

DEGRADATION DES HYDROCARBURES ET DENITRIFICATION BACTERIENNE
DANS LES SEDIMENTS MARINS DE LA COTE MEDITERRANEENNE

E. AZOULAY ¹, M. VIOLET ¹, G. GIUSTI ², C. STRAGIER ²

1. Laboratoire de structure et Fonction des Biomembranes -
Faculté des Sciences de Luminy. E.R. 143 - 13288 MARSEILLE Cedex 9
2. Laboratoire de Chimie Organique -
Faculté de St-Jérôme 13397 MARSEILLE Cedex 4

INTRODUCTION

Dans beaucoup de sédiments, du fait de la diminution du taux d'oxygène et de l'abaissement des potentiels d'oxydo-réduction, la réduction du nitrate en nitrite puis en azote moléculaire, reste pour de nombreux micro-organismes une alternative à la respiration oxygène. Dans la plupart des sédiments, cette respiration oxygène ou nitrate ne peut exister que dans les 6 premiers centimètres puisque au delà de ces profondeurs on ne retrouve pas d'oxygène et les potentiels redox sont bas (- éé(mV) (J. Sorensen, 1978).

Sans entrer dans le détail du cycle de l'azote nous avons indiqué sommairement dans la figure 1 les voies de transformation de l'azote minéral. Compte tenu des conditions d'oxydoréduction des sédiments et des états d'oxydation des différents composés de l'azote (fig. 2) on peut considérer que la nitrification reste un phénomène complexe et aléatoire intervenant dans une proportion relativement faible mais non négligeable par rapport à la dénitrification elle même (G. BILLEN 1978).

D'une manière générale, on considère que dans les sols, les sédiments ou les eaux dépourvues d'oxygène, le nitrate est réduit en nitrite jusqu'à l'azote moléculaire (lequel est relargué dans l'atmosphère). Ce phénomène appelé dénitrification est réalisé par un bon nombre de *Pseudomonas* et *Micrococcus*. Cette réduction du nitrate peut se poursuivre jusqu'à l'ammonium qui sera incorporé dans les protéines cellulaires par des réactions d'amination complexes où interviennent essentiellement des enzymes de la synthèse du glutamate (J.A. Cole, C.M. Brown, 1980).

La population bactérienne de ces sédiments peut être considérée comme en grande partie responsable de la dissimilation du nitrate. D'autre part, la diminution de l'azote ammoniacal dans ces milieux, accompagnée d'un accroissement de l'azote nitrite constitue pour les organismes présents dans le sédiment une source d'azote non négligeable. Ce processus d'utilisation de l'azote nitrique est intéressant à connaître dans la mesure où il constitue l'un des facteurs clé dans l'utilisation et la transformation de la matière organique dans les sédiments.

Les travaux réalisés sur les conditions d'accumulation des produits pétroliers dans les sédiments marins de la côte méditerranéenne et les capacités de biodégradation de ces produits par ces mêmes milieux ont conduit Azoulay *et al.*, (1981) à établir l'existence d'une flore microbienne spécifique impliquée directement dans l'accroissement des capacités auto-épuratrices de ces biotopes lorsqu'ils sont pollués. L'étude physiologique précise et complète sur le comportement des populations bactériennes mixtes de ces sédiments a par ailleurs permis d'apporter des éléments d'information sur les capacités métaboliques de ces populations prises globalement ou individuellement.

Ces résultats obtenus avec des sédiments prélevés en différents endroits pollués impliquent que la dynamique physiologique mise en place et responsable des potentiels de biodégradation de ces sédiments ne dépend pas uniquement de la nature des constituants de la matière organique accumulée ou de leur concentration, mais aussi des capacités de transformation du nitrate en ammoniac (dénitrification) et inversement de l'ammoniac en nitrate (nitrification) de ces sédiments eux-mêmes.

Pour une meilleure compréhension du rôle de la source d'azote dans la transformation de la matière organique (biogénique ou anthropogénique), nous ajouterons que pour la

plupart des micro-organismes l'azote ammoniacal reste la source la meilleure et la plus largement assimilée par les bactéries marines utilisant les hydrocarbures comme source de carbone et d'énergie. L'assimilation du nitrate par ces mêmes micro-organismes passe par plusieurs voies soumises elles-mêmes à différents niveaux de régulation sur lesquels des travaux récents ont apporté quelques lumières. La réduction du NO_3 aboutit à la formation de N_2 ou de NH_4^+ selon les conditions d'oxydo-réduction et de concentration d'ammonium du milieu.

Nous ajouterons qu'il n'existe actuellement aucune publication sérieuse donnant des indications précises sur les capacités des micro-organismes aussi divers soient ils, à transformer les hydrocarbures en l'absence d'oxygène et en présence de nitrate comme accepteur d'électrons final. De ce fait, la bio-dégradation des hydrocarbures par les bactéries marines est oxygène dépendante et par voie de conséquence le nitrate ne peut être utilisé par ces organismes qu'en tant que source d'azote. Par contre, d'autres constituants organiques (sucres ...) peuvent être transformés par ces bactéries marines en l'absence d'oxygène et en présence de nitrate à la place de l'oxygène. Ces conditions conduisent à établir que le fonctionnement de la voie dissimilative de transformation du nitrate dans les biotopes pollués par des hydrocarbures conduira nécessairement à une perte nette en azote utilisable pour le développement des bactéries actives à l'égard de ces composés.

La deuxième voie d'utilisation du nitrate en présence d'hydrocarbures, caractérisée par son aptitude à transformer le nitrate en ammoniac est insensible à l'action de l'oxygène, contrairement à la précédente, mais peut être inhibée en partie en présence de faibles concentrations de sels d'ammonium dans les milieux naturels. L'existence de cette voie, souvent absente chez les bactéries marines particulièrement actives sur les hydrocarbures, est intéressante dans la mesure où elle permet aux bactéries marines de se développer et de dégrader les différents constituants de la matière organique, y compris les hydrocarbures.

Enfin, nous signalerons que les différentes enzymes impliquées dans ces deux voies sont distinctes et probablement de structures moléculaires différentes, sauf en ce qui concerne les nitrate réductases dissimilatrice et assimilatrice qui présentent entre elles certaines analogies de structure qui peuvent être aisément exploitées pour entreprendre une étude directement dans les milieux naturels.

Pour notre part, sans entrer dans le détail de nombreux travaux portant sur la transformation de la matière organique dans les milieux marins (eaux, particules, sédiment) nous avons tenté d'analyser les mécanismes physiologiques impliqués dans l'utilisation des nitrates. Ces mécanismes dépendant des populations bactériennes isolées des sédiments côtiers méditerranéens soumis à une pollution chronique sont en grande partie contrôlés par la matière organique présente dans ces sédiments dont les hydrocarbures.

Sur le plan méthodologique, les difficultés rencontrées pour interpréter les résultats analytiques portant d'une part sur l'accumulation de constituants d'origine pétrolière dans ces sédiments et d'autre part sur les accumulations d'azote nitrique anormalement élevées dans certains biotopes marins nous ont amenés à mettre au point une série de techniques permettant de préciser le comportement des populations bactériennes présentes dans les sédiments et responsables de la dégradation des hydrocarbures et de l'utilisation du nitrate.

Par ailleurs, si nous considérons que les hydrocarbures biogéniques présents dans les sédiments proviennent en grande partie de l'activité métabolique du phytoplancton exprimée en termes de production primaire et que l'évolution de ce phytoplancton est conditionnée par la concentration et la nature de la source d'azote nous avons aussi été amenés à étudier le comportement des bactéries dénitrifiantes associées à ce phytoplancton (Slawyk 1980).

MATERIEL ET METHODES

Les souches utilisées sont des souches isolées de sédiments, d'eau de mer ou de mousses de l'Etang de Berre. On dispose également d'une population isolée d'une culture de phytoplancton (*Phacodactylum tricoratum*).

Milieux et conditions de culture.

L'isolement et l'entretien des micro-organismes sont effectués sur des milieux nutritifs liquides ou solides contenant :

1) une solution saline assimilée à de l'eau de mer synthétique (EMS) dont la composition a été décrite par Bertrand et coll. (1976) ou bien de l'eau de mer naturelle filtrée sur filtre Millipore stérile pour éliminer les particules et les bactéries présentes.

