

44

TRANSFERT ET MINÉRALISATION DE LA MATIÈRE ORGANIQUE AZOTÉE A TRAVERS LES DEUX PREMIERS ECHELONS DE LA MICRO COMMUNAUTÉ HÉTÉROTROPHE

F. VAN WAMBEKE et M. BIANCHI

Microbiologie Marine. E.R. 223 C.N.R.S. Université de Provence, 3, place Victor-Hugo. 13331 MARSEILLE Cedex 3 (FRANCE)

RÉSUMÉ - Des systèmes expérimentaux non renouvelés (350 litres) ont servi à étudier la réponse bactérienne à des enrichissements en azote minéral (NH_4^+) ou organique (acides aminés). Les expériences réalisées montrent que l'utilisation de l'azote organique par le compartiment bactérien aboutit à une reminéralisation importante de l'ammoniaque, partiellement justifiée par les relations entre le rapport C/N du substrat et celui de la bactérie et par les besoins énergétiques de la bactérie en croissance. Lors des phénomènes de broutage des bactéries par les microflagellés hétérotrophes, la reminéralisation de l'azote organique s'accélère. Le rôle de cet échelon est donc aussi important dans les transferts d'azote du compartiment organique vers le compartiment minéral.

Mots clés : bactérie, micro-prédateur, azote, minéralisation, rapport C/N.

ABSTRACT - Bacterial response to organic (amino acids) or inorganic (NH_4^+) nitrogen was studied in 350 liter closed batch systems. The experiments demonstrate an important NH_4^+ remineralization associated with bacterial growth. The differences between substrate and bacterial C/N ratios and bacterial metabolic demands partly explain the high values of ammonia produced.

Grazing by heterotrophic microflagellates resulted in an important release of NH_4^+ . This suggests an important role of grazers for the nitrogen remineralization in natural waters.

Key words : bacteria, micro-flagellate, nitrogen, regeneration, C/N ratio.

INTRODUCTION

L'étude de la minéralisation aérobie des acides aminés dans le milieu marin est un exemple d'approche permettant de mieux cerner les flux d'azote existant au niveau des premiers échelons hétérotrophes de la chaîne alimentaire.

Un des moyens d'approche de cette étude est de constituer des systèmes expérimentaux non renouvelés, enrichis par une source d'azote minérale (NH_4^+) ou organique (AA). L'utilisation d'une stratégie d'échantillonnage adaptée à la rapidité des réponses bactériennes (pas d'échantillonnage serré), combinée à une durée expérimentale d'une dizaine de jours permettent de distinguer la réponse bactérienne de la réponse des micro-prédateurs bactériens, ces deux communautés étant impliquées dans les flux d'azote à partir de la source initiale de matière organique dissoute.

C'est dans de tels systèmes que nous avons établi, à partir des valeurs de comptages en épifluorescence, de dosages d'azote minéral et des rapports C/N des éléments particuliers ; les rendements de transfert d'azote via les fluctuations de la biomasse, le phénomène de prédation et la régénération d'ammonium à partir de la matière organique dissoute.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

De l'eau de mer oligotrophe prélevée dans le golfe de Marseille est divisée en trois bacs de 350 litres chacun. Les bacs sont enrichis de la façon suivante au temps 0 :

- bac dit "enrichi" reçoit $30 \mu\text{g}$ at N.l^{-1} en acides aminés (hydrolysate de caséine).
- bac dit "contrôle" reçoit $30 \mu\text{g}$ at $\text{N-NH}_4.\Gamma^{-1}$,
- bac "témoin" ne reçoit rien.

Ces bacs dans lesquels l'eau n'est pas renouvelée pendant les 10 jours de l'expérience sont aérés par un bullage assurant une teneur en oxygène à saturation.

Bactéries et micro-prédateurs sont comptés en épifluorescence, selon la technique de Hobbie *et al.* (1977). Les volumes bactériens sont estimés, d'après des photographies prises lors des comptages en épifluorescence, à partir de la mesure de la longueur (l) et de la largeur (w) des bactéries :

$\text{vol} = 3.14 (w^2 l / 4 - w^3 / 12)$ Krambeck *et al.*, 1981.

