par l'ajout de quelques gouttes de réactif de Greiss dans chaque puits.

Les milieux de cultures utilisés pour les dénombrements sont élaborés à partir des milieux de MacFarlane & Herbert (1984) et Koops & Möller (1992), et sont composés de : NaCl, 25 g ;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 235 mg (pour les nitrosantes) ou  $\text{NaNO}_2$ , 247 mg (pour les nitrifiantes) ;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 200 mg ;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 40 mg ;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 40 mg ; Solution stock de Fe/EDTA (Tableau 2), 2 ml ; Solution stock d'oligo-éléments (Tableau 3), 1 ml ; eau distillée, 1000 ml. Les milieux sont autoclavés 15 mn à  $121^\circ\text{C}$  puis ajustés aseptiquement à un pH de 7,2 - 7,4 par une solution de soude (NaOH, 2M).

$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	50 mg
NaEDTA	50 mg
Rouge de phénol	50 mg
Eau distillée	200 ml

Tableau 2 : Composition de la solution stock de Fe/EDTA selon MacFarlane & Herbert (1984).

HCl 36 %	8 ml
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	40 mg
$\text{H}_3\text{BO}_3$	49 mg
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	43 mg
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	973 mg
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	803 mg
$\text{CuCl}_2$	17
Eau distillée	1000 ml

Tableau 3 : Composition de la solution stock d'oligo-éléments selon Stehr et al. (1995).

## 2. Mesure de l'activité nitrifiante

### 2.1 Principe de la méthode et protocole (Fig. 3)

L'activité nitrifiante est mesurée selon la méthode décrite par Henriksen (1980) qui est basée sur l'utilisation de la N-serve ou Nitrapyrine qui est un inhibiteur de la première étape de la nitrification ( $\text{NH}_4^+ \rightarrow \text{NH}_2\text{OH}$ ).

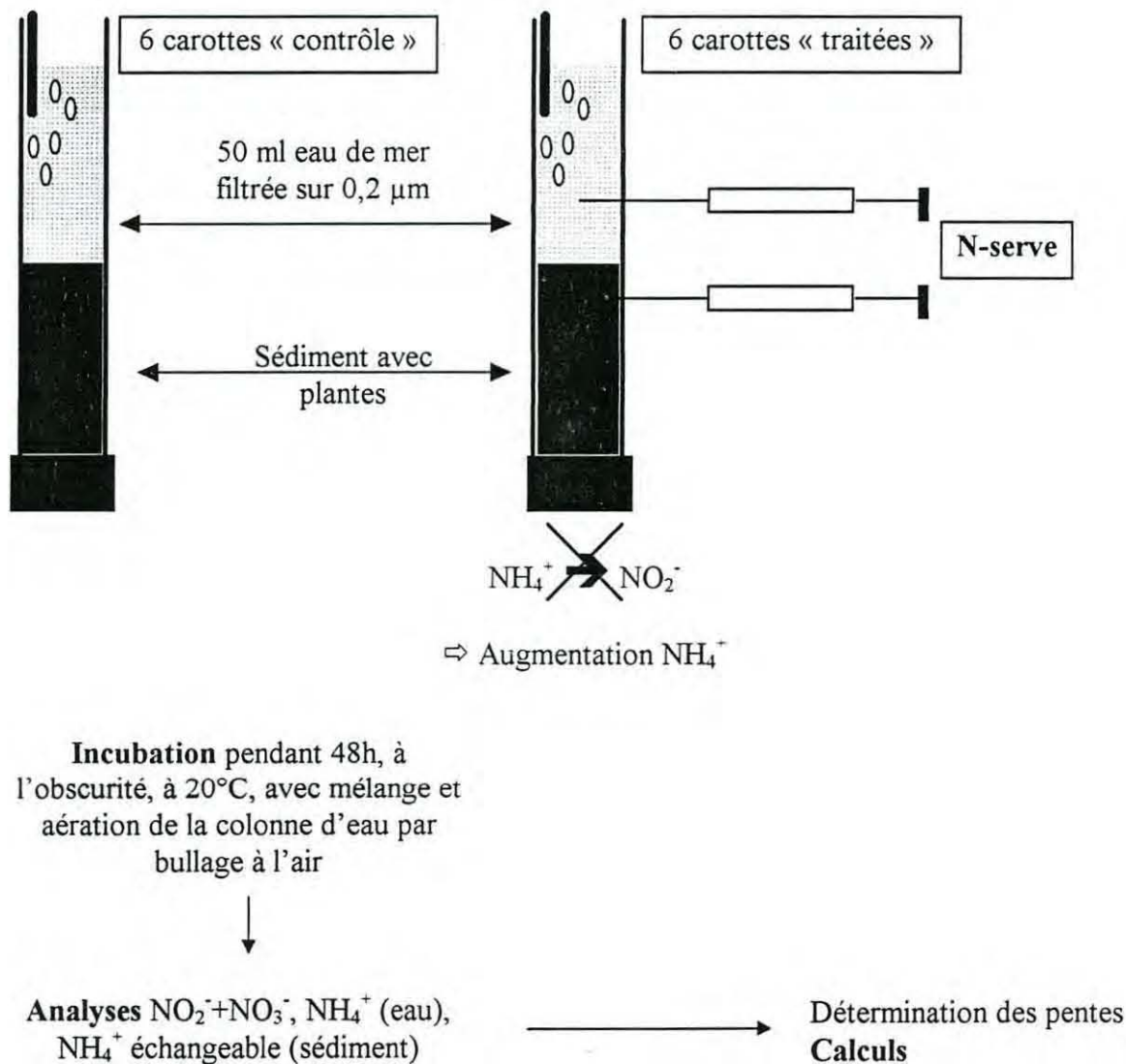


Figure 3 : Protocole modifié de mesure du taux de nitrification selon la méthode de Henriksen (1980)

Douze carottes (diamètre interne 4,4 cm) sont incubées pendant deux jours à l'obscurité et à 20°C. La moitié des carottes reçoit une injection de ~ 30 µl dans chacun des deux premiers centimètres et 25 µl dans l'eau surnageante (50 ml d'eau de mer *in situ* préalablement filtrés sur 0,2 µm) de N-serve (100 mg ml<sup>-1</sup> dissous dans l'acétone) afin d'obtenir une concentration finale de 20 ppm dans le sédiment et de 5 ppm dans l'eau. L'eau surnageante est oxygénée et agitée par bullage d'air grâce à une petite aiguille. Chaque jour 25 µl de N-serve sont ajoutés à l'eau. On mesure les teneurs en ammonium de l'eau et des deux premiers centimètres de sédiment (extraction par KCl 1M). Le taux de nitrification est calculé sur la base de la production d'ammonium entre le traitement et le contrôle.

## 2.2 Calculs

Le taux de nitrification en µmol N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> m<sup>-2</sup> h<sup>-1</sup> est calculé comme suit :

$$(PT_{\text{NH}_4^+} - P\text{CTRL}_{\text{NH}_4^+}) \bullet \frac{V_{\text{eau}} + V_{\text{sed}}}{\pi r^2}$$

où  $PT_{\text{NH}_4^+}$  est la pente de production d'ammonium obtenue à partir des carottes traitées à la N-serve,  $P\text{CTRL}_{\text{NH}_4^+}$  la pente des carottes contrôle,  $r$  le rayon des carottes,  $V_{\text{eau}}$  le volume d'eau des carottes et  $V_{\text{sed}}$  le volume de sédiment des carottes.

## 3. Mesure de l'activité dénitrifiante

### 3.1 Principe de la méthode du « <sup>15</sup>N isotope pairing » (Nielsen, 1992)

La méthode pose l'hypothèse que la distribution du rapport <sup>14</sup>NO<sub>3</sub>/<sup>15</sup>NO<sub>3</sub> est homogène dans le sédiment, et que l'association des isotopes se fait « au hasard ». Du nitrate <sup>15</sup>NO<sub>3</sub><sup>-</sup> marqué par un isotope lourd de l'azote (<sup>15</sup>N) est ajouté à l'eau surnageante d'un sédiment et diffuse à travers la zone oxygène du sédiment. Le nitrate non-marqué <sup>14</sup>NO<sub>3</sub><sup>-</sup> qui provient soit de la colonne



d'eau soit de la nitrification dans le sédiment se mélange avec le  $^{15}\text{NO}_3^-$  ajouté, et après un certain temps il s'établit un profil stable de concentration du nitrate  $^{14}\text{NO}_3^-$  et du nitrate marqué  $^{15}\text{NO}_3^-$ . Juste sous l'interface oxiqne-anoxiqne, les micro-organismes pratiquant la réduction des nitrates vont réduire le mélange isotopique de nitrates soit en azote moléculaire  $\text{N}_2$  (dénitrification) soit en ammonium (réduction dissimilatrice des nitrates en ammonium).

Aussi, pour la mesure de la dénitrification, il est possible de calculer par inférence le taux de production de l'azote moléculaire  $^{14}\text{N}^{14}\text{N}$  à partir de la teneur en isotopes  $^{14}\text{N}^{15}\text{N}$  et  $^{15}\text{N}^{15}\text{N}$ . La production de gaz  $^{14}\text{N}_2$  représente la dénitrification *in situ*. Quand le pourcentage d'atome  $^{15}\text{N}$  dans le nitrate de l'eau est connu, le taux de dénitrification attribuée aux nitrates diffusant de la colonne d'eau ( $D_w$ ) peut-être déterminé. Le taux de dénitrification liée à la nitrification ( $D_n$ ) est ensuite estimé par soustraction de  $D_w$  au taux de dénitrification *in situ* ( $D_{14}$ ).

### 3.2 Protocole des incubations

Après le prélèvement sur le terrain, les carottes sont ramenées au laboratoire et placées dans un mésocosme contenant de l'eau de mer *in situ* où elles sont maintenues à la température *in situ*, le tout durant une nuit au moins afin d'obtenir l'état d'équilibre. Chaque carotte est équipée d'un agitateur magnétique placé dans la colonne d'eau afin d'assurer le mélange de celle-ci (Figure 4). L'eau est constamment oxygénée par bullage à l'air. 10 carottes sédimentaires de 10,4 cm de diamètre interne servent à la mesure du taux de dénitrification par la méthode du «  $^{15}\text{N}$  isotope pairing technique » où le taux de dénitrification est calculé à partir de l'accumulation de  $\text{N}_2$  simplement ou doublement marqué après l'addition de  $^{15}\text{NO}_3^-$  dans la colonne d'eau (Nielsen, 1992). Le nitrate  $^{15}\text{NO}_3^-$  provenant d'une solution stock à 10 mM (99%  $^{15}\text{NO}_3^-$ ) est ajouté à la colonne d'eau de chaque carotte à une concentration finale de  $\sim 30 \mu\text{M}$  de  $^{15}\text{NO}_3^-$ , concentration jugée optimale et déterminée lors d'expériences préliminaires (Bartoli et al., com. pers.). Les échantillons d'eau pour l'analyse de l'azote marqué  $^{15}\text{N}-\text{N}_2$  sont transférés dans des tubes en verre

de 6 ml (Exetainers, Labco, High Wycombe, UK) et fixés par l'ajout de 0,2 ml d'une solution de  $\text{ZnCl}_2$  (7 M). Le sédiment et l'eau surnageante de chaque carotte sont ensuite mélangés avec précaution après l'addition de 5 ml de la solution de  $\text{ZnCl}_2$ . 6 ml d'échantillon de cet « homogénat » sont récupérés dans les tubes de verre (Exetainers) et fixés par addition de 0,2 ml de la solution de  $\text{ZnCl}_2$ . L'abondance des espèces  $^{15}\text{N}^{15}\text{N}$  et  $^{14}\text{N}^{15}\text{N}$  dans l'azote  $\text{N}_2$  est analysée par spectrométrie de masse. L'azote dissous dans les échantillons d'eau et de l'« homogénat » est extrait par l'échange volume à volume de 10 % de l'échantillon contre de l'hélium. Les échantillons sont ensuite mélangés manuellement avec vigueur pendant 5 mn afin d'équilibrer les gaz de l'échantillon avec l'hélium. En utilisant une seringue étanche en verre, le gaz issu du volume d'hélium est injecté dans un spectromètre de masse à rapport isotopique (Sira Series II, V.G. Isotech, Middelwich, UK) en ligne avec un chromatographe en phase gazeuse (Risgaard-Petersen & Rysgaard, 1995). Ces mesures ont été effectuées lors de deux séjours au Département d'Ecologie Microbienne de l'Université d'Århus au Danemark en septembre 1997 et février 1998. L'abondance de l'azote marqué  $^{15}\text{N}$  dans le nitrate  $\text{NO}_3^-$  (at.%  $\text{NO}_3^-$ ) est déterminée comme la différence entre les concentrations en nitrate  $\text{NO}_3^-$  avant et après l'addition de nitrate marqué  $^{15}\text{NO}_3^-$ .

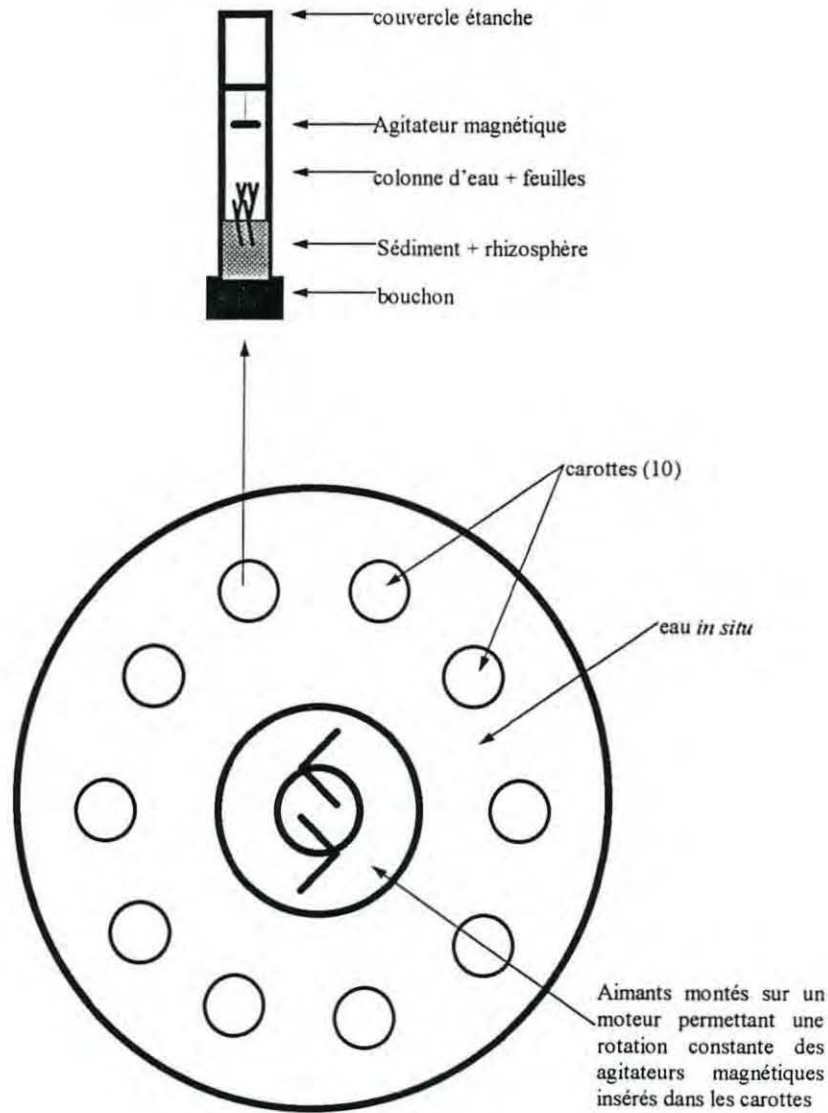


Figure 4 : Montage utilisé pour la mesure de la dénitrification et des flux

### 3.3 Calculs

Le taux de production (en  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{h}^{-1}$ ) des 2 espèces marquées de  $^{15}\text{N-N}_2$  ( $p^{15}\text{N}_2$ ) est calculé comme suit :

$$p^{15}\text{N}_2 = \frac{(C_{\text{eau}} - C_{\text{ini}}) \cdot (\text{vol}_1 - \text{vol}_3) + (C_{\text{homogénat}} - C_{\text{ini}}) \cdot [(\text{vol}_2 \times \phi) + \text{vol}_3]}{\delta t} \cdot \frac{1}{A}$$

où  $C_{\text{eau}}$  et  $C_{\text{homogénat}}$  sont les concentrations de l'isotope dans l'eau et l'« homogénat », respectivement,  $C_{\text{ini}}$  la concentration initiale de l'isotope dans l'eau,  $\text{vol}_1$  le volume de la colonne



d'eau,  $vol_2$  le volume du sédiment,  $vol_3$  le volume de la colonne d'eau après l'échantillonnage mais avant le mélange de la carotte,  $\phi$  la porosité,  $A$  la surface et  $t$  le temps d'incubation.

Les taux de dénitrification sont estimés à partir de la production des isotopes  $^{15}\text{N}$  (Nielsen, 1992) :

$$D_{15} = p(^{14}\text{N}^{15}\text{N}) + 2p(^{15}\text{N}^{15}\text{N})$$

$$D_{14} = \frac{p(^{14}\text{N}^{15}\text{N})}{2p(^{15}\text{N}^{15}\text{N})} \bullet D_{15}$$

où  $D_{15}$  et  $D_{14}$  sont les taux de dénitrification du nitrate  $^{15}\text{NO}_3^-$  et  $^{14}\text{NO}_3^-$ , respectivement, et  $p(^{14}\text{N}^{15}\text{N})$  et  $p(^{15}\text{N}^{15}\text{N})$  les taux de production des 2 espèces marquées de l'azote  $\text{N}_2$ .  $D_{15}$  exprime l'activité dénitrifiante du nitrate marqué  $^{15}\text{NO}_3^-$  ajouté, et  $D_{14}$  correspond à l'activité dénitrifiante totale *in situ*.

Le taux de dénitrification attribuée aux nitrates diffusant de la colonne d'eau ( $D_w$ ) est calculé à partir de  $D_{15}$  et de l'abondance de l'isotope marqué  $^{15}\text{N}$  dans les nitrates de la colonne d'eau (Risgaard-Petersen & Rysgaard, 1995) :

$$D_w = \left( \frac{100}{\text{at.}\% \text{ NO}_3} \bullet D_{15} \right) - D_{15}$$

où at.%  $\text{NO}_3$  est le pourcentage d'isotope 15 dans les nitrates de la colonne d'eau  $^{15}\text{N}$  at.% calculé comme suit :

$$\text{at.}\% \text{ NO}_3 = \frac{(CN_{\text{ajouté}} - CN_{\text{ini}})}{CN_{\text{ajouté}}} \bullet 100$$

où  $CN_{\text{ajouté}}$  est la concentration totale de nitrate  $\text{NO}_3^-$  juste après l'addition de nitrate marqué  $^{15}\text{NO}_3^-$  ( $^{14}\text{NO}_3^- + ^{15}\text{NO}_3^-$ ) et  $CN_{\text{ini}}$  la concentration initiale de nitrate  $^{14}\text{NO}_3^-$  de la colonne d'eau, respectivement.

Le taux de dénitrification attribuée à la nitrification couplée ( $D_n$ ) est calculé comme suit :

$$D_n = D_{14} - D_w$$

#### 4. Protocoles des incubations pour la détermination des flux de $O_2$ , $NO_2^-$ , $NO_3^-$ et $NH_4^+$ entre la colonne d'eau et les sédiments avec les zostères

Les carottes de sédiment (10,4 cm de diamètre interne) sont prélevées à marée basse. Au laboratoire elles sont placées dans un mésocosme contenant de l'eau de mer prélevée *in situ* où elles sont maintenues à la température *in situ*, le tout durant une nuit au moins afin d'obtenir l'état d'équilibre. Le flux de l'élément dissous à l'interface eau-sédiment est mesuré en fermant hermétiquement les carottiers à l'aide de bouchons plastiques empêchant la diffusion d'air. Dans ces conditions, les carottes sont incubées durant 1 à 2 h, soit à l'obscurité, soit à la lumière. Les concentrations de l'élément dissous dans l'eau surnageante sont mesurées au début et à la fin de l'incubation. Les échantillons d'eau sont récoltés dans l'eau surnageante à l'aide d'une seringue munie d'un long tube plastique en évitant tout bullage. Puis ils sont transférés pour la mesure i) de l'oxygène dans des tubes Hungate de ~ 13 ml en remplissant le tube par le bas et en faisant déborder l'échantillon, ii) des sels azotés dissous, filtrés sur GF/F (0,45  $\mu$ m, NALGENE-USA) et congelés (- 20 °C) pour une analyse ultérieure. Le flux moyen est calculé à partir des flux de 5 carottes différentes.

## 5. Analyses

### 5.1 Mesure de l'oxygène dissous

La concentration en oxygène dissous des échantillons est déterminée selon la méthode de Winkler (Strickland & Parsons, 1972). 200  $\mu$ l des réactifs Winkler I et II sont ensuite ajoutés tour

à tour à l'échantillon et mélangés par retournement du tube entre chaque ajout. Les échantillons sont ensuite conservés à l'obscurité et au frais puis analysés dans les 2 jours. Après acidification de l'échantillon, 5 ml sont titrés avec du thiosulfate à 0,01 M.

Pour déterminer la pénétration maximale de l'oxygène dissous dans l'eau interstitielle des sédiments de nos stations, nous avons utilisé des mini-électrodes polarographiques (De Wit et al., 1997). Ces sondes utilisent une polarisation de la cathode contre l'anode qui entraîne une réduction (cas de l'oxygène) ou une oxydation du composé mesuré. Ainsi il se forme un courant électrique dont l'intensité est directement proportionnelle à la teneur du composé dans le milieu. Après calibration, la sonde est descendue dans la carotte à l'aide d'un micromanipulateur.

### 5.2 Mesure des nitrates et nitrites

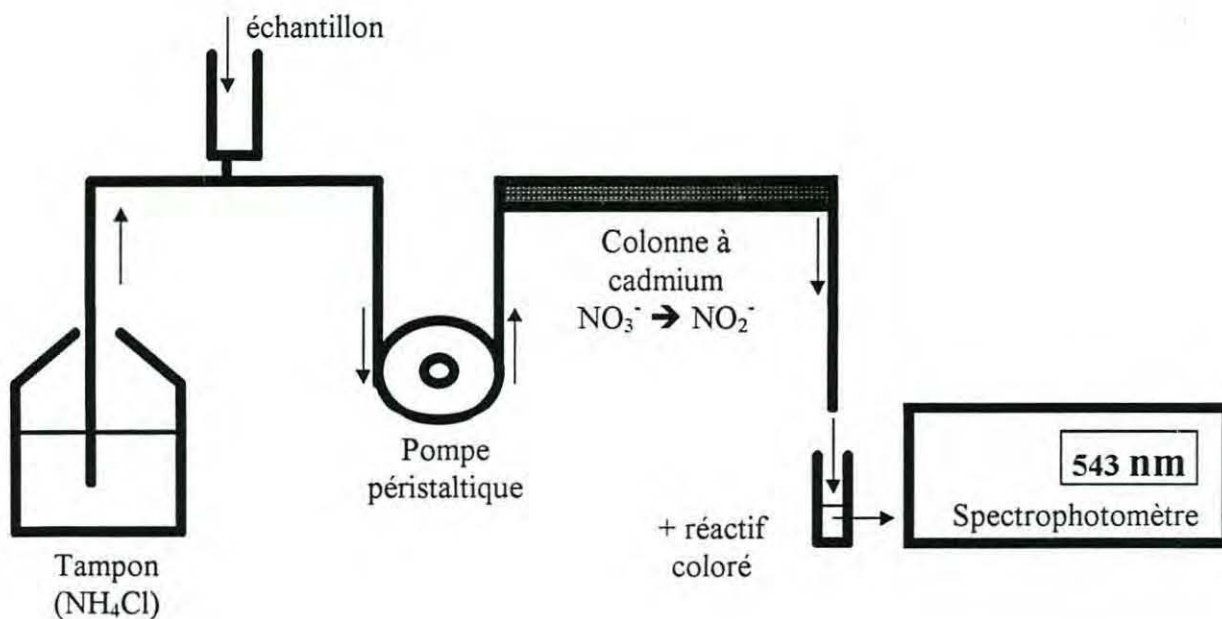


Figure 5 : Principe de la mesure des nitrates par réduction sur colonne à cadmium

Les teneurs en nitrates et nitrites dans l'eau sont déterminées manuellement selon le principe de la réaction de Griess (Strickland & Parsons, 1972 ; Aminot & Chaussepied, 1983). Les ions nitrites forment un diazoïque avec la sulfanilamide en milieu acide qui réagit avec le N-



naphtyl-éthylènediamine pour former un « colorant » rose qui absorbe à 543 nm. Les nitrates sont eux réduits quantitativement (>95%) en nitrites sur une colonne à cadmium (Fig. 5) avant d'être analysés selon la réaction de Griess (Wood et al., 1967 ; Aminot & Chaussepied, 1983).