2) une source d'azote constituée par du chlorure d'ammonium (0,07 M) ou du nitrate de sodium (0,035 M) selon le cas. Ces milieux sont stérilisés 20 minutes à 120° C après ajustement du pH à 7,3 pour l'EMS et pH 8 pour l'eau de mer naturelle (EMN).

3) une source de carbone constituée pour les milieux riches (EMR) de biotrypcase Mérieux (15 g/l) et de phytone Mérieux (5 g/l) et pour les autres milieux soit de glycérol (4 g/l) soit d'hydrocarbures (FD₁ ou pétrole brut) à des concentrations de 2 g/l.

Les milieux solides sont préparés en ajoutant du bactoagar (15 g/l) aux milieux liquides.

Les cultures sont réalisées en fiole de Fernbach de 2 litres contenant 500 ml de milieu liquide, soumises à une agitation de 200 tours/minute, à la température de 32°C.

L'incubation est en général limitée à 48 heures. Les croissances bactériennes sont suivies par néphélométrie à 450 nm et exprimées en unités de densité optique (mesurée avec un spectrophotomètre Zeiss PM QII).

Pour établir une corrélation entre turbidité du milieu exprimée en unités de D.O. et la matière bactérienne sèche, des aliquots de milieu de culture sont soumis à centrifugation ; les cellules obtenues après lavage à l'eau de mer naturelle sont desséchées et pesées. On peut ainsi représenter la densité optique en fonction du poids sec de cellules exprimé en mg/ml.

Nature des produits utilisés.

Le fuel FD₁ est un gazoil léger comprenant en majeure partie des hydrocarbures aliphatiques ; le carbexol est un produit naturel d'origine pétrolière fourni par la Société ELF ERAP, constitué par un mélange d'hydrocarbures benzéniques ramifiés à chaîne contenant en moyenne 20 atomes de carbone ; le pétrole brut est un pétrole léger (Arabian light) ; le FD₂ est un gazoil lourd constitué en majorité par des hydrocarbures aromatiques, des constituants contenant des hétéroatomes (P, S, O) et de l'asphaltène en faible concentration ; le constituant désigné sous le terme de HCM est composé de FD₁ (20 ml), d'une coupe pétrolière comprenant des hydrocarbures aliphatiques C₁₂ à C₁₈ (5 ml), de pétrole brut (0,2 ml) de FD₂ (1 ml), de dodécyl-benzène (5ml), d'huile¹² de parafine (1 ml), de pristane (5 ml), d'hexadécène (1 ml) de cyclohexane (1 ml), de benzène (1 ml) de méthyl-1-naphtalène (1 ml), de naphtalène (1 ml) et de phénantrène (1 ml).

Développement des micro-organismes.

La détermination du nombre de bactéries présentes dans les sédiments a été réalisée dans les conditions classiques comportant la mise en incubation du sédiment dans l'eau de mer naturelle, sous agitation vigoureuse pendant 1 heure, pour permettre la libération dans le milieu liquide des micro-organismes absorbés sur ce sédiment. Le liquide obtenu après décantation est utilisé pour ensemencher, dans une gamme de dilutions allant de 10⁻² à 10⁻⁸, des milieux nutritifs solides EMR, EMS ou EMN, supplémentés en azote. La détermination du nombre de bactéries est ramenée à 1 g de sédiment humide après comptage du nombre de colonies dans les bonnes dilutions. Technique de Pochon et Tardieux (1962) et Teller de Mac Grady (1918). Les différentes colonies isolées sont ensuite conservées sur le milieu nutritif initial d'isolement.

Analyses chimiques.

Les analyses chimiques des hydrocarbures dans les sédiments et les milieux de culture ont été réalisées dans les conditions décrites par Mille et coll. (1981).

Préparation des extraits cellulaires.

Les cellules recueillies en phase exponentielle par centrifugation à 5000 g pendant 20 minutes sont lavées trois fois dans de l'EMS sans azote, puis suspendues dans le même milieu. Elles sont alors cassées sous forte pression (1,2 tonnes/cm²) dans une cellule de French. Les extraits bruts sont obtenus par centrifugation à 25000 g pendant 15 minutes. Le surnageant est passé 00 minutes à 220000 g. Les culots homogénéisés dans le tampon EMS constituent les extraits particulaires.

Dosage des protéines.

Les protéines sont dosées selon la méthode colorimétrique décrite par Lowry (8) utilisant le réactif de Folin. Une courbe de référence est établie grâce à la sérum albumine de boeuf.

Activité nitrate réductase.

L'activité nitrate réductase a été dosée par une méthode colométrique en utilisant du benzyl viologène réduit comme agent réducteur selon la technique de Garland et coll. (1977).

Le système réactionnel est constitué par l'extrait enzymatique, le benzyl viologène réduit par du dithionite de sodium (le benzyl viologène se colore en violet), et du tampon phosphate 100 mM pH 6,5. Le nitrate est ajouté au système. Sa réduction en nitrites s'accompagne de l'oxydation du benzyl viologène qui se décolore. On suit alors la densité optique au spectrophotomètre. L'activité nitrate réductase est exprimée en μ moles de nitrate réduit par heure et par ml d'extrait ; l'activité spécifique en μ moles de nitrate réduit par heure et par mg de protéines, dosées par la méthode de Lowry et al., (1951).

Dosage des nitrites.

Les nitrites sont dosés selon la technique de Mellon et Rider (1966). Les réactifs utilisés sont l'acide sulfanilique et l' α -naphthylamine. Il se forme un complexe coloré rouge dosable en spectrophotométrie à 525 nm.

Dosage du glucose.

Il est effectué selon la technique de Schmidt (1961) à l'aide des tests Boehringer.

Dosage de l'ammonium.

L'ammonium est dosé selon la technique de Da Fonseca Wollheim (1973) à l'aide des tests Boehringer.

RESULTATS ET DISCUSSION

METHODE D'IDENTIFICATION ET DE DENOMBREMENT DES BACTERIES DENITRIFIANTES DES ECHANTILLONS DE SEDIMENT ET D'EAU DE MER

Les souches dénitrifiantes (dénitrification assimilatrice ou dissimilatrice) d'une population bactérienne peuvent être dénombrées et identifiées par une méthode mise au point par les généticiens s'intéressant à la dénitrification. (Begg et al., 1977).

Cette technique consiste à étaler à différentes dilutions la population bactérienne sur un milieu nutritif solide en eau de mer synthétique contenant de la phytone comme seule source de carbone et d'énergie et supplémenté en azote ammoniacal (3,7 g/l).

Après 48 heures d'incubation en aérobose à 32 ou 20°C, on choisit la boîte de Pétri pour laquelle on a un nombre de colonies satisfaisant, et on coule à la surface de cette boîte une fine couche d'agar contenant du nitrate à 10 g/l. On laisse 10 à 15 minutes, le temps que la nitrate réductase s'exprime puis on étale une nouvelle couche d'agar auquel on a préalablement ajouté les réactifs nécessaires pour la détection des nitrites (technique de Mellon et Rider (1956)). Les bactéries dénitrifiantes porteuses de l'activité nitrate réductase se colorent ainsi en rose et peuvent être facilement dénombrées (Fig.3).

On peut donc par cette méthode évaluer aisément la population dénitrifiante par rapport à la flore hétérotrophe totale. De plus, il est possible de vérifier la capacité dénitrifiante des différents clones préalablement sélectionnés, en les repiquant sur des milieux nutritifs solides contenant de l'ammonium comme seule source d'azote et en effectuant le teste précédemment décrit (Fig.4).

L'utilisation du nitrate comme seule source d'azote par les bactéries des milieux marins est testée sur des milieux solides contenant du nitrate et des hydrocarbures (mélange HCM ou FD1) comme source de carbone. Le dénombrement est effectué après incubation en aérobose à deux températures 32 et 20°C.

Sur des milieux solides contenant de la phytone et du nitrate, on peut aussi tester les souches dénitrifiantes possédant la voie dissimilatrice en incubant ces milieux de culture en anaérobose à 32 et 20°C.

Pour l'ensemble de ces milieux, les concentrations en nitrate varient de 0,1 % à 0,3 % (p/v).

Dénombrement des bactéries dénitrifiantes dans le sédiment de l'Etang de Berre et dans les mousses formées à la sortie des émissaires de raffineries.

1 - Dans le sédiment.

La population bactérienne hétérotrophe isolée d'un sédiment de l'Etang de Berre (de l'ordre 10^{10} à 10^{12} cellules par gramme de sédiment humide) est constituée de 60 à 80 % de bactéries aptes à se développer sur hydrocarbures (mélange HCM). Cette population est constituée de neuf souches (dont cinq majoritaires et 4 minoritaires apparaissant en nombre nettement plus faible).