Le volume du flagellé micro-prédateur est estimé à partir d'une représentation sphérique de la cellule.

Des coefficients de conversion permettent de calculer le carbone bactérien : C-bactérien = comptages directs \times vol \times densité \times rapport carbone/poids sec, avec la densité $10^{-9} \text{ mg}.\mu\text{m}^{-3}$, et le rapport C/PS 0.1.

Carbone et azote particulaire sont estimés par dosage sur analyseur CHN Perkin-Elmer des particules retenues sur filtre Whatman GF/C. Les sels minéraux sont dosés suivant les techniques de Strickland et Parsons (1968). L'activité hétérotrophe est mesurée par incubation d'une heure à l'obscurité en présence de ^{14}C amino acides. La fraction assimilée est mesurée par filtration sur $0.2 \mu\text{m}$, la fraction minéralisée est piégée sur filtres Whatman imbibés de phényl-éthylamine (Van Wambeke et Bianchi, 1985).

Les taux de croissance des bactéries et des flagellés sont calculés à partir de la partie exponentielle des courbes de croissance (régression linéaire). Les nombres moyens de flagellés et de bactéries utilisés pour calculer les vitesses de minéralisation pendant la phase exponentielle sont estimés compte tenu du temps de doublement de la population. Pendant l'intervalle de temps $dt = t_f - t_0$: $N \text{ moyen} = (N_t - N_0) / (1 - N_t - 1 - N_0)$, (Sherr *et al.*, 1983).

RÉSULTATS DISCUSSION

Malgré une température moyenne de 10°C , les 10 jours d'expérimentation ont permis d'observer une succession hétérotrophe. Le pic de bactéries s'observe 2 jours après le début de l'expérimentation, avec des maxima de 30.0^6 , 7.10^6 et 5.10^6 bactéries ml^{-1} et des taux de croissance, estimés à partir de comptages directs, de 0.074 , 0.03 et 0.064 h^{-1} pour les bacs enrichis (AA), de contrôle (NH_4^+) et témoin, respectivement. La croissance des micro-prédateurs s'observe dès le 5^e jour (fig.1).

Le taux de croissance des micro-prédateurs est estimé à partir des comptages directs à 0.074 h^{-1} (corrélation 0.96 sur 5 points); soit, pour une aussi courte période, une croissance aussi rapide que celles des bactéries.

Pendant cette période de croissance des flagellés, le taux de broutage diminue progressivement de 12 à 0.7 bactéries ingérées par flagellé et par heure.

Le rendement volumique du transfert bactéries - flagellés est exprimé d'après les estimations des volumes moyens et des maxima des nombres bactériens et de flagellés, en dehors