### **5.3 Mesure de l'ammonium dans l'eau et les sédiments**

Les teneurs en ammonium sont déterminées selon le principe de la méthode de Koroleff (Koroleff 1969 *in* Aminot & Chaussepied, 1983) où l'ammoniac forme une monochloramine avec l'hypochlorite, qui réagit avec le phénol pour former le bleu d'indophénol qui absorbe à 630 nm.

L'ammonium du sédiment est extrait par une solution de KCl (1 M). 2 ml de sédiment et 4 ml d'une solution de KCl 1 M sont mélangés pendant 1 heure puis centrifugés 10 min à 4000 tpm (JOUAN-F). Le surnageant est récupéré et analysé.

Afin d'améliorer la précision de nos mesures pour les petites concentrations nous avons utilisé un spectrophotomètre acceptant des cuves de 4 cm de trajet optique (SAFAS-Monaco).

### **5.4 Mesure de la chlorophylle**

Les teneurs en chlorophylle *a* et en phéopigments *a* sont déterminées selon la méthode spectrophotométrique de Lorenzen (Aminot & Chaussepied, 1983). A chaque prélèvement, 3 carottes de sédiment (4,4 cm de diamètre) sont prélevées à la main à marée basse. Les deux premiers centimètres de sédiment sont découpés et lyophilisés (48 h, EDWARDS-UK). Les échantillons de sédiment lyophilisés sont mis en présence d'acétone pendant 24 h afin d'extraire les pigments. Les échantillons sont ensuite centrifugés (10 min, 4 °C, 3000 tpm, JOUAN-F) puis leur absorbance est mesurée au spectrophotomètre à 665 et 750 nm. Ensuite, le surnageant est acidifié par ajout d'acide chlorhydrique et on recommence la mesure aux deux longueurs d'onde. Les concentrations en pigments sont exprimées en  $\mu\text{g g}^{-1}$  de sédiment sec.

### **5.5 Mesure des teneurs en carbone total et organique**

Les teneurs en carbone total et en carbone organique des échantillons de sédiments sont déterminées par un auto-analyseur (CS-25-LECO-USA) selon le protocole décrit par Nieuwenhuize et al. (1994). L'obtention du carbone organique nécessite une décarbonatation préalable des échantillons par un traitement à l'acide chlorhydrique (HCl, 2N) pendant 12 h. Ces mesures ont été réalisées au Laboratoire de Géochimie - CNRS UMR 5805 - Bordeaux par l'équipe du Dr Henri Etcheber.

### **5.6 Porosité**

La porosité du sédiment est déterminée comme la différence entre le poids humide et le poids sec du sédiment par unité de volume.

### **Références bibliographiques**

- Aminot A, Chaussepied M (1983) Manuel des analyses chimiques en milieu marin. CNEXO (Ed), Brest, 395 p
- Bourguès S (1996) Ecologie des bactéries sulfato-réductrices en milieu lagunaire : minéralisation de la matière organique et fixation de l'azote atmosphérique. Thèse de doctorat de l'Université Bordeaux 1, 165 p
- Castel J, Caumette P, Herbert R (1996) Eutrophication gradients in coastal lagoons as exemplified by the Bassin d'Arcachon and the Etang du Prévost. *Hydrobiol* 329 : ix-xxviii
- Clarke KR, Owens NJP (1983) A simple and versatile micro-computer program for the determination of « Most Probable Number ». *J Microbiol Meth* 1 :133-137
- Cochran WG (1950) Estimation of bacterial densities by means of the « Most Probable Number ». *Biometrics* 6 :105-116

- De Wit R, Relexans J-C, Bouvier T, Moriarty D (1997) Microbial respiration and diffusive oxygen uptake of deep-sea sediments in the Southern ocean (ANTARES-I cruise). *Deep-Sea Res II* 44 :1053-1068
- Henriksen K (1980) Measurement of *in situ* rates of nitrification in sediment. *Microb Ecol* 6 :329-337
- Herbert RA (1990) Methods for enumerating microorganisms and determining biomass in natural environments. In : Grigorova R, Norris JR (Ed) *Methods in microbiology*. Vol. 22. Academic Press, London, p 1-39
- IFREMER (1997) Etude intégrée du Bassin d'Arcachon. Rapport Interne/DEL/97.09/Arcachon, 5 tomes
- Koops HP, Möller UC (1992) The lithotrophic ammonia-oxidizing bacteria. In : Balows et al. (Ed) *The prokaryotes. A handbook on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification, applications*. 2nd Edition, vol. III. Springer Verlag, New York, p 2625-2637
- Mac Crady MH (1915) The numerical interpretation of fermentation-tube results. *J Infec Dis* 17 :183-212
- Mac Crady MH (1918) Tables for the rapid interpretation of fermentative tube results. *Can J Public Health* 9 :202-216
- MacFarlane GT, Herbert RA (1984) Comparative study of enrichment methods for the isolation of autotrophic nitrifying bacteria from soil, estuarine and marine sediments. *FEMS Microbiol Letters* 22 :127-132
- Nielsen LP (1992) Denitrification in sediment determined from nitrogen isotope pairing. *FEMS Microbiol Ecol* 86 :357-362
- Nieuwenhuize J, Maas YEM, Middelburg JJ (1994) Rapid analysis of organic carbon and nitrogen in particulate materials. *Mar Chem* 45 :217-224



- Risgaard-Petersen N, Rysgaard S (1995) Nitrate reduction in sediments and waterlogged soil measured by  $^{15}\text{N}$  techniques. In : Alef K, Nannipieri P (Ed) Methods in applied soil microbiology and biochemistry. Academic Press, London, p 287-295
- Rowe R, Todd R, Waide J (1977) Microtechnique for most probable number analysis. Appl Environ Microbiol 33 :675-680
- Stehr G, Böttcher B, Dittberner P, Rath G, Koops HP (1995) The ammonia-oxidizing nitrifying population of the river Elbe estuary. FEMS Microbiol Ecol 17 :177-186
- Strickland JDH, Parsons TR (1972) A practical handbook of sea water analysis. Bull Fish Res Bd Can 167, 311 p
- Wood ED, Armstrong FAJ, Richards FA (1967) Determination of nitrate in sea water by cadmium copper reduction to nitrite. J Mar Biol Ass UK 47 :23-31
- Woodward RL (1957) How probable is the most probable number ? J AWWA 49 :1060-1068



## *Chapitre 3*

*Benthic nitrification in the Bassin  
d'Arcachon (France) : bacterial  
populations and nitrification rates*



## *Avant-propos*

*Après les proliférations massives de macro-algues vertes que connut le Bassin d'Arcachon au début des années 90, une étude menée sous la responsabilité de l'IFREMER a montré que les modifications du milieu liées à l'augmentation des apports azotés d'origine agricole pouvaient expliquer le déclenchement du phénomène.*

*Cependant, les processus internes du bassin, en particulier les métabolismes bactériens impliqués dans le cycle de l'azote à l'interface eau-sédiment étaient peu étudiés. Parmi ceux-ci, la dénitrification est le processus bactérien qui en anaérobiose permet la transformation des nitrates  $\text{NO}_3^-$  en oxide nitreux  $\text{N}_2\text{O}$  et/ou azote moléculaire  $\text{N}_2$ . Ces produits gazeux peuvent diffuser dans l'atmosphère, et constituer ainsi une perte d'azote pour le système. Les nitrates alimentant la dénitrification proviennent soit de la diffusion à partir de la colonne d'eau, soit sont produits par les bactéries nitrifiantes dans la zone oxygène du sédiment.*

*Dans une première étape, nous avons donc souhaité évaluer l'importance de la nitrification benthique dans le bassin d'Arcachon en quantifiant la population des bactéries nitrifiantes et en estimant leur activité durant un cycle annuel.*



## *Chapitre 3 :*

# « Benthic nitrification in the Bassin d'Arcachon (France) : bacterial populations and nitrification rates »

Stéphane A. RIOU, David T. WELSH, Rutger DE WIT

*This chapter is submitted to Journal of Sea Research.*

### **Abstract**

Production of nitrate within the sediments by nitrifying bacteria can lead to the net loss of nitrogen from the ecosystem when this process is coupled to denitrification. In order to determine the role of benthic nitrification in the *Bassin d'Arcachon*, we have studied 3 stations located in *Zostera noltii* meadows (Stations A and B) and subtidal sediments in tidal channel (Station *Courbey*), respectively, for at least a full year. Nitrification rates were determined as accumulation of excess ammonium following addition of the specific inhibitor N-serve and nitrifying bacteria were enumerated using a microtitre MPN technique. Benthic bacterial nitrifying activities ranged from 0 to 90  $\mu\text{mol-NH}_4^+ \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ , which are low compared to other coastal systems and are in agreement with similarly low densities of nitrifiers (MPN counts). Activities and population densities of nitrifiers were maximal during the winter period (November to April) and particularly low from May to October, which is the growing season of the plants. This pattern correlates with the seasonal pattern of nitrate and ammonium concentrations in the water column. Nitrification

rates represent approximately 10 % of the ammonium loading to the bay. In conclusion, benthic nitrification appears to be of minor importance in the lagoon and its possible interactions with the N-metabolism of the plants is discussed.

**Key-words :** Ammonia-oxidizers, MPN, N-serve, Nitrite-oxidizers, Sediment

## 1. Introduction

Problems of eutrophication in coastal environments are often related to increased nitrogen inputs into the coastal zone (Nixon, 1995). It has been recognized that in the coastal zone, nitrogen, rather than phosphorus, is most often the limiting factor for primary production (Cadée et al., 1994 ; Valiela, 1995). Since the eighties in Western Europe environmental management has focused particularly on decreasing phosphorus inputs into aquatic ecosystems. Reductions of nitrogen loadings are more difficult to achieve, because they depend on non-point sources. Therefore, nitrogen is nowadays a major concern for coastal environments. This is exemplified by the *Bassin d'Arcachon*, a macrotidal lagoon on the Atlantic coast of SW France. For the last 20 years, nitrogen loading to the *Bassin d'Arcachon* has increased due to the development of intensive maize agriculture in the catchment area and, concurrently, phosphorus loading has decreased after the implementation of an urban wastewater collection and treatment system in the seventies (Castel et al., 1996). A detailed study of inorganic nitrogen inputs into the *Bassin d'Arcachon* has been performed for the year 1996. This study showed that tributaries contributed 90 %, atmospheric deposition 9 % and ground water flow 1 % of the yearly DIN inputs in the lagoon (Rimmelin et al., 1998). Furthermore, the total dissolved nitrogen and phosphorus throughputs in the tributaries have been monitored for more than ten years by the local water



management body (*Agence de l'Eau Adour-Garonne, unpublished*). This information shows that N/P input ratios have strongly exceeded the Redfield ratio and that nitrogen loading per unit area is still moderate by comparison with several other coastal environments (Table 1). The lagoon is the home of the largest meadows of the small intertidal seagrass species *Zostera noltii* Hornem. in Western Europe (Auby and Labourg, 1996). Recent decades have shown a catastrophic losses of seagrass vegetation which have been related to increased eutrophication (Taylor et al., 1995). Hence, nitrogen loading to the *Bassin d'Arcachon* is still a matter of concern. In this lagoon, blooms of nitrophilous macroalgae including *Enteromorpha sp.* and *Monostroma obscurum* occur occasionally in the inner lagoon, which interfere negatively with the *Z. noltii* meadows and also with human resource use such as oyster farming or tourism (Auby et al., 1994).

**Table 1**

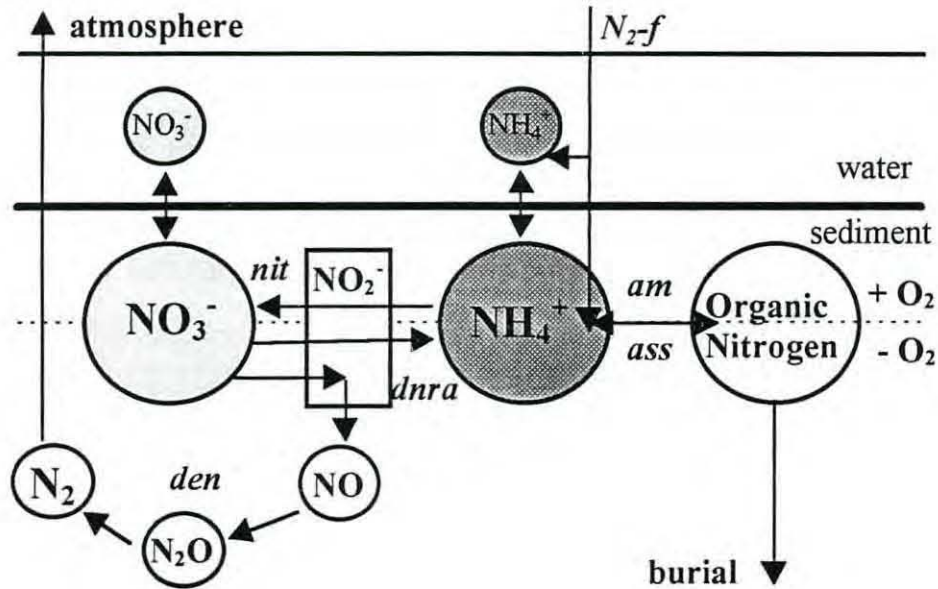
External N loads in several estuaries calculated per unit area

	N inputs (g-N m <sup>-2</sup> yr <sup>-1</sup> )	References
Teacapan Agua Brava Bay (MX)	3.4	Smith et al., 1997
Grevelingen Lagoon (NL)	4.0	Nienhuis, 1992
Waquoit Bay (USA)	4.6	Valiela et al., 1997
Altata Ensenada del Pabellón Bay (MX)	5.1	Smith et al., 1997
Arcachon Bay (F)	6.4	Auby et al., 1994 ; Rimmelin et al., 1998
Four League Bay (USA)	9.8	Smith et al., 1985*
Terminos Lagoon (MX)	10.7	Smith et al., 1997
Narragansett Bay (USA)	14.7	Seitzinger, 1988*
Ochlokonee Bay (USA)	22.1	Seitzinger, 1988*
Delaware Bay (USA)	27.0	Seitzinger, 1988*
Veerse Meer Lagoon (NL)	34.0	Nienhuis, 1992
Sacca di Goro (I)	40.5	P. Viaroli, pers. com.
Tejo Estuary (P)	61.3	Seitzinger, 1988*
Norsminde Fjord (DK)	120.2	Jørgensen and Sørensen, 1988*

\* in Seitzinger, 1990



**Fig. 1.** Benthic bacterial N-cycle in coastal marine sediments. Abbreviations: *am* = ammonification, *ass* = assimilation, *nit* = nitrification, *dnra* = dissimilatory nitrate reduction to ammonium, *den* = denitrification,  $N_2$ -*f* = atmospheric-nitrogen fixation.



Internal processes in the lagoon, particularly bacterial denitrification, may provide mechanisms that, to a certain extent, counterbalance increased nitrogen loading (Fig. 1). Denitrification is an anaerobic process which results in the reduction of nitrate to dinitrogen gases as  $N_2O$ , and  $N_2$ . It is therefore restricted to the sediment in the *Bassin d'Arcachon*. The nitrate for this process is obtained from the water column or produced by nitrifying bacteria both in the water column and in the aerobic layers of the sediment. Nitrification is the biological conversion of ammonium to nitrite and nitrate. Autotrophic bacterial nitrification is a strictly aerobic process realized in two steps, firstly ammonium is oxidized to nitrite by the lithotrophic ammonia oxidizers, this nitrite is subsequently oxidized to nitrate by the lithotrophic nitrite oxidizers, mainly by chemolithoautotrophic bacteria (See reviews of Focht and Verstraete, 1977; Prosser, 1986; Blackburn and Sørensen, 1988). In the *Bassin d'Arcachon*, water column nitrate and ammonium concentrations are generally low, particularly in summer. Unlike ammonium, nitrate does not bind

to cation exchange sites on sediment particles and thus readily diffuses in the sediment. So, a strong coupling between nitrification and denitrification may potentially occur in the sediment (Jenkins and Kemp, 1984 ; Nielsen, 1992). Thus, benthic nitrification may present a key factor determining denitrification rates in the *Bassin d'Arcachon*.

The aim of this study was to estimate the significance of benthic bacterial nitrification processes in the *Bassin d'Arcachon* by following the spatial and temporal variations of the nitrifier populations and quantifying nitrifying activities. This is studied with respect to the marine vegetation type and other environmental factors and the importance of nitrification to the N-budget of the bay is also estimated.

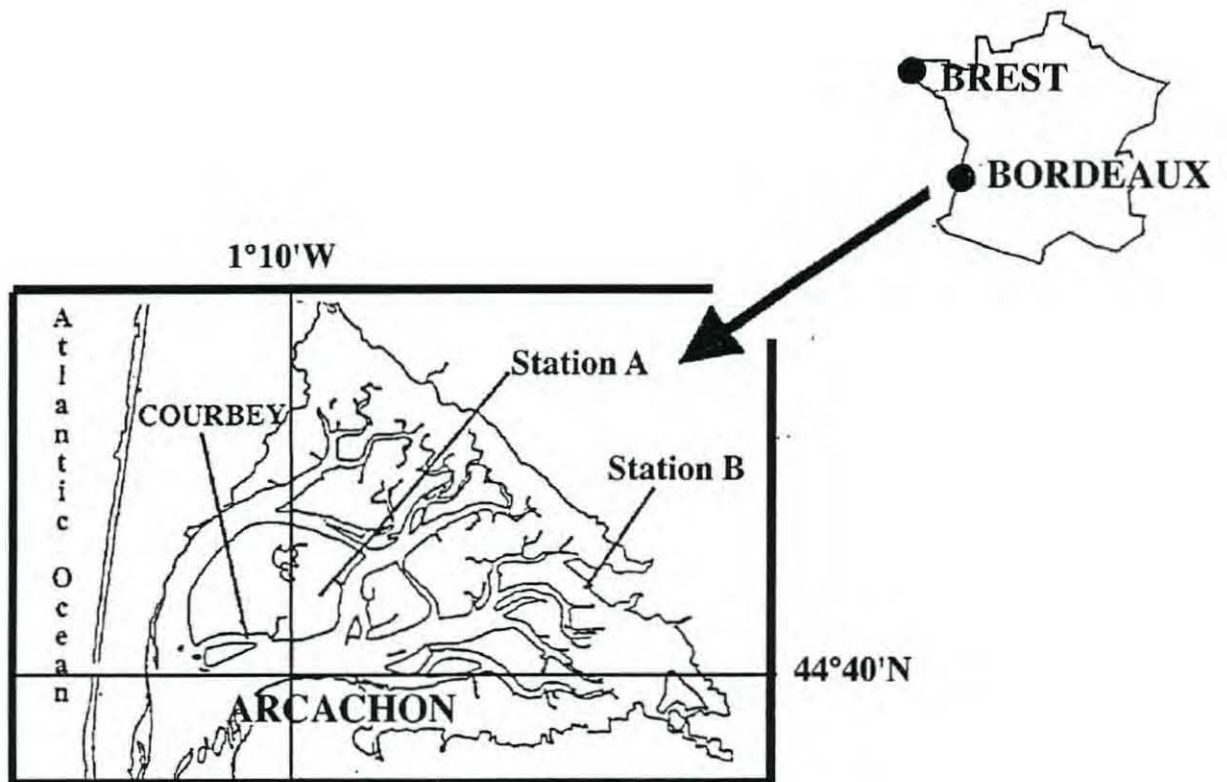
## 2. Material and methods

### 2.1. Study area

The sampling sites were located in the *Bassin d'Arcachon* (44°40'N, 1°10'W) on the southwestern Atlantic coast of France. Arcachon bay is a macrotidal lagoon with a surface area of 155 km<sup>2</sup> of which only about 40 km<sup>2</sup> are subtidal. The intertidal areas are covered by *Z. noltii* Hornem. (70 km<sup>2</sup>, the largest beds in Europe) whilst *Zostera marina* L. (4.26 km<sup>2</sup>) is found in the channels (Castel et al., 1996). The sediments are composed of fine clayish muds to muddy sands, the salinity varies from 30 to 33 ‰, whilst the water temperature ranges from 6-8 °C in mid-winter to 21-22 °C in August (Bouchet, 1968 ; Robert et al., 1987). Station A and B were located in intertidal *Z. noltii* meadows at MW height approximately. Station A was located on the eastern side of the *Île aux Oiseaux* submerged by the external neritic waters of the bay, and Station B - *Cap de Prat* in the inner neritic portion of the bay (Fig. 2). The station *Courbey* is located just below LWST in a channel of the bay colonized by *Z. marina*. The general characteristics of the 3 sampling stations are summarized in Table 2. After sampling, the cores were preincubated for at

least one night in a mesocosm system (600 l tanks with a continuous flow of bay's water at a dilution rate of approximately  $0.15 \text{ hr}^{-1}$ ).

**Fig. 2.** Location of the study area in the French Atlantic coast and the sampling stations in the *Bassin d'Arcachon*.



## 2.2. Monitoring data on water column ammonium and nitrate concentrations.

Water column ammonium and nitrate concentrations have been monitored by IFREMER-Arcachon on a weekly basis. The samples were analyzed according standard methodology, *i.e.* the Greiss reaction for nitrates and the Koroleff principle for ammonium (Aminot and Chaussepied, 1983).



