



HAL
open science

**CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DES EAUX ET DES
SÉDIMENTS DE L'ÉTANG DE BAGES-SIGEAN
(AUDE) IV. - RECHERCHES SUR LES PROCESSUS
DE NITRIFICATION (étude préliminaire)**

M. Fiala

► **To cite this version:**

M. Fiala. CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DES EAUX ET DES SÉDIMENTS DE L'ÉTANG DE BAGES-SIGEAN (AUDE) IV. - RECHERCHES SUR LES PROCESSUS DE NITRIFICATION (étude préliminaire). Vie et Milieu , 1967, pp.227-238. hal-02951574

HAL Id: hal-02951574

<https://hal.sorbonne-universite.fr/hal-02951574v1>

Submitted on 28 Sep 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DES EAUX
ET DES SÉDIMENTS
DE L'ÉTANG DE BAGES-SIGEAN (AUDE)**

**IV. — RECHERCHES SUR LES PROCESSUS
DE NITRIFICATION (étude préliminaire)**

par M. FIALA

Laboratoire Arago, 66 - Banyuls-sur-Mer

SOMMAIRE

L'auteur décrit une méthode d'estimation du pouvoir nitrifiant des microflores des sédiments d'un étang roussillonnais, l'étang de Bages-Sigean. La méthode a été appliquée à l'étude de plusieurs stations, et permet de mettre en évidence les variations d'activité des populations auto et hétérotrophes.

INTRODUCTION

Depuis quelques années, des investigations sur les microflores bactériennes peuplant l'eau et les sédiments de l'étang de Bages-Sigean sont poursuivies : étude de la pollution bactérienne (LAGARDE et CASTELLVI, 1964), recherches sur les bactéries responsables de la réduction des composés soufrés (CAHET, 1965) et sur les microorganismes dénitrifiants (LAGARDE, 1964).

Le présent travail complète ces résultats : il est consacré à l'étude d'une étape importante du cycle de l'azote : la nitrification. Nous ne traiterons ici que de la répartition et des activités globales des populations bactériennes qui participent à ce processus.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

I. — LE COMPLEXE LAGUNAIRE BAGES-SIGEAN

Ses caractéristiques topographiques, hydrologiques, sédimentologiques et climatiques ont déjà fait l'objet de plusieurs travaux (PETIT et MIZOULE, 1962), (LAGARDE, CAHET et MOURRUT, 1964). Ce vaste ensemble lagunaire s'étend sur 14 km de longueur de Port-la-Nouvelle au Sud, à la Nautique au Nord, et sur 2,5 km de largeur. Soumis à des influences variées, il est constitué par la juxtaposition de biotopes très différents. Il communique avec la mer par le canal de Port-la-Nouvelle. De nombreux ruisseaux à débit variable, mais peu important (à l'exception du canal de la Robine et la rivière la Berre) l'alimentent en eau douce. Il en résulte une variation de salinité qui détermine une grande diversification de la végétation, composée en majeure partie de Phanérogames : *Zostera*, *Ruppia*, *Potamogeton*. Par ailleurs, du fait de sa faible profondeur (2,80 m au maximum) cet étang est soumis à l'action directe des vents (dominance N-NW).

II. — STATIONS DE PRÉLÈVEMENT

Nous avons choisi 6 stations les plus représentatives possible. Dans ce but, plusieurs facteurs ont été envisagés : salinité, profondeur, végétation et granulométrie (Fig. 1).

Deux stations se situent dans le bassin sud (Etang de l'Aute - Sigean - la Nadière) :

- La station A accessible par tous les temps; sa salinité variant de 9,2 ‰ l'hiver à 28,9 ‰ l'été, permet le développement de *Zostera nana* vivant à faible profondeur (0,10 m à 0,30 m).
- La station B, située dans le chenal de la Nadière, diffère de la précédente par sa salinité plus élevée (19,7 ‰ l'hiver, 35,1 ‰ l'été) et par sa végétation (*Zostera nana* fait place à *Zostera marina*). La profondeur y est également plus importante : 1 m en moyenne.