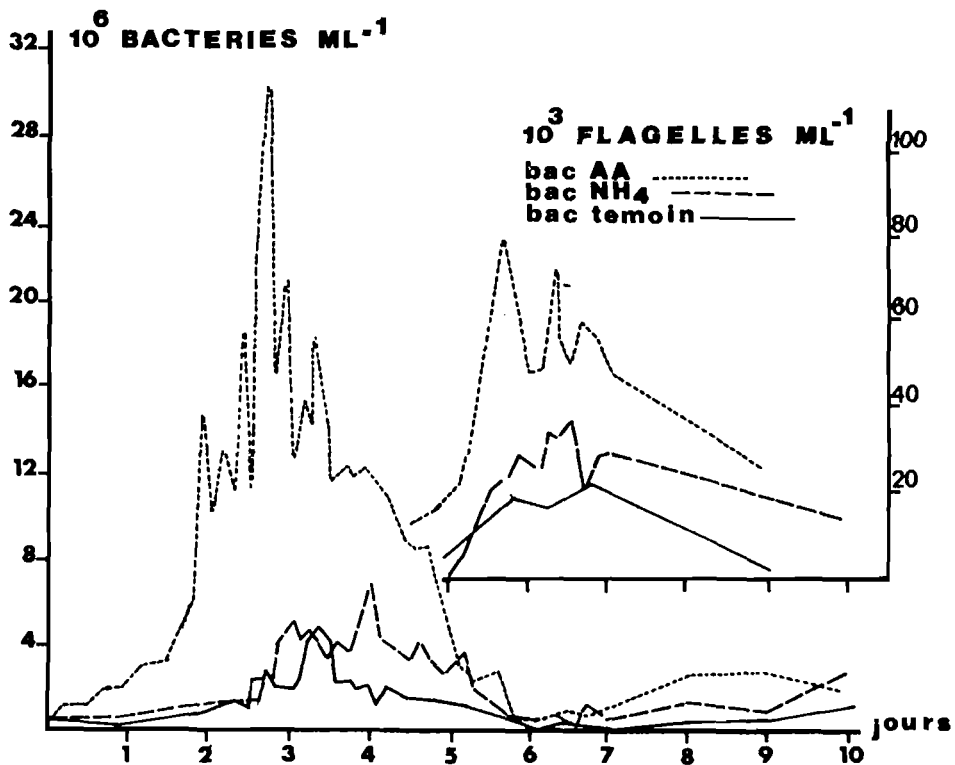


Figure 1 : Comptages directs des bactéries et des micro-flagellés.

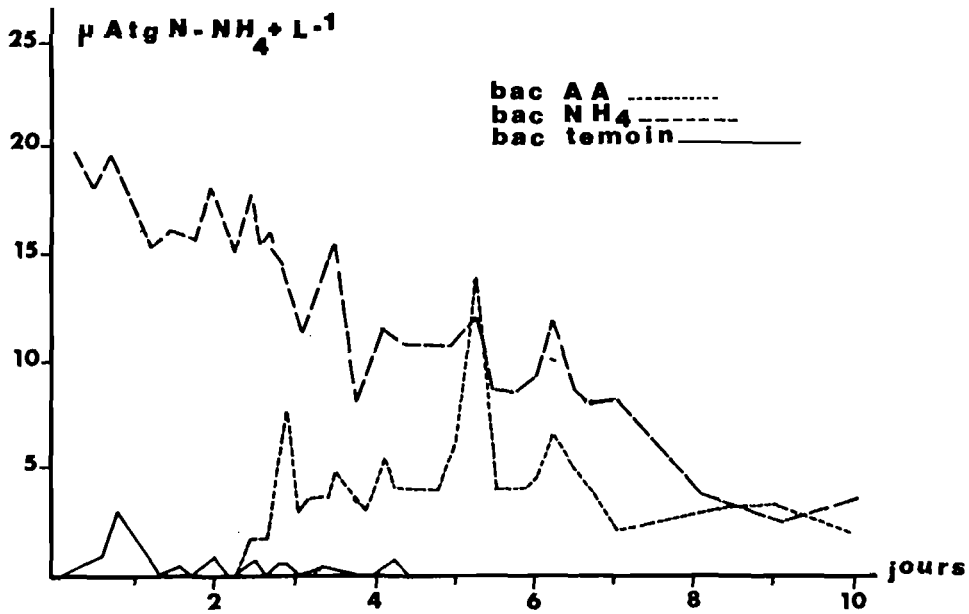


Figure 2 : Production d'ammonium dans les trois bacs.

de toute information concernant les rapports poids humide- carbone- azote des flagellés et le taux de mortalité de ceux-ci. Il est de $80.10^3 \times 8,7 / 30.10^6 \times 0,1 = 23 \%$, valeur inférieure à celle de 30 % citée par Fenchel (1982). Un bilan en carbone proposé par Newell *et al.*(1981) donnerait des valeurs encore plus faibles (12 %).

Lors de cette expérience, le rapport C/N de la matière particulaire présente dans les bacs est de 17. Il témoigne d'une matière particulaire peu dégradée. La diminution à 7-8 de ce rapport C/N dans les trois bacs (tab.1), montre nettement que la matière particulaire s'enrichit rapidement en azote au cours de sa colonisation et de sa dégradation par les bactéries (Fenchel et Jorgensen, 1977).

temps (jours)	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
bac témoin (non enrichi)	16.9	13.9	10.5	9.2	8.1	8.5	8.9	8.9	8.6	13.4	12.3
bac contrôle (NH ₄ ⁺)		13.7	13	9.7	9.1	7.9	8.4	8.3	8.4	9.8	7.9
bac enrichi		10.7	9.3	7.8	7.5	7.2	7.8	7.5	7.5	7.7	7.6

Tableau 1 : Rapports C/N de la matière organique particulaire dans les 3 bacs.

