

GERBAM — Deuxième Colloque International de Bactériologie marine — CNRS, Brest, 1-5 octobre 1984  
IFREMER, Actes de Colloques, 3, 1986, pp. 319-324

37

## REDUCTION DU NITRATE DANS LES SEDIMENTS MARINS COMPARAISON DES ACTIVITES MESUREES *IN VITRO* ET *IN SITU*

J.L. ESTEVES\*, P. BONIN, F. BLANC, G. MILLE\*\* et J.C. BERTRAND

Centre d'Océanologie de Marseille, U.A. 41, Faculté des Sciences de Luminy, Case 901,  
13288 MARSEILLE Cedex 9. (FRANCE)

\* Centro Nacional Patagonico (CONICET), 28 de Julio n° 28. 9120 PUERTO MADRYN,  
(ARGENTINE)

\*\* Centre de Spectroscopie moléculaire. Faculté des Sciences et Techniques de St  
Jérôme, rue H-Poincaré. 13299 MARSEILLE (FRANCE)

RÉSUMÉ - La réduction du nitrate dans un sédiment marin pollué par les hydrocarbures a été étudiée *in vitro* par un système à flux continu. L'évolution de l'activité en fonction des concentrations variables en nitrate a permis d'établir les constantes cinétiques  $K_m$  ( $330 \mu M$ ) et  $v_{max}$  ( $2,0 \mu M \cdot g^{-1} \cdot h^{-1}$ ) pour ce type de sédiment. Parallèlement, des mesures ont été entreprises dans le milieu naturel. Les vitesses de réduction du nitrate à partir des paramètres cinétiques déterminés *in vitro* et celles établies *in situ* sont respectivement égales à  $60 \mu M \cdot m^{-2} \cdot h^{-1}$  et  $67,4 \mu M \cdot m^{-2} \cdot h^{-1}$ . La corrélation qui existe entre ces valeurs démontre la validité de la technique mise en œuvre au laboratoire.

Mots-clés : réduction du nitrate, dénitrification, flux continu, sédiment, Méditerranée.

ABSTRACT - *In vitro* nitrate reduction in hydrocarbon polluted marine sediments has been studied by flow-through system. By analysing the rate of nitrate consumption as a function of nitrate concentration we could determine the Michaelis-Menten kinetics parameters. ( $k_m = 330 \mu M$ ;  $v_{max} = 2,0 \mu M \cdot g^{-1} \cdot h^{-1}$ ). We found a value of  $60 \mu M \cdot m^{-2} \cdot h^{-1}$  for the rate of *in vitro* nitrate consumption derived from the above kinetic parameters and from the nitrate concentration in the sediment. In parallel we found a value of  $67,4 \mu M \cdot m^{-2} \cdot h^{-1}$  for the rate of nitrate consumption under *in situ* conditions. The great similarity between both results would favor the *in vitro* technique as a valid and for more convenient one.

Key words : nitrate reduction, denitrification, flow-through system, sediment, Mediterranean sea.

### INTRODUCTION

De nombreuses études concernant la dénitrification dans les sédiments marins ont été faites *in vitro* dans les systèmes clos. Par contre, compte tenu des difficultés pratiques rencontrées pour la mesure de cette activité dans les milieux naturels, les données acquises *in situ* sont très limitées. Cependant, la méthode mise au point par Dessery *et al.* (1982), qui consiste à étudier les flux d'échanges entre le sédiment et l'eau subjacente dans une enceinte close, permet d'évaluer la dénitrification. En ce qui nous concerne, nous avons déterminé les vitesses de réduction du nitrate, *in vitro*, par une technique de flux continu (Azoulay *et al.*, 1982 ; Esteves, 1986) et *in situ* en adoptant le dispositif préconisé par Dessery *et al.* (1982). Les résultats ainsi acquis par la mise en œuvre de ces deux techniques ont été comparés.

## RESULTATS

### Activité *in vitro* : détermination des paramètres cinétiques

A partir des valeurs obtenues en utilisant le système à flux continu (tab. 1) on peut effectuer une représentation graphique de l'évolution de l'activité en fonction de la concentration initiale en nitrate. On obtient une courbe de type hyperbolique correspondant à une cinétique de type Michaelis- Menten. Une représentation selon Lineweaver-Burk permet de calculer un  $K_m$  et un  $V_{max}$  qui sont respectivement de  $330 \mu M$  et  $2.0 \mu M \cdot g^{-1} \cdot h^{-1}$ . (fig. 3).