Trois autres stations ont été suivies dans le bassin central (Etang de Bages) caractérisé par une salinité homogène (19,4 ‰ l'été, 6,8 ‰ l'hiver) :

- La station C, proche de la côte, de profondeur moyenne, 1 m, dont la végétation est composée de *Ruppia* et de *Potamogeton*.

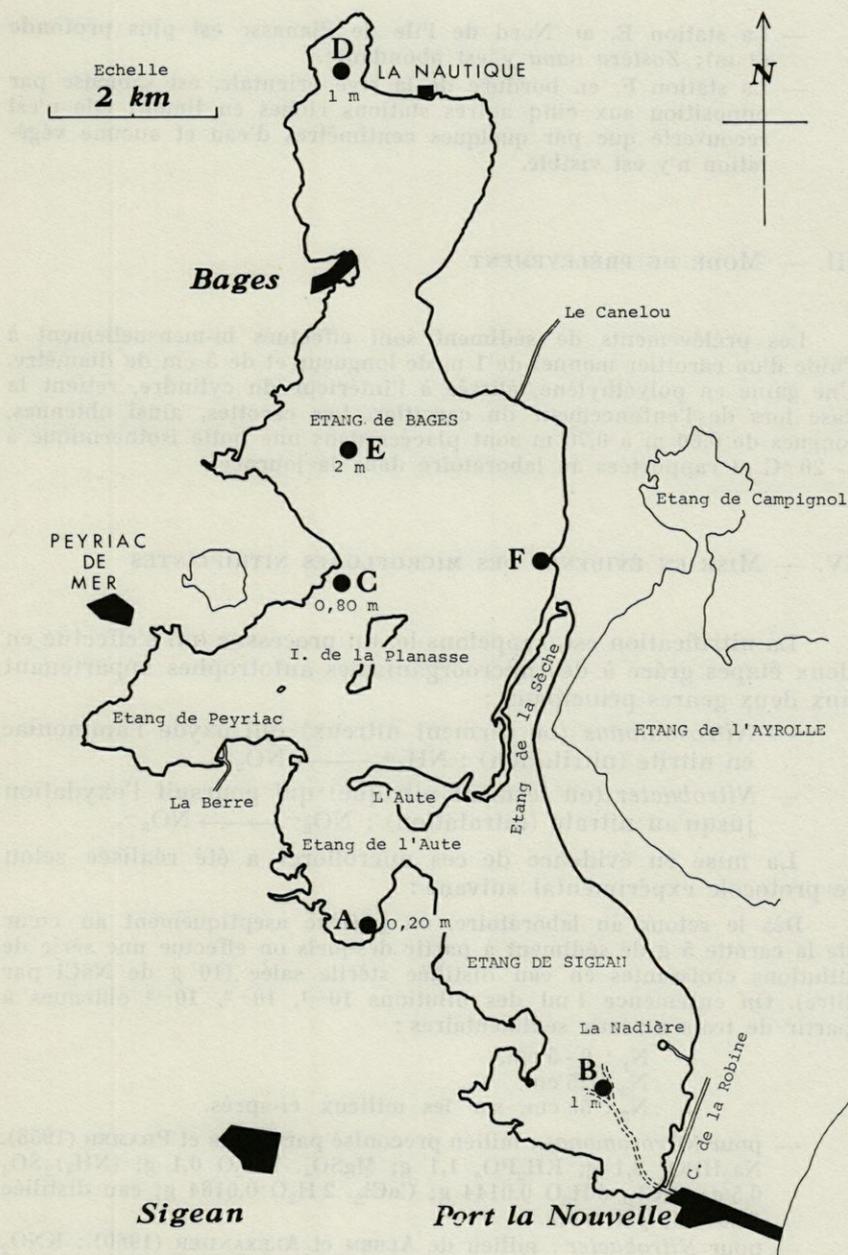


FIG. 1. — Le complexe lagunaire Bages-Sigean. Répartition générale des stations avec mention de leur profondeur.