Le pourcentage de bactéries utilisant le nitrate comme seule source d'azote en présence de FD1 (dénitrification assimilatrice) correspond à 10^3 à 10^4 cellules par gramme de sédiment humide soit un pourcentage très faible de la population hétérotrophe.

Les bactéries dénitrifiantes "constitutives" c'est-à-dire présentant une activité nitrate réductase lorsqu'elles sont cultivées en aérobiose sur un milieu nutritif riche ne contenant pas de nitrate représentent 10 à 10^2 cellules (par gramme de sédiment humide).

Les bactéries dénitrifiantes (dénitrification dissimilatrice) déterminées en utilisant des milieux nutritifs solides contenant de la phytone et du nitrate, incubant en anaérobiose, représentent 10^3 à 10^4 bactéries par gramme de sédiment humide (Tableau 1).

Nous noterons que les valeurs obtenues sont particulièrement élevées et correspondent aux concentrations bactériennes des milieux de culture riches en carbone, ce qui est d'ailleurs le cas des sédiments de l'Etang de Berre qui contiennent environ 2 g d'hydrocarbures par kg de sédiment sec.

2 - Dans les mousses et eaux de surface.

Les sorties d'émissaires de raffineries sont souvent le siège de phénomènes d'apparition de mousses consécutifs à des épandages de produits pétroliers plus ou moins dilués et au développement bactérien impliqué dans la transformation de ces produits. Ces mousses contiennent des polymères d'origine biologique à propriétés émulsifiantes.

Les échantillons prélevés dans ces mousses et dans les eaux de surface sous jacentes par la cellule antipollution de Marseille ont été analysés sur le plan microbiologique. Une série de déterminations a été effectuée permettant d'évaluer le nombre de bactéries hétérotrophes (de l'ordre de 10^5 à 10^7) ainsi que la proportion de bactéries actives sur hydrocarbures. Les résultats obtenus sont consignés dans le Tableau 2.

Les bactéries dénitrifiantes "constitutives" correspondent à environ 10^3 à 10^5 cellules par ml d'échantillon. Ces bactéries présentant une activité dénitrifiante non préalablement inductible par le nitrate peuvent être considérées comme dénitrifiants "constitutifs".

ISOLEMENT ET EVALUATION DE L'ACTIVITE DENITRIFIANTE DES BACTERIES ASSOCIEES A UNE SOUCHE DE PHYTOPLANCTON : PHACODACTYLUM TRICORNUTUM (diatomée atypique).

Les cultures de cette diatomée ont été mises à notre disposition par Mr. Y. Collos (laboratoire d'océanographie dirigé par Mr. Minas).

L'évaluation de l'activité dénitrifiante de ces bactéries a été entreprise afin d'explicitier les accumulations de nitrites dans certaines zones où se développe le phytoplancton. Nous avons donc tenté au cours de cette expérience de mettre en évidence la contribution de la population bactérienne associée au phytoplancton dans le cycle de l'azote et en particulier au niveau de la dénitrification.

Une culture de diatomées dans un milieu d'eau de mer contenant du carbonate de sodium, du nitrate de sodium et du silicate a été étalée sur un milieu nutritif riche, solide et incubée pendant 48 heures à 32° à l'obscurité.

Une population bactérienne comprenant quatre souches différentes a été isolée. Parmi elles, 2 ont une capacité dénitrifiante et synthétisent une nitrate réductase "constitutive" c'est-à-dire en aérobiose, en présence d'ammonium et sans nitrate. Nous ajouterons que ces deux souches ne sont pas capables de réduire les nitrites lorsque ceux-ci constituent la seule source d'azote.

Ces deux souches après isolement ont été testées sommairement : elles se développent dans des conditions d'halophilisme modéré (NaCl 400 mM soit 27 g/l), utilisent comme source de carbone les divers acides aminés, le glycérol et le succinate mais ne peuvent assimiler les sucres, ni les hydrocarbures.

Etude d'une bactérie dénitrifiante nitrate réductase "constitutive" isolée des populations mixtes présentes dans les sédiments marins.

L'une des souches (P₂) a été retenue pour effectuer cette étude. Cette souche développe une activité nitrate réductase lorsqu'elle est cultivée en aérobiose sur un milieu nutritif contenant de la phytone et de l'ammonium comme seule source d'azote.

1°) Dans une première expérience nous avons montré que la souche P₂ cultivée en présence de glycérol comme seule source de carbone se développe en aérobiose avec ammonium, nitrate ou nitrate plus ammonium comme sources d'azote.

Les taux de croissance sont respectivement de 0,25, 0,20 et 0,15 (h⁻¹) pour des cultures sur glycérol et ammonium, glycérol plus nitrate et ammonium, et glycérol plus nitrate.

Les concentrations respectives en ces diverses sources d'azote correspondent à 5,9 nmoles d'azote par litre de milieu de culture.

Cette souche ne peut se développer en anaérobiose quelle que soit la source d'azote.

En présence de nitrite, ou de nitrite plus ammonium aux mêmes concentrations, cette souche ne se développe pas.

Ces résultats nous amènent aux conclusions suivantes : la souche P₂ possède une nitrate réductase assimilatrice qui dans ce cas précis est insensible à l'oxygène. Le développement sur nitrate ne peut se concevoir que dans la mesure où cette souche est capable d'assimiler le nitrite formé après réduction du nitrate. Nous avons constaté que dans les cultures sur nitrate, la souche P₂ n'accumule pas de nitrites alors que les cultures sur nitrate plus ammonium contiennent des nitrites à des concentrations de l'ordre de 28 µmoles/litre. On peut donc penser que le nitrite à concentrations relativement fortes ne peut être utilisé comme source d'azote et constitue même un inhibiteur de la croissance. Le fait que sur nitrate la souche puisse se développer, implique que les quantités de nitrite formées restent toujours suffisamment basses et qu'il existe donc un mécanisme de régulation au niveau du nitrite portant sur l'utilisation même du nitrate comme source d'azote.

2°) Dans un second temps, nous avons récolté les cellules cultivées sur ces différents milieux et mesuré l'activité dénitrifiante dans des systèmes réactionnels incubant en anaérobiose et contenant une suspension cellulaire dans l'eau de mer synthétique sans azote (environ 3,5 mg de cellules poids sec par ml) du glycérol (4 g/l) et du nitrate (2 g/l). Les nitrites sont dosés en fonction du temps d'incubation. L'activité dénitrifiante est exprimée en nmoles de nitrites apparus par mg de cellules poids sec et par heure (figure 5).

On constate que pour les cellules cultivées sur glycérol plus ammonium, cette activité est présente mais à un niveau relativement faible (de l'ordre de 15 unités) ; l'addition de nitrate au milieu de culture accroît de deux fois ce niveau (25 unités). Pour les cellules cultivées avec du nitrate comme seule source d'azote, cette activité est environ 10 fois supérieure (130 unités).

Ces résultats suggèrent que la nitrate réductase synthétisée dans les cellules P₂ bien que "constitutive" reste cependant soumise à une régulation par le nitrate qui conduit à une augmentation de l'enzyme évaluée à partir de son activité.

- Pour une meilleure compréhension de ce système de régulation complexe, nous sommes intéressés à l'activité nitrate réductase mesurée sur les extraits cellulaires en nous référant aux données proposées par Piéchaud et al., (1967) sur la classification des nitrate réductases A et B.

L'enzyme A, particulière, synthétisée en anaérobiose exerce une fonction respiratoire, alors que la nitrate réductase de type B, soluble, sensible à l'oxygène et à l'ammonium intervient dans l'assimilation du nitrate. Ces deux enzymes ont également un comportement différent à l'égard du chlorate : il est inhibiteur de B et un substrat pour A.

Dans le tableau 3, nous avons mesuré l'activité nitrate réductase sur les extraits bruts des cellules P₂. Celles-ci étaient cultivées sur glycérol en présence de différentes sources d'azote. Nous constatons que l'activité nitrate réductase spécifique est minimale lorsque la source d'azote est l'ammonium. L'addition d'ammonium aux cultures contenant du nitrate donne un niveau d'enzyme deux fois plus faible que celui mesuré en présence de nitrate comme seule source d'azote. Cette activité nitrate réductase est liée à l'activité chlorate réductase. De plus elle est entièrement de nature membranaire. Il convient de noter également que l'enzyme est insensible à l'action du cyanure de potassium (mM) ; par contre elle est fortement inhibée par l'azoture de sodium. (mM).