Dans le bac enrichi en AA la matière organique dissoute introduite (hydrolysate de caséine) possède un rapport C/N moyen de 4. Dans ce bac, la communauté bactérienne métabolise le substrat le plus accessible (les AA dissous), et excrètent du NH₄⁺ (fig.2). Les AA sont en effet un substrat préférentiel pour les bactéries, représentant un composé organique aisément assimilable. Par contre, dans le bac de contrôle, la matière organique disponible par les communautés bactériennes est la matière particulaire à fort rapport C/N. Son assimilation aboutit à un besoin en azote (NH₄⁺) qui est soustrait du compartiment minéral.

Si l'acide aminé est dégradé suivant les voies cataboliques à des fins énergétiques, il est d'abord désaminé (désamination oxydative), puis décarboxylé via le cycle de Krebs. Les réactions de décarboxylation des acides aminés, aboutissant à la formation d'amines primaires, sont beaucoup plus rares dans le métabolisme.

Deux facteurs importants régissent donc la quantité de NH₄⁺ libérée par des communautés disposant d'acides aminés comme substrat.

Le premier facteur est le rendement d'assimilation en carbone des AA. Tous les AA qui sont destinés à être minéralisés en CO₂ passent par le cycle de Krebs, ils sont donc d'abord désaminés. On peut penser qu'il existe un rapport constant entre le CO₂ minéralisé et le NH₄⁺ d'origine "respiratoire".

Le second facteur est la relation entre le C/N du substrat et le rapport C/N bactérien. L'excrétion d'azote minéral sera d'autant plus importante que l'acide aminé possède un rapport C/N faible (jusqu'à 1,5/1 pour l'arginine). Mais en postulant que le mélange d'AA proposé est utilisé de façon homogène (pas de choix de certains acides aminés), un rapport C/N de 4 pour le substrat correspond à celui de la bactérie.

Lors des maxima bactériens, le nombre de bactéries par ml, le volume moyen cellulaire, le rapport C/N estimé à 4, permettent de calculer l'azote bactérien. Si l'on tient compte des pourcentages de respiration des acides aminés, déterminés par les traceurs radioactifs, les acides aminés ayant pénétré dans les cellules bactériennes (uptake) peuvent être calculés :

uptake AA = N bactérien x 100/A, A représentant la fraction assimilée.

De même, on peut calculer les quantités théoriques de NH_4^+ qui devraient être libérées dans ces conditions :

N rejeté = (uptake N-AA x R/100), R étant la fraction respirée. A titre comparatif, ces mêmes calculs ont été effectués au cours de deux autres expériences avec des enrichissements en acides aminés différents (tab.2).

expérience	maxima bactériens (bactéries.ml ⁻¹)	volume bactérien moyen (μm ³)	% de respiration sur acides aminés	enrichissement initial en AA (μg at N.l ⁻¹)
juin 1981	40.10 ⁶	0.25	40	100
janvier 1982	30.10 ⁶	0.1	30	30
juin 1983	24.10 ⁶	0.2	40	100
expérience	N bactérien calculé (μg at N.l ⁻¹)	N uptake correspondant (μg at N.l ⁻¹)	N-NH ₄ ⁺ minéralisé correspondant (μg at N.l ⁻¹)	N-NH ₄ ⁺ observé en réalité (μg at N.l ⁻¹)
juin 1981	17.8	29.7	11.9	50
janvier 1982	5.3	7.6	2.3	8
juin 1983	8.6	14.3	5.7	30

Tableau 2 : Eléments de calcul d'excrétion d'ammonium par les bactéries.