- La station E, au Nord de l'île de Planasse est plus profonde (2 m); *Zostera nana* y est abondante.
- La station F, en bordure de la rive orientale, est sableuse par opposition aux cinq autres stations riches en limon; elle n'est recouverte que par quelques centimètres d'eau et aucune végétation n'y est visible.

III. — MODE DE PRÉLÈVEMENT

Les prélèvements de sédiment sont effectués bi-mensuellement à l'aide d'un carottier manuel de 1 m de longueur et de 5 cm de diamètre. Une gaine en polyéthylène, glissée à l'intérieur du cylindre, retient la vase lors de l'enfoncement du carottier. Les carottes, ainsi obtenues, longues de 0,60 m à 0,70 m sont placées dans une boîte isothermique à -20°C et rapportées au laboratoire dans la journée.

IV. — MISE EN ÉVIDENCE DES MICROFLORES NITRIFIANTES

La nitrification est, rappelons-le, un processus qui s'effectue en deux étapes grâce à des microorganismes autotrophes appartenant aux deux genres principaux :

- *Nitrosomonas* (ou ferment nitreux) qui oxyde l'ammoniac en nitrite (nitritation) : $\text{NH}_4^+ \longrightarrow \text{NO}_2^-$.
- *Nitrobacter* (ou ferment nitrique) qui poursuit l'oxydation jusqu'au nitrate (nitratation) : $\text{NO}_2^- \longrightarrow \text{NO}_3^-$.

La mise en évidence de ces microflores a été réalisée selon le protocole expérimental suivant :

Dès le retour au laboratoire, on prélève aseptiquement au cœur de la carotte 5 g de sédiment à partir desquels on effectue une série de dilutions croissantes en eau distillée stérile salée (10 g de NaCl par litre). On ensemence 1 ml des dilutions 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} obtenues à partir de trois niveaux sédimentaires :

- N_1 : 0-5 cm,
- N_2 : 25 cm,
- N_3 : 50 cm, sur les milieux ci-après.

- pour *Nitrosomonas* : milieu préconisé par LEWIS et PRAMER (1958). Na_2HPO_4 3,1 g; KH_2PO_4 1,1 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,1 g; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,5 g; $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,0144 g; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,0184 g; eau distillée 1 000 cc; pH = 7,2.
- pour *Nitrobacter* : milieu de ALEEM et ALEXANDER (1960) : KNO_3 0,3 g; K_2HPO_4 0,175 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,175 g; KHCO_3 1,5 g; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 35 μg ; pH = 8.

On ajoute à chaque milieu 10 g de NaCl.

Parallèlement aux autotrophes classiques, *Nitrosomonas* et *Nitrobacter* des microorganismes hétérotrophes participant à cette oxydation, ont été mis en évidence. Le problème de la nitrification hétérotrophe n'a cependant fait l'objet que de quelques travaux parmi lesquels ceux de KALINENKO (1948), T. et E. FISCHER et APPLEMAN (1952), ALEXANDER, MARSHALL et HIRSCH (1960), BRISOU et VARGUES (1962). Nous avons tenté de mettre en évidence et de tester l'activité de ces bactéries. 0,5 g de Bacto-peptone DIFCO et 0,2 g de Yeast extract DIFCO ont été ajoutés à chacun des deux milieux. Chaque milieu est ensuite réparti à raison de 10 ml par tube à essais et stérilisé à 115 °C pendant 20 minutes. Les tubesensemencés sont incubés à l'obscurité à la température du laboratoire (18 - 20 °C).

Les nitrites et nitrates sont testés trois mois plus tard à l'aide des réactifs suivants :

- pour les nitrites : Réactif de GRIESS,
- pour les nitrates : Diphénylamine sulfurique après destruction préalable des nitrites par l'urée et l'acide sulfurique (POCHON, 1954).

RÉSULTATS

1°) LE POUVOIR NITRIFIANT

L'activité nitrosante est proportionnelle à la quantité de nitrite produite dans le milieu de culture par les germes nitreux. Nous avons établi une codification apte à en rendre compte, en déterminant préalablement par dosage (méthode de RIDER et MELLON, 1946), les quantités de nitrites correspondant aux colorations obtenues par le réactif de GRIESS.