On peut considérer que les bactéries isolées dans les sédiments et considérées comme des dénitrifiantes "constitutives" possèdent une nitrate réductase de type A, de nature membranaire, insensible à l'oxygène et faiblement réprimée par l'ammonium.

Cet ensemble de propriétés confère à cette nitrate réductase une certaine originalité puisqu'elle se comporte comme les nitrate réductases dissimilatrices ou respiratoires présentes chez un grand nombre de bactéries. Il s'y ajoute que cette enzyme est en fait une nitrate réductase assimilatrice et qu'elle n'est sensible à l'ammonium que très faiblement tout en restant fortement inhibée par le nitrite.

Analyse de l'activité dénitrifiante chez les bactéries isolées des sédiments ou du phytoplancton et présentant le "caractère nitrite positif".

Cette étude a été systématiquement étendue à plusieurs bactéries isolées des sédiments, des mousses ou du phytoplancton. Sur six souches testées nous avons constaté une similitude de comportement sur le plan de la dénitrification bien qu'apparemment ces souches soient différentes si l'on se réfère à l'aspect des colonies et à l'examen microscopique des cellules. C'est le cas en particulier des deux souches associées au phytoplancton. Il est important de souligner, que les bactéries (en faible nombre) "nitrite positives" dans les populations mixtes hétérotrophes isolées des sédiments provenant de biotopes pollués par des hydrocarbures peuvent se développer sur FD1 en présence de nitrate et en aérobiose mais avec des rendements deux fois plus faible que ceux mesurés en présence d'ammonium comme seule source d'azote.

MISE AU POINT D'UNE METHODE D'ETUDE DIRECTE DE L'ACTIVITE DENITRIFIANTE
D'UNE POPULATION BACTERIENNE PRESENTE DANS UN SEDIMENT MARIN.

La difficulté d'interprétation du comportement des souches à activité dénitrifiante présentes dans les sédiments contenant de la matière organique ou des hydrocarbures à des concentrations anormalement élevées (0,7 à 2 g d'hydrocarbures par kg de sédiment sec) nous a amenés à mettre au point une méthode directe de détermination de cette activité dans les sédiments. Dans la technique illustrée par la figure 6 nous utilisons un réacteur comportant une colonne fermée à son extrémité par un verre fritté de porosité bien déterminée et variable suivant la nature du sédiment analysé. Au fond de cette colonne, on dépose un sédiment contenant des bactéries dans une proportion de 10^4 à 10^6 cellules par gramme de sédiment humide (la porosité de ce sédiment est de l'ordre de 85 à 90 % et sa densité de 1,80 à 2 g/cm³). Le potentiel redox Eh (mVolts) est d'environ + 75 mV. Sur cette colonne, fermée à son autre extrémité nous faisons arriver d'une part l'eau de mer naturelle contenant la source de carbone suivant un débit déterminé en fonction des conditions expérimentales imposées et d'autre part l'eau de mer naturelle additionnée de nitrate ou d'ammonium (0,5 g/l) selon le cas. Les débits sont réglés par des pompes ; il est possible d'adjoindre à ce réacteur différentes sondes permettant d'effectuer des mesures d'oxygène ou de gaz carbonique.

A la sortie de cette colonne, nous mesurons les nitrites accumulés ou le glucose consommé.

Evolution de la dénitrification dans un sédiment chargé artificiellement en une population bactérienne mixte isolée indépendamment d'un sédiment de l'Etang de Berre.

La population bactérienne mixte EM₅ préalablement cultivée dans un milieu d'eau de mer naturelle contenant de la phytone (0,5 g/l), du glucose (0,5 g/l) du nitrate (0,5 g/l) est mélangée à 20 g de sédiment (poids humide) débarrassé de toute matière organique et stérilisé afin d'éliminer tous les micro-organismes présents.

Nous faisons arriver sur ce sédiment un mélange d'eau de mer naturelle, de phytone, de glucose et de nitrate (aux concentrations de 0,5 g/l). Le mélange, soumis à un bullage d'air, est parfaitement aéré. La température d'incubation est de 18 à 20°C (température ambiante).

Les débits d'entrée et de sortie, identiques et parfaitement adaptés aux conditions expérimentales, sont de l'ordre de 10 ml/heure.

La figure 7 illustre l'évolution de l'activité dénitrifiante ainsi que l'importance de la source de carbone. Nous constatons que les nitrites, apparus environ au bout d'une demi-heure, augmentent régulièrement pendant deux heures pour atteindre un plateau qui se maintient stable. Si l'on supprime la source de carbone (ici phytone plus glucose) et si l'on ne fait plus passer que de l'eau de mer enrichie en nitrate, nous observons une décroissance rapide de l'activité dénitrifiante qui s'annule au bout de 4 à 5 heures.

Les vitesses de réduction du nitrate en nitrite sont fonction des débits d'entrée et de la présence d'une source de carbone. On peut calculer le taux de transformation du nitrate au plateau : il est égal à 40,74 μ moles de nitrites par heure et si l'on se rapporte au poids de sédiment dans la colonne (20 g de sédiment poids humide), cette transformation est de 2,14 μ moles de nitrites formés par heure et par gramme de sédiment humide. Sachant qu'il passe sur le sédiment $6,10^{-5}$ g de nitrate par heure, on peut dire que 68,7 % des

nitrate sont réduits en nitrites.

La figure 8 illustre la même expérience que précédemment mais l'activité dénitrifiante est mesurée cette fois-ci en anaérobiose. En effet, le mélange qui passe sur le sédiment est soumis à un bullage d'azote. On peut noter que la capacité dénitrifiante de la population bactérienne varie très peu si l'on passe de l'aérobiose à l'anaérobiose. Les activités spécifiques et les rendements sont sensiblement identiques lorsqu'on les mesure en anaérobiose ou en présence d'oxygène. Sur cette figure, nous pouvons également voir l'influence du débit sur l'activité dénitrifiante. Lorsque le débit (de 12 ml/h au départ) augmente de deux fois (jusqu'à 25 ml/h), la vitesse de transformation du nitrate en nitrites passe de 2,14 à 2,58 μ moles de nitrites formés par heure et par gramme de sédiment, le rendement tombant ainsi à 38 %.

Une expérience similaire est réalisée en ajoutant comme seule source d'azote non plus du nitrate mais du nitrite. On constate rapidement que celui-ci n'est pas utilisé.

Nous avons pu mettre en évidence l'importance de la source de carbone dans la dénitrification (fig. 9) en utilisant uniquement le glucose et le nitrate (toujours aux concentrations de 0,5 g/l). Nous avons mesuré parallèlement la réduction du nitrate en nitrite et la consommation du glucose. Nous constatons que durant les 10 premières heures, la concentration en nitrites apparus est faible, elle augmente ensuite progressivement jusqu'à atteindre un plateau qui correspond à une consommation totale du glucose. Ces résultats suggèrent que les 30 % de nitrate non transformés en nitrites ont été utilisés intégralement pour assimiler le glucose, bien que dans l'état de nos expériences nous n'ayons pas pu doser le nitrate. Il convient de noter qu'à la sortie des effluents, nous n'avons constaté aucune accumulation de bactéries. Nous avons simplement vérifié que l'accroissement bactéries est relativement peu important (passant de 10^6 à 10^8) ; par contre le pourcentage de bactéries dénitrifiantes de l'ordre de 10 à 20 % au départ, augmentait notablement (50 à 60 % en fin d'expérience).

Dénitrification en présence d'hydrocarbures.

Dans une expérience similaire (figure 10), nous avons volontairement chargé le sédiment avec un hydrocarbure (2 essais ont été faits : un avec un pétrole brut, l'autre avec du Fd1). Puis nous l'avonsensemencé avec une population (isolée des mousses de l'étang de Berre) apte à se développer sur hydrocarbures. En faisant passer sur la colonne une eau de mer naturelle enrichie en nitrate (0,5 g/l), nous n'avons pu observer aucun phénomène de dénitrification. En changeant la source d'azote, et en remplaçant le nitrate par l'ammonium, nous n'avons constaté aucune diminution de celui-ci.

