

34

NITRIFIANTS AUTOTROPHES ET HÉTÉROTROPHES EN ZONE LITTORALE ET ESTUARIENNE

G. MEVEL et S. CHAMROUX

Station Biologique de Roscoff, place Georges-Teissier, ROSCOFF (FRANCE)

RÉSUMÉ - La nitrification est étudiée du point de vue bactérien dans l'eau et le sédiment d'un estuaire et son débouché en mer. Pour se faire, nous nous intéressons à l'importance des populations de nitrifiants autotrophes et hétérotrophes (dénombrements des organismes par la méthode des MPN sur plaques à microtitration), puis nous étudions le pouvoir nitrifiant de quelques organismes bactériens en culture pure (autotrophes et hétérotrophes). Les résultats concernant les dénombrements montrent que les populations nitrifiantes quelles qu'elles soient (autotrophes, hétérotrophes, pélagiques ou benthiques), diminuent avec l'éloignement des côtes et sont beaucoup moins nombreuses dans l'eau que dans les sédiments sous-jacents. On voit également que les nitrifiants hétérotrophes sont toujours plus nombreux que les autotrophes. Le rapport hétérotrophes/autotrophes est de 100 dans l'estuaire et de 10 dans la zone sub-littorale. Si les hétérotrophes sont plus importants en terme d'effectifs, les études physiologiques montrent que l'activité nitrifiante des hétérotrophes est 10^4 fois plus faible que celle des autotrophes. Tenant compte de ces différentes données, (densité des populations et activité cellulaire), l'importance relative des deux types de nitrification autotrophe et hétérotrophe, est discutée.

Mots-clés : nitrification, littoral, estuaire, autotrophie, hétérotrophie.

ABSTRACT - This study concerns bacterial nitrification in a small estuary and its outlet. Both autotrophic and heterotrophic nitrifiers were studied. Sediment and water samples were examined for the presence of nitrifiers using an MPN microtechnique. Several isolates were examined in pure culture for specific nitrifying activity. The numbers of both autotrophs and heterotrophs, whether benthic or pelagic, decreased the nearer one got the sea-outlet and were much more abundant in the sediment than in the water; heterotrophic nitrifiers were much more abundant than autotrophic types. The ratio of heterotrophs to autotrophs was 100 : 1 in the estuary but only 10 : 1 in the sub-littoral zone. Although less numerous, laboratory experiment showed that the nitrifying activity of the autotrophs was some $\times 10^4$ greater than that of the heterotrophs: the significance of population sizes and specific activities are discussed.

Key-words : nitrification, marine ecosystem, estuary, autotrophy, heterotrophy.

INTRODUCTION

La présence d'azote oxydé dans les sédiments estuariens et côtiers s'explique par des apports terrigènes plus ou moins importants mais aussi par l'activité nitrifiante du biotope (Billen, 1975 et 1976; Koike et Hattori, 1978). Dans cette étude nous nous intéressons à deux écosystèmes littoraux situés sur les côtes nord-ouest françaises, à l'entrée de la Manche (fig.1) : un site estuarien (étage intertidal) où l'eau atteint une profondeur de 3 à 4 mètres à marée haute et dont le sédiment est constitué d'une vase eutrophe où seuls les premiers mm sont oxydés, et un site marin appartenant à l'étage infralittoral, qui est caractérisé par une profondeur d'eau de 15 à 20 mètres et par un sable fin, oligotrophe et bien oxydé sur 5 à 10 cm. Ces deux biotopes sont caractérisés par les teneurs en azote minéral suivantes : 240 μ moles de NH_4 et 840 μ moles de N-oxydé/litre d'eau interstitielle dans le sédiment estuarien et 125 μ moles de NH_4 et 205 μ moles de

N-oxydé/litre d'eau interstitielle dans le sable infralittoral. Ces valeurs sont des teneurs moyennes, calculées sur une année (20 mesures). Comparativement aux données généralement rencontrées dans la littérature (Billen, 1976 ; Hoike et Hattori, 1978 ; Henriksen *et al.*, 1981 ; Kaspar, 1982 ; Helder et de Vries, 1983), ces teneurs sont très élevées et particulièrement l'azote oxydé dont plus de 70 % est sous forme de nitrate. Dans ces biotopes côtiers, certes soumis à d'importants apports terrigènes, il est donc intéressant d'étudier l'impact de la nitrification dans l'eutrophisation du milieu par les nitrates.