- une teneur de N-NO₂ comprise entre 10 et 100 γ/litre se traduisant par une teinte rose pâle est affectée du coefficient arbitraire 1.
- une teneur de N-NO₂ comprise entre 100 et 500 γ/litre se traduisant par une couleur rose franc est affectée du coefficient 2.
- une teneur de N-NO₂ comprise entre 500 et 4 000 γ/litre se traduisant par une couleur rouge carmin est affectée du coefficient 3.
- une teneur de N-NO₂ supérieure à 4 000 γ/litre se tradui-

sant par une couleur rouge brique foncé est affectée du coefficient 4.

On attribue les valeurs 5, 10, 15, 20, respectivement aux dilutions 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} .

Pour chaque dilution on fait le produit du coefficient nitrite par le coefficient dilution et la constante K. Le pouvoir nitreux du niveau sédimentaire envisagé est alors donné par la somme des valeurs ainsi calculées.

$$\text{Pne} = \Sigma (\text{coefficient.nitrite}) \times (\text{coefficient.dilution}) \times K$$

K étant égal à 1/2

Exemple :

Supposons qu'au niveau N_1 les tubes aient donné les résultats ci-après :

solution 10^{-1}	$\text{NO}_2 = 20$
» » 10^{-2}	$\text{NO}_2 = 15$
» » 10^{-3}	$\text{NO}_2 = 5$
» » 10^{-4}	$\text{NO}_2 = 0$

Le pouvoir nitreux du niveau sédimentaire N_1 sera :

$$\text{Pne} = (20 \times 1) + (15 \times 2) + (5 \times 3) \cdot 1/2 = 32,5.$$

K a été choisi empiriquement égal à 1/2 de façon que, dans le cas où tous les tubes présentent la teneur la plus élevée en nitrite (coefficient 20), Pne ait une valeur égale à 100, qui correspond à l'activité maximale de la microflore nitreuse.

Le réactif à la diphenylamine sulfurique donne, selon la teneur en nitrate, une coloration bleue plus ou moins intense. Pour la représentation graphique des résultats nous avons adopté des conventions similaires à celles appliquées aux nitrites : la couleur bleue diffuse au fond du tube correspond au coefficient 5 et l'anneau bleu au coefficient 20.

Des essais quantitatifs étant en cours, nous nous contenterons lors de ce premier exposé d'appréciations approximatives des teneurs en nitrate.

2°) RÉSULTATS

Les résultats obtenus pour la station de référence A durant la période s'étendant de février à octobre 1966 sont représentés par