En fin d'expérience, après 48 heures d'incubation, les sédiments ont été traités afin d'extraire les hydrocarbures et de les doser. Nous avons ainsi constaté que les quantités d'hydrocarbures retrouvées à la fin de l'expérience réalisée dans le réacteur de dénitrification, correspondent (aux erreurs d'expériences près) aux hydrocarbures introduits initialement. Le remplacement du nitrate par l'ammonium ne permet pas une meilleure dégradation.

Par contre, nous avons constaté que ce même sédiment chargé en bactéries, en hydrocarbures, et en nitrate ou ammonium mis à incuber sous forte agitation conduit après 48 heures à une dégradation des hydrocarbures (80 % en présence d' NH_4 et 50 % en présence de NO_3) et à une augmentation notable des bactéries présentes dans cet échantillon. (Tableau 4).

Ces résultats suggèrent en première approximation que la population bactérienne mixte apte à dégrader les hydrocarbures en présence de nitrate ou d'ammonium est incapable de les métaboliser lorsqu'elle est introduite dans un sédiment placé en couche et soumis à un flux continu d'eau de mer enrichie en nitrate ou ammonium. Par contre, lorsque ce mélange bactéries, sédiment et hydrocarbures est soumis à une forte agitation destinée à augmenter les "contacts", la dégradation s'effectue normalement.

On peut donc conclure sur cette base expérimentale que dans les sédiments des biotopes naturels pollués par des hydrocarbures, l'absence d'oxygène, l'abaissement des potentiels redox, la diminution du nitrate et surtout les faibles possibilités de rencontre bactéries-hydrocarbures liées à l'insolubilité dans l'eau de ces sédiments conduisent à penser que les hydrocarbures dans ces sédiments sont très faiblement dégradés.

Ce travail a bénéficié de l'aide financière du C.N.E.X.O. (contrat n° 80/2335) et de la Société Elf Aquitaine (contrat S.N.E.A. n° 3667).

RESUME

Les populations bactériennes isolées des sédiments ou des eaux de surface de l'Etang de Berre dans des zones soumises à des pollutions permanentes par des fractions pétrolières dégradent les différentes classes d'hydrocarbures en présence de nitrate ou d'ammonium comme source d'azote.

L'activité dénitrifiante des souches constituant ces populations a été déterminée par plusieurs méthodes dont les résultats conduisent en première approximation aux conclusions suivantes :

- La majorité des bactéries qui dégradent les hydrocarbures possèdent une nitrate réductase constitutive insensible à l'oxygène et à l'ammonium et se différencient de ce fait des nitrate réductases bactériennes classiques assimilatrices ou dissimilatrices.

- Chez ces bactéries l'absence d'activité nitrite réductase permet d'expliquer dans une certaine mesure l'accumulation des nitrites dans les biotopes où ont été isolées ces populations.

- Certaines bactéries associées au phytoplancton présentent les mêmes caractéristiques : forte activité nitrate réductase et absence d'activité nitrite réductase et pourraient être aussi dans une certaine mesure responsables de l'accumulation des nitrites.

Cultivées dans des milieux nutritifs liquides contenant des hydrocarbures comme seule source de carbone et fortement aérés ces populations bactériennes peuvent utiliser le nitrate en présence ou en absence d'ammonium.

Après fixation sur des sédiments d'origine marine utilisés comme support solide, ces populations bactériennes ont une activité dénitrifiante en présence de diverses sources de carbone (acides aminés ou glucose) mais sont incapables de dégrader les différentes classes d'hydrocarbures (paraffiniques, cycliques, aromatiques) en présence de nitrate avec ou sans ammonium.

MOTS CLES

Dénitrification - Nitrate réductase - Associations bactéries phytoplancton -
Cycle de l'azote dans les sédiments méditerranéens - Biodégradation.

SUMMARY

BIODEGRADATION OF PETROLEUM HYDROCARBONS AND BACTERIAL DENITRIFYING IN THE MEDITERRANEAN SEDIMENTS

The bacterial populations located in marine sediments or in the areas of "Etang de Berre" which are regularly polluted by petroleum rejects, are able to degrade hydrocarbons in the presence of ammonium and at a lesser degree in the presence of nitrate as sole nitrogen source.

Denitrifying activity was determined by different methods. The obtained results lead in first approximation to the general following conclusions:

- Most of the bacteria which degrade hydrocarbons possess a constitutive nitrate reductase, oxygen and ammonium insensible, which is different from the classical dissimilatory or assimilatory nitrate reductase.

- In these bacteria, the lack of nitrite reductase activity allows to explain the nitrite accumulation in the medium where these bacteria grow.

- Some bacteria linked to phytoplankton have the same characteristics: high nitrate reductase activity, oxygen insensible, and no nitrite reductase activity.

- The study of this "constitutive" nitrate reductase produced in aerobic conditions led us to the fact that this enzyme which is similar to the dissimilatory bacterial nitrate reductase behaves in fact as an assimilatory nitrate reductase.

- When grown on liquid nutritive medium containing hydrocarbons as sole carbon source and under rigorous shaking, these bacteria can use nitrate in presence or in absence of ammonium.

- When fixed on marine sediments used as solid support, these bacterial populations have a denitrifying activity in presence of different carbon sources (amino acids, glucose ...) but they are unable to degrade hydrocarbons in the presence of nitrate with or without ammonium.

	Nombre de bactéries
Population hétérotrophe	10^{10} à 10^{12}
Population active sur HCM	10^9 à 10^{10}
Dénitrifiants assimilateurs HCM + NO_3	10^3 à 10^4
Dénitrifiants constitutifs Phytone + NH_4	10 à 10^2
Dénitrifiants dissimilateurs : (Phytone + $\text{NO}_3 - \text{O}_2$ Bactéries accumulant NO_2)	10^3 à 10^4 80 %

Tableau 1 : Dénombrement de bactéries dans un sédiment pollué. (Etang de Berre)
Le dénombrement des bactéries a été effectué selon une technique décrite dans matériel et méthodes.

Les chiffres retenus correspondent à une moyenne après comptage de 10 boîtes pour chacune des dilutions. Les résultats sont exprimés en cellules par gramme de sédiment humide.

Echantillon	Nombre de bactéries/ml		Nombre d'espèces se développant sur hydrocarbures
	Bactéries Hétérotrophes	Bactéries actives sur hydrocarbures	
EM ₁	5 à $3 \cdot 10^5$	10^5	3
EM ₂	8 à $6 \cdot 10^6$	10^6	5
EM ₃	6 à $2 \cdot 10^5$	10^4	3
EM ₅	6 à $4 \cdot 10^7$	10^7 à 10^6	-
EM ₆	2 à $0 \cdot 10^7$	non détectable	-

Tableau 2 : Dénombrement des bactéries actives sur hydrocarbures dans les échantillons prélevés dans les mousses et les eaux de surface à la sortie des émissaires des raffineries de l'Etang de Berre.

Conditions de culture (en aérobiose)	Protéines mg/ml	Activité nitrate réductase		Activité chlorate réductase	
		Totale	Spécifique	Totale	Spécifique
Glycérol + NH ₄	13,5	8,51	0,63	29,08	2,15
Glycérol + NH ₄ + NO ₃	13	28,38	2,18	141,89	10,91
Glycérol + NO ₃	3,6	14,89	4,14	68,10	18,98

Tableau 3 : Activités nitrate et chlorate réductase mesurées sur les extraits bruts.

L'activité totale est exprimée en μmoles de NO₃ réduit par ml d'extrait et par heure.

L'activité spécifique en μmoles de NO₃ réduit par heure et par mg de protéines.

Rapport Echantillon	C17/Pristane	C17/ramifiés entre C16 et C18	Pristane / ramifiés
Témoin non ensemencé	4,1	4,5	1,1
* Sédiment + NH ₄ + Fd1 + bactéries	4,1	4,5	1,1
* Idem	4,1	4,5	1,1
** Sédiment + NH ₄ + Ff1 + bactéries	0,96	2,1	2,2

Tableau 4 : Analyse par chromatographie en phase gazeuse capillaire du Fd1 introduit dans un sédiment (0,2g/20g de sédiment), extrait, avant et après incubation en présence de bactéries, par la méthode Azoulay et Coll (1981).

Dans la fraction F_A les différents pics C17 pristane et hydrocarbures ramifiés témoins ont été mesurés et ont permis à partir des rapports des aires de connaître le pourcentage de dégradation.

* Sédiment introduit dans le réacteur décrit dans la figure 7, et traité pendant 48 heures.