Plusieurs raisons expliquent les faibles valeurs des calculs théoriques par rapport à la réalité observée. En premier lieu, les calculs dérivent directement de la valeur du rapport C/N bactérien. Or, les chiffres relevés varient suivant les auteurs : ainsi, si des valeurs inférieures à 4 sont citées par Fukami *et al.* (1981), d'autres sont voisines de 5 (Fenchel et Blackburn, 1977) ou de 6 (Fenchel et Jorgensen, 1977 ; Hollibaugh, 1978). Des rapports C/N supérieurs à 4 justifieraient une excrétion d'ammoniaque encore plus importante due au maintien du rapport C/N bactérien.

Par ailleurs, pour ces calculs, on admet le postulat de la constance en qualité des acides aminés lors de l'assimilation d'un mélange de ceux-ci. Or, la phase de latence nécessaire à l'excrétion du NH_4^+ dépend, d'une façon générale, de la facilité d'entrée de la molécule dans le cycle de Krebs (nombre de réactions intermédiaires) et des vitesses de ces réactions enzymatiques. Cette phase de latence varie suivant la nature de l'acide aminé proposé, comme l'a montré Hollibaugh, (1978). Ce qu'il appelle la "lag period", définie entre le moment où l'acide aminé est introduit et où la moitié de l'azote régénéré en NH_4^+ est excrétée, voit sa durée varier de 2 j 1/2 (arginine) à 5 j 1/2 (tryptophane), dans une eau à 10°C, d'ou des assimilations plus ou moins rapides suivant l'acide aminé (Amano *et al.*, 1982, Iturriaga et Zsolnay, 1981).

Enfin, l'augmentation des possibilités d'utilisation des acides aminés (comme seule source de carbone et d'énergie) et d'autres familles de composés traduit la sélection bactérienne. Au cours du temps, un pourcentage croissant de bactéries hétérotrophes est capable d'utiliser les AA et entraîne un accroissement de la minéralisation de l'azote.

Le $N-NH_4^+$ excrété par les bactéries étant inférieur à celui effectivement dosé dans le milieu, on peut aussi penser à une autre voie d'introduction du NH_4^+ dans le milieu marin qui est l'excrétion par le microzooplancton. Des travaux récents ont révélé que c'est la fraction 45-200 μm , correspondant surtout aux copépodes juvéniles, rotifères et flagellés (Caperon *et al.*, 1979; Paashe et Kristiansen, 1982) qui produit la plupart du NH_4^+ excrété par le plancton.

Un pic de NH_4^+ à 8 μg at $N.l^{-1}$ est effectivement observé lors de la poussée des flagellés.

Dans ces conditions, une quantité importante de matière organique particulaire (féces) et dissoute (excrétats) doit profiter à nouveau aux communautés bactériennes. Ceci se traduit par une activité hétérotrophe assimilatrice importante pendant la deuxième phase de 5 à 10 jours de l'expérience, les pourcentages de respiration des acides aminés restant aux alentours de 5-10 %. L'augmentation de cette activité correspond à la recolonisation des substrats physiques libérés lors du broutage des bactéries (Fenchel et Jorgensen, 1977).

Cette activité hétérotrophe, en effet, ne peut être imputable qu'aux bactéries, les capacités d'assimilation de matière organique dissoute par les flagellés n'étant détectables qu'à partir de concentrations en substrat bien supérieures à celles utilisées ici pour les enrichissements ou les mesures d'activité hétérotrophe par traceurs radioactifs (Fenchel et Blackburn, 1979).

Afin de rendre comparable les valeurs des activités minéralisatrices des bactéries et celles en présence des prédateurs, celles ci sont calculées en ramenant au poids sec : soit respectivement 2.5 et 10 μg at $N-NH_4^+$.mg $PS^{-1}.h^{-1}$ pour les bactéries et les flagellés (tab.3), dans ces conditions optima. Les périodes de temps considérées dans ces calculs correspondent aux pics de production d'ammonium et considèrent que toute l'activité minéralisatrice est due, lors du premier pic aux bactéries, et lors du second pic aux flagellés, faute d'information sur les taux d'excrétion relatifs de ces deux groupes d'organismes.