**Table 2**

General characteristics of the sampling sites. Temperatures and salinities from Bouchet (1968) and Auby et al. (1994)

Parameters	<i>Courbey</i>	<i>Île aux Oiseaux</i> (station A)	<i>Cap de Prat</i> (station B)
Salinity (‰)	25 - 35	25 - 35	9 - 34
Temperature (°C)	7 - 21	7 - 21	5 - 24
Total Carbon (0-5 cm) (%)	1.0 - 2.6	2.0 - 5.0	2.0 - 4.0
Organic Carbon (0-5 cm) (%)	0.3 - 2.0	2.0 - 4.0	2.0 - 3.0
Chlorophyll <i>a</i> (0-2 cm) ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	<i>n.d.</i>	15 - 20	30 - 40
Oxygen (maximal depth penetration) (mm)	1	3	4
Water content (0-5 cm) (%)	25 - 51	30 - 40	26 - 38
Porosity ( $\text{g cm}^{-3}$ )	1.22	1.97	1.42

*n.d.* = not determined

### 2.3. Enumeration of nitrifying bacteria

At stations A and B, quintuplicate Plexiglas cores (4 cm *i.d.*) were hand collected. The top two centimeters were homogenized and a portion was sampled for MPN analysis. A depth distribution profile was studied in detail at the station *Courbey*. Therefore, 3 cores were sampled and sectioned in one centimeter-thick depth slices from the surface to 5 cm depth. Ammonia- and nitrite-oxidizing bacteria were enumerated using a microtitre MPN (*Most Probable Number*) technique according to Rowe et al. (1977) and Herbert (1990). The first series of wells of an 8 x 12 microtitre plate were inoculated with a 10 % sediment slurry and a serial twofold dilution performed along the length of the plate. The plates were incubated for 4-5 weeks at 24 °C covered with an aluminum foil to exclude light and reduce evaporative losses. Positive growth results were detected by using the Griess Llosvay's reagent to determine nitrite production for ammonia-oxidizers and nitrite disappearance for nitrite-oxidizers. The synthetic growth medium used was based on those of MacFarlane and Herbert (1984) and Koops and Möller (1992) and consisted of the following components : NaCl, 25 g ;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 235 mg (for ammonia-oxidizers) or  $\text{NaNO}_2$ , 247 mg (for nitrite-oxidizers) ;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 200 mg ;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 40 mg ;

MgSO<sub>4</sub> • 7H<sub>2</sub>O, 40 mg ; Stock solution of Fe/EDTA (according to MacFarlane and Herbert, 1984), 2 ml ; Stock solution of trace elements (described by Stehr et al., 1995), 1 ml ; distilled water, 1000 ml. MPN values and 95 % confidence limits were determined using the computer program devised by Clarke and Owens (1983).

#### 2.4. Nitrifying activities

Nitrification rates were measured in the dark at 20 °C in twelve undisturbed sediment cores (4.4 cm *i.d.*) by use of 2-chloro,6-(trichloromethyl) pyridine (or N-serve), a specific inhibitor of the first step of the nitrification process, following the method described by Henriksen (1980). Nitrification rates ( $\mu\text{mol-NH}_4^+ \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ ) were calculated from the difference between the mean ammonium contents (water column + 2 first centimeters of the sediment) for 6 N-serve-treated and 6 control cores.

#### 2.5. Analytical procedures

To determine the maximum penetration depth of dissolved oxygen in the sediments, oxygen profiles were performed using a polarographic oxygen minisensor (De Wit et al., 1997). A two-point calibration was performed: *i.e.*, in the overlying water and in the anoxic part of the sediment; the actual oxygen concentration in the water column was assayed with the Winkler method (Strickland and Parsons, 1972). Nitrite and nitrate (following reduction to nitrite over Cadmium columns) concentrations were determined by the principle of the Griess reaction (Strickland and Parsons, 1972) and ammonium by the indophenol blue method (Koroleff 1969 *in* Aminot and Chaussepied 1983). The exchangeable NH<sub>4</sub><sup>+</sup> pool of the sediment was extracted by shaking for 1 hour with a volume of 1 M KCl. The sediment slurries were centrifuged at 4,000 x g for 10 min at 10 °C. The supernatant was decanted and frozen for later ammonium analysis. Chl. *a* contents in the first 2 centimeters of the sediment were determined after acetone extraction by



the method of Lorenzen (Aminot and Chaussepied, 1983). Total carbon and organic carbon (after addition of HCl to remove inorganic carbon) contents were measured with a CS-125 LECO Corp. (USA) analyzer according to Nieuwenhuize et al. (1994). Porosity was determined as the difference between the wet weight and the dry weight of the sediment per volume unit.

## 2.6. Statistical analysis

To compare MPN counts between months a one-way ANOVA (fixed factor = months) was performed. Statistics were applied on log-transformed data, and *a priori* normality was assumed and homogeneity of variances verified by the Cochran test. The ANOVA was conducted with total MPN counts as the variable and was repeated for each month. At the station *Courbey* the effect of sediment depth on bacterial abundances was tested by two-way ANOVA (fixed factors = months and depth). Three cores were analyzed for bacterial enumeration. At all depth horizons MPN counts were assessed in the same core. This procedure introduced a dependence effect (Underwood, 1981) and did not permit a classical two-way crossed ANOVA. Therefore, an ANOVA with repeated measures was applied using the SYSTAT 5.2.1 software package to analyze these data, with the time period as the fixed factor and the depths as repeated measures (5 levels). Data were log-transformed, subsequently normality was assumed and homoscedasticity checked by the Cochran test.

## 3. Results

### 3.1. Monitoring of water column nitrate and ammonium concentrations.

Water column nitrate and ammonium concentrations for the three year period from beginning 1995 to end 1997 are shown in Fig. 3. Nitrate concentrations show a very striking annual pattern. From May to October, the concentrations of nitrate are below the detection limit,



while the highest values were found from November until April. Ammonium followed a similar pattern although the fluctuations were less pronounced. This pattern is influenced by both the hydrological regime which is characterized by higher inputs of nitrate and ammonium rich fresh water in winter time, as well as by the growing season of the plants due to their requirements for inorganic N.

### 3.2. Bacterial enumerations

The station *Courbey* showed a significant stratification of ammonium-oxidizer populations decreasing with depth excepted for June and July 1996 (Fig. 4). Ammonium-oxidizer counts varied significantly with time ( $p < 0.05$ ) showing higher densities in winter than in summer, which were  $> 10^2$  and  $10^1$  bacteria per ml, respectively (Fig. 4). Likewise, autotrophic nitrifying bacteria varied significantly with time ( $p < 0.05$ ) and were higher in winter than in summer at stations A and B (Fig. 5 and 6). This trend was particularly marked for nitrite oxidizers at station A (Fig. 5). However, at the station B temporal variations were less pronounced and the densities were always below  $10^3$  bacteria per ml. In the *Z. noltii* beds, the population densities were higher in station B compared to station A, with populations consistently below  $10^3$  and  $10^2$  bacteria per ml, respectively.

Fig. 3. Water column ammonium and nitrate concentrations of the stations *Courbey*, A and B in the *Bassin d'Arcachon* (Data from IFREMER-Arcachon).

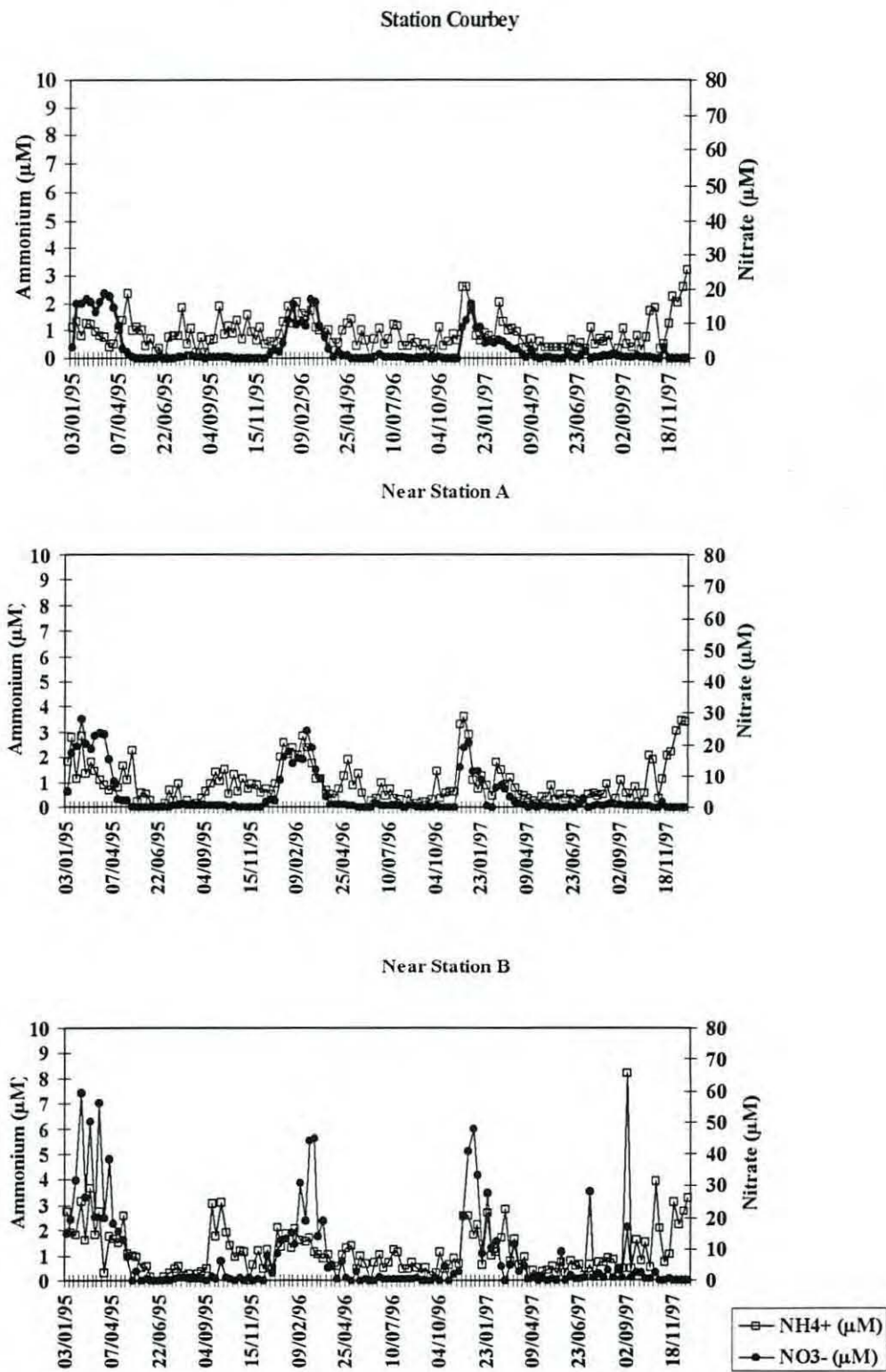


Fig. 4. Depth profiles of the ammonia-oxidizer MPN counts in the sediment of the station Courbey - Arcachon. The significance of depth stratification is indicated for each month : \* =  $p < 0.05$ , \*\* =  $p < 0.01$ , \*\*\* =  $p < 0.001$ , ns = not significant.

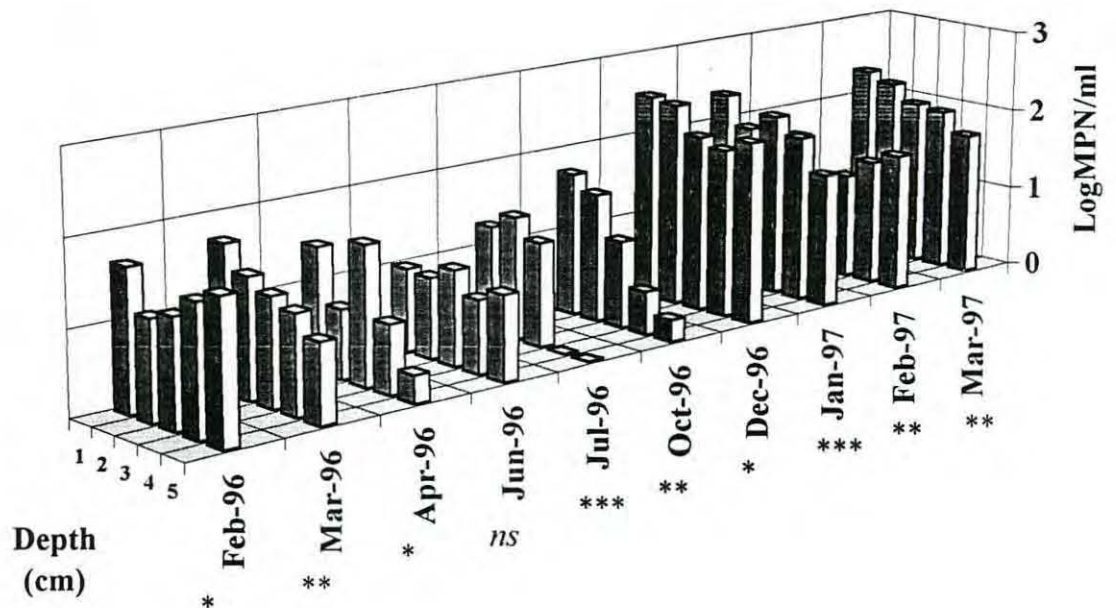




Fig. 5. Nitrifier MPN-counts (0-2 cm) for station A - *Ile aux Oiseaux* - Arcachon. Error bars correspond to one standard deviation.

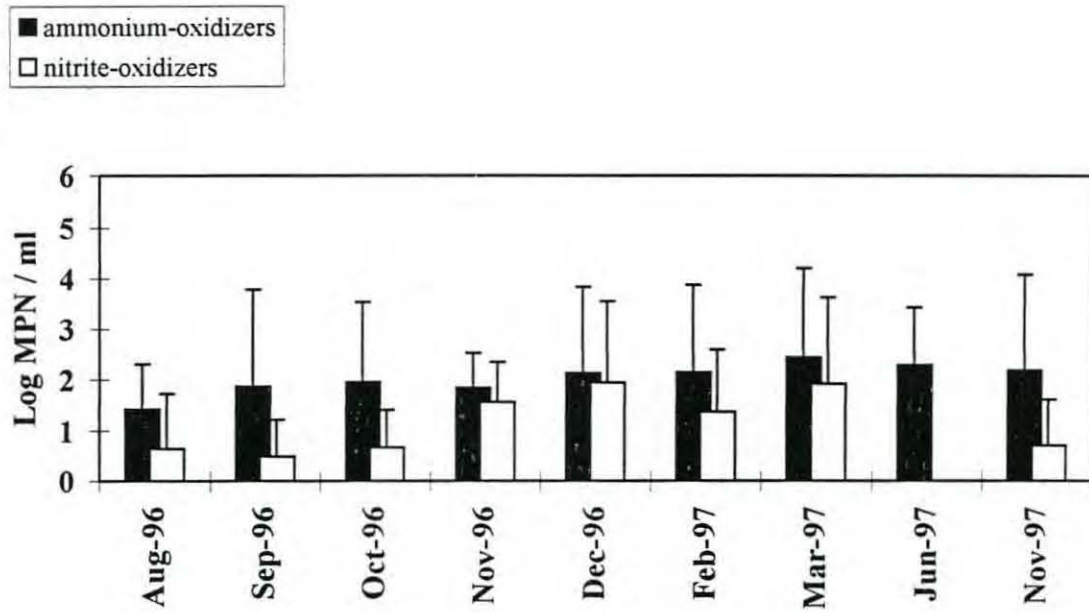
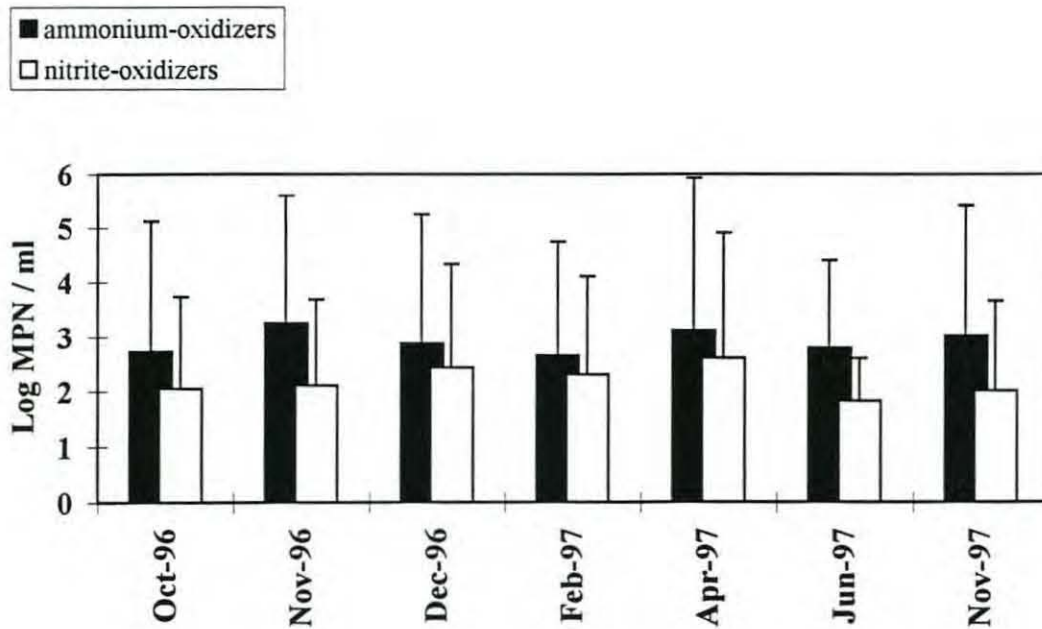


Fig. 6. Nitrifier MPN-counts (0-2 cm) for station B - *Cap de Prat* - Arcachon. Error bars correspond to one standard deviation.



### 3.3. Nitrifying activities

Nitrifying activities were measured from June 1996 to November 1997. Benthic bacterial nitrifying activities ranged from approximately 0 to 90  $\mu\text{mol-NH}_4^+ \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$  with a maximum rate recorded in February 1997 at the station *Courbey* (Table 3). The stations A and B showed a maximum activity during the late winter and the early spring with values of 48 and 34  $\mu\text{mol-NH}_4^+ \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$  in April 1997, respectively. The values during the period May-October 1997 were close to or below the detection limit of 1  $\mu\text{mol NH}_4^+ \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ .

**Table 3**

Nitrification rates (in  $\mu\text{mol-NH}_4^+ \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ ) measured by the N-serve -  $\text{NH}_4^+$ -accumulation method in the *Bassin d'Arcachon*

	<i>Courbey</i>	<i>Île aux Oiseaux</i> (Station A)	<i>Cap de Prat</i> (Station B)
June - November 1996			
4/6/96	2	-	-
16/10/96	-	≤ 1	-
27/11/96	-	≤ 1	-
December 1996 - April 1997			
12/12/96	75	-	-
02/97	88	≤ 1	15
4-8/04/97	-	48	34
May 1997 - November 1997			
27/05/97	-	≤ 1	-
26/06/97	-	-	≤ 1
6-18/11/97	-	3	≤ 1

## 4. Discussion

The MPN values determined in this study show very low nitrifier population densities compared to other coastal ecosystems studied using the same methods (Table 4). This indicates unfavorable environmental conditions for nitrifiers in the *Bassin d'Arcachon*. First, the oxic zone is very thin in the sediments of the *Bassin d'Arcachon* as revealed by the minisensors oxygen

profiles (Table 2). This is essentially due to high mineralization and sulfate-reduction rates (Bourguès, 1996 ; Isaksen and Finster, 1996). The ammonium in the water column is only a minor source for benthic nitrification due to the very low concentrations (Fig. 3). Besides, the thin oxic zone restricted to the first 0-4 millimeters of the sediment may explain these very low nitrification rates because of the competition with heterotrophs, photoautotrophs and microphytobenthos for oxygen and ammonium (Hansen et al., 1981 ; Henriksen and Kemp, 1988 ; Verhagen and Laanbroek, 1991 ; Herbert and Welsh, 1993 ; Rysgaard et al., 1996).

**Table 4**

MPN counts of benthic nitrifying bacteria in different estuaries and lagoons

Location	Depth zone	Ammonium-oxidizers (10 <sup>3</sup> bacteria/ml)	Nitrite-oxidizers (10 <sup>3</sup> bacteria/ml)	References
Delware inlet (NZ)	Surface	0.15 - 3	<i>n.d.</i>	Belser & Mays, 1982
KingGoodie Bay (Scotland)	0-1 cm	6 - 94	7 - 90	MacFarlane & Herbert, 1984
Chesapeake Bay (USA)	0-6 cm	<i>Spring</i> : 100 - 1.5 10 <sup>3</sup> <i>Summer</i> : 0 - 10	<i>Spring</i> : 25 - 60	Jenkins & Kemp, 1984
Kysing Fjord (DK)	0-1 cm	11 10 <sup>3</sup>	3.3 10 <sup>3</sup>	Hansen, 1980*
<i>Bassin d'Arcachon</i> (F)	0-2 cm	0.01 - 1.8	0 - 0.47	<i>This study</i>

*n.d.* = not determined, \* = *in* Henriksen & Kemp, 1988

The decrease of the nitrifying populations and their activities during summertime indicates a strong interaction with the aquatic vegetation. The May-October period corresponds to the growing season of *Z. noltii* and *Z. marina* (Auby and Labourg 1996). The effects of rooted plants on nitrification processes are diverse and contradictory. Thus, oxygen released by the macrophytes roots can also produce oxic microniches (Caffrey and Kemp, 1990 ; Pedersen et al., 1998), and Herbert and Welsh (1993) have previously found higher densities of nitrifiers associated with the *Z. noltii* roots. But, the presence of rooted macrophytes does not



systematically enhance the nitrification rates via oxygen release, since the roots also compete bacteria for ammonium (Bodelier et al., 1998). In the rhizosphere, the nitrifiers also have to compete with heterotrophic bacteria for oxygen released from roots. The root exudates mainly comprise sugars, which create a high demand for inorganic nitrogen by the heterotrophic bacteria which compete with the nitrifiers for ammonium (Finster et al., in prep.). Apparently, the latter three phenomena predominate in the *Bassin d'Arcachon*. First, the moderate N-loading (see Table 1) and the low water column concentrations of  $\text{NO}_3^-$  and  $\text{NH}_4^+$  (see Fig. 3) indicate that most mineral N is taken up by the plants. Secondly, the high oxygen demand of the sediment indicates a strong competition between heterotrophic bacteria and nitrifiers.

The depth profiles of the nitrifier population at the station *Courbey* indicate the presence of nitrifying bacteria both in oxic and anoxic sediment layers. Bioturbation by macrofauna and sediment mixing due to currents and sediment resuspension by wave action, which is particularly strong in winter, may explain the presence of these strictly aerobic bacteria in the deeper sediment layers where they can also survive a certain period of time. Previous studies have demonstrated that nitrifying bacteria can survive under anoxic conditions (Hansen et al., 1981; Henriksen et al., 1981; Koops and Möller, 1992; Jensen et al., 1993; Bodelier et al., 1996). The burial of these strictly aerobic bacteria in anoxic layers by bioturbation and sediment mixing represents an export from the growth zone which is a serious constraint for these bacteria which are characterized by very low growth rates. Otherwise, the resuspension and surface deposition of nitrifying bacteria may expose them at low tide to high light and high temperatures, especially during summer, which are known to be inhibiting (Ward, 1986 ; Bock et al., 1991 ; Koops and Möller, 1992; Guerrero and Jones, 1996). Therefore, it seems that bioturbation and sediment mixing are unfavorable for nitrifiers.

Even though we took care to optimize our MPN procedure, in general, MPN methods are considered to provide an underestimation of the microbial population (Belser and Mays, 1982)

due to problems of optimal ammonium concentration in the culture medium, the extended incubation time (evaporation, variations of pH...), incomplete desorption of the cells from sediment particles (Schmidt and Belser, 1994). Furthermore, the  $\text{NH}_4^+$ -accumulating/N-serve technique shows several limits: the real efficiency of the inhibitor in muddy sediments, the dark incubation procedure which can affect the *in situ* activity (Henriksen, 1980). Even in the dark, an  $\text{NH}_4^+$  assimilation process by *Z. noltii* and microphytobenthos may subsist. Data must therefore be interpreted with care. Despite these caveats, a comparison of our observations with observations made with the same methods clearly indicate that both population densities and activities of nitrifiers are low compared to other lagoon and marine systems (cf. Tables 4 and 5, for population densities and activities, respectively).