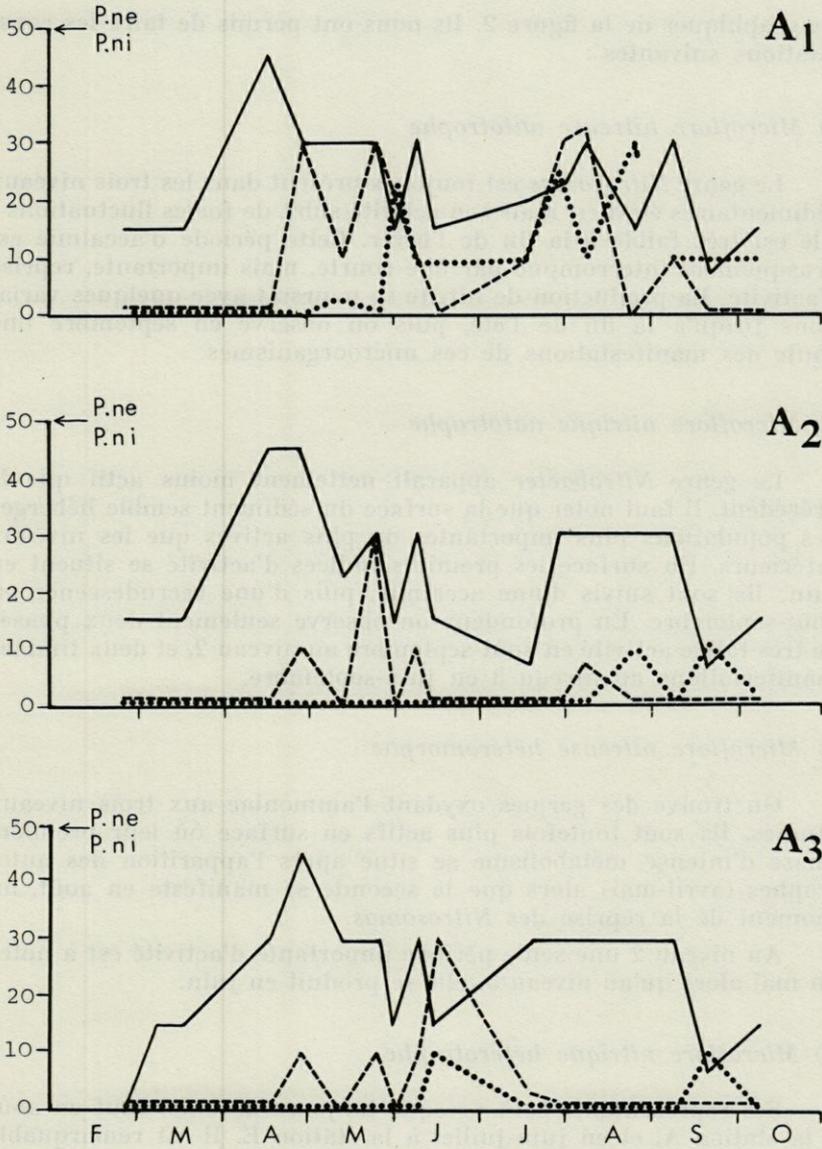


FIG. 2. — Activité nitrifiante de la station A aux trois niveaux sédimentaires.

A₁ : 0-5 cm, A₂ : 25 cm, A₃ : 50 cm.

P.ne : Pouvoir nitreux

P.ni : Pouvoir nitritique

— autotrophie
- - - hétérotrophie
..... autotrophie.

les graphiques de la figure 2. Ils nous ont permis de faire les constatations suivantes :

a) *Microflore nitreuse autotrophe*

Le genre *Nitrosomas* est toujours présent dans les trois niveaux sédimentaires étudiés, mais son activité subit de fortes fluctuations : elle est très faible à la fin de l'hiver. Cette période d'accalmie est brusquement interrompue par une courte, mais importante, reprise d'activité. La production de nitrite se poursuit avec quelques variations jusqu'à la fin de l'été, puis on observe en septembre une chute des manifestations de ces microorganismes.

b) *Microflore nitrique autotrophe*

Le genre *Nitrobacter* apparaît nettement moins actif que le précédent. Il faut noter que la surface du sédiment semble héberger des populations plus importantes ou plus actives que les niveaux inférieurs. En surface les premiers indices d'activité se situent en juin; ils sont suivis d'une accalmie, puis d'une recrudescence en août-septembre. En profondeur on observe seulement deux phases de très faible activité en août-septembre au niveau 2, et deux timides manifestations au niveau 3 en juin-septembre.

c) *Microflore nitreuse hétéromorphe*

On trouve des germes oxydant l'ammoniac aux trois niveaux étudiés. Ils sont toutefois plus actifs en surface où leur première phase d'intense métabolisme se situe après l'apparition des autotrophes (avril-mai) alors que la seconde se manifeste en août, au moment de la reprise des *Nitrosomas*.

Au niveau 2 une seule période importante d'activité est à noter en mai alors qu'au niveau 3, elle se produit en juin.

d) *Microflore nitrique hétérotrophe*

Ses représentants sont presque toujours absents, sauf en août à la station A, et en juin-juillet à la station E. Il est remarquable qu'ils se localisent dans les deux cas au niveau le plus inférieur; aucune activité n'est décelable en surface.

Les résultats obtenus aux autres points de prélèvement étant à quelques nuances près, similaires, nous ne représentons que leurs valeurs moyennes (Fig. 3).