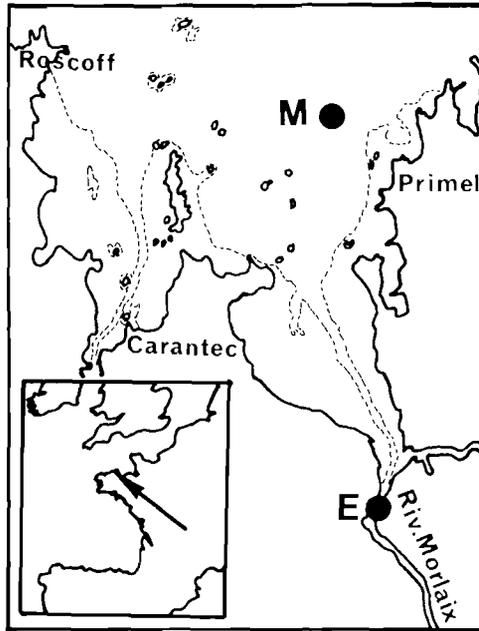


Figure 1 : Localisation des sites d'étude (E : site estuarien ; M : site marin de l'étage infralittoral).

La nitrification est un métabolisme bactérien qui permet la conversion de l'azote inorganique ou organique, d'un état réduit à un état plus oxydé. Elle est réalisée par deux groupes d'organismes : des bactéries autotrophes dont les principales espèces sont *Nitrosomonas* et *Nitrobacter*, et par certains micro-organismes hétérotrophes (Eylar et Schmidt, 1959 ; Verstraete, 1975). Bien qu'il soit classiquement reconnu que la nitrification est principalement assurée par les organismes autotrophes, des études réalisées dans les dernières décennies, suggèrent que la nitrification hétérotrophe pourrait être plus importante que ce qui était supposé jusqu'à présent (Laurent, 1971 ; Gode et Overbeck, 1972 ; Verstraete et Alexander, 1973). En effet, dans de nombreux biotopes, la faible activité nitrifiante des hétérotrophes pourrait être compensée par leur nombre très important (Verstraete, 1975). Dans les biotopes qui font l'objet de cette étude, les taux de matière organique disponible étant importants, nous nous proposons d'étudier en parallèle les organismes autotrophes et hétérotrophes qui interviennent dans la première étape de la nitrification (oxydation de NH_4 en HO_2). L'estimation du niveau des peuplements de ces différents nitrifiants ainsi que le calcul de leur activité spécifique nous permettront au terme de cette étude, d'évaluer la part relative de l'autotrophie et de l'hétérotrophie dans la nitrification.

RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

Évaluation des peuplements d'organismes nitrifiants

Le niveau des peuplements d'organismes nitrifiants producteurs de nitrite, a été déterminé dans les sédiments superficiels (0-4 cm) et dans l'eau sus-jacente, à un rythme bi-mensuel pendant une période de un an. Les sédiments sont prélevés à l'aide d'un carottier à main dans l'estuaire (Govaere et Thielemans, 1980) et d'une benne Peterson dans l'infralittoral. Pour ce qui concerne l'eau, on utilise l'échantillonneur d'eau de type J.Z (Zobell, 1941). Pour ces dénombrements qui sont basés sur la méthode du MPN, nous utilisons la technique des micro-dilutions sur plaques à micro-titration ce qui permet 12 dilutions successives au 1/2 et 8 répliques par dilution. Cette technique a l'avantage d'être simple, rapide et plus précise que la méthode classique en tubes (Rowe et al., 1977). La numération des nitrifiants autotrophes est réalisée sur un milieu minéral contenant par litre : 200 mg de sulfate d'ammonium ; 250 mg de bicarbonate de sodium ; 50 mg de phosphate de potassium ; 1 ml d'une solution d'oligo-éléments. Les nitrifiants hétérotrophes sont dénombrés sur un milieu organique caractérisé par un rapport C/N de 3,6 soit par litre de milieu : 1 000 mg d'hydrolysate de caséine ; 1 000 mg de succinate de sodium ; 500 mg de sulfate d'ammonium et 50 mg de phosphate de potassium. On ajoute à ce milieu un inhibiteur de la nitrification autotrophe, le N-Serve (Goring, 1962) qui, dissous dans l'éthanol puis stérilisé par filtration sur nucléopore de 0,22 μm , est incorporé au milieu de culture à une concentration de 1 mg/litre. Après un temps d'incubation de une semaine pour les hétérotrophes et de neuf semaines pour les autotrophes, l'existence des nitrifiants est décelée par la présence de nitrite dans les cupules. Ce sel azoté est mis en évidence par le réactif de Griess.