** Sédiment soumis à l'agitation réciproque pendant 48 heures.

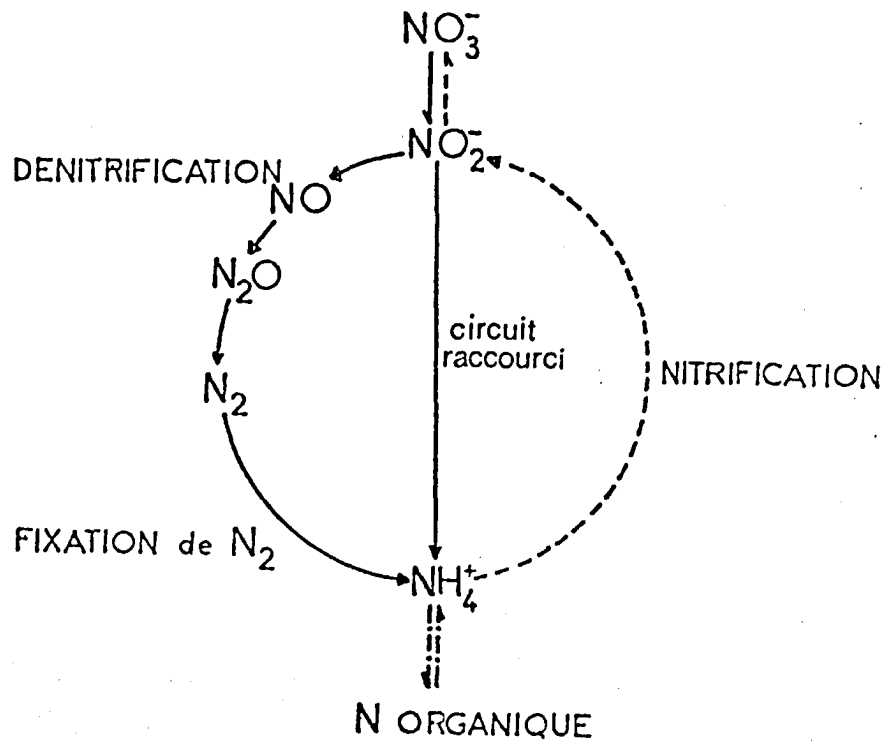


Figure 1 : Cycle de l'azote.

Etats d'oxydation de l'azote

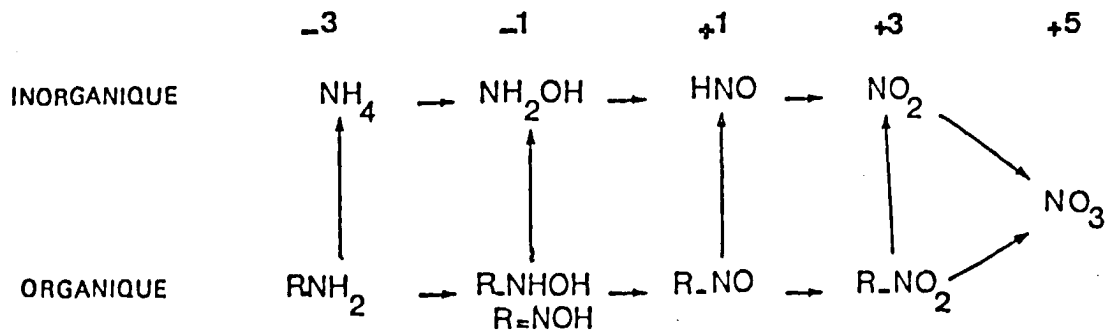


Figure 2 : Nitrification.

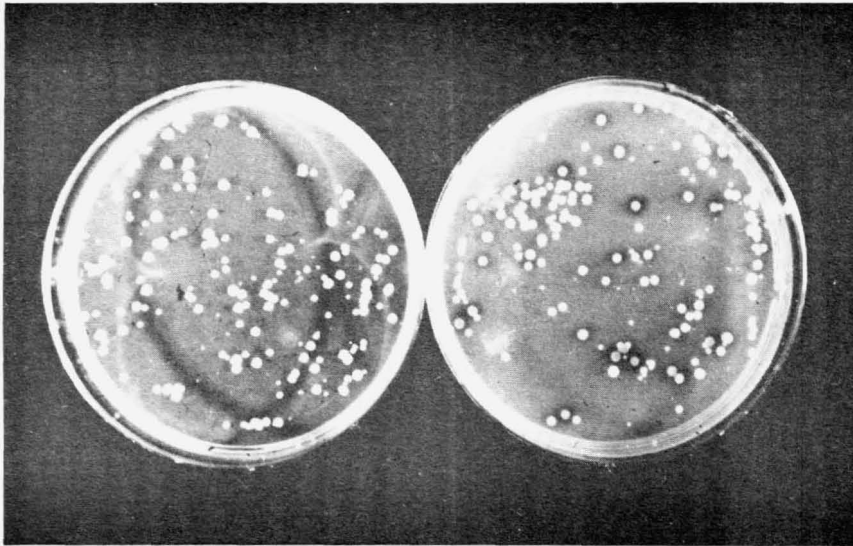


Figure 3

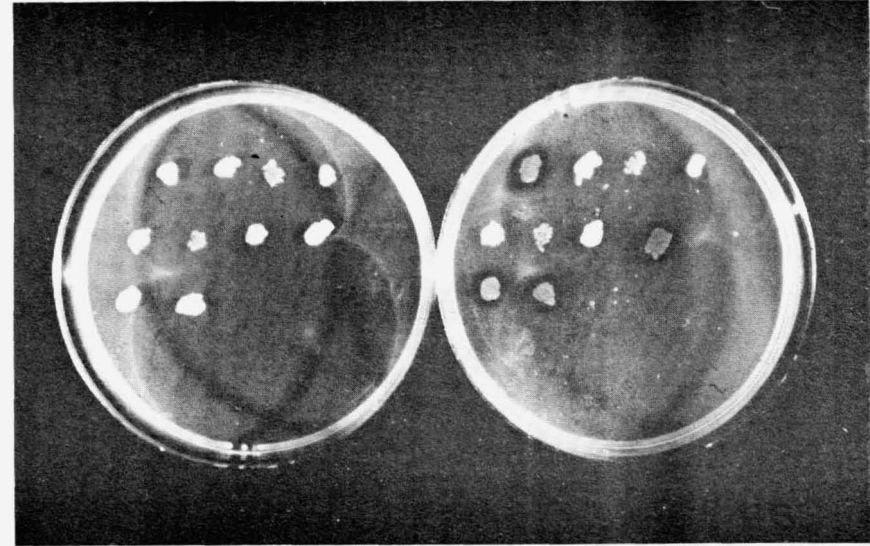


Figure 4

Mise en évidence des clones "nitrite \oplus " porteurs de la nitrate réductase constitutive. Sur les cellules cultivées sur un milieu nutritif (EMR) enrichi en NH_4^+ , on coule une couche d'agar contenant du NO_3 . On laisse l'enzyme s'exprimer pendant 10 à 15 min, puis on coule une nouvelle couche d'agar contenant les réactifs nécessaires pour la détection des nitrites. Les bactéries porteuses de l'activité nitrate réductase se colorent en rose (noir sur la photo).

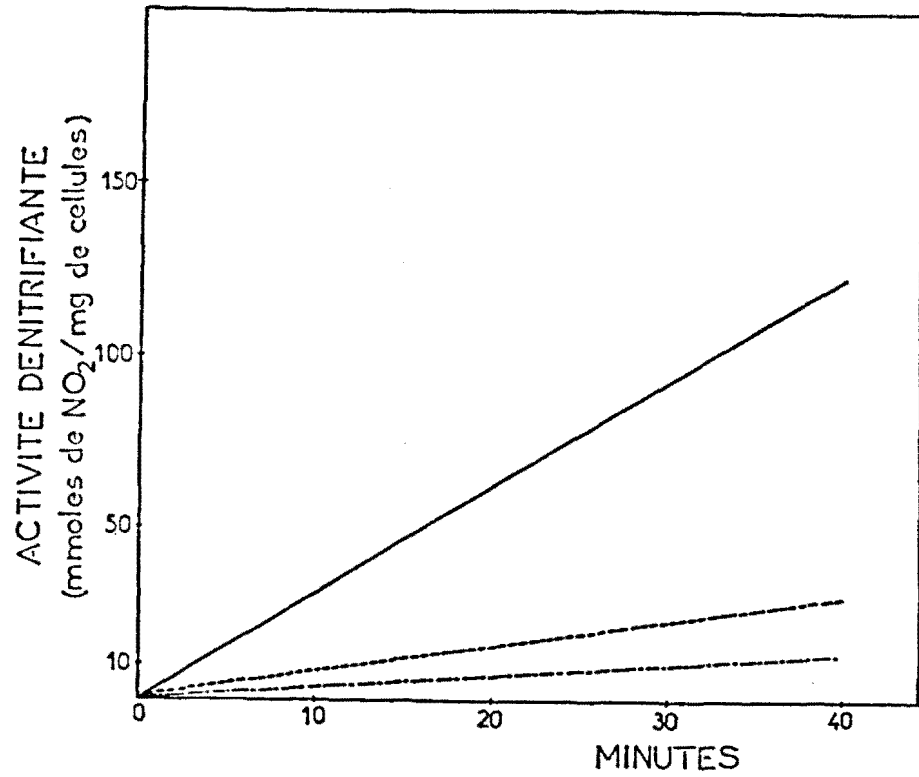


Figure 5 : Mesure de l'activité dénitrifiante sur les cellules entières.