période de temps considérée	nombre de cellules moyenne extrapolée N	NH_4^+ minéralisé	volume moyen cellulaire	NH_4^+ excrété /cell./heure	NH_4^+ excrété /mg poids sec/heure
	bactéries.ml ⁻¹	μg at $N.l^{-1}$	μm^3	μg at N /bact./h	μg at N /mg PS/h
de 2j 6 h à 2j 21-h 15 heures	1 10 ⁶ 30 10 ⁶ N = 8.5 10 ⁶	0 8	0.1	6.2 10 ⁻¹¹	2.7
	flagellés.ml ⁻¹	μg at $N.l^{-1}$	μm^6	μg at N /flagellé/h	μg at N /mg PS/h
de 4j 18 h à 5j 6 h 12 heures	13.8 10 ³ 80 10 ³ N + 37.6.10 ³	4 13.8	8.7	2.2 10 ⁻⁸	10

Tableau 3 : Eléments de calcul des taux de production d'ammonium par les deux communautés hétérotrophes.

Dans ces conditions, les microflagellés hétérotrophes constituent le maillon intermédiaire de la chaîne alimentaire pélagique entre ces bactéries et les autres micro-prédateurs, et joueraient un rôle minéralisateur aussi important que celui des bactéries en favorisant la régénération du NH_4^+ .

-
- AMANO M., HARA S. & TAGA N., 1982. Utilization of Dissolved Amino Acids in Sea Water by Marine Bacteria. *Mar. Biol.* 68 : 31-36.
- CAPERON J., SCHELL D., HIROTA J. & LAWS E., 1979. Ammonium Excretion Rates in Kaneohe Bay, Hawaiï, Measured by an ¹⁵N Isotope Technique. *Mar. Biol.*, 54 : 33-40.
- FENCHEL T., 1982. Ecology of Heterotrophic Microflagellates. IV Bioenergetics and Growth. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 8 : 225-231.
- FENCHEL T.M. & JORGENSEN B.B., 1977. Detritus food chain of aquatic ecosystems : The role of bacteria in *Advances in Microbial Ecology*, M. Alexander, Ed, New york, pp 1-49.
- FENCHEL T. & BLACKBURN T.H., 1979. Bacteria and Mineral Cycling. *Academic Press*, London.
- FUKAMI K., SIMIDŪ U. & TAGA N., 1981. A Microbiological Study on the Decline Process of a Phytoplankton Bloom in Aburatsubo Inlet, Kanagawa, Japan. *Bull. Plankton Soc. Japan*, 28 : 33-41.
- HOBBIE J.E., DALEY R.J. & JASPER S., 1977. Use of Nuclepore Filters for Counting Bacteria by Fluorescence Microscopy. *Applied and Environmental Microbiology* 37(5) : 805-812.
- HOLLIBAUGH., 1978. Nitrogen Regeneration during the degradation of several amino acids by plankton communities collected near Halifax, Nova Scotia, Canada. *Mar. Biol.*, 45 : 191-201.
- ITURRIAGA R. & ZSOLNAY., 1981. Transformation of Some Dissolved Organic Compounds by a Natural Heterotrophic Population. *Mar. Biol.*, 62 : 125-129.
- KRAMBECK C., KRAMBECK K.H. & OVERBECK J., 1981. Microcomputer assisted Biomass Determination of Plankton Bacteria on Scanning Electron Micrographs. *Applied and Environmental Microbiology* 42(1) : 142-149.
- NEWELL R.C., LUCAS M.L. & LINLEY E.A.S., 1981. Rate of Degradation and Efficiency of Conversion of Phytoplankton Debris by Marine Microorganisms. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 6 : 123-136.
- PAASHE E., & KRISTIANSEN S., 1982. Ammonium Regeneration by Microzooplankton in the Oslofjord. *Mar. Biol.*, 69 : 55-63.
- STRICKLAND J.D.H. & PARSONS T.R., 1968. A Practical Handbook of Sea-Water analysis. *Bull. Fish. Res. Board. Canada.*, Ottawa. Bull no 168.
- VAN WAMBEKE F. ET BIANCHI M., 1985. Bacterial biomass production and ammonium regeneration in mediterranean sea water supplemented with amino acids. I. Correlations between bacteria biomass, bacterial activities and environmental parameters. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 23 : 107-115.