Les densités des peuplements de nitrifiants dans l'eau et le sédiment des biotopes littoraux, sont rassemblées dans le tableau 1. Elles correspondent aux moyennes annuelles calculées à partir des résultats que nous avons obtenus. Nous y avons ajouté à titre comparatif, le niveau moyen de la microflore hétérotrophe totale qui est dénombrée par la méthode classique de numérations sur boîtes en utilisant le milieu dont la formule est la suivante : 2 000 mg de succinate de sodium ; 1 000 mg d'hydrolysate de caséine ; 200 mg d'extrait de levure ; 15 000 mg de bacto-agar ; 1 000 ml d'eau de mer artificielle. Bien que nous ayons observé des fluctuations annuelles plus ou moins importantes selon les types d'organismes, chacune de ces moyennes calculées à partir de 20 dénombrements, est représentative. Ces valeurs moyennes nous permettent de déterminer l'importance relative des différents peuplements étudiés.

		Estuaire	Infralittoral
Eau	A	17	1
	H	$9,35 \times 10^3$	84
	MT	$4,48 \times 10^5$	$5,18 \times 10^2$
Sédiment	A	$4,93 \times 10^4$	$2,59 \times 10^2$
	H	$1,67 \times 10^7$	$4,81 \times 10^3$
	MT	$3,34 \times 10^7$	$6,59 \times 10^5$

Tableau 1 : Niveau des peuplements bactériens (A : nitrifiants autotrophes ; H : nitrifiants hétérotrophes ; MT : microflore hétérotrophe totale). Les résultats sont exprimés en nombre de bactéries par ml d'eau ou par ml de sédiment.

Ces dénombrements mettent en évidence un point important. On voit que les deux types d'organismes nitrifiants autotrophes et hétérotrophes, existent dans l'eau et le sédiment

de l'écosystème littoral étudié, que ce soit dans la zone estuarienne ou dans l'étage infralittoral. Le calcul des pourcentages de nitrifiants autotrophes par rapport à la microflore nitrifiante totale montre, en termes d'effectifs, que les autotrophes sont vraiment minoritaires (tab. 2). Ils sont inférieurs à 1 % dans le biotope estuarien et de l'ordre de 5 % dans le sédiment infralittoral. D'autre part, si l'on compare l'abondance des nitrifiants hétérotrophes à la microflore hétérotrophe totale (tab. I), on s'aperçoit que dans le sédiment estuarien, près de la moitié de la microflore hétérotrophe totale est capable de nitrifier. Ce biotope, riche en matière organique et faiblement oxygéné, serait donc particulièrement favorable au développement des nitrifiants hétérotrophes.

	Estuaire	Infralittoral
Eau	0,18	1,19
Sédiment	0,30	5,40

Tableau 2 : Importance relative des nitrifiants autotrophes en termes d'effectifs. Les résultats représentent les pourcentages de nitrifiants autotrophes par rapport à l'ensemble des organismes nitrifiants.