$NO_3^- (\mu)$	10	20	53	108	210	420	1000
$R_{NO_3^-} (x 10^{-3}) (\mu M \cdot g^{-1} \cdot h^{-1})$	65	126	320	542	577	1097	1019

Tableau 1 : vitesse de réduction du nitrate en fonction de la concentration en nitrate. Débit :  $48 \text{ ml} \cdot \text{h}^{-1}$  ; poids sec : 8 g.

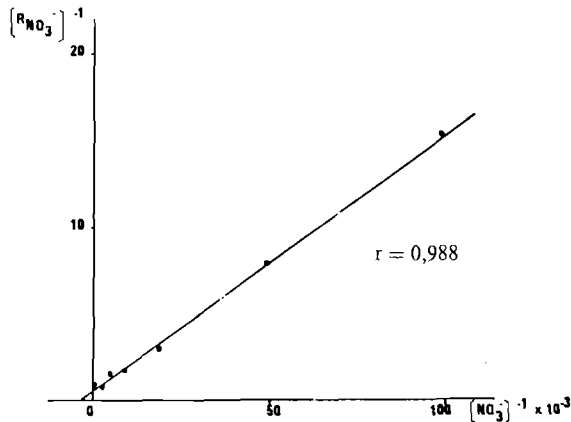


Figure 3 : représentation selon Lineweaver-Burk des données du tableau 1.

### Estimation de la vitesse de consommation du nitrate à partir des concentrations dosées *in situ*.

Les données cinétiques établies précédemment permettent de calculer l'activité dans le milieu naturel. En effet, la vitesse de consommation du nitrate peut s'exprimer par l'équation :

$$V = \frac{V_{max} \cdot C_{NO_3}}{K_m + C_{NO_3}}$$

A partir des concentrations de nitrate dosées *in situ* on peut calculer les vitesses de réduction pour la couche comprise entre l'interface et le premier centimètre (tab. 2).

L'intégration graphique visuelle des trois valeurs ponctuelles (interface à 0,5 cm et 0,5 à 1 cm.) mentionnées dans le tableau 2 ( $V_2$ ) permet d'estimer l'activité *in situ* par unité de surface, supposée limitée au premier centimètre ( $10^4 \text{ cm}^3 \cdot \text{m}^{-2}$ ), à la valeur approximative de  $60 \mu M \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$  ; c'est-à-dire :

$$V = 6 \times 10^{-3} (\mu M \cdot \text{cm}^{-3} \cdot \text{h}^{-1}) \times 10^4 (\text{cm}^3 \cdot \text{m}^{-2})$$

$$V = 60 (\mu M \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{h}^{-1})$$

Profondeur (cm)	Concentration nitrate ( $\mu\text{M}$ )	( $\mu\text{M} \cdot \text{g}^{-1} \text{V}_1 \cdot \text{h}^{-1}$ )	( $\mu\text{M} \cdot \text{cm}^{-3} \text{V}_2 \cdot \text{h}^{-1}$ )
interface	4,9	$29,3 \times 10^{-3}$	$13,18 \times 10^{-3}$
0 - 0,5	1,42	$8,6 \times 10^{-3}$	$3,87 \times 10^{-3}$
0,5 - 1	1,35	$8,1 \times 10^{-3}$	$3,64 \times 10^{-3}$

Tableau 2 : activité en fonction de la profondeur par gramme ( $V_1$ ) ou par  $\text{cm}^3$  ( $V_2$ ) en tenant compte d'une densité de sédiment de 1,5 et d'une porosité de 70 % (30 % du poids sec).

### Activité mesurée in situ

Dans le dispositif expérimental utilisé, le volume de l'enceinte est de 9,5 litres et la surface de sédiment de 0,0958  $\text{m}^2$ . Les valeurs des flux obtenus sont les suivantes :

oxygène = 13, 72 ( $\mu\text{M} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$ ) ; nitrate = 67,4 ( $\mu\text{M} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$ ) ;  
ammonium = -750 ( $\mu\text{M} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$ ).

Il y a donc une consommation d'oxygène et de nitrate au niveau du sédiment et une forte production d'ammonium (fig. 4).