**Table 5**

Nitrification rates measured with the N-serve technique in different sediment types recalculated on an annual basis

Location	Estimated annual rates ( $\text{mmol m}^{-2} \text{yr}^{-1}$ )	References
North Sea sediments	700 - 750	Lohse et al., 1993
Kysing Fjord (DK)	600 - 700	Hansen et al., 1981
Arhus Bay (DK)	300 - 400	Hansen et al., 1981
Chesapeake Bay (USA)	350 - 400	Kemp et al., 1990
<i>Bassin d'Arcachon</i> (F)	140 - 150	<i>This study</i>
Saltmarsh, Newport River Estuary (USA)	25 - 80	Thompson et al., 1995

In order to estimate the part of the nitrification in the N-budget of the bay, we have distinguished 3 different temporal periods based on the hydrological regime of the basin: 1 winter period (December-96/April-97) corresponding to high freshwater inflows with high nutrients water concentrations and 2 summer periods (Jun/Nov-96 and May/Nov-97) with low freshwater inflows containing few nutrients (Fig. 3). From June to November 1996, December 1996 to April 1997 and May to November 1997 the averages of the nitrifying activity were 1.3, 44.7 and 14.7



$\mu\text{mol m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ , respectively. Considering the total surface area of the intertidal flats ( $116 \text{ km}^2$ ) we estimated an annual nitrification rate of  $145\text{-}150 \text{ mmol m}^{-2} \text{ yr}^{-1}$  (Table 5). Nitrification converts 23 tons per year of N-ammonium in N-nitrate which can be potentially denitrified and lost from the system. It represents 1.5 % of the total-, 2.5 % of the mineral- and 12 % of the ammonium-N-inputs of the bay. Thus, the relatively low rate of nitrification is linked to the moderate nitrogen loading into the bay (cf. Table 1) and nitrification rates can only support a moderate rate of coupled denitrification and consecutively contribute only to a minor loss of nitrogen for the system.

### Acknowledgments

Stéphane A. Riou is supported by a grant from IFREMER (*Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la MER*) and the *Région Aquitaine*. We wish to thank Xavier de Montaudouin for his help in statistics, and Rodney A. Herbert for stimulating discussions. Henri Etcheber is acknowledged for Carbon analysis and IFREMER-Arcachon for supplying the nutrients and hydrological monitoring data. This work is a contribution to the *Unité de Recherche Marine n°13* (cooperation of the CNRS-Université Bordeaux 1 and IFREMER) and to the European Union ELOISE Program (ELOISE No. ---) in the framework of the ROBUST project carried out under contract ENV4-CT96-0218.

### References

- Aminot, A., and Chaussepied, M., 1983. Manuel des analyses chimiques en milieu marin. CNEXO, Brest, 395 pp.



- Auby, I., and Labourg, P.-J., 1996. Seasonal dynamics of *Zostera noltii* Hornem. in the bay of Arcachon (France). *J. Sea Res.*, 35 : 269-277.
- Auby, I., Manaud, F., Maurer, D., Trut, G., 1994. Etude de la prolifération des algues vertes dans le Bassin d'Arcachon. Rapport IFREMER - CEMAGREF - SABARC, 163 pp.
- Belser, L.W., and Mays, E.L., 1982. Use of nitrifier activity measurements to estimate the efficiency of viable nitrifier counts in soils and sediments. *Appl. Environ. Microbiol.*, 43 : 945-948.
- Blackburn, T.H., and Sørensen, J., 1988. Nitrogen cycling in coastal marine environments. *J. Wiley and Sons, New York*, 443 pp.
- Bock, E., Koops, H.P., Harms, H., and Ahlers, B., 1991. The biochemistry of nitrifying organisms. In : J.M. Shivey and L.L. Barton (Editors), *Variations in autotrophic life*. Academic Press, London, pp. 171-200.
- Bodelier, P.L.E., Libochant, J.A., Blom, C.W.P.M., and Laanbroek, H.J., 1996. Dynamics of nitrification and denitrification in root-oxygenated sediments and adaptation of ammonia-oxidizing bacteria to low-oxygen or anoxic habitats. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62 : 4100-4107.
- Bodelier, P.L.E., Duyts, H., Blom, C.W.P.M., and Laanbroek, H.J., 1998. Interactions between nitrifying and denitrifying bacteria in gnotobiotic microcosms planted with the emergent macrophyte *Glyceria maxima*. *FEMS Microb. Ecol.*, 25 : 63-78.
- Bouchet, J.M., 1968. Etude océanographique des chenaux du Bassin d'Arcachon. *Doct. Thesis, Univ. Bordeaux*, 306 pp.
- Bourguès, S., 1996. Ecologie des bactéries sulfato-réductrices en milieu lagunaire : minéralisation de la matière organique et fixation de l'azote atmosphérique. *Doct. Thesis, Univ. Bordeaux 1*, 165 pp.

- Cadée, N., Dronkers, J., Heip, C., Martin, J.-M., and Nolan, C., 1994. European Land-Ocean Interaction Studies Science Plan. Ecosystems research report n° 11, European Commission, Luxembourg, 52 pp.
- Caffrey, J.M., and Kemp, W.M., 1990. Nitrogen cycling in sediments with estuarine population of *Potamogeton perfoliatus* and *Zostera marina*. Mar. Ecol. Prog. Ser., 66 : 147-160.
- Castel, J., Caumette, P., and Herbert, R., 1996. Eutrophication gradients in coastal lagoons as exemplified by the Bassin d'Arcachon and the Etang du Prévost. Hydrobiol., 329 : ix-xxviii.
- Clarke, K.R., and Owens, N.J.P., 1983. A simple and versatile micro-computer program for the determination of « Most Probable Number ». J. Microbiol. Meth., 1 : 133-137.
- De Wit, R., Relexans, J.-C., Bouvier, T., and Moriarty, D., 1997. Microbial respiration and diffusive oxygen uptake of deep-sea sediments in the Southern ocean (ANTARES-I cruise). Deep-Sea Res. II, 44 : 1053-1068.
- Focht, D.D., and Verstraete, W., 1977. Biochemical ecology of nitrification and denitrification. Adv. Microb. Ecol., 1 : 135-214.
- Guerrero, M.A., and Jones, R.D., 1996. Photoinhibition of marine nitrifying bacteria. I. Wavelength dependent response. Mar. Ecol. Prog. Ser., 141 : 183-192.
- Hansen, J.I., Henriksen, K., and Blackburn, T.H., 1981. Seasonal distribution of nitrifying bacteria and rates of nitrification in coastal marine sediments. Microb. Ecol., 7 : 297-304.
- Henriksen, K., 1980. Measurement of *in situ* rates of nitrification in sediment. Microb. Ecol., 6 : 329-337.
- Henriksen, K., and Kemp, W.M., 1988. Nitrification in estuarine and coastal marine sediments. In : T.H. Blackburn and J. Sørensen (Editors), Nitrogen cycling in coastal marine environments. J. Wiley and Sons, New York, pp. 207-249.



- Henriksen, K., Hansen, J.I., and Blackburn, T.H., 1981. Rates of nitrification, distribution of nitrifying bacteria, and nitrate fluxes in different types of sediment from Danish waters. *Mar. Biol.*, 61 : 299-304.
- Herbert, R.A., 1990. Methods for enumerating microorganisms and determining biomass in natural environments. In : R. Grigorova and J.R. Norris (Editors), *Methods in microbiology*. Vol. 22. Academic Press, London, pp. 1-39.
- Herbert, R.A., and Welsh, D.T., 1993. A comparative study of the seasonal changes in the populations of bacteria involved in the cycling of nitrogen in two coastal lagoons in Southern France. In : F. Rodriguez-Valera and P. Caumette (Editors), *Proceedings of the CEC workshop CLEAN: Coastal Lagoon Eutrophication and ANaerobic processes, progress report, Part II*, Alicante (Espana), 3-5 December 1993, pp. 199-229.
- Isaksen, M.F., and Finster, K., 1996. Sumphate reduction in the root zone of the seagrass *Zostera noltii* on the intertidal flats of a coastal lagoon (Arcachon, France). *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 137 : 187-194.
- Jenkins, M.C., and Kemp, W.M., 1984. The coupling of nitrification and denitrification in two estuarine sediments. *Limnol. Oceanogr.*, 29 : 609-619.
- Jensen, K., Revsbech, N.P., and Nielsen, L.P., 1993. Microscale distribution of nitrification activity in sediment determined with a shielded microsensor for nitrate. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59 : 3287-3296.
- Kemp, W.M., Sampou, P., Caffrey, J., Mayer, M., Henriksen, K., and Boynton, W.R., 1990. Ammonium recycling *versus* denitrification in Chesapeake Bay sediments. *Limnol. Oceanogr.*, 35 : 1545-1563.
- Koops, H.P., and Möller, U.C., 1992. The lithotrophic ammonia-oxidizing bacteria, In : A. Balows et al. (Editors), *The prokaryotes. A handbook on the biology of bacteria: ecophysiology,*

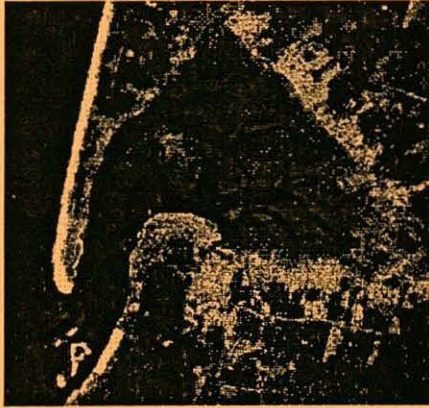


- isolation, identification, applications. 2nd Edition, vol. III, Springer Verlag, New York, pp. 2625-2637.
- Lohse, L., Malschaert, J.F.P., Slomp, C.P., Helder, W., and van Raaphorst, W., 1993. Nitrogen cycling in the North Sea sediments: interaction of denitrification and nitrification in offshore and coastal areas. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 101 : 283-296.
- MacFarlane, G.T., and Herbert, R.A., 1984. Comparative study of enrichment methods for the isolation of autotrophic nitrifying bacteria from soil, estuarine and marine sediments. *FEMS Microbiol. Letters*, 22 : 127-132.
- Nielsen, L.P., 1992. Denitrification in sediment determined from nitrogen isotope pairing. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 86 : 357-362.
- Nienhuis, P.H., 1992. Ecology of coastal lagoons in The Netherlands (Veerse Meer and Grevelingen). *Vie Milieu* 42 : 59-72.
- Nieuwenhuize, J., Maas, Y.E.M., and Middelburg, J.J., 1994. Rapid analysis of organic carbon and nitrogen in particulate materials. *Mar. Chem.*, 45 : 217-224.
- Nixon, S.W., 1995. Coastal marine eutrophication : a definition, social causes, and future concerns. *Ophelia*, 41 : 199-219.
- Pedersen, O., Borum, J., Duarte C.M., and Fortes, M.D., 1998. Oxygen dynamics in the rhizosphere of *Cymodocea rotundata*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 169 : 283-288.
- Prosser, J.I., 1986. Nitrification. IRL Press, Oxford.
- Rimmelin, P., Dumon, J.-C., Maneux, E., and Gonçalves, A., 1998. Study of annual and seasonal dissolved inorganic nitrogen inputs into the Arcachon lagoon, Atlantic coast (France). *Estuar. Coast. Shelf Sci.*, 47 (*in press*).
- Robert, R., Guillocheau, N., and Collos, Y., 1987. Hydrobiological parameters during an annual cycle in the Arcachon Basin. *Mar. Biol.*, 95 : 631-640.

- Rowe, R., Todd, R., and Waide, J., 1977. Microtechnique for most probable number analysis. *Appl. Environ. Microbiol.*, 33 : 675-680.
- Rysgaard, S., Risgaard-Petersen, N., and Sloth, N.P., 1996. Nitrification, denitrification, and nitrate ammonification in sediments of two coastal lagoons in Southern France. *Hydrobiol.*, 329 : 133-141.
- Schmidt, E.L., and Belser, L.W., 1994. Autotrophic nitrifying bacteria. In : *Methods of soil analysis, Part 2. Microbiological and biochemical properties*. Soil Science Society of America Book series, n°5, pp. 159-177.
- Seitzinger, S.P., 1990. Denitrification in aquatic sediments. In: N.P. Revsbech and J. Sørensen (Editors), *Denitrification in soil and sediment*. Plenum Press, New York, pp. 301-322.
- Smith, S.V., Ibarra-Obando, S., Boudreau, P.R., Camacho-Ibar, V.F., 1997. Comparison of carbon, nitrogen and phosphorus fluxes in Mexican coastal lagoons. LOICZ reports and studies n°10, LOICZ Texel, The Netherlands, 84 pp.
- Stehr, G., Böttcher, B., Dittberner, P., Rath, G., and Koops, H.P., 1995. The ammonia-oxidizing nitrifying population of the river Elbe estuary. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 17 : 177-186.
- Strickland, J.D.H., and Parsons, T.R., 1972. *A practical handbook of sea water analysis*. Bull. Fish. Res. Bd. Can., vol. 167, 311 pp.
- Taylor, D., Nixon, S., Granger, S., and Buckley, B., 1995. Nutrient limitation and the eutrophication of coastal lagoons. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 127 : 235-244.
- Thompson, S.P., Paerl, H.W., and Go, M.C., 1995. Seasonal patterns of nitrification and denitrification in a natural and restored salt marsh. *Estuaries*, 18 : 399-408.
- Underwood, A.J., 1981. Techniques of analysis of variance in experimental marine biology and ecology. *Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev.*, 19 : 513-605.
- Valiela, I., 1995. *Marine ecological processes*. 2<sup>nd</sup> Edition, Springer, New York, 686 pp.

- Valiela, I., Collins, G., Kremer, J., Lajtha, K., Geist, M., Seely, B., Brawley, J., and Sham, C.H., 1997. Nitrogen loading from coastal watersheds to receiving estuaries: new method and application. *Ecological Applications*, 7 : 358-380.
- Verhagen, F.J.M., and Laanbroek, H.J., 1991. Competition for ammonium between nitrifying and heterotrophic bacteria in dual energy-limited chemostats. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57 : 3255-3263.
- Ward, B.B., 1986. Nitrification in marine environments. In : J.I. Prosser (Editor). *Nitrification*, IRL Press, Oxford, pp. 157-184.





## *Chapitre 4*

*Annual rates of denitrification in a  
marine coastal lagoon (Arcachon  
bay, SW France) colonized by  
Zostera noltii*

## *Avant-propos*

*La dénitrification représente un puits de nutriments par la production de N<sub>2</sub> atmosphérique. Ce processus biologique peut réduire potentiellement l'impact de l'augmentation des apports de nutriments par les fertilisants azotés dans l'environnement.*

*Les nitrates produits par la nitrification benthique, ainsi que les nitrates diffusant de la colonne d'eau vers le sédiment, représentent les principales sources de nitrates pour la dénitrification benthique. Le suivi des densités de populations des bactéries nitrifiantes (MPN) et des activités nitrifiantes (N-serve) a montré que la nitrification était faible dans le Bassin d'Arcachon (Chapitre 3). D'autres études ont montré que les teneurs en nitrates dans la colonne d'eau suivent des fluctuations saisonnières, et qu'un gradient décroissant existe depuis l'embouchure de la Leyre vers l'océan. A long terme, les apports en nutriments azotés augmentent dans le Bassin d'Arcachon du fait de l'eutrophisation (Auby et al. 1994 ; Castel et al. 1996).*

*Aussi, nous avons mesuré l'activité dénitrifiante par l'utilisation de <sup>15</sup>NO<sub>3</sub><sup>-</sup> afin de déterminer le taux de dénitrification totale que nous avons scindé en une composante due à la dénitrification des nitrates diffusant de la colonne d'eau, et une composante due à la dénitrification liée à la nitrification. Afin de décrire le plus fidèlement possible notre écosystème, nous avons compartimentalisé le bassin en 6 stations caractéristiques, et réalisé les mesures en été et en hiver.*



## *Chapitre 4 :*

# « Annual rates of denitrification in a marine coastal lagoon (Arcachon bay, SW France) colonized by *Zostera noltii* »

Stéphane A. RIOU, David T. WELSH, Rutger DE WIT

*This chapter is in preparation for submission to Aquatic Microbial Ecology.*

## **INTRODUCTION**

In the last decades many studies have revealed an increase of the eutrophication in coastal marine ecosystems (Nixon 1995 ; Vitousek et al. 1997). The understanding of the functioning of the bacterial N-cycle in the sediments of the coastal zone is a major issue to evaluate the impact of increasing anthropogenic nitrogen inputs. Particularly, attention is paid to denitrification (*i.e.* nitrate reduction to atmospheric N<sub>2</sub> and N<sub>2</sub>O), which acts as a nutrient sink, and, consequently, may control the primary production in marine systems (Seitzinger



1988, 1990). Benthic bacterial N-processes, e.g. denitrification, nitrification, ammonification, assimilation, dissimilatory nitrate reduction to ammonium, are strongly linked to the supplies of the substrates and their distributions in the gradients of the sediments (Revsbech and Sørensen 1990). The N-biogeochemistry of these sediments is very sensitive to the presence of microphytobenthos and macrophytes (Christensen and Sørensen 1986, 1988 ; Henriksen and Kemp 1988 ; Caffrey and Kemp 1990).

For the last 20 years, nitrogen loading to the *Bassin d'Arcachon* has increased due to the development of intensive maize agriculture in the catchment area and, concurrently, phosphorus loading has decreased after the implementation of an urban wastewater collection and treatment system in the seventies (Castel et al. 1996). Nitrogen loadings to the *Bassin d'Arcachon* are still a matter of concern. In this lagoon, blooms of nitrophilous macroalgae including *Enteromorpha sp.* and *Monostroma obscurum* occur occasionally in the inner lagoon, which may interfere negatively with the *Z. noltii* meadows and also with human resource use such as oyster farming or tourism (Auby et al. 1994).

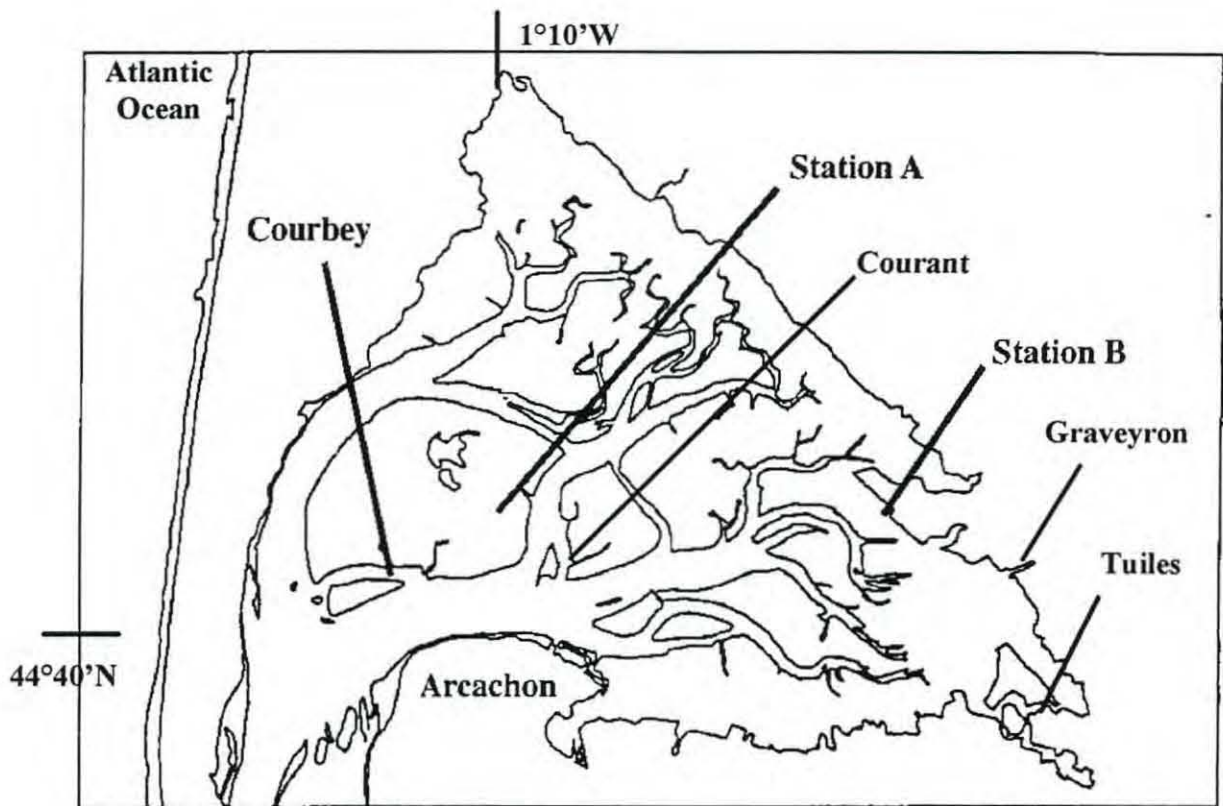
The aim of this study was to estimate the importance of denitrification in the *Bassin d'Arcachon*. We applied the «  $^{15}\text{N}$  isotope pairing » technique to intertidal sediment with and without *Z. noltii* and/or microphytobenthos, to subtidal sediments, to marine and riverine areas, during summer and winter periods. Oxygen, nitrates and ammonium fluxes across the sediment-water interface were also measured as well as pigment contents of the sediment. Denitrification rates are discussed in terms of their environmental implications.

## MATERIALS AND METHODS

### Study area and sampling.

Arcachon Bay is a macrotidal lagoon covering an area of 155 km<sup>2</sup> located on the southwestern Atlantic French coast (44°40'N, 1°10'W). Intertidal flats occupy 115 km<sup>2</sup> of which 70 km<sup>2</sup> are colonized by the small seagrass species *Zostera noltii* Hornem. (*i.e.* these are the largest seagrass meadows in Western Europe) whilst *Zostera marina* L. is found in the channels (4,3 km<sup>2</sup>). The water masses in the lagoon can be separated into : i) an external water mass which is efficiently renewed by tidal flushing and ii) inner water masses which are more strongly influenced by continental freshwater inflow and have a longer residence time (salinity of inner waters fluctuates from 0 to 35 ppt) (Bouchet 1968 ; Castel et al. 1996). We have compartmentalized the bay in 6 stations in order to describe completely the ecosystem. Two stations were located in the intertidal *Z. noltii* meadows (stations A & B), two others in diatom covered intertidal flats (stations *Tuiles* & *Graveyron*) and two stations were located in subtidal sediments in tidal channels and sampled by diving (stations *Courbey*, 6-8 m depth & *Courant*, 3-5 m depth), respectively (Fig. 1). During late summer of 1997 and the winter of 1998 we sampled water and randomly by hand 25 intact cores (20 in 10.4 cm and 5 in 5 cm inner diameter Plexiglas tubes) for each sampling site.

**Figure 1.** Location map of the study area in the southwestern Atlantic French coast with the 6 sampling sites.



#### **Incubation procedure.**

After sampling the sediment cores were brought back to the laboratory where they were left uncapped overnight in a dark reservoir containing *in situ* sampled water. The overlying water in the cores was stirred by a small Teflon-coated magnet receiving momentum from an external rotating magnet. The temperature was held at *in situ* conditions and O<sub>2</sub> concentration at air saturation by bubbling.

Ten of the 10.4 cm cores *i.d.* were used for the flux measurements. The marine plants and the sediment were considered together as a single compartment, *i.e.* vegetated sediments. The concentrations changes in the water column compartment were interpreted in terms of fluxes between the vegetated sediment compartment and the water column compartment, and



expressed per area unit. Cores were incubated under light and dark conditions. Net fluxes of  $O_2$  and  $NO_3^-$ ,  $NO_2^-$  and  $NH_4^+$  were measured by closing the cores with a lid and incubating for 1 to 1.5 h, ensuring that the change in  $O_2$  concentration never exceeded 20 % of the initial  $O_2$  concentration. Water samples were collected just before closing the cores and after incubation. Water samples were analyzed for  $O_2$  by Winkler titration within a few hours of sampling and GF/C filtered samples for  $NO_3^-$ ,  $NO_2^-$  and  $NH_4^+$  were immediately frozen for later analysis. Fluxes of  $O_2$  and  $NO_3^-$ ,  $NO_2^-$  and  $NH_4^+$  between vegetated sediments and water column were calculated for each sediment core from concentrations changes in the water column during incubation and expressed as the rate per square meter.