La souche P_2 est cultivée sur glycérol et différentes sources d'azote (— NO_3 , ---- $\text{NO}_3 + \text{NH}_4$, -.-.- NH_4). Les cellules sont récoltées par centrifugation et l'activité dénitrifiante mesurée dans des systèmes réactionnels incubés en anaérobiose et contenant une suspension cellulaire, du glycérol et du nitrate. Les nitrites sont dosés en fonction du temps d'incubation.

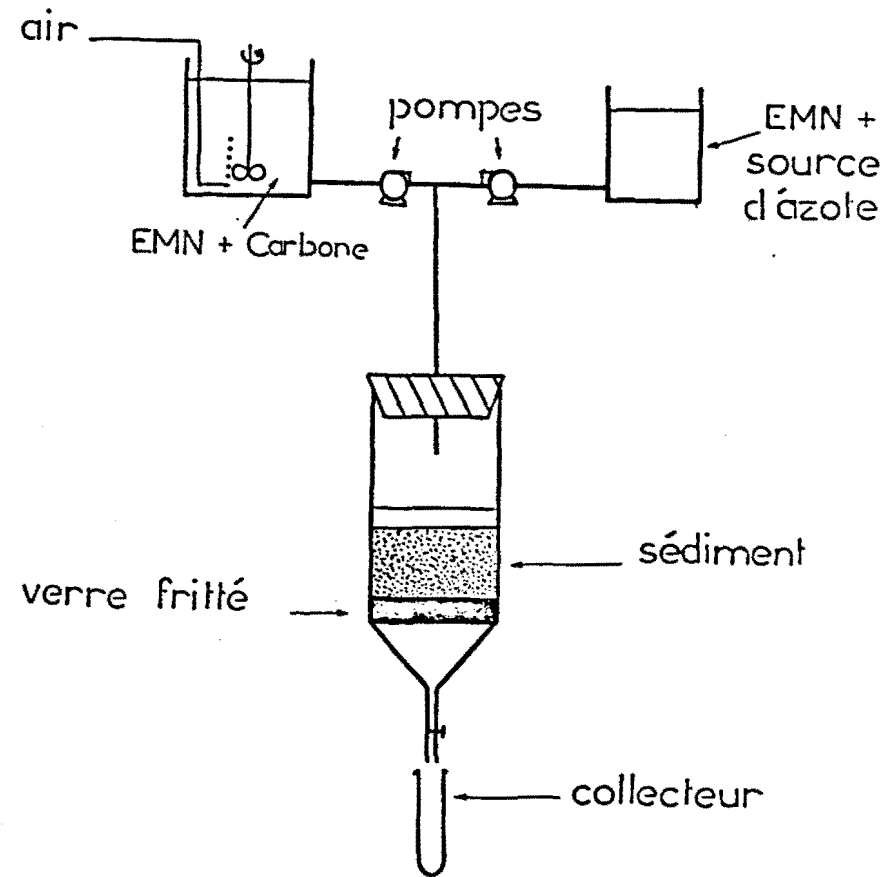


Figure 6 : Schéma d'un réacteur expérimental permettant d'effectuer les mesures d'activité dénitrifiante des sédiments contenant une population bactérienne.

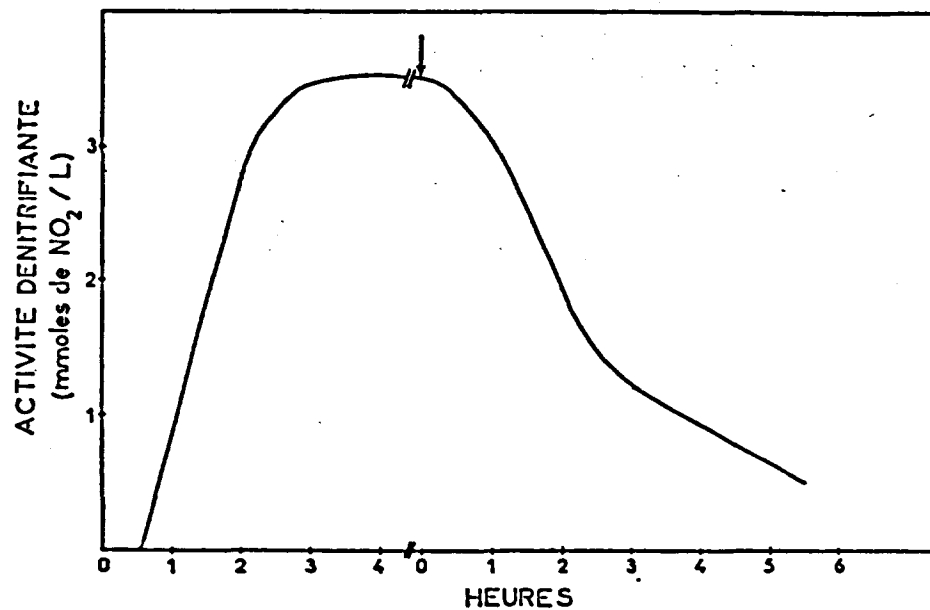


Figure 7 : Activité dénitrifiante de la population bactérienne fixée sur le sédiment et influence de la source de carbone sur cette activité.

L'activité dénitrifiante est mesurée en aérobiose en présence de phytone, glucose et nitrate (aux concentrations de 0,5 g/l). Les nitrites apparus augmentent régulièrement jusqu'à un plateau qui se maintient stable durant plusieurs heures. La suppression de la source de carbone provoque la chute de l'activité dénitrifiante.

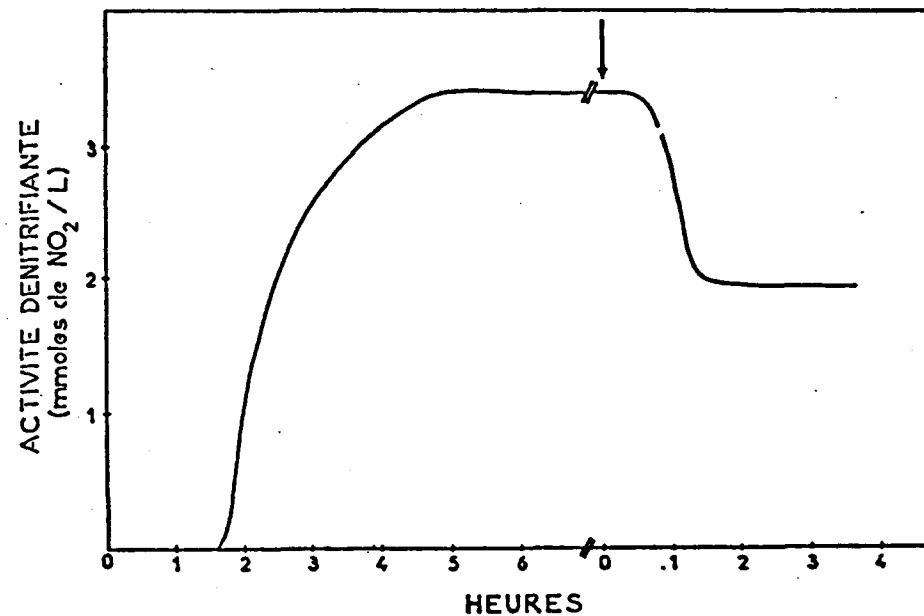


Figure 8 : Activité dénitrifiante de la population bactérienne fixée sur le sédiment et variation de cette activité en fonction du débit.