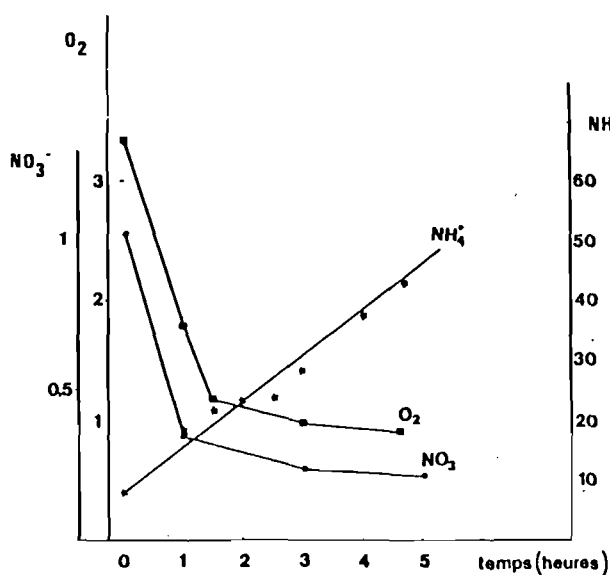


Figure 4 : évolution de l'oxygène ( $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$ ), du nitrate ( $\mu\text{g-at N} - \text{NO}_3^- \cdot \text{l}^{-1}$ ) et de l'ammonium ( $\mu\text{g-at N} - \text{NH}_4^+ \cdot \text{l}^{-1}$ ) dans l'enceinte de la cloche au cours du temps.

### CONCLUSION

Nous avons mesuré parallèlement l'activité dénitrifiante potentielle par un flux continu et l'activité réelle qui existe dans le même sédiment. On constate une différence très importante entre l'évolution des concentrations en nitrate mesurées directement dans l'enceinte de la cloche (activité réelle) et l'activité potentielle déterminé par flux continu ; la première ne représente que 1 % de la seconde. Une telle divergence a été déjà observée par d'autres auteurs (Kaspar, 1982, 1983 ; Tiedje *et al.*, 1982).

Par contre, si les flux d'échange du nitrate à travers l'interface sédiment-eau sont calculés à partir des paramètres cinétiques établies *in vitro* et des concentrations en substrats

trouvées dans le biotope on note une bonne corrélation entre les deux modes d'approche  $67,4 \mu\text{M} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$ ; par utilisation de la cloche et environ  $60 \mu\text{M} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$  par la technique du flux continu. Dessery *et al.*, (1982), dans le bassin de Méry-sur-Oise, ont mesuré des valeurs comparables à celles établies dans ce site. Ces résultats démontrent la validité du système à flux continu et soulignent la similitude des informations que l'on peut obtenir *in situ* et *in vitro*.

---

AZOULAY E., VIOLET M., GIUSTI G., STRAIGER C., 1982. Dégradation des hydrocarbures et dénitrification bactérienne dans les sédiments marins de la côte méditerranéenne. pp : 11-29, in : *Deuxième Colloque Microbiologie marine, n°13*. Centre National pour l'Exploitation des Océans. Paris.

CARPENTER J. H., 1965. The accuracy of the Winkler method for dissolved oxygen. *Limnology and Oceanography*, 10 : 135-140.

DESSERTY S., BILLEN G., MEYBECK M. et CAVELIER C., 1982. Evaluation et modélisation des échanges d'azote à travers l'interface eau-sédiment dans le bassin de Méry-sur-Oise. *Journal Français d'Hydrologie*, 13 (3) 39 : 215-235.

ESTEVEZ J. L., MILLE G., BLANCF., BERTRAND J. C., 1986. Nitrate reduction activity by continuous flow-through system in marine sediments. *Microbial Ecology* 12 : 106-120.

KASPAR H. F., 1982. Denitrification in marine sediment : measurement of capacity and estimate of *in situ* rate. *Applied and Environmental Microbiology*, 43 (3) : 522-527.

KASPAR H. F., 1983. Denitrification, nitrate reduction to ammonium and inorganic pools in intertidal sediments. *Marine Biology*, 74 : 133-139.

MILLE G., DOU H., CRISTIANI G. et GIUSTI G., 1981. Hydrocarbures présents dans des sédiments côtiers superficiels méditerranéens. I : Etude qualitative et quantitative fine. *Environmental Pollution (série B)*, 2 : 437-450.

NORTHBY J. A., 1976. A comment of rate measurements in open systems. *Limnology and Oceanography*, 21 : 180-182.

STRICKLAND J. D. H. et PARSONS T. R., 1972. A practical handbook of sea-water analysis. *Fisheries Research Board of Canada. Bulletin 167 (2nd ed.)*.

TIEDJE J. M., SEXSTONE A. J., MYROLD D. D. and ROBINSON J. A., 1982. Denitrification : ecological niches, competition and survival. *Antonie van Leeuwenhoek*, 48 : 569- 583.