L'examen du tableau 1 montre également que les bactéries nitrifiantes qu'elles soient pélagiques ou benthiques, autotrophes ou hétérotrophes, sont toujours plus abondantes dans la zone estuarienne que dans l'étage infralittoral. Ce tableau met également l'accent sur la pauvreté de l'eau en organismes nitrifiants, comparativement aux sédiments sous-jacents. Cette répartition spatiale s'explique de deux façons. D'une part, dans l'estuaire comparativement à l'infralittoral, de même que dans le sédiment comparativement à l'eau, la quantité de substrat disponible est plus importante que ce soit en matière organique ou en azote ammoniacal. Et, comme l'ont montré de nombreux auteurs (voir Niewolak *et al.*, 1978), l'abondance des autotrophes comme des hétérotrophes, est fonction de la quantité de matière organique présente dans le milieu. D'autre part, le besoin d'adhérence des bactéries nitrifiantes à un substrat solide (Goldberg et Gainey, 1955 ; Lesel, 1979), explique également que ces organismes sont plus nombreux dans le sédiment que dans l'eau, de même que dans l'eau estuarienne qui est plus chargée en particules que l'eau infralittorale.

Activité nitrifiante spécifique

Devant l'abondance des nitrifiants hétérotrophes dans l'écosystème littoral étudié, nous avons voulu voir l'importance des deux types de nitrification en termes d'activité. Pour ce faire, nous avons isolé dans chacun des deux biotopes benthiques (estuaire et infralittoral), une souche autotrophe et une souche hétérotrophe. Les isollements sont faits à partir de cultures d'enrichissement (autotrophes et hétérotrophes) d'échantillons de vase ou de sable. Quand les cultures d'enrichissement sont positives (production de nitrite), les souches autotrophes sont purifiées par la méthode des dilutions de Lewis et Pramer (1958). Par cette technique, nous avons pu isoler une souche nitrosante de chaque type de sédiment. Pour ce qui concerne les souches hétérotrophes, on utilise la méthode classique de purification des bactéries hétérotrophes, en étalant un aliquot de culture active sur un milieu gélosé de même composition que le milieu utilisé pour les cultures d'enrichissement. Chaque colonie est ensuite mise en culture dans 1 ml de milieu pour nitrifiants hétérotrophes et sa capacité à nitrifier est testée après quelques jours d'incubation. Nous avons pu ainsi isoler 100 souches nitrifiantes hétérotrophes parmi lesquelles nous avons choisi une, originaire de chacun des deux biotopes étudiés. La composition des milieux de

culture utilisés dans les différentes phases de ces purifications, est identique à celle des milieux de dénombrements décrits précédemment. On s'assure de la pureté des cultures obtenues par observation en microscope à contraste de phase.

Chaque souche est mise en culture dans une fiole en milieu non-renouvelé. Pour ces études, nous utilisons des fioles de Fernbach de 2 litres contenant 1 litre de milieu de culture de même composition que le milieu de dénombrement. L'ensemble fiole-milieu est stérilisé à l'autoclave puis ensemencé par 10 ml de culture active pour les hétérotrophes et par 100 ml dans le cas des autotrophes. Les cultures sont incubées à 17° C et subissent une agitation permanente. Des prélèvements réguliers nous permettent de suivre en parallèle la croissance des cellules par comptages sur plaques à microtitration et leur activité nitrifiante en dosant le nitrite produit dans le milieu. Connaissant à chaque instant la densité cellulaire de la culture et son activité nitrifiante, il nous est possible de calculer l'activité spécifique par cellule et par heure.

Les courbes relatives aux organismes autotrophes sont représentées sur la figure 2. Si l'on compare le comportement des deux souches, on voit que l'organisme estuarien a une croissance beaucoup plus rapide que son homologue infralittoral pour lequel on observe une phase de latence de plusieurs jours.

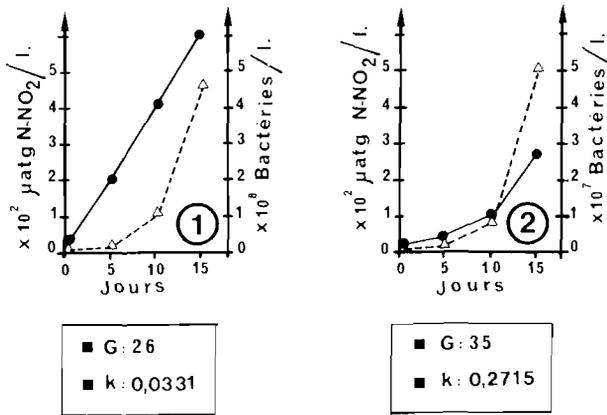


Figure 2 : Croissance et activité de deux souches nitrifiantes autotrophes. Nombre de bactéries/litre de culture ; $\mu\text{atg N-NO}_2$ litre de culture. 1 souche estuarienne ; 2 souche infralittoral. G. : temps de génération en heures ; k : activité nitrifiante spécifique en $\text{pg N-NO}_2/\text{heure/cellule}$.