L'activité dénitrifiante, mesurée en anaérobiose en présence de phytone, glucose et nitrate (aux concentrations de 0,5 g/l) est sensiblement égale à celle mesurée en aérobiose (fig.8) Pour un débit de 10 ml/h le taux de réduction du NO₃ en NO₂ atteint 68,7 %, quand ce débit atteint 25 ml/h, ce taux passe à 38 %.

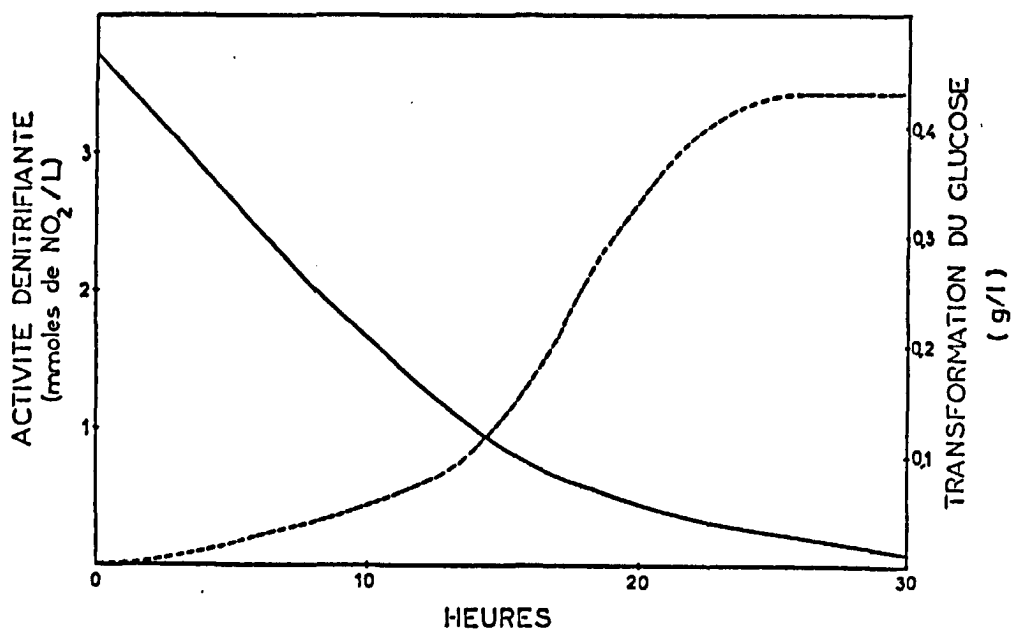


Figure 9 : Activité dénitrifiante de la population bactérienne fixée au sédiment.

Cette activité est mesurée en aérobiose en présence de glucose et de NO_3 (aux concentrations de 0,5 g/l). La réduction du nitrate en nitrite (---) est mesurée parallèlement à l'utilisation du glucose (—). Le taux de nitrites augmente jusqu'à atteindre un plateau lorsque la consommation du glucose est totale.

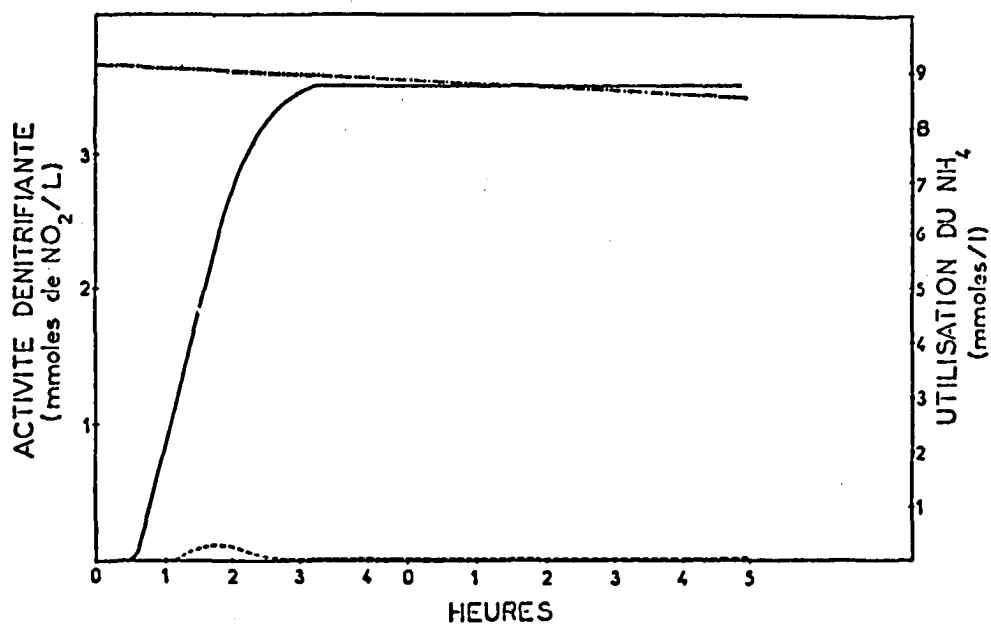


Figure 10 : Comparaison des activités dénitrifiantes mesurées en présence de deux sources de carbone différentes : — phytone + glucose
----- pétrole brut.

En présence d'hydrocarbures, l'activité dénitrifiante de la population bactérienne est nulle. La même expérience réalisée avec de l'ammonium comme source d'azote au lieu du nitrate montre qu'il n'est pas consommé (-.-).

REFERENCES

- AZOULAY, E., DUBREUIL, J., COLIN, M., DOU, H.J.M., MILLE, G., GIUSTI, G., 1981. Relationship between hydrocarbons and bacterial activity in the mediterranean sediments. Mar. Environ. Research. (sous presse).
- AZOULAY, E., DOU, H.J.M., 1980. Evolution des hydrocarbures dans les sédiments marins. Rapport C.N.E.X.O. contrat 792032.
- BEGG, Y.A., WHYTE, J.N. and HADDOCK, B.A., 1977. The identification of mutants of *Escherichia coli* deficient in formate dehydrogenase and nitrate reductase activities using dye indicator plates. FEMS Microbiol. Let. 2, 47-50.
- BERTRAND, J.C., MUTAFTSCHIEV, S., HENKEL, H.G., BAZIN, H. et AZOULAY, E., 1976. Isolement et étude d'une bactérie marine se développant sur hydrocarbures. Ann. Microbiol. Inst. Pasteur 127B 393-409.
- BILLEN, G. A budget of nitrogen recycling in north sea sediments off the belgian coast. 1978. Estuarine and coastal marine Science, 7, 127-146.
- COLE, J.A., BROWN, C.M., 1980. Nitrite reduction to ammonia by fermentative bacteria: a short circuit in the biological nitrogen cycle. FEMS Microbiol. Let. 1973. 7, 65-72.
- DA FONSECA WOLLHEIM, F., 1973. Z. Klin. Chem. Kliss. Biochem., 11, 421-426.
- FOCHT et VESTRAETE, Adv. in Microbiol. Ecol. Vol. 1, p. 135.
- GARLAND, P.B., DOWNIE, J.A. and HADDOCK, B.A., 1975. Proton translocation and the respiratory nitrate reductase of *Escherichia coli*. Biochim. J., 152, 547-559.
- LOWRY, O.H., ROSEN BROUGH, N.H., FARR, A. and RANDAL, J.R., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193, 265-275.
- PIECHAUD, M., PUIG, J., PICHINOTY, F., AZOULAY, E. et LE MINOR, L., 1967. Mutations affectant la nitrate réductase A et d'autres enzymes bactériennes d'oxydo-réduction. Etude préliminaire. Ann. Inst. Pasteur, 112, 24-37.
- RIDER, B.F. and MELLON, M.G., 1946. Biochem. J., 164, 199-211.
- SCHMIDT, F.M., 1961. Klin. Wschr., 39, 1244.
- SLAWYK, G., 1980. L'absorption de composés azotés par le phytoplancton marin : Rôle dans la production primaire ; Relation avec la photosynthèse et les variables du milieu extra et intracellulaire. Thèse Doctorat d'Etat, Université Aix-Marseille II.
- SORENSEN, J., 1979. Capacity for denitrification and reduction of nitrate to ammonia in coastal marine sediment. Appl. Environ. Microbiol., 35, 301-330.