In parallel, ten 10.4 cm *i.d.* sediment cores were used to measure denitrification using the isotope pairing technique whereby the denitrification rate is calculated from the accumulation of single- and double-labeled  $N_2$  following addition of  $^{15}NO_3^-$  to the water column (Nielsen 1992).  $^{15}NO_3^-$  from a 10 mM stock solution (99%  $^{15}NO_3^-$ ) was added to the water column of each core to a final concentration of  $\sim 30 \mu M$   $^{15}NO_3^-$ . This concentration has previously been found to be optimal for measurements in these sediments (Bartoli et al., *in prep.*). Water samples for  $^{15}N-N_2$  analysis were transferred to 6 ml glass vials (Exetainers, Labco, High Wycombe, UK) and preserved with 0.2 ml of a 7 M  $ZnCl_2$  solution. The sediment and the water column of each core were carefully mixed with a glass rod after the addition of 5 ml of the  $ZnCl_2$  solution and a 6 ml sample of the resultant slurry was transferred to a glass vial (Exetainer) and preserved with 0.2 ml of the  $ZnCl_2$  solution.

#### **Analytical procedures.**

$NH_4^+$  was determined spectrophotometrically by the indophenol blue method, and  $NO_3^-$  and  $NO_2^-$  (following reduction to nitrite over Cadmium columns) concentrations by the principle of the Griess reaction (Strickland and Parsons 1972).

The  $^{15}\text{N}^{15}\text{N}$  and  $^{14}\text{N}^{15}\text{N}$  abundances in  $\text{N}_2$  were analyzed by mass spectrometry. The  $\text{N}_2$  gas dissolved in the water and slurry samples was extracted into an added 10 % (vol/vol) helium-head-space by vigorously shaking for 5 min. By use of a gas-tight glass syringe, gas from the helium headspace was injected into an isotope ratio mass spectrometer (Sira Series II, V.G. Isotech, Middelwich, UK) on line with a gas chromatograph (Risgaard-Petersen and Rysgaard 1995). The  $^{15}\text{N}$  abundance in  $\text{NO}_3^-$  (at.%  $\text{NO}_3^-$ ) was determined as the difference in  $\text{NO}_3^-$  concentrations before and after the  $^{15}\text{NO}_3^-$  addition.

To determine pigment contents in the sediments, we collected sediment cores and cut the leaves of *Z. noltii*. Chlorophyll *a* and phaeopigments contents in the upper 2 cm were determined on separate 5 cm *i.d.* sediment cores (n=3) after acetone extraction followed by spectrophotometric analysis at 665 and 750 nm (Aminot and Chaussepied 1983).

To determine the maximum penetration depth of dissolved oxygen in the sediments, oxygen profiles were performed using oxygen minisensor with a 0-100 %  $\text{O}_2$  saturated calibration assessed by Winkler titration.

Total carbon and organic carbon (after addition of HCl to remove inorganic carbon) contents were measured with a CS-125 LECO Corp. (USA) analyzer according to Nieuwenhuize et al. (1994).

Porosity was determined as the difference between the wet weight and the dry weight of the sediment per volume unit.

### Calculations.

The production rate (in  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{h}^{-1}$ ) of both  $^{15}\text{N}$ -labeled  $\text{N}_2$  species ( $p^{15}\text{N}_2$ ) was calculated as follows :

$$p^{15}\text{N}_2 = \frac{(C_{\text{water}} - C_{\text{ini}}) \times (\text{vol}_1 - \text{vol}_3) + (C_{\text{slurry}} - C_{\text{ini}}) \times [(\text{vol}_2 \times \phi) + \text{vol}_3]}{\delta t} \times \frac{1}{A} \quad (1)$$

where  $C_{\text{water}}$  and  $C_{\text{slurry}}$  are the concentrations of the isotope in the water and slurry respectively,  $C_{\text{ini}}$  is the initial concentration of the isotope in the water,  $\text{vol}_1$  is the volume of the water column,  $\text{vol}_2$  is the volume of the sediment,  $\text{vol}_3$  is the volume of the water column after sampling but before mixing,  $\phi$  is the porosity,  $A$  is the surface area and  $t$  is the incubation time.

Denitrification rates were estimated from the production of  $^{15}\text{N}$  isotopes (Nielsen 1992) :

$$D_{15} = p(^{14}\text{N}^{15}\text{N}) + 2p(^{15}\text{N}^{15}\text{N}) \quad (2)$$

$$D_{14} = \frac{p(^{14}\text{N}^{15}\text{N})}{2p(^{15}\text{N}^{15}\text{N})} \times D_{15} \quad (3)$$

where  $D_{15}$  and  $D_{14}$  are the rates of denitrification based on  $^{15}\text{NO}_3^-$  and  $^{14}\text{NO}_3^-$  respectively, and  $p(^{14}\text{N}^{15}\text{N})$  and  $p(^{15}\text{N}^{15}\text{N})$  are the rates of production of the 2 labeled  $\text{N}_2$  species.

The denitrification rates measured under the experimental conditions are higher than *in situ*, because the cores have been amended with  $^{15}\text{NO}_3^-$ . However, the calculation of total *in situ* rates is straightforward, since the *in situ* mole fraction of  $^{15}\text{NO}_3^-$  is negligible. Thus, the rate of *in situ* total denitrification is represented by  $D_{14}$ , while  $D_{15}$  expresses denitrification rate of the added  $^{15}\text{NO}_3^-$ . Subsequently, we have decomposed the total *in situ* denitrification rate ( $D_{14}$ ) in two different rates according to nitrate source, *i.e.* to nitrates diffusing from the water column ( $D_w$ ) and to nitrates produced by benthic nitrification ( $D_n$ ), respectively.

The denitrification rate attributed to nitrate diffusing from the water column ( $D_w$ ) was calculated from  $D_{15}$  and the  $^{15}\text{N}$  abundance of nitrate in the water column (Risgaard-Petersen and Rysgaard 1995) :



$$D_w = \left( \frac{100}{\text{at.\% NO}_3} \times D_{15} \right) - D_{15} \quad (4)$$

where at.% NO<sub>3</sub> is the <sup>15</sup>N at.% of NO<sub>3</sub><sup>-</sup> in the water column calculated as follows :

$$\text{at.\% NO}_3 = \frac{(CN_{\text{added}} - CN_{\text{ini}})}{CN_{\text{added}}} \times 100 \quad (5)$$

where  $CN_{\text{added}}$  is the total NO<sub>3</sub><sup>-</sup> concentration just after the addition of the <sup>15</sup>NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (<sup>14</sup>NO<sub>3</sub><sup>-</sup> + <sup>15</sup>NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) and  $CN_{\text{ini}}$  is the initial <sup>14</sup>NO<sub>3</sub><sup>-</sup> concentration of the water column, respectively.

The denitrification rate attributed to nitrates produced by benthic nitrification ( $D_n$ ) was finally calculated as follows :

$$D_n = D_{14} - D_w \quad (6)$$

## RESULTS & DISCUSSION

### General description of the studied stations.

The table 1 summarize the general biogeochemistry of the sampling sites of this study. Nitrate concentrations vs. salinities showed a strong decreasing gradient from the continent to the ocean (Fig. 2). This gradient was similar in winter and summer but the nitrate concentrations increased in winter whilst salinities decreased, according to the seasonal variation of the N-rich freshwater inputs. Salinities and temperatures permit to separate the stations in two groups : *Courant*, *Courbey* and station A are located in the so-called external bay whereas station B, *Graveyron* and *Tuiles* are included in the internal part of the bay. The highest values of total and organic carbon contents were encountered in the sediments of *Courant*, *Courbey*, stations A and B. The channels are hydrodynamically constrained and

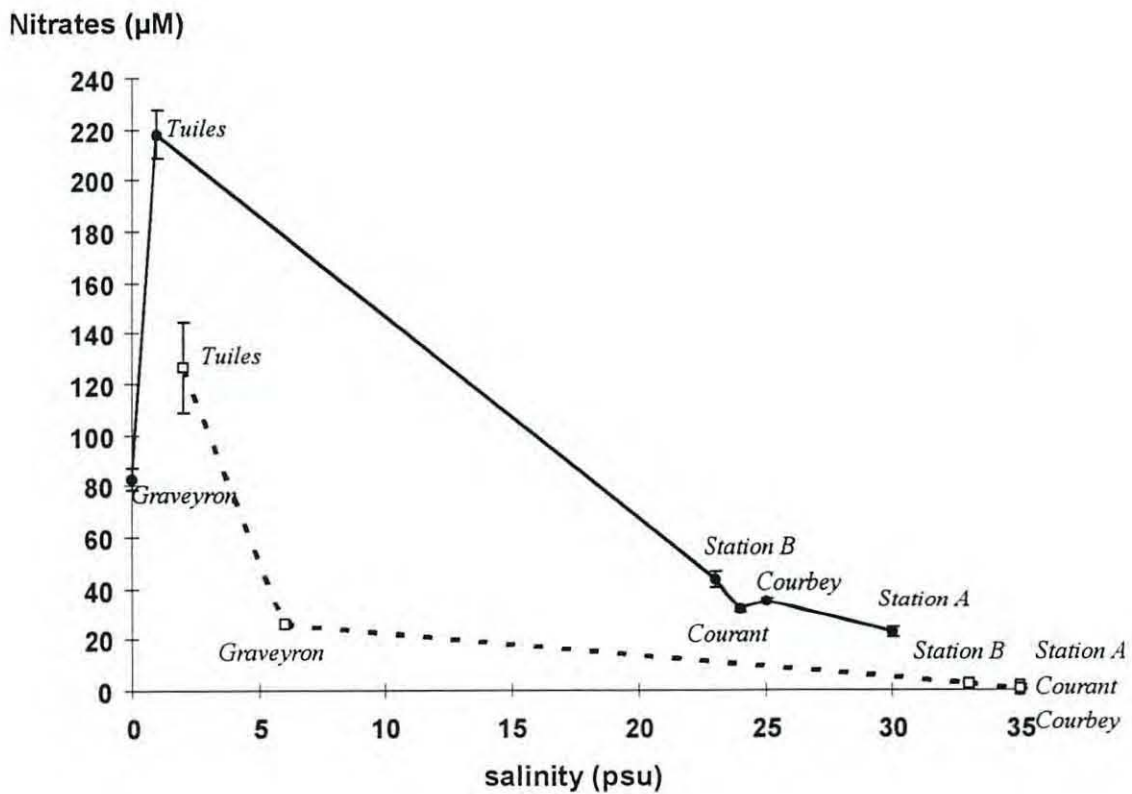
received high quantities of dead organic material (e.g. *Z. marina* and *Z. noltii* leaves). In the same way, dead leaves might be deposited and buried on intertidal sediments colonized by *Z. noltii*. Furthermore, the canopy of *Z. noltii* meadows may have trapped organic matter.

*Chlorophyll a and phaeopigments* - Phaeopigments are degradation products of Chlorophyll *a*; therefore the ratio phaeopigments to Chlorophyll *a* indicates the extent of senescence of the vegetative biomass or the degradation of detritus from vegetative origin. Stations A and B inhabited with *Z. noltii* showed higher Chlorophyll *a* contents in summer than in winter from 25 - 30 to approximately 15  $\mu\text{g g}^{-1}$ , respectively. In the same time, Chlorophyll *a* content exceeded phaeopigments in these sediments during summer and this tendency is reversed for the winter period (Fig. 3). *Graveyron*, a sandy intertidal station, showed insignificant pigments content all over the year (Fig. 3). *Tuiles*, a station located in the river *Leyre* without plants, always showed higher Chlorophyll *a* content than phaeopigments with an increase from 4 in summer to 10  $\mu\text{g g}^{-1}$  in winter (Fig. 3). Concerning the subtidal sediments, *Courbey* showed highest Chlorophyll *a* content in winter rather than in summer, from 22 to 3  $\mu\text{g g}^{-1}$ , respectively, whilst the phaeopigment content is constant around 5  $\mu\text{g g}^{-1}$  (Fig. 3). At the opposite, Chlorophyll *a* in the sediments of *Courant* was almost constant around 25  $\mu\text{g g}^{-1}$  whereas phaeopigment content marked a strong increase between summer and winter, from 6 to 22  $\mu\text{g g}^{-1}$ , respectively (Fig. 3).

*Oxygen* - The oxygen fluxes between the vegetated sediments and the water column are depicted in Fig. 4. The dark incubations showed the oxygen demand of the sediments and marine plants. Generally, these oxygen fluxes were higher in summer than in winter. The comparison between light and dark incubations showed the impact of photosynthetic oxygen production by the marine plants and the benthic phototrophic organisms. Surprisingly, at station *Courant* in summer, oxygen showed an efflux during dark incubation (Fig. 4A). This could be a pumping effect due to high irrigation rates by the infauna. Because of the plants and

the high biomass of infauna a high heterogeneity among cores existed showing by the high standard deviation values. At station A and *Graveyron* in summer and station B in winter, the oxygen production even exceeded respiration which resulted in a net efflux of oxygen to the water column. In all the other cases respiration exceeded photosynthetic oxygen production (Fig. 4).

**Figure 2.** Nitrate concentrations in the water column vs. salinity during summer 1997 (-□-) and winter 1998 (-●-) experiments. Error bars represent standard deviation (n=10).



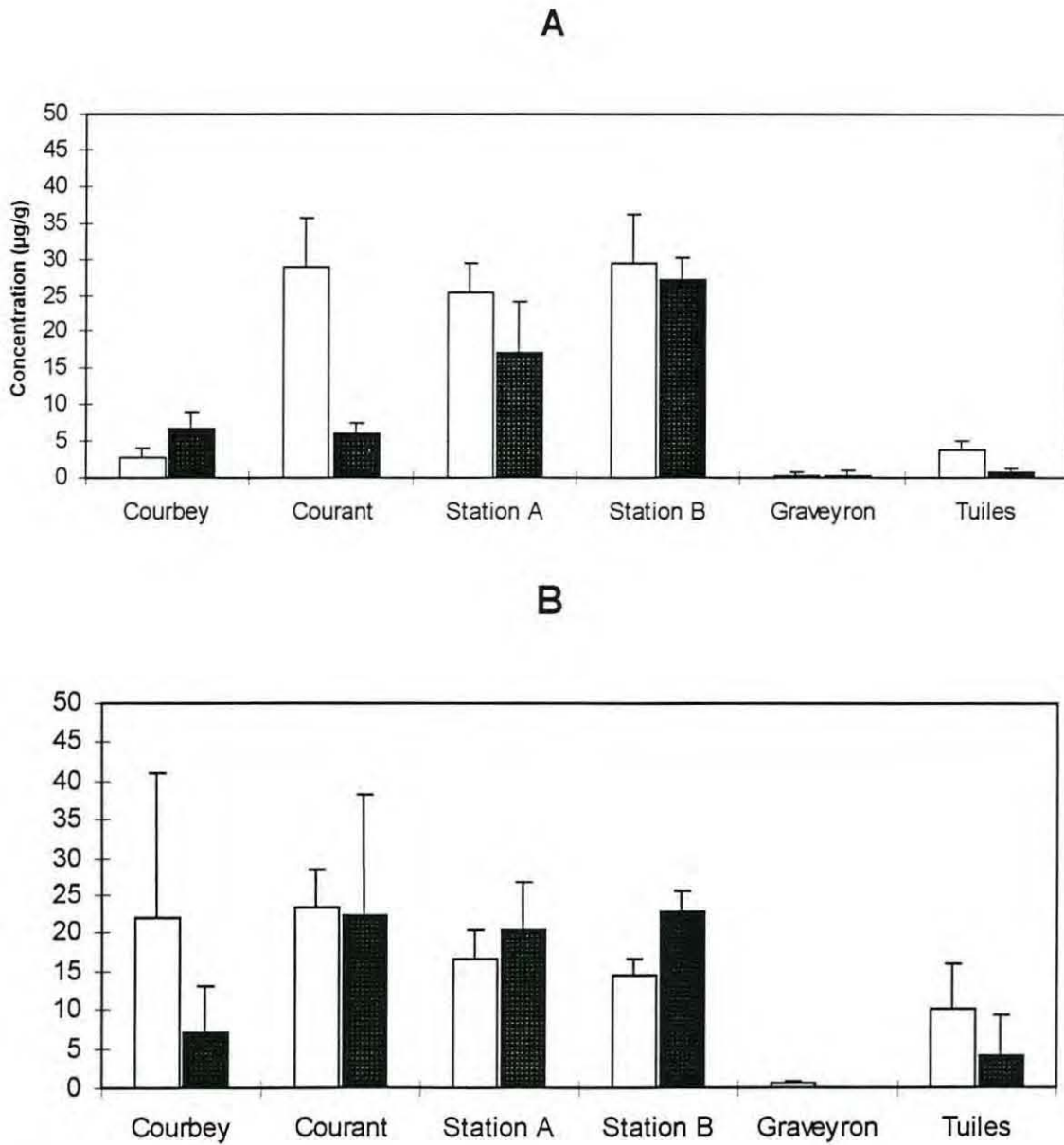


**Table 1.** General characteristics of the sediments. The first number represents the data obtained during the winter time, and the second during the summer period.

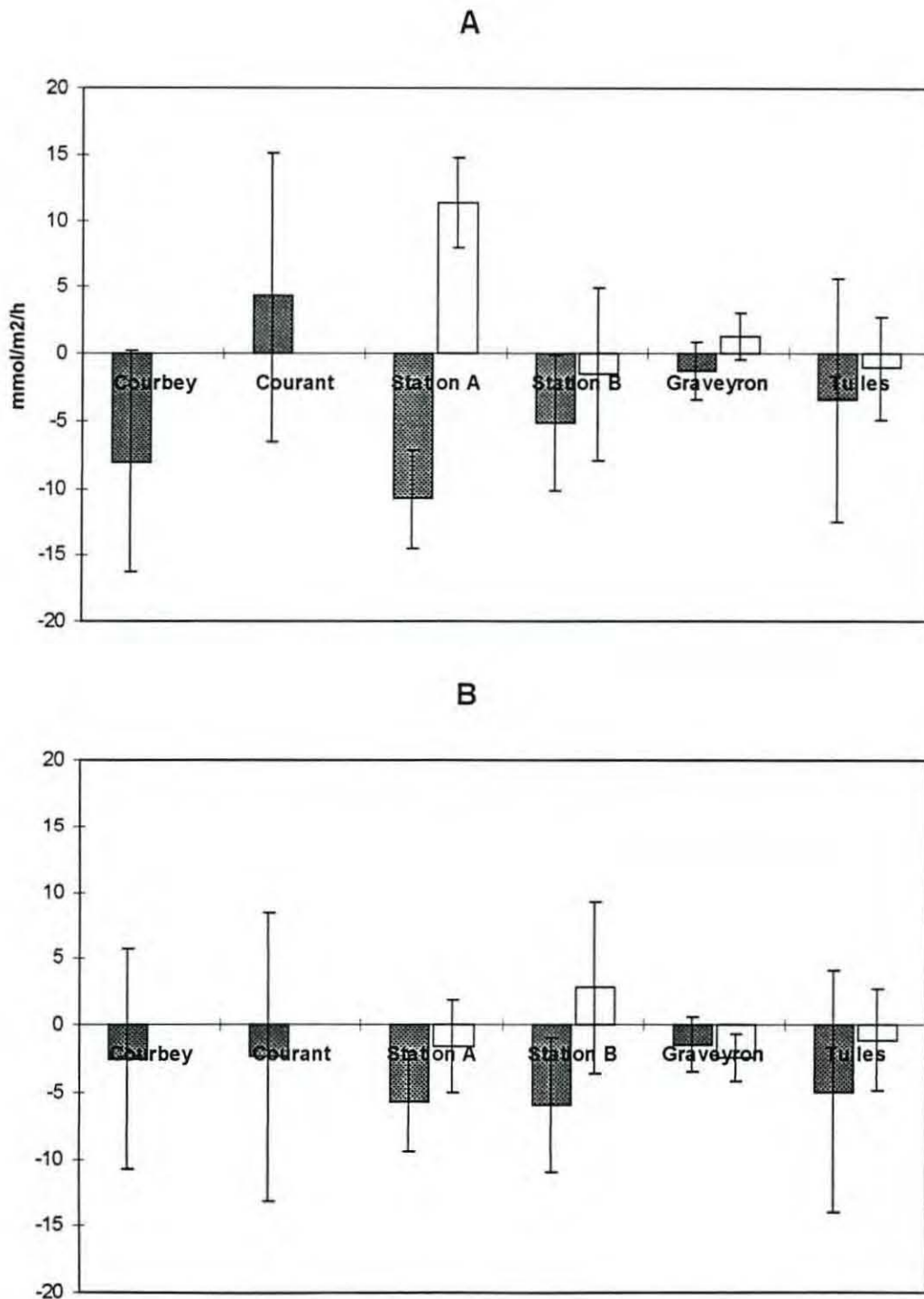
Parameters	<i>Courant</i>	<i>Courbey</i>	Station A	Station B	<i>Graveyron</i>	<i>Tuiles</i>
Salinity (psu)	25 - 35	25 - 35	25 - 35	9 - 34	0 - 20	0 - 20
Temperature (°C)	7 - 21	7 - 21	7 - 21	5 - 24	5 - 24	5 - 24
Depth (m)	3 - 5	6 - 8	intertidal	intertidal	intertidal	0.5
Sediment	sandy-mud	sandy-mud	sandy-mud	sandy-mud	sand	fine muddy-sand
Porosity (g cm <sup>-3</sup> )	0.68 - 1.34	0.62 - 1.22	0.72 - 1.97	0.72 - 1.42	0.38 - 0.66	0.45 - 0.66
Total Carbon (0-5 cm) (%)	2.2 - 1.5	2.5 - 1.7	2.0 - 2.5	3.2 - 3.8	0.1 - 0.1	0.2 - 2.5
Organic Carbon (0-5 cm) (%)	1.9 - 1.3	1.1 - 0.4	1.6 - 2.0	3.0 - 3.6	0.1 - 0.1	1.5 - 0.1
Dominant Primary Producers	Microphytobenthos	Microphytobenthos	<i>Zostera noltii</i>	<i>Zostera noltii</i>	Microphytobenthos	Microphytobenthos
Oxygen (maximal depth penetration) (mm)	1	1	3	4	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>

*n.d.* = not determined.

**Figure 3.** Pigment contents of the upper 2 cm of the sediment (without leaves of *Z. noltii*) during summer (A) and winter (B) at the different stations. Chlorophyll *a* and phaeopigments contents are illustrated as open and solid bars, respectively. Error bars represent standard deviation (n=3).



**Figure 4.** O<sub>2</sub> fluxes between the vegetated sediments (sediment + plants) and the water column during summer (A) and winter (B) at the different stations. Rates obtained in dark- and light-incubated cores are illustrated as solid and open bars, respectively. Error bars represent standard deviation (n=5).