Par contre, la production de nitrite est du même ordre de grandeur dans les deux cultures. A quinze jours elle atteint 6 à 7 mg de N-NO₂/litre de culture. Les paramètres de croissance et d'activité nitrifiante sont calculés pendant la phase de croissance exponentielle où le substrat n'est pas limitant (entre 5 et 10 jours). On constate que ces organismes sont lents à se développer. Leurs temps de génération est de l'ordre de la journée soit 26 heures pour l'organisme estuarien et 35 heures pour l'organisme infralittoral. Par contre, le taux d'oxydation spécifique k, exprimé en $\text{pg de N-NO}_2/\text{cellule/heure}$, est relativement élevé. Il est de 0,0331 $\text{pg N-NO}_2/\text{cellule/heure}$, pour la souche estuarienne et de 0,2715 $\text{pg N-NO}_2/\text{cellule/heure}$ pour la souche marine. D'après ces données, on voit donc que l'organisme estuarien que nous avons étudié a une croissance plus rapide mais une activité nitrifiante spécifique 10 fois plus faible que celle de l'organisme originaire de l'étage infralittoral. La comparaison de ces résultats avec les chiffres cités dans la bibliographie montre que les souches côtières que nous étudions ont des coefficients d'activités spécifiques du même ordre de grandeur que les différentes souches d'origine terrestre étudiées par Belser (1979).

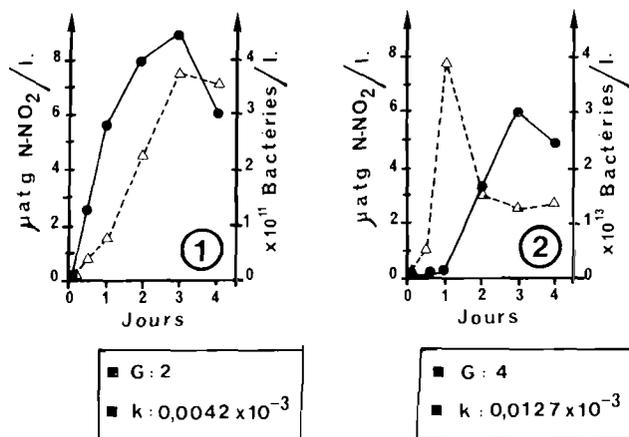


Figure 3 : Croissance et activité de deux souches nitrifiantes hétérotrophes. Nombre de bactéries/litre de culture ; µatg N-NO₂/litre de culture. 1 souche estuarienne ; 2 souche infralittorale. G : temps de génération en heures ; k : activité nitrifiante spécifique en pg N-NO₂/heure/cellule.

La croissance et l'activité nitrifiante des deux souches hétérotrophes, sont illustrées par les courbes de la figure 3. Contrairement aux autotrophes, on sait que la production de nitrite traduisant l'activité nitrifiante n'est pas forcément liée à la croissance cellulaire. L'étude comparative de ces deux souches hétérotrophes, montre que l'organisme estuarien a une croissance initiale rapide et son activité nitrifiante augmente régulièrement, la concentration de nitrite étant maximale à la fin de la phase de croissance active. A l'inverse, la croissance de la souche marine est lente à se développer (phase de latence) tandis que son activité nitrifiante est précoce. Le temps de génération, calculé pendant la phase de croissance exponentielle, montre bien que la souche estuarienne a une croissance plus rapide que son homologue marine, soit respectivement 2 et 4 heures. Par contre, les taux de nitrification spécifiques, calculés quand la production de nitrite est maximale (à 3 jours pour la souche estuarienne et à 1 jour pour la souche marine), montre que cette dernière est plus active. Elle a une activité spécifique de $0,0127 \times 10^{-3}$ pg N-NO₂/cellule/heure, tandis que pour la souche estuarienne elle n'est que de $0,0042 \times 10^{-3}$ pgN-NO₂/cellule/heure. Comme nous l'avons vu pour les organismes autotrophes, la souche hétérotrophe originaire de l'estuaire a une croissance plus rapide mais une activité nitrifiante 10 fois plus faible que son homologue marine.