### Denitrification.

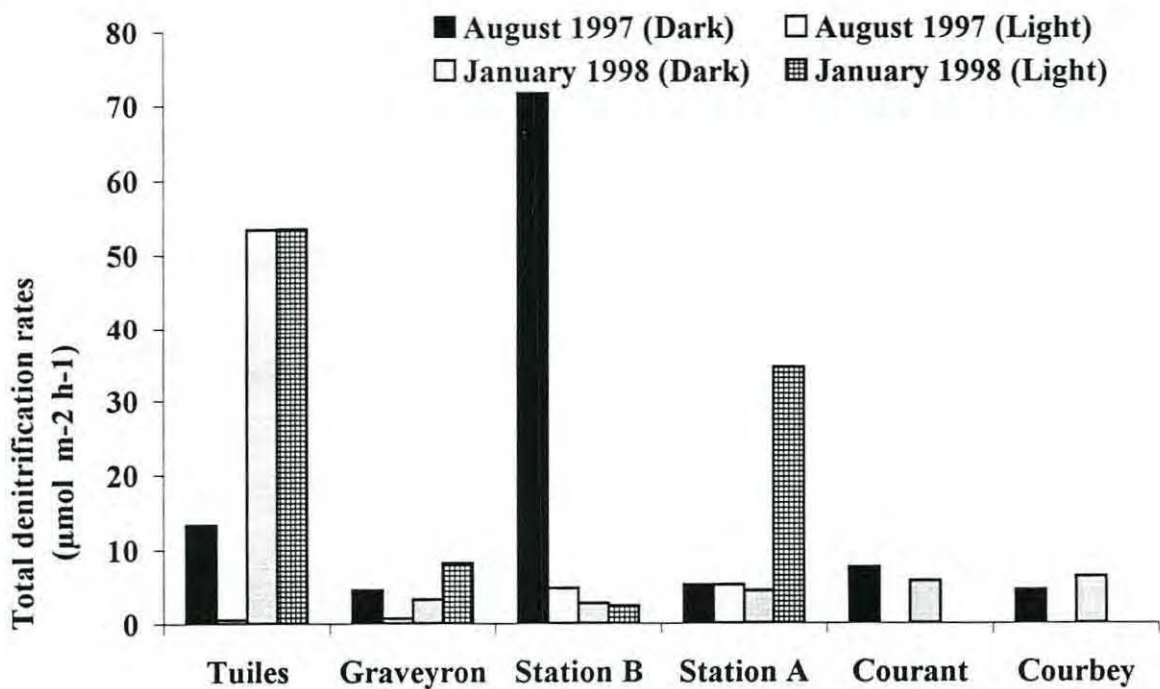
Total denitrification activity ( $D_n + D_w$ ) varied between 0.5 to 74.7  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{h}^{-1}$  with a mean  $\pm$  SD of  $15.4 \pm 4.0$  and  $13.7 \pm 15.4 \mu\text{mol m}^{-2} \text{h}^{-1}$  under dark and light conditions, respectively (Fig. 4). Generally, during summer, nitrification was the most important source of nitrate resulting in a strong coupling of nitrification and denitrification activity ( $D_n$ ) whilst in winter, nitrates diffusing from the water column were the most important source for denitrification ( $D_w$ ) (Table 2). The seasonal variation of  $D_w$  may be explained by differences in the  $\text{NO}_3^-$  load to the system (*i.e.* high in winter, low in summer).

During summer, in *Z. noltii* meadows, the nitrates produced by nitrification support the bulk of the total denitrification activity, representing 100 and 70-97 % for stations A and B, respectively (Table 2). In contrast, total denitrification activity is mainly supported by nitrates diffusing from the water column during winter which supported 90-100 and 96-100 % of the total activity for stations A and B, respectively (Table 2). The same phenomenon was observed for the subtidal stations *Courbey* and *Courant*, where nitrification supported 55-96 % of denitrification activity during summer, and only 5-30 % in winter (Table 2).

Illumination inhibited total denitrification during summer at stations *Tuiles*, *Graveyron* and B (Fig. 5). N-assimilation by microphytobenthos, especially high at station B (Fig. 3), and *Z. noltii* may explain these lower denitrification rates by  $\text{NO}_3^-$  limitation. Furthermore,  $\text{O}_2$  produced by microphytobenthos or released by the roots of *Z. noltii* might increase the diffusion distance for  $\text{NO}_3^-$  to anoxic zone of the sediment. In winter, total denitrification was stimulated under light conditions for *Graveyron* and station A (Fig. 5).  $\text{O}_2$  production by microphytobenthic photosynthesis and  $\text{O}_2$  released by the roots of *Z. noltii* may enhance the coupling of nitrification with denitrification. Unfortunately, oxygen fluxes directed throughout the sediment do not support this hypothesis (Fig. 4). Moreover, the increase of total denitrification is more due to  $D_w$  than  $D_n$  for station A (Table 2).

Surprisingly, a very high  $D_n$  rate ( $72.39 \mu\text{mol m}^{-2} \text{h}^{-1}$ ) was obtained in *Z. noltii* meadows of the station B during summer 1997. The most probable explanation may be a strong stimulation of coupled nitrification-denitrification due to high ammonium inputs. Precipitations as summer storms occurred during the week before the sampling date with a particularly strong episode the 27<sup>th</sup> of August 1997 (I. Auby, *pers. comm.*; IFREMER-Arcachon, *unpubl.*). Station B is bathed by several tributaries which may contained high ammonium concentrations during storm events. Then, heterotrophs and autotrophs were not ammonium-limited, and ammonium was not completely assimilated by phanerogams and microphytobenthos (dark incubation). Thus, nitrification might be stimulated and produced a high pool of nitrates.

Figure 5. Total denitrification rates at the different stations.



**Table 2.** Partitioning of *in situ* total denitrification rates ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{h}^{-1} \pm \text{SD}$ ) in the sediments of Arcachon Bay during winter and summer periods. Dn represents the denitrification rate supported by nitrates produced by benthic nitrification and Dw represents the denitrification rate supported by water column nitrates diffusing in the sediment.

Stations	August 1997				January 1998			
	Dark		Light		Dark		Light	
	Dw	Dn	Dw	Dn	Dw	Dn	Dw	Dn
Station A	<i>n.d.</i>	5.16 ± 1.98	<i>n.d.</i>	5.14 ± 5.31	4.41 ± 3.45	<i>n.d.</i>	31.24 ± 53.36	3.25 ± 2.65
Station B	2.35 ± 1.44	72.39 ± 16.52	1.42 ± 0.70	3.34 ± 3.65	2.75 ± 1.82	<i>n.d.</i>	2.28 ± 1.31	0.10 ± 0.23
Tuiles	7.48 ± 3.34	5.79 ± 11.57	0.56 ± 0.52	<i>n.d.</i>	53.43 ± 23.56	<i>n.d.</i>	53.49 ± 99.56	<i>n.d.</i>
Graveyron	1.31 ± 0.94	3.16 ± 4.77	0.55 ± 0.35	0.16 ± 0.36	1.60 ± 1.38	1.61 ± 3.18	3.08 ± 0.51	5.01 ± 4.63
Courbey	0.18 ± 0.07	4.31 ± 1.70			4.86 ± 3.09	2.10 ± 2.17		
Courant	3.38 ± 5.23	4.16 ± 5.99			5.39 ± 1.64	0.26 ± 0.36		

*n.d.* = not detectable



Finally, total denitrification rates in the *Bassin d'Arcachon* are low compared to other coastal marine sediments colonized by marine phanerogams (Table 3). Our results are one order of magnitude below the mean denitrification rate in coastal marine environments calculated on a 116 data basis (Table 3 and Chapitre 1).

**Table 3.** Total denitrification rates in several coastal marine environments colonized by marine phanerogams.

Location	Rate ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{h}^{-1}$ )	Method	References
Limfjorden, <i>Z. marina</i> , DK	6.25	$^{15}\text{N}$ isotope-pairing	Sloth et al. 1995
Arcachon Bay, <i>Z. noltii</i> , F	0 - 19.4	$^{15}\text{N}$ isotope-pairing	Rysgaard et al. 1996
Århus Bay, DK	12 - 21	$^{15}\text{N}$ isotope-pairing	Nielsen & Glud 1996
Arcachon Bay, <i>Z. noltii</i> , F	0.5 - 74.7	$^{15}\text{N}$ isotope-pairing	This study
Chesapeake Bay, <i>P. perfoliatus</i> , USA	10 - 638	acetylene block	Caffrey & Kemp 1990
Chesapeake Bay, <i>Z. marina</i> , USA	67 - 209	acetylene block	Caffrey & Kemp 1990
Coastal systems			
arithmetic mean	117		Chapter 1 of this study
median	17		Chapter 1 of this study

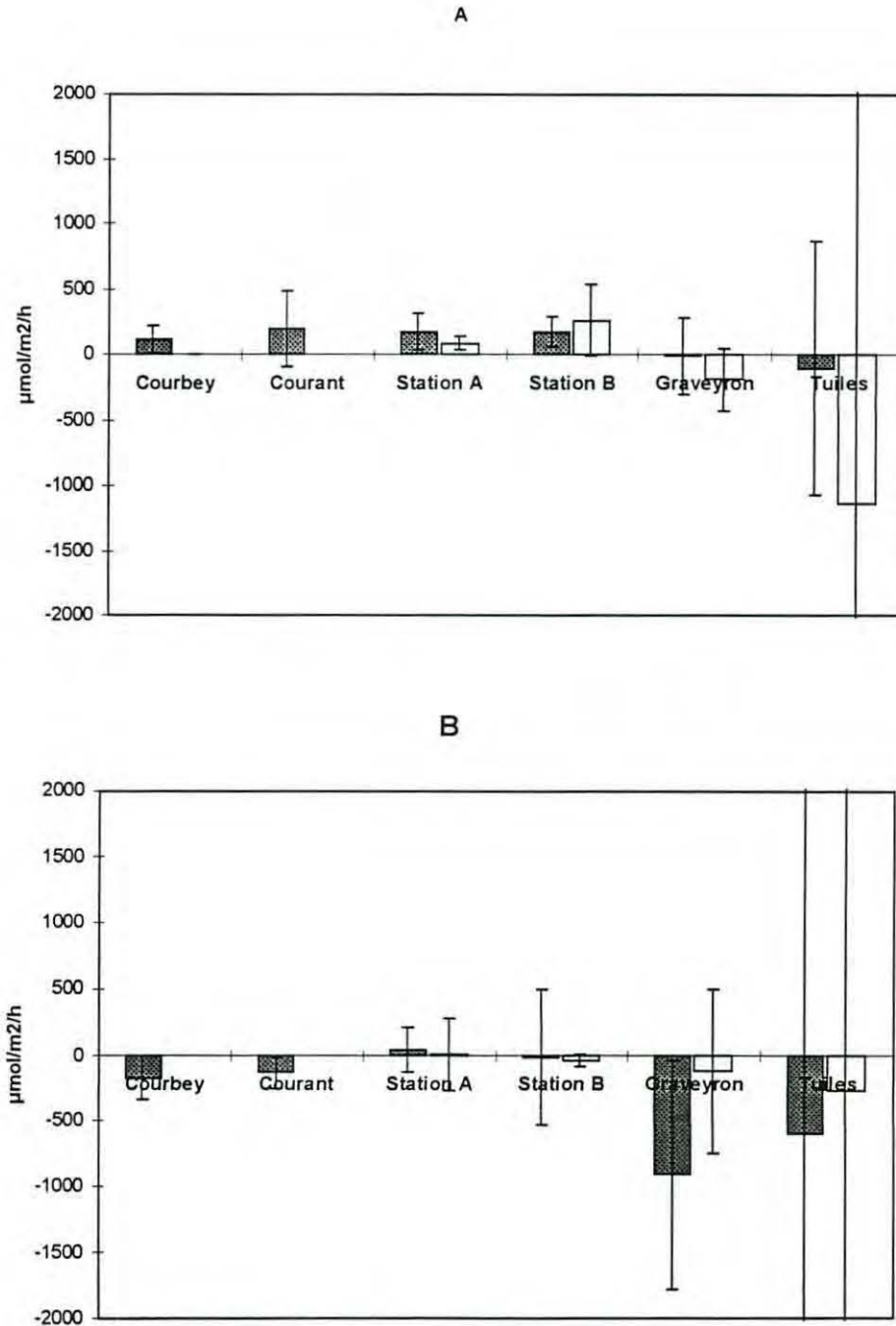
### Comparison of denitrification and fluxes.

Generally, summer was characterized by a  $\text{NO}_3^-$  efflux for subtidal stations due to mineralization of organic matter (Fig. 6A), and winter by a  $\text{NO}_3^-$  influx (Fig. 6B). In summer and under light conditions, stations A and B, inhabited with *Z. noltii*, showed an ammonium influx whereas we observed an ammonium efflux under dark conditions (Fig. 7). During summer, the ammonium release seemed to be stimulated by high mineralization rates (Fig. 7A) whereas the ammonium uptake was observed during wintertime (Fig. 7B).

Nevertheless,  $\text{NO}_3^-$  fluxes from the water column to the vegetated sediments are higher than denitrification rates (Fig. 5 and 6). Using mesocosm experiments and acetylene inhibition technique, Welsh et al. (*in prep.*) have shown that denitrification represent  $\sim 1\%$  of the  $\text{NO}_3^-$

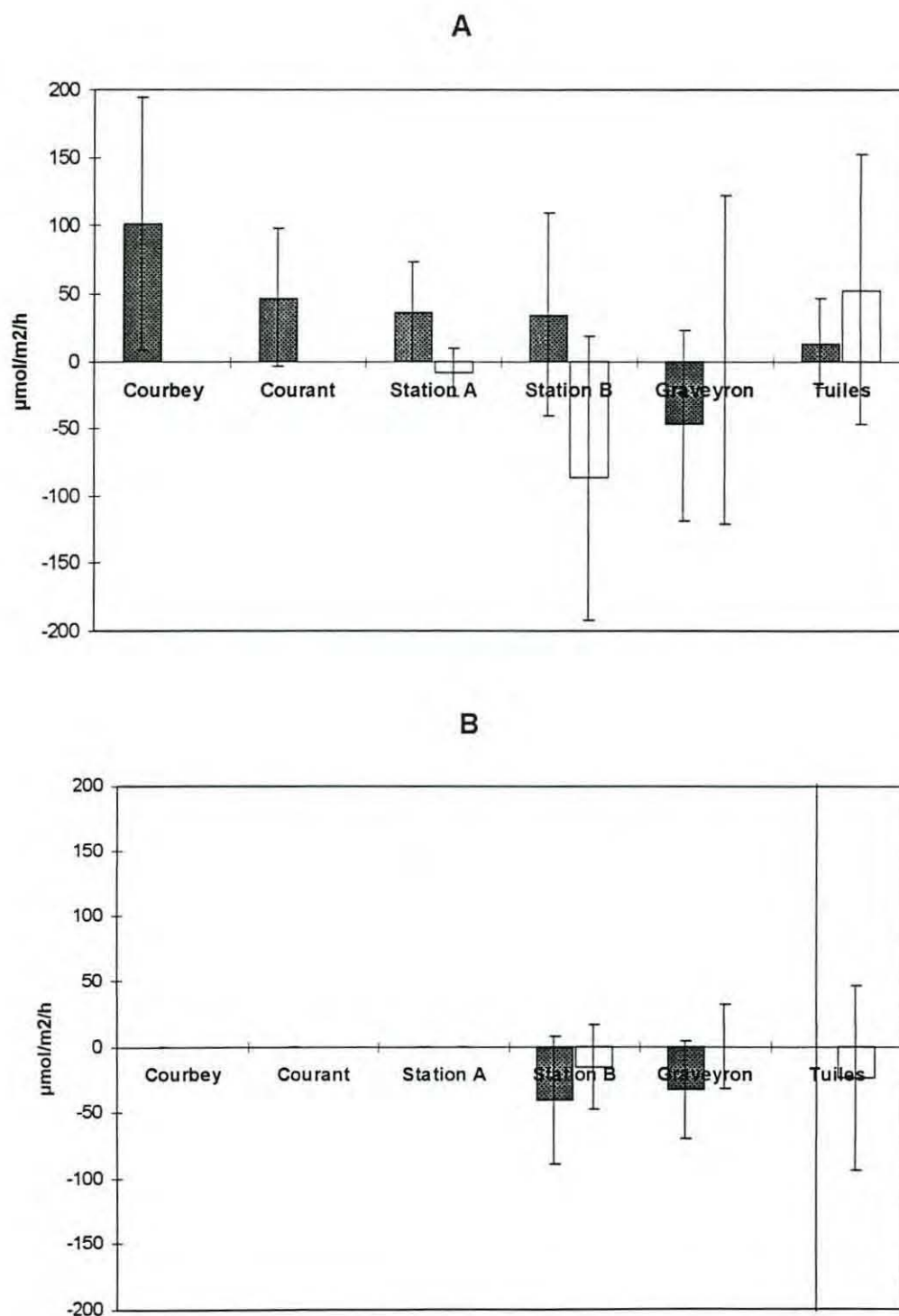
fluxes in sediments colonized by *Z. noltii*. Moreover, in these experiments, the authors cut the leaves of *Z. noltii* and therefore influxes were reversed to effluxes showing the high capacity for zostera leaves to assimilate nitrate or ammonium.

**Figure 6.**  $\text{NO}_3^-$  fluxes between the vegetated sediments (sediment + plants) and the water column during summer (A) and winter (B). Rates obtained in dark- and light-incubated cores are illustrated as solid and open bars, respectively. Error bars represent standard deviation (n=5).





**Figure 7.**  $\text{NH}_4^+$  fluxes between the vegetated sediments (sediment + plants) and the water column during summer (A) and winter (B). Rates obtained in dark- and light-incubated cores are illustrated as solid and open bars, respectively. Error bars represent standard deviation (n=5).



## CONCLUSION

Denitrification rates are low in the *Bassin d'Arcachon*. Denitrification is strongly linked to benthic nitrification in summer, whereas denitrification is supported by nitrates diffusing from the water column in winter. Our results indicate that N-cycle in the *Bassin d'Arcachon* is dominated by marine phanerogams N-assimilation rather than microbial processes.

## ACKNOWLEDGMENTS

Stéphane A. Riou is supported by a grant from IFREMER - URM n°13 (*Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la MER*) and *Région Aquitaine*. This work is a contribution to the *Unité de Recherche Marine n°13* (cooperation of the CNRS-Université Bordeaux I and IFREMER) and to the European Union ELOISE Program (ELOISE No. ---) in the framework of the ROBUST project carried out under contract ENV4-CT96-0218. We wish to thank Lars Peter Nielsen and Nils Risgaard-Petersen for providing practical training for <sup>15</sup>N analyses to Stéphane Riou and for providing access to Mass Spectrometry facilities at the University of Århus, Denmark. Sten Pedersen is acknowledged for technical assistance with the use of the Mass Spectrometer, Isabelle Auby for stimulating discussions, Henri Etcheber for carbon analysis, and Franck Lerouvreur for diving.

## LITERATURE CITED

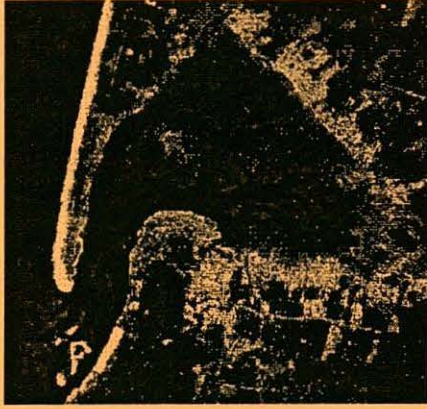
Aminot A, Chaussepied M (1983) Manuel des analyses chimiques en milieu marin. CNEXO (ed), Brest, 395 p

Auby I, Manaud F, Maurer D, Trut G (1994) Etude de la prolifération des algues vertes dans le Bassin d'Arcachon. Rapport IFREMER - CEMAGREF - SABARC, 163 p

- Bouchet JM (1968) Etude océanographique des chenaux du Bassin d'Arcachon. Doct Thesis, Univ Bordeaux
- Caffrey JM, Kemp WM (1990) Nitrogen cycling in sediments with estuarine population of *Potamogeton perfoliatus* and *Zostera marina*. Mar Ecol Prog Ser 66 :147-160
- Campagne 1996
- Castel J, Caumette P, Herbert R (1996) Eutrophication gradients in coastal lagoons as exemplified by the Bassin d'Arcachon and the Etang du Prévost. Hydrobiol 329 : ix-xxviii
- Christensen PB, Sørensen J (1986) Temporal variation of denitrification activity in plant-covered littoral sediment from lake Hampen, Denmark. Appl Environ Microbiol 51 :1174-1179
- Christensen PB, Sørensen J (1988) Denitrification in sediment of lowland streams: regional and seasonal variations in Gelbaek and Rabis baek, Denmark. FEMS Microbiol Ecol 53 :335-344
- Henriksen K, Kemp WM (1988) Nitrification in estuarine and coastal marine sediments. In : Blackburn TH, Sørensen J (ed) Nitrogen cycling in coastal marine environments. Wiley J and Sons, New York, p 207-249
- Nielsen LP (1992) Denitrification in sediment determined from nitrogen isotope pairing. FEMS Microbiol Ecol 86 :357-362
- Nielsen LP, Glud RN (1996) Denitrification in a coastal sediment measured *in situ* by the nitrogen isotope pairing technique applied to a benthic flux chamber. Mar Ecol Prog Ser 137 :181-186
- Nieuwenhuize J, Maas YEM, Middelburg JJ (1994) Rapid analysis of organic carbon and nitrogen in particulate materials. Mar Chem 45 :217-224



- Nixon SW (1995) Coastal marine eutrophication : a definition, social causes, and future concerns. *Ophelia* 41 :199-219
- Revsbech NP, Sørensen J (1990) Denitrification in soil and sediment. Plenum Press, New York
- Risgaard-Petersen N, Rysgaard S (1995) Nitrate reduction in sediments and waterlogged soil measured by <sup>15</sup>N techniques. In : Alef K and Nannipieri P (ed) *Methods in applied soil microbiology and biochemistry*. Academic Press, London, p 287-295
- Rysgaard S, Risgaard-Petersen N, Sloth NP (1996) Nitrification, denitrification, and nitrate ammonification in sediments of two coastal lagoons in Southern France. *Hydrobiologia* 329 :133-141
- Seitzinger SP (1988) Denitrification in freshwater and coastal marine ecosystems: Ecological and geochemical significance. *Limnol Oceanogr* 33 :702-724
- Seitzinger SP (1990) Denitrification in aquatic sediments. In: Revsbech NP, Sørensen J (ed) *Denitrification in soil and sediment*. Plenum Press, New York, p 301-322
- Sloth NP, Blackburn TH, Hansen LS, Risgaard-Petersen N, Lomstein BA (1995) Nitrogen cycling in sediments with different organic loading. *Mar Ecol Prog Ser* 116 :163-170
- Strickland JDH, Parsons TR (1972) *A practical handbook of sea water analysis*. Bull Fish Res Bd Can vol 167
- Vitousek PM, Aber JD, Howarth RW, Likens GE, Matson PA, Schindler DW, Schlesinger WH, Tilman DG (1997) Human alteration of the global nitrogen cycle : sources and consequences. *Ecological applications* 7 :737-750



# *Synthèse & Conclusion*

## *Avant-propos*

*Depuis l'installation d'une station marine en 1867, le Bassin d'Arcachon est un écosystème qui a fait l'objet de nombreuses études scientifiques. La baie présente, en effet, une unité géographique, hydrogéologique, biologique et socio-économique qui favorise l'investigation scientifique.*

*L'IFREMER a réalisé récemment une synthèse des connaissances existantes dans une étude intitulée « L'étude intégrée du Bassin d'Arcachon », selon 5 axes : physique, qualité de l'eau et des sédiments, biologie, activités, et activités ressources vivantes.*

*Pour notre part, nous avons synthétisé les travaux relatifs aux processus bactériens du cycle de l'azote. Puis nous avons construit un bilan de masse provisoire du cycle de l'azote dans le Bassin d'Arcachon.*



## *Synthèse & Conclusion*

### **1. SYNTHÈSE DES RESULTATS OBTENUS SUR LES PROCESSUS BACTÉRIENS DU CYCLE DE L'AZOTE DANS LE BASSIN D'ARCACHON**

#### *1.1. Généralités*

La figure 1 schématise les principaux processus bactériens impliqués dans le cycle de l'azote dans les sédiments marins côtiers.