Cette étude concernant la physiologie de quelques organismes nitrifiants, met l'accent sur la grande différence qui existe entre les capacités nitrifiantes des deux types d'organismes. Les bactéries nitrifiantes autotrophes sont capables de produire de grandes quantités de nitrite (400 à 500 µatg de N-NO₂/litre de culture) par opposition aux espèces hétérotrophes qui n'en produisent que de très faibles quantités (moins de 8 µatg de N-NO₂/litre de culture). Elle montre également que les taux de croissance sont très différents. Les hétérotrophes se multiplient rapidement tandis que les autotrophes sont très lents à se développer. Il en résulte une activité nitrifiante spécifique/cellule/heure, 10 000 fois plus forte chez les autotrophes.

Pouvoir nitrifiant autotrophe et hétérotrophe

En se basant sur les résultats concernant l'activité nitrifiante des quelques souches que nous avons prises comme modèle et le niveau des peuplements que nous avons défini au

début de ce travail, il est possible d'estimer l'importance relative de deux types de métabolismes nitrifiants, soit le nombre d'individus multiplié par l'activité nitrifiante spécifique. On obtient ainsi une estimation du pouvoir nitrifiant autotrophe et hétérotrophe de l'eau et du sédiment des deux biotopes étudiés. Ces résultats sont exprimés en $\mu\text{g N-NO}_2$ produit/heure/ml d'eau ou /ml de sédiment (tab 3). D'après ces données,

		Estuaire	Infralittoral
Eau	A	0,5627	0,2715
	H	0,0393	0,0011
Sédiment	A	1631,83	70,32
	H	68,46	0,06

Tableau 3 : Estimation du pouvoir nitrifiant autotrophe (A) et hétérotrophe (H). Les résultats sont exprimés en $\mu\text{g N-NO}_2$ /heure/ml d'eau ou de sédiment.

l'estuaire, plus riche en organismes nitrifiants mais dont les cellules sont moins actives, aurait un pouvoir nitrifiant beaucoup plus important que la zone marine de l'étage infralittoral. L'examen de ce tableau montre également que 1 ml d'eau serait beaucoup moins productif que 1 ml de sédiment ce qui semble normal puisque les peuplements de nitrifiants y sont toujours beaucoup moins denses. Enfin, d'après ce tableau, le pouvoir nitrifiant hétérotrophe serait beaucoup plus faible que l'activité nitrifiante autotrophe et ceci bien que les peuplements de nitrifiants hétérotrophes dominent largement les autotrophes. Si l'on calcule le pourcentage de l'hétérotrophie dans le processus de nitrification des biotopes étudiés (tab 4), on constate que ce type de nitrification semble jouer un rôle minime. Elle est de 4 % à 6 % dans l'estuaire et inférieure à 1 % dans l'étage infralittoral.

	Estuaire	Infralittoral
Eau	6,52	0,40
Sédiment	4,03	0,09

Tableau 4 : Part de l'hétérotrophie, en termes d'activité, dans le processus de la nitrification. Les résultats représentent les pourcentages de l'activité nitrifiante hétérotrophe par rapport à l'activité nitrifiante globale.

Le plus grand pourcentage observé dans le biotope estuarien peut s'expliquer par la présence de très nombreux organismes nitrifiants hétérotrophes dont le développement est favorisé par les conditions du milieu (grande richesse en matière organique et faible oxygénation). Toutefois, il faut noter que ces résultats ne sont que des estimations car nous nous sommes basés sur l'activité de souches isolées dont on ne sait rien de la représentabilité dans le milieu naturel. Avant de confirmer ces résultats, il serait peut-être bon de comparer notre technique d'étude à une méthode plus globale qui pourrait consister en l'incubation de portions d'écosystème avec ou sans inhibiteur de la nitrification autotrophe.