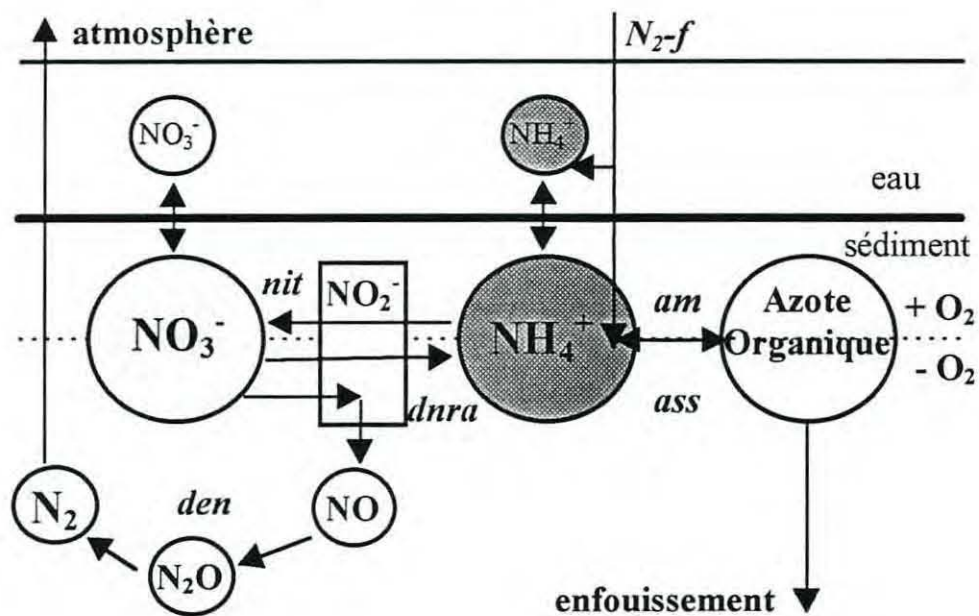
L'activité des micro-organismes du sédiment provoque :

- des gains en azote : la fixation d'azote est la conversion de l'azote moléculaire  $N_2$  en ammonium ou en azote organique ; cette fixation est réalisée exclusivement par un certain nombre de micro-organismes autotrophes ou hétérotrophes ;
- des transformations des différentes formes de l'azote : l'ammonification convertit l'azote organique en ammonium (forme inorganique dissoute) ; la nitrification autotrophe est un processus aérobie qui se déroule en deux étapes : i) tout d'abord l'ammonium est oxydé en nitrites par les bactéries nitrosantes ; ii) puis les nitrites sont oxydés en nitrates par les bactéries nitrifiantes ; la réduction dissimilatrice est un processus anoxique qui réduit les nitrates en ammonium ;
- des pertes en azote : la dénitrification est le processus bactérien qui en anaérobiose permet la transformation des nitrates  $NO_3^-$  en oxyde nitreux  $N_2O$  et/ou azote moléculaire  $N_2$  ; ces produits gazeux peuvent diffuser dans l'atmosphère, et constituer ainsi une perte d'azote pour le système ; les nitrates alimentant la dénitrification

proviennent soit de la diffusion à partir de la colonne d'eau, soit sont produits par les bactéries nitrifiantes dans la zone oxygène du sédiment.

**Figure 1.**

Cycle bactérien de l'azote dans les sédiments marins côtiers. Abréviations: *am* : ammonification, *ass* : assimilation, *nit* : nitrification, *dnra* : réduction dissimilatrice des nitrates en ammonium, *den* : dénitrification, *N<sub>2</sub>-f* : fixation de l'azote atmosphérique.



### 1.2. La fixation d'azote

La fixation de l'azote moléculaire  $N_2$  est réalisée par de nombreuses espèces de bactéries autotrophes et hétérotrophes, libres ou symbiotiques présentes dans les sédiments marins. Les bactéries hétérotrophes fixatrices d'azote appartiennent à des groupes taxinomiques divers comprenant des espèces aérobies, microaérophiles et strictement anaérobies (Capone 1988). Le coût métabolique important associé à cette fixation, implique, pour les hétérotrophes, une limitation par les sources de carbone disponible (Herbert 1975, Jones 1982). Pour cette raison, ces populations bactériennes ont tendance à se développer à proximité de la rhizosphère des

phanérogames dont les racines excrètent des composés organiques liés à leur métabolisme photosynthétique (Capone *et al.* 1979 ; Boyle & Patriquin 1981 ; O'Donohue *et al.* 1991). L'azote moléculaire  $N_2$  fixé par ces bactéries est transformé en ammoniac  $NH_3$  grâce à la nitrogénase, qui est soit assimilé par les bactéries elles-mêmes, soit absorbé et assimilé par les plantes (Capone 1988 ; O'Donohue *et al.* 1991).

Les taux de fixation de l'azote dans les sédiments des herbiers de *Zostera noltii*, particulièrement développés dans le Bassin d'Arcachon, ont été mesurés aux quatre saisons, entre mars 1994 et janvier 1995 (Welsh *et al.* 1996). Les mesures ont été réalisées à l'aide de la méthode de réduction de l'acétylène (Stewart *et al.* 1967), en utilisant deux techniques, celle de la carotte entière (utilisée pour les calculs de flux), et celle des homogénats de sédiment (ou « boues »).

Les taux suivants ont été mesurés :

- printemps (mars) : 0,2 - 0,4 mg N m<sup>-2</sup> an<sup>-1</sup> ;
- été (juillet) : 2,0 - 7,3 mg N m<sup>-2</sup> an<sup>-1</sup> ;
- automne (octobre) : 1,8 - 4,4 mg N m<sup>-2</sup> an<sup>-1</sup> ;
- hiver (janvier) : 0,1 - 0,2 mg N m<sup>-2</sup> an<sup>-1</sup>.

Le pic estival observé correspond à la période où la température est la plus haute, où la concentration en azote inorganique dans l'eau interstitielle des sédiments et dans les masses d'eau sont minimales (Welsh *et al.* 1996, Auby *et al.* in prep.) et où la biomasse des zostères est maximale (Auby & Labourg, 1996).



Au total, cet azote fixé représente de 0,4 à 1,1 g N m<sup>-2</sup> an<sup>-1</sup>, soit entre 28 et 77 tonnes par an pour l'ensemble des herbiers du Bassin d'Arcachon. Ce taux est faible par rapport à d'autres écosystèmes côtiers colonisés par des phanérogames marines (Tableau 1).

**Tableau 1.**

Comparaison des taux de fixation d'azote (mg N m<sup>-2</sup> jour<sup>-1</sup>) entre le Bassin d'Arcachon et d'autres écosystèmes côtiers. D'après Welsh *et al.* 1996.

Végétation	Lieux	Taux (mg N m <sup>-2</sup> jr <sup>-1</sup> )	Références
<i>Zostera noltii</i>	Arcachon	0,1 - 7,3	Welsh <i>et al.</i> 1996
<i>Zostera capricornia</i>	Australie	10 - 40	O'Donohue <i>et al.</i> 1991
<i>Enhalus acoroides</i>	Golfe de Carpentaria	25	Moriarty & O'Donohue 1993*
<i>Thalassia hemprichii</i>	Golfe de Carpentaria	16	Moriarty & O'Donohue 1993*
<i>Thalassia testudinum</i>	Floride	0,03	McRoy <i>et al.</i> 1973*
<i>Thalassia testudinum</i>	Floride du Sud	5 - 24	Capone & Taylor 1980*
<i>Thalassia testudinum</i>	Bahamas	14 - 41	Oremland <i>et al.</i> 1976*
<i>Thalassia testudinum</i>	Bahamas	6 - 9	Capone <i>et al.</i> 1979
<i>Thalassia testudinum</i>	Barbados	27 - 140	Patriquin & Knowles 1972*

\* in Welsh *et al.* 1996.

Outre ce bilan de l'azote moléculaire fixé dans les herbiers, les travaux de Welsh *et al.* (1996) ont permis de mettre en évidence un certain nombre de processus liés à cette fixation.

A toutes les saisons, les micro-organismes responsables de la fixation de l'azote sont en majorité (>75 %) des bactéries sulfatoréductrices, comme l'a démontré l'effet du molybdate de sodium, inhibiteur spécifique des BSR, sur les taux de fixation. D'autres expériences ont permis de montrer que la croissance des populations bactériennes est particulièrement stimulée par le sucrose. Ce composé est le principal sucre de transport pour les angiospermes, et il est souvent excrété par le système racinaire dans le sédiment. Ceci expliquerait que la fixation est plus élevée en conditions éclairées, c'est à dire lorsque les plantes photosynthétisent. Néanmoins, lorsque le contenu des zostères en azote est très élevé (milieu naturellement ou artificiellement eutrophisé), la différence entre le taux de fixation à la lumière et à l'obscurité diminue. Selon D. Welsh (comm.

pers.), les plantes pourraient donc contrôler l'exsudation de substances carbonées par leurs racines en fonction de leur contenu en azote, régulant ainsi l'activité fixatrice d'azote des bactéries associées à leur rhizosphère.

### 1.3. La nitrification

Afin d'étudier le processus de nitrification, deux approches complémentaires ont été conduites entre juin 1996 et novembre 1997 : le dénombrement des populations de bactéries nitrifiantes du sédiment par la méthode dite du « *Nombre le Plus Probable* », ou NPP, plus connue sous son appellation anglaise MPN ou « *Most Probable Number* » (Rowe *et al.* 1977) et l'estimation de l'activité nitrifiante par l'utilisation d'un inhibiteur de la nitrosation, la nitrapyrine ou N-serve (Henriksen 1980).

#### Dénombrement des bactériens nitrifiantes

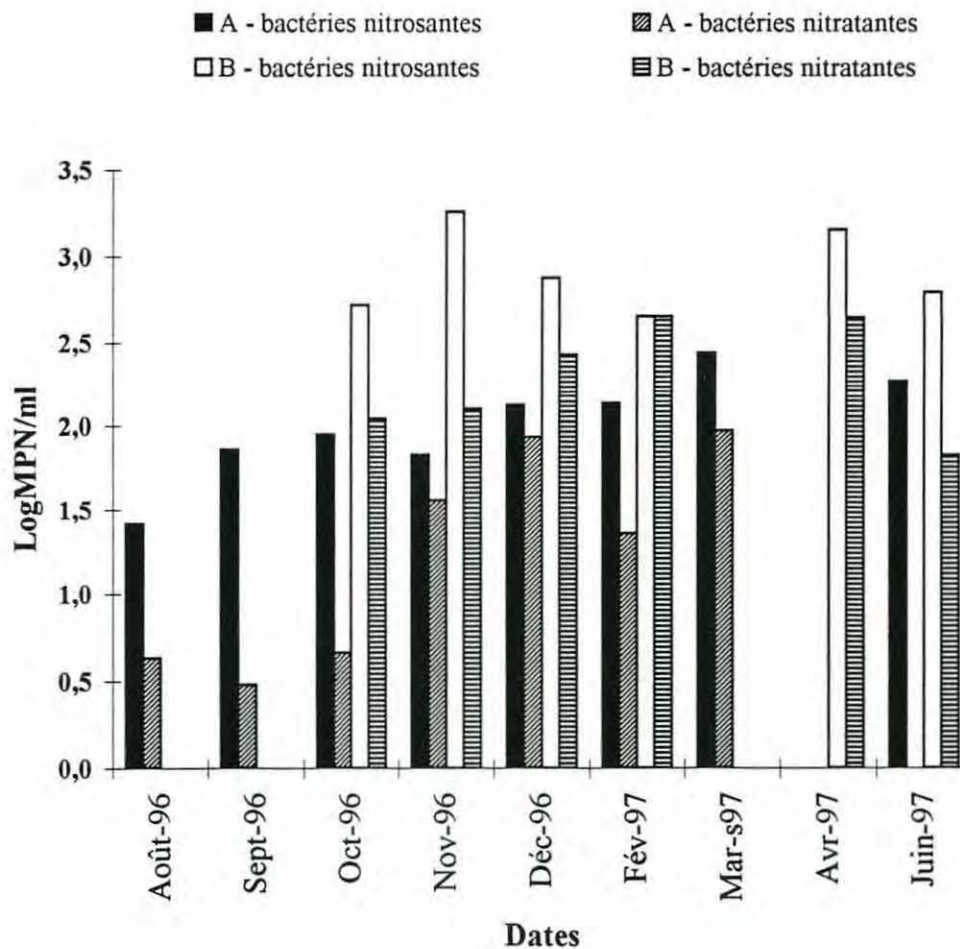
Concernant les dénombrements bactériens, la station située dans la partie interne du bassin présentait des densités bactériennes plus importantes que la station plus marine (Figure 2). Malgré tout, les abondances des bactéries nitrifiantes, de l'ordre de  $10^2$  à  $10^4$  bactéries par ml de sédiment, font parties des valeurs basses relevées dans la littérature (Riou *et al.* soumis ; *Chapitre 3*). Plusieurs facteurs sont susceptibles de limiter la croissance des bactéries nitrosantes :

- la faible épaisseur de la zone oxique dans les sédiments ;
- les faibles teneurs en ammonium de l'eau surnageante ;
- la compétition pour i) l'ammonium avec les bactéries hétérotrophes et les micro-organismes phototrophes, ii) l'ammonium et l'oxygène avec le microphytobenthos et les plantes marines (Hansen *et al.* 1981 ; Henriksen & Kemp 1988 ; Verhagen & Laanbroek 1991 ; Rysgaard *et al.* 1996) ;

- les processus hydrodynamiques et la bioturbation qui peuvent remettre en suspension les micro-organismes ou, au contraire, les enfouir dans la zone anoxique du sédiment, et enfin, l'exposition à basse mer aux fortes températures et à la lumière qui inhibent la croissance des bactéries nitrifiantes (Henriksen *et al.* 1981 ; Ward 1986 ; Koops & Möller 1992 ; Jensen *et al.* 1993 ; Bodelier *et al.* 1996 ; Guerrero & Jones 1996).

**Figure 2.**

Dénombrements des bactéries nitrifiantes dans les 2 premiers centimètres des sédiments du Bassin d'Arcachon colonisés par l'herbier de *Z. noltii*. A = station localisée au sud-est de l'Île aux Oiseaux (eaux néritiques externes), B = station localisée à Cap de Prat (eaux néritiques internes). D'après Riou *et al.* (soumis) ; *Chapitre 3*.





Ces résultats sur les populations de bactéries nitrifiantes permettent de poser l'hypothèse que la nitrification est un processus peu important dans le Bassin d'Arcachon. Cependant, ces comptages bactériens ne renseignent en rien sur le niveau des taux d'activité des organismes.

#### Estimation de l'activité nitrifiante

Dans la littérature, on répertorie une trentaine d'inhibiteurs de la nitrification (Bedard & Knowles 1989). Le plus utilisé en milieu marin est la nitrapyrine ou 2-chloro-6-trichlorométhyl pyridine, appelée encore N-serve. C'est un inhibiteur de la nitrosation (première étape de la nitrification) qui bloque l'ammonium-mono-oxygénase. Le protocole qui a été utilisé était une modification de la méthode proposée par Henriksen (1980).

Les activités nitrifiantes étaient comprises entre 0 et  $90 \mu\text{mol-NH}_4^+ \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ , ce qui est faible comparativement aux données disponibles dans la littérature (Henriksen & Kemp 1988, Riou *et al.* soumis ; Chapitre 3). Les plus forts taux de nitrification ont été mesurés entre décembre 1996 et mars 1997 c'est à dire pendant la période où les apports en azote inorganique par les rivières sont les plus importants.

L'estimation du taux moyen annuel de nitrification était basé sur les taux de nitrification mesurés par la méthode de Henriksen dans les sédiments intertidaux du bassin. La moyenne des taux obtenus a été calculée pour une période hivernale (de décembre 1996 à avril 1997), et pour deux périodes estivales (de juin à novembre 1996 et de mai à novembre 1997). Ces taux moyens ont ensuite été ajustés à la superficie des sédiments intertidaux ( $116 \text{ km}^2$ ) et ramenés à une base annuelle (Riou *et al.* soumis ; Chapitre 3). Pour la période 1996/1997, le taux moyen annuel de nitrification était de  $120\text{-}140 \text{ mmol m}^{-2} \text{ an}^{-1}$ . Ce taux fait partie des valeurs basses de la littérature (Tableau 2). En 1996/1997, la nitrification a transformé 20 à 30 tonnes d'ammonium en nitrates dans les sédiments intertidaux recouverts par l'herbier de *Z. noltii*.

**Tableau 2.**

Taux de nitrification mesurés par la technique du blocage à la N-serve dans différents sédiments côtiers (recalculés sur une base annuelle) - D'après Riou *et al.* (soumis) ; *Chapitre 3*

Situation géographique	Taux annuels estimés (mmol m <sup>-2</sup> an <sup>-1</sup> )	Références
Mer du Nord	700 - 750	Lohse <i>et al.</i> 1993
Kysing Fjord (DK)	600 - 700	Hansen <i>et al.</i> 1981
Baie d'Arhus (DK)	300 - 400	Hansen <i>et al.</i> 1981
Baie de Chesapeake (USA)	350 - 400	Kemp <i>et al.</i> 1990
Bassin d'Arcachon (F)	120 - 140	Riou <i>et al.</i> soumis ; <i>Chapitre 3</i>
Marais salé, estuaire de la rivière de Newport (USA)	25 - 80	Thompson <i>et al.</i> 1995

#### 1.4. La dénitrification

La première étude sur la dénitrification dans le Bassin d'Arcachon a été menée par Rysgaard *et al.* (1996). Les mesures ont été effectuées en juin et novembre 1993 et en janvier 1994, sur une seule station, dans un herbier de *Z. noltii* au sud de l'Île aux Oiseaux. Les taux de dénitrification ont été déterminés selon la méthode du « <sup>15</sup>N isotope pairing » (Nielsen 1992). Les taux de dénitrification mesurés dans cette étude préliminaire étaient faibles et compris entre 0 et 17,5 μmol m<sup>-2</sup> h<sup>-1</sup>.

Une étude plus complète utilisant la même méthode isotopique a été menée par Riou *et al.* (in prep. ; *Chapitre 4*) en 1997 et 1998. Le bassin a été compartimentalisé en 6 stations représentatives de l'écosystème : en milieu intertidal en présence ou en l'absence de l'herbier de *Z. noltii*, dans les chenaux subtidaux, et dans le delta de la Leyre. Les mesures ont été effectuées en été 1997 (fin août - début septembre) et en hiver 1998 (mi janvier). Les taux de dénitrification étaient compris entre 0 et 75 μmol m<sup>-2</sup> h<sup>-1</sup> (Figure 3). Les taux moyens annuels de dénitrification totale sont de 15,4 ± 4,0 et 13,7 ± 15,4 μmol m<sup>-2</sup> h<sup>-1</sup> à l'obscurité et sous conditions lumineuses, respectivement. Ces taux de dénitrification sont faibles comparativement à d'autres écosystèmes côtiers (Riou & De Wit in prep. ; *Chapitre 1*).



Nous avons calculé le bilan annuel de la dénitrification dans le bassin (Tableau 3 et Annexe). Les taux moyens de dénitrification en été et en hiver, ainsi qu'en conditions éclairées et à l'obscurité, ont été calculés pour l'herbier de *Z. noltii* (moyenne de 2 stations), les chenaux (2 stations), et le delta de la Leyre (1 station). De manière schématique, nous avons considéré une période jour/nuit égale (12h/12h), un rythme de marée de 12h pour les stations intertidales, une période estivale de 7 mois et une période hivernale de 5 mois. Les superficies ont été évaluées à 70 km<sup>2</sup> pour l'herbier de zostères, 40 km<sup>2</sup> pour les chenaux, et 7,5 km<sup>2</sup> pour le delta de la Leyre.

**Tableau 3.**

Flux d'azote dans le bassin d'Arcachon dus au processus bactérien de dénitrification.  $D_{tot}$  = dénitrification totale,  $D_w$  = dénitrification des nitrates diffusant de la colonne d'eau,  $D_n$  = dénitrification liée à la nitrification. D'après Riou *et al.* (in prep.) ; *Chapitre 4*

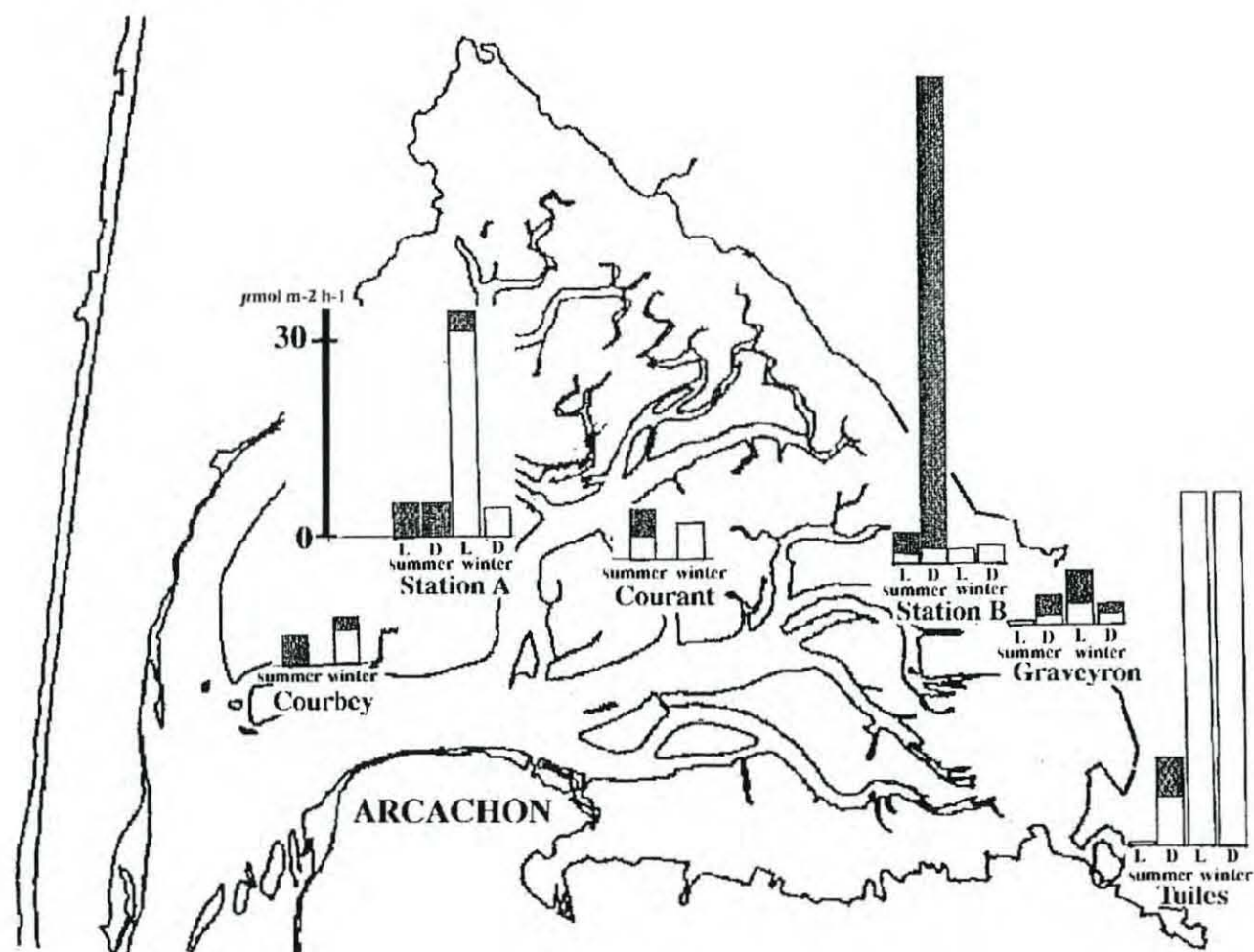
	ETE 97		HIVER 98		ANNUEL 97/98	
	en tN an <sup>-1</sup>	en % de $D_{tot}$ -été	en tN an <sup>-1</sup>	en % de $D_{tot}$ -hiver	en tN an <sup>-1</sup>	en % de $D_{tot}$
<b>D<sub>w</sub></b>	<b>8</b>	7	<b>43</b>	83	<b>51</b>	42
<b>D<sub>n</sub></b>	<b>67</b>	93	<b>5</b>	17	<b>72</b>	58
<b>D<sub>tot</sub> en tN an<sup>-1</sup></b> (en % de $D_{tot}$ annuelle)	<b>75</b>	(61)	<b>48</b>	(39)	<b>123</b>	(100)

L'activité dénitrifiante est dominée par le couplage nitrification-dénitrification l'été, alors qu'en hiver ce sont les nitrates diffusant de la colonne d'eau qui soutiennent entièrement la dénitrification totale (Tableau 3). Ces résultats semblent corrélés aux apports en sels nutritifs dans le système. La dénitrification totale annuelle représentait 123 tonnes d'azote en 1997-1998 dans le Bassin d'Arcachon.



Figure 3.

Taux de dénitrification (en  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{h}^{-1}$ ) dans le Bassin d'Arcachon. Été = summer, Hiver = winter, Dw en blanc, Dn en noir, D = incubations à l'obscurité, L = incubations à la lumière. D'après Riou *et al.* (in prep.); Chapitre 4



## 2. BILAN DE MASSE DU CYCLE DE L'AZOTE DANS LE BASSIN D'ARCACHON

La part relative de chaque processus bactérien dans le cycle de l'azote des sédiments du Bassin d'Arcachon a été calculée en fonction des apports en sels azotés et de l'assimilation d'azote par les producteurs primaires. Les tonnages maxima correspondants à chaque processus ont été divisés par 500 tonnes d'apports en azote (caractéristiques d'une année aux apports peu importants, type année « sèche » comme 1991) et par 3000 tonnes d'azote assimilés par les producteurs primaires. Les tonnages minima ont été divisés par 1000 tonnes d'apports (caractéristiques d'une année aux apports importants, type année « humide » comme 1994) et 5000 tonnes d'azote assimilés par les producteurs primaires. Les proportions sont exprimées en %.

Les processus bactériens du cycle de l'azote dans les sédiments du Bassin d'Arcachon se répartissent de la manière suivante (Fig. 4) :

- la nitrification représente de 3 à 14 % des apports en sels azotés dissous dans la lagune, et de 0,4 à 2,3 % de l'azote assimilé par les producteurs primaires ;
- la dénitrification représente de 12 à 24 % des apports en sels azotés dissous dans la lagune, et de 2,4 à 4 % de l'azote assimilé par les producteurs primaires ;
- la fixation d'azote représente de 3 à 16 % des apports en sels azotés dissous dans la lagune, et de 0,6 à 2,7 % de l'azote assimilé par les producteurs primaires.

Les exports d'azote sont encore mal connus. Ils sont de 2 types :

- l'export de sels nutritifs par les échanges tidaux : le volume oscillant du Bassin d'Arcachon est compris entre 200 et 400 millions de m<sup>3</sup> d'eau, mais seuls quelques pourcents sont renouvelés durant chaque marée (IFREMER 1997) ;

- l'export de biomasse de zostères : l'étude de l'hydrodynamique du bassin montre que les grands chenaux sont soumis à un effet de « chasse », c'est à dire que les vitesses des courants sont maximales lors du jusant (IFREMER 1997) ; ainsi, lors des périodes de dégénérescence des zostères, les forts courants de « vidange » peuvent entraîner les feuilles mortes à l'extérieur du bassin et des accumulations de débris de zostères ont été observées à plusieurs reprises sur le plateau continental voire en milieu abyssal dans le Golfe de Gascogne (Laubier & Sibuet 1979 ; Sorbe in press).

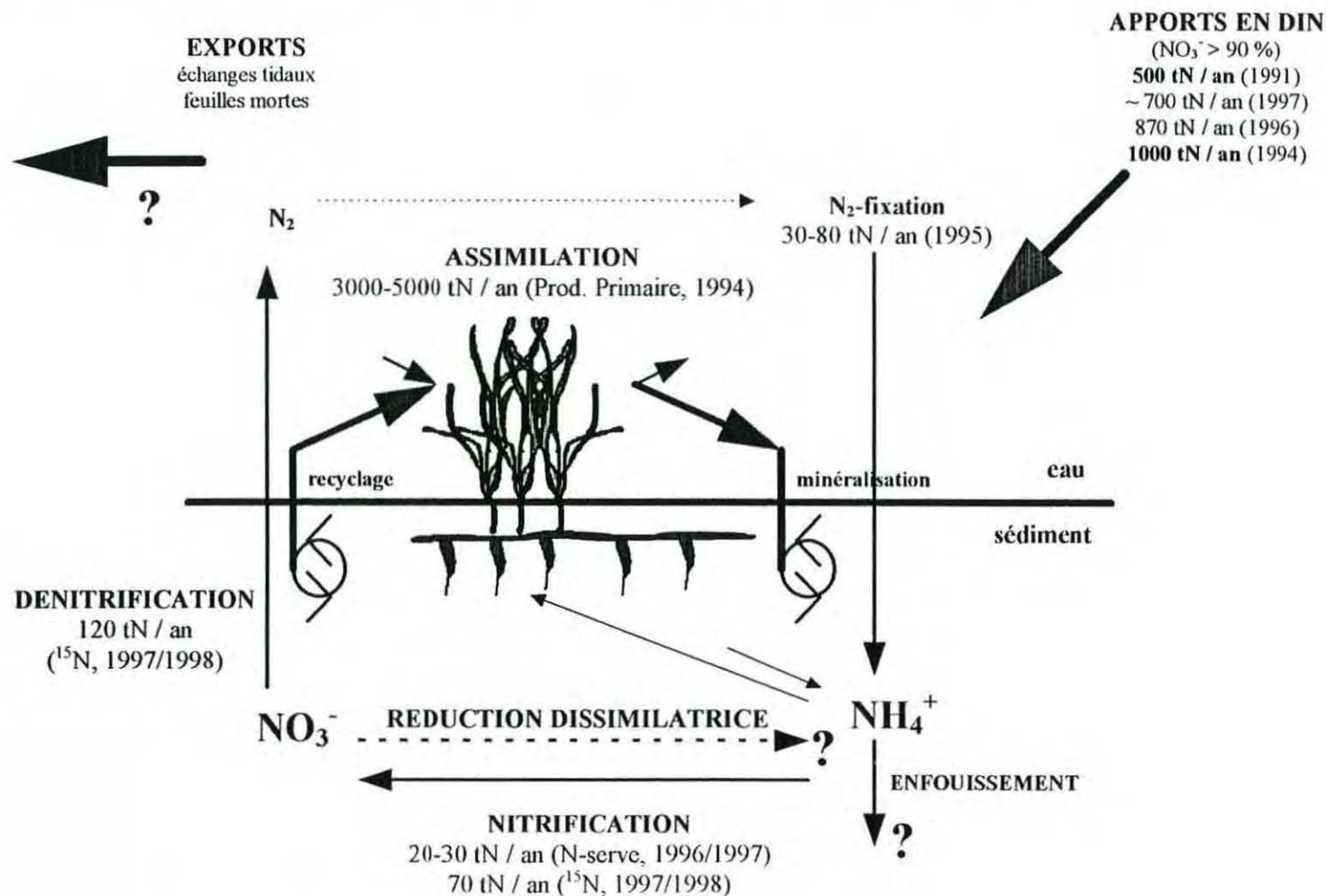
Enfin, les services techniques des municipalités du bassin opèrent un ramassage des zostères mortes déposées sur les plages lors de la saison estivale. L'estimation de la biomasse ainsi extraite du système semble difficile évaluer : si les volumes engagés sont connus, la part de matériel biologique qu'ils contiennent ne l'est pas.

De plus, le processus bactérien de réduction dissimilatrice des nitrates en ammonium reste à déterminer (Fig. 4). De nombreux groupes bactériens, dont les bactéries sulfatoréductrices, peuvent réduire les nitrates en ammonium (Tiedje 1988). Rysgaard *et al.* (1996) ont montré que la réduction dissimilatrice des nitrates en ammonium pouvait représenter 95 % de la réduction dissimilatrice des nitrates diffusant de la colonne d'eau. Aussi, à cause des fortes densités de populations de BSR dans les sédiments du Bassin d'Arcachon et parce que celles-ci ont une plus grande affinité pour les nitrates que les bactéries dénitrifiantes, il est possible que la réduction dissimilatrice des nitrates en ammonium soit un processus significatif.



Figure 4.

Bilan de masse des processus bactériens du cycle de l'azote et de la production primaire dans le Bassin d'Arcachon. D'après Auby 1991, Auby *et al.* 1994, Welsh *et al.* 1996, Rimmelin *et al.* 1998, Riou *et al.* soumis ; *Chapitre 3* ; Riou *et al.* in prep. ; *Chapitre 4*



### 3. CONCLUSION

Les taux de nitrification et de dénitrification sont faibles dans le Bassin d'Arcachon. Les taux mesurés pour les deux processus font parties des valeurs basses relevées dans la littérature (Chapitres 1 & 3). Ainsi, la dénitrification représente 12 à 24 % des apports en sels azotés du bassin alors qu'il est généralement reconnu que 30 à 60 % des nitrates apportés sont dénitrifiés dans les écosystèmes estuariens ou côtiers (Seitzinger 1988, Nixon *et al.* 1996).

Les mesures effectuées en été et en hiver sur 6 stations représentatives du système montrent que :

- en été, la nitrification benthique est la source majeure des nitrates alimentant la dénitrification ;
- en hiver, la dénitrification est soutenue par les nitrates diffusant de la colonne d'eau vers le sédiment.

L'impact des processus bactériens sur le cycle global de l'azote du bassin est donc faible comparativement aux apports externes azotés et à l'assimilation d'azote par les phanérogames marines.

### 4. PROSPECTIVES

Un suivi mensuel, sur un cycle annuel, des taux de dénitrification mesurés par la technique du «  $^{15}\text{N}$  isotope pairing » pourrait être envisagé. Le suivi serait appliqué à 4 stations-type : une dans un chenal subtidal, deux en zone intertidale dans l'herbier de zostères (l'une dans la partie externe du bassin, l'autre dans la partie interne), et une dans la Leyre.

Ces données pourraient ensuite être incorporées à un modèle mathématique (Blackburn 1990 ; Middelburg *et al.* 1996) prenant en compte : la dénitrification liée à la nitrification, la dénitrification des nitrates diffusant de la colonne d'eau, la consommation d'oxygène du sédiment, le taux de minéralisation, les apports en sels nutritifs. Ainsi, on pourrait évaluer l'impact à long terme d'une augmentation des apports en sels azotés.

L'impact des zones humides sur le cycle de l'azote du bassin devrait être pris en compte. En effet, en période de crue, de nombreuses zones du bassin sont inondées. La présence de macrophytes et de matière organique peut stimuler fortement la dénitrification. Aussi, il serait souhaitable de connaître l'écologie microbienne de ces zones humides afin d'évaluer si elles représentent une perte en azote pour l'écosystème.

Le processus bactérien de réduction dissimilatrice des nitrates en ammonium reste à évaluer. Une approche de terrain pourrait être envisagée par l'utilisation d'isotope lourd de l'azote,  $^{15}\text{NH}_4^+$  (Risgaard-Petersen & Rysgaard 1995). Parallèlement, en laboratoire, des études cinétiques pourraient être réalisées sur des souches de bactéries sulfatoréductrices du bassin.

L'estimation des exports est un problème crucial. Un suivi des concentrations en sels nutritifs dans les passes du bassin pourrait apporter quelques éléments de réponse. L'estimation des biomasses de feuilles de zostères mortes exportées du bassin pourrait être abordée par l'utilisation de pièges à particules disposés à l'extérieur du bassin. Cependant, l'exercice semble périlleux.



## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Auby I 1991. Contribution à l'étude des herbiers de *Zostera noltii* dans le Bassin d'Arcachon : dynamique, production et dégradation, macrofaune associée. Thèse Doct. Univ. Bordeaux 1, 162 pp.
- Auby I, Labourg, P-J 1996. Seasonal dynamics of *Zostera noltii* Hornem. in the bay of Arcachon (France). J. Sea Res. 35 : 269-277.
- Auby I, Manaud F, Maurer D, Trut G 1994. Etude de la prolifération des algues vertes dans le Bassin d'Arcachon. Rapport IFREMER - CEMAGREF - SABARC, 163 pp.
- Bedard C, Knowles R 1989. Physiology, biochemistry, and specific inhibitors of CH<sub>4</sub>, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, and CO oxidation by methanotrophs and nitrifiers. Microbiol. Rev. 53 : 68-84.
- Blackburn TH 1990. Denitrification model for marine sediment. In: Revsbech NP & Sørensen J (Ed) Denitrification in soil and sediment. Plenum Press, New York, pp. 323-331.
- Bodelier PLE, Libochant JA, Blom CWPM, Laanbroek HJ 1996. Dynamics of nitrification and denitrification in root-oxygenated sediments and adaptation of ammonia-oxidizing bacteria to low-oxygen or anoxic habitats. Appl. Environ. Microbiol. 62 : 4100-4107.
- Boyle CD, Patriquin DG 1981. Carbon metabolism of *Spartina alterniflora* Loisel in relation to that of associated nitrogen-fixing bacteria. New Phytol. 89 : 275-288.
- Capone DG 1988. Benthic nitrogen fixation. In : TH Blackburn, J Sørensen (Editors), Nitrogen cycling in coastal marine environments. J. Wiley and Sons, New York, pp. 85-123.
- Capone DG, Penhale PA, Oremland RS, Taylor BF 1979. Relationship between productivity and N<sub>2</sub> (C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>) fixation in the rhizosphere of *Thalassia testudinum*. Limnol. Oceanogr. 24 : 117-125.
- Guerrero MA, Jones RD 1996. Photoinhibition of marine nitrifying bacteria. I. Wavelength dependent response. Mar. Ecol. Prog. Ser. 141 : 183-192.

- Hansen JI, Henriksen K, Blackburn TH 1981. Seasonal distribution of nitrifying bacteria and rates of nitrification in coastal marine sediments. *Microb. Ecol.* 7 : 297-304.
- Henriksen K 1980. Measurement of *in situ* rates of nitrification in sediment. *Microb. Ecol.* 6 : 329-337.
- Henriksen K, Hansen JI, Blackburn TH 1981. Rates of nitrification, distribution of nitrifying bacteria, and nitrate fluxes in different types of sediment from Danish waters. *Mar. Biol.* 61 : 299-304.
- Henriksen K, Kemp WM 1988. Nitrification in estuarine and coastal marine sediments. In : TH Blackburn, J Sørensen (Editors), Nitrogen cycling in coastal marine environments. J. Wiley and Sons, New York, pp. 207-249.
- Herbert RA 1975. Heterotrophic nitrogen fixation in shallow estuarine sediments. *J. exp. Mar. Biol. Ecol.* 18 : 215-225.
- IFREMER 1997. Etude intégrée du Bassin d'Arcachon. 5 tomes, IFREMER/DEL Arcachon
- Jensen K, Revsbech NP, Nielsen LP 1993. Microscale distribution of nitrification activity in sediment determined with a shielded microsensor for nitrate. *Appl. Environ. Microbiol.* 59 : 3287-3296.
- Jones K 1982. Nitrogen fixation in the temperate estuarine intertidal salt marsh sediments of the river Lune. *Limnol. Oceanogr.* 22 : 814-832.
- Kemp WM, Sampou P, Caffrey J, Mayer M, Henriksen K, Boynton WR 1990. Ammonium recycling *versus* denitrification in Chesapeake Bay sediments. *Limnol. Oceanogr.* 35 : 1545-1563.
- Koops HP, Möller UC 1992. The lithotrophic ammonia-oxidizing bacteria, In : A Balows *et al.* (Editors), The prokaryotes. A handbook on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification, applications. 2nd Edition, vol. III, Springer Verlag, New York, pp. 2625-2637.



- Laubier L, Sibuet M 1979. Ecology of the benthic communities of the deep North East Atlantic. *Ambio Special Report 6* :37-42.
- Lohse L, Malschaert JFP, Slomp CP, Helder W, van Raaphorst W 1993. Nitrogen cycling in the North Sea sediments: interaction of denitrification and nitrification in offshore and coastal areas. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 101 : 283-296.
- Middelburg JJ, Soetaert K, Herman PMJ, Heip CHR (1996) Denitrification in marine sediments : a model study. *Global Biogeochem Cycles* 10 :661-673
- Nielsen LP 1992. Denitrification in sediment determined from nitrogen isotope pairing. *FEMS Microbiol. Ecol.* 86 : 357-362.
- Nixon SW, Ammerman JW, Atkinson LP, Berounsky VM, Billen G, Boicourt WC, Boynton WR, Church TM, Ditoro DM, Elmgren R, Garber JH, Giblin AE, Jahnke RA, Owens NJP, Pilson MEQ, Seitzinger SP 1996. The fate of nitrogen and phosphorus at the land-sea margin of the North Atlantic Ocean. *Biogeochem.* 35 : 141-180.
- O'Donohue MJ, Moriarty DJW, MacRae IC 1991. Nitrogen fixation in sediments and the rhizosphere of the seagrass *Zostera capricornia*. *Microb. Ecol.* 22 : 53-64.
- Rimmelin P, Dumon J-C, Maneux E, Gonçalves A in press. Study of annual and seasonal dissolved inorganic nitrogen inputs into the Arcachon lagoon, Atlantic coast (France). *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 47.
- Risgaard-Petersen N, Rysgaard S 1995. Nitrate reduction in sediments and waterlogged soil measured by <sup>15</sup>N techniques. In : Alef K, Nannipieri P (ed) *Methods in applied soil microbiology and biochemistry*. Academic Press, London, pp. 287-295.
- Rowe R, Todd R, Waide J 1977. Microtechnique for most probable number analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 33 : 675-680.



- Rysgaard S, Risgard-Petersen N, Sloth NP 1996. Nitrification, denitrification, and nitrate ammonification in sediments of two coastal lagoons in Southern France. *Hydrobiologia* 329 :133-141.
- Seitzinger SP 1988. Denitrification in freshwater and coastal marine ecosystems: Ecological and geochemical significance. *Limnol. Oceanogr.* 33 : 702-724.
- Sorbe JC in press. Deep-sea macrofaunal assemblages within the Benthic Boundary Layer of the Cap-Ferret Canyon (Bay of Biscay, NE Atlantic). *Deep Sea Res II*
- Stewart WDP, Fitzgerald GP, Burris RH 1967. *In situ* studies of N<sub>2</sub> fixation using the acetylene reduction technique. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 58 : 2071-2078.
- Thompson SP, Paerl HW, Go MC 1995. Seasonal patterns of nitrification and denitrification in a natural and restored salt marsh. *Estuaries* 18 : 399-408.
- Tiedje JM 1988. Ecology of denitrification and dissimilatory nitrate reduction to ammonium. In: Zehnder AJB (Ed) *Biology of anaerobic microorganisms* Wiley J & Sons Press, New York, pp. 179-244.
- Verhagen FJM, Laanbroek HJ 1991. Competition for ammonium between nitrifying and heterotrophic bacteria in dual energy-limited chemostats. *Appl. Environ. Microbiol.* 57 : 3255-3263.
- Ward BB 1986. Nitrification in marine environments. In : JI Prosser (Editor). *Nitrification*, IRL Press, Oxford, pp. 157-184.
- Welsh DT, Bourguès S, De Wit R, Herbert RA 1996. Seasonal variation in rates of heterotrophic nitrogen fixation (acetylene reduction) in *Zostera noltii* meadows and uncolonised sediments of the Bassin d'Arcachon, south-west France. *Hydrobiol.* 329 : 161-174.

## Annexe

Calculs des taux de dénitrification dans le Bassin d'Arcachon. Dt<sub>tot</sub> = dénitrification totale, D<sub>n</sub> = dénitrification liée à la nitrification, été = 5 136 h, hiver = 3624 h. D'après Riou *et al.* in prep. ; *Chapitre 4*

Stations	Dt <sub>tot</sub> (Obscurité, $\mu\text{mol m}^{-2} \text{h}^{-1}$ )		Dt <sub>tot</sub> (Lumière, $\mu\text{mol m}^{-2} \text{h}^{-1}$ )		Dt <sub>tot</sub> (ETE, $\mu\text{mol m}^{-2}$ )	Dt <sub>tot</sub> (HIVER, $\mu\text{mol m}^{-2}$ )	Dt <sub>tot</sub> ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{an}^{-1}$ )	Superficie ( $\text{km}^2$ )	Dt <sub>tot</sub> ( $\mu\text{mol an}^{-1}$ )	Dt <sub>tot</sub> (TN $\text{an}^{-1}$ )
	Eté	Hiver	Eté	Hiver						
Station A	5,16	4,41	5,14	34,49						
Station B	74,74	2,75	4,76	2,38						
<b>Z. noltii</b>	<b>39,95</b>	<b>3,58</b>	<b>4,95</b>	<b>18,44</b>	<b>57651,6</b>	<b>19945,6</b>	<b>77597,2</b>	<b>70,0</b>	<b>5,43E+12</b>	<b>76,05</b>
Courant	7,54	5,65								
Courbey	4,49	6,96								
<b>Chenaux</b>	<b>6,02</b>	<b>6,31</b>			<b>30893,0</b>	<b>32382,5</b>	<b>63275,5</b>	<b>40</b>	<b>2,53E+12</b>	<b>35,43</b>
Tuiles	13,27	53,43	0,56	53,49						
<b>Delta Leyre</b>	<b>13,27</b>	<b>53,4</b>	<b>0,56</b>	<b>53,5</b>	<b>17757,7</b>	<b>96869,5</b>	<b>114627,2</b>	<b>7,5</b>	<b>8,60E+11</b>	<b>12,04</b>
<b>BASSIN</b>					<b>75,66</b>	<b>47,85</b>				<b>123,52</b>
					%	61	39			
Stations	D <sub>n</sub> (Obscurité, $\mu\text{mol m}^{-2} \text{h}^{-1}$ )		D <sub>n</sub> (Lumière, $\mu\text{mol m}^{-2} \text{h}^{-1}$ )		D <sub>n</sub> (ETE, $\mu\text{mol m}^{-2}$ )	D <sub>n</sub> (HIVER, $\mu\text{mol m}^{-2}$ )	D <sub>n</sub> ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{an}^{-1}$ )	Superficie ( $\text{km}^2$ )	D <sub>n</sub> ( $\mu\text{mol an}^{-1}$ )	D <sub>n</sub> (TN $\text{an}^{-1}$ )
	Eté	Hiver	Eté	Hiver						
Station A	5,16	0,00	5,14	3,25						
Station B	72,39	0,00	3,34	0,10						
<b>Z. noltii</b>	<b>38,78</b>	<b>0,00</b>	<b>4,24</b>	<b>1,68</b>	<b>55231,3</b>	<b>1517,6</b>	<b>56748,8</b>	<b>70,0</b>	<b>3,97E+12</b>	<b>55,61</b>
Courant	4,16	0,26								
Courbey	4,31	2,1								
<b>Chenaux</b>	<b>4,24</b>	<b>1,18</b>			<b>21751,0</b>	<b>6060,5</b>	<b>27811,4</b>	<b>40</b>	<b>1,11E+12</b>	<b>15,57</b>
Tuiles	5,79	0	0	0						
<b>Delta Leyre</b>	<b>5,79</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>7434,4</b>	<b>0,0</b>	<b>7434,4</b>	<b>7,5</b>	<b>5,58E+10</b>	<b>0,78</b>
<b>BASSIN</b>					<b>67,09</b>	<b>4,88</b>				<b>71,97</b>
					%	93	7			