CONCLUSIONS

En conclusion de ce travail, principalement axé sur les organismes de la nitrification, on peut estimer la part relative des deux types de nitrification qui aboutissent à la production de nitrite. D'après nos résultats, il semblerait que dans les écosystèmes que nous avons étudiés (estuaire et zone marine de l'étage infralittoral), la forte densité des peuplements de nitrifiants hétérotrophes ne leur donne pas une part prépondérante dans le processus de la nitrification du fait de leur très faible activité spécifique. Cependant, si l'on se base

sur les estimations définies dans ce travail, l'hétérotrophie n'est pas négligeable puisqu'elle peut atteindre 4 % à 6 % dans les zones chargées en matière organique. Pour compléter ce travail, il s'avère nécessaire de faire une étude similaire sur l'importance relative de l'autotrophie et de l'hétérotrophie dans la deuxième étape de la nitrification, la production de nitrate à partir de nitrite.

-
- BELSER, L. W., 1979. Population ecology of nitrifying bacteria. *Ann. Rev. Microbiol.*, 33, 309-333.
- BILLEN G., 1975. Nitrification in the Scheldt estuary (Belgium and the Netherlands). *Estuar. Coast. Mar. Sci.*, 3, 79-89.
- BILLEN, G., 1976. Evaluation of nitrifying activity in sediments by dark ^{14}C -bicarbonate incorporation. *Water Res.*, 10, 51-57.
- EYLAR D.R., SCHMIDT E.L., 1959. A survey of heterotrophic micro-organisms from soil for ability to form NO_2 and NO_3 . *J. Gen. Microbiol.*, 20, 473-487.
- GODE P., OVERBECK J., 1972. Untersuchungen zur heterotrophen nitrifikation imsee. *Ž. Allg. Mikrobiol.*, 12, 567-574.
- GOLDBERG S.S., GAINEY P.L., 1955. Role of surface phenomena in nitrification. *Soil Sci.*, 80, 43-53.
- GORING C.A.I., 1962. Control of nitrification by 2-chloro-6-(trichloromethyl)-pyridine. *Soil Sci.*, 93, 211-218.
- HELDER W., de VRIES R.T.P., 1983. Estuarine nitrite maxima and nitrifying bacteria (Ems-Dollard estuary). Netherlands *J. Sea Res.*, 17, 1-18.
- HENRIKSEN K., HANSEN J.I., BLACKBURN T.H., 1981. Rates of nitrification, distribution of nitrifying bacteria and nitrate fluxes in different types of sediment from Danish waters. *Marine Biol.*, 61, 299-304.
- KASPAR H.F., 1982. Denitrification in marine sediment : measurement of capacity and estimate of *in situ* rate. *Appl. Environ. Microbiol.*, 43 : 522-527.
- KOIKE I., HATTORI A., 1978. Simultaneous determinations of nitrification and nitrate reduction in coastal sediments by a ^{15}N -dilution technique. *Appl. Environ. Microbiol.*, 35, 853-857.
- LAURENT M., 1971. La nitrification autotrophe et hétérotrophe dans les écosystèmes aquatiques. *Ann. de l'Inst. Pasteur*, 121, 795-810.
- LESEL R., 1979. Étude de la nitrification dans les circuits d'eau renouvelée. II : Dynamiques des microflores bactériennes. *Bull. Cent. Étud. Rech. Sci. Biarritz*, 12, 651-680.
- LEWIS R.F., PRAMER D., 1958. Isolation of *Nitrosomonas* in pure culture. *J. Bact.*, 76, 524-528.
- NIEWOLAK S., KORYCKA A., POTOCKA E., 1978. Ammonification processes in fertilized lakes. *Ekol. Pol.*, 26, 555-572.
- ROWE R., TODD R., WAIDE J., 1977. Microtechnique for most probable number analysis. *Appl. Environ. Microbiol.*, 33, 675-680.
- VERSTRAETE W., 1975. Heterotrophic nitrification in soils and aqueous media. *Bull. Acad. Sci. USSR, Biol. Ser.*, 4, 541-558.
- VERSTRAETE, W., ALEXANDER, M., 1973. Heterotrophic nitrification in samples of natural ecosystems. *Environ. Sci. Technol.* 7, 39-42.
- ZOBELL C.E., 1941. Studies on marine bacteria. I: The cultural requirements of heterotrophic aerobes.