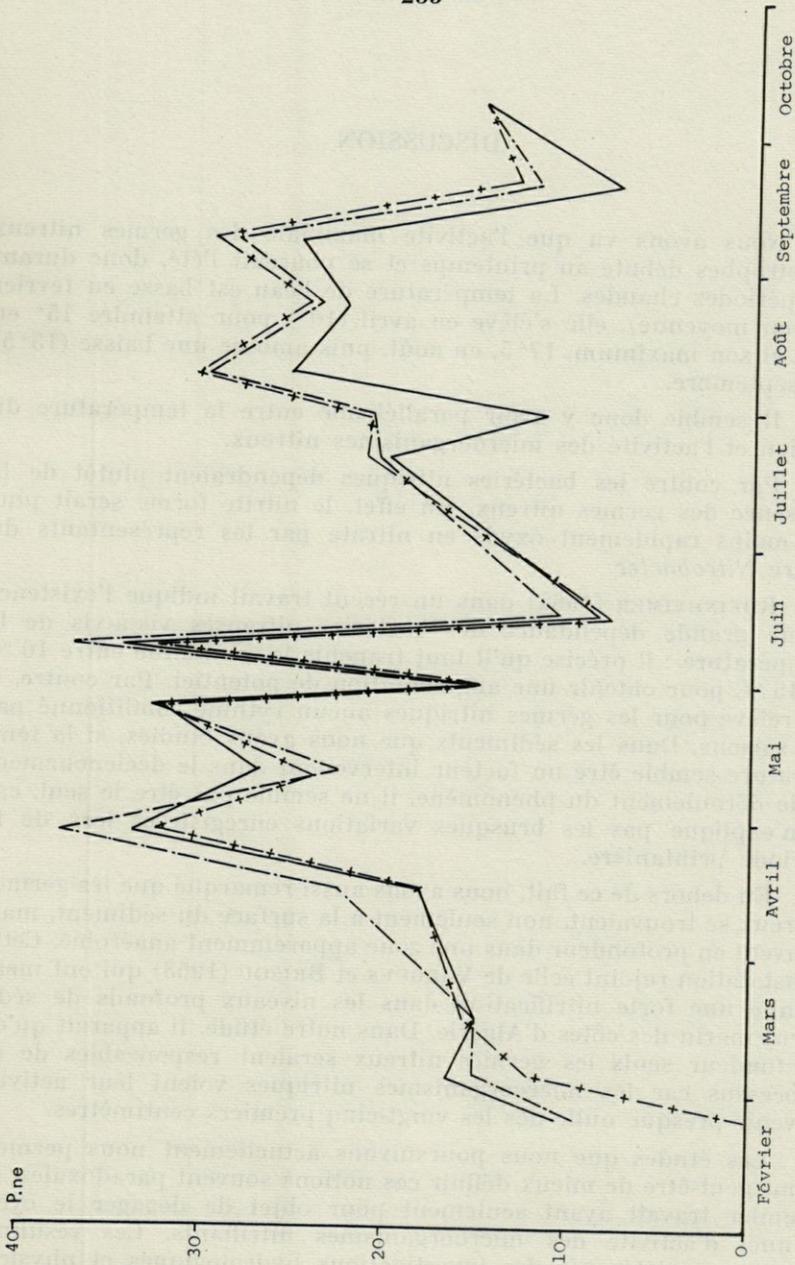


FIG. 3. — Pouvoir nitreux autotrophe. Moyenne de l'ensemble des stations aux trois niveaux sédimentaires.

— niveau 1
- - - - - niveau 2
+ + + + + niveau 3

DISCUSSION

Nous avons vu que l'activité maximale des germes nitreux autotrophes débute au printemps et se poursuit l'été, donc durant les périodes chaudes. La température de l'eau est basse en février (8° en moyenne), elle s'élève en avril (10°) pour atteindre 15° en mai et son maximum, 17° 5, en août, puis amorce une baisse (13° 5) en septembre.

Il semble donc y avoir parallélisme entre la température du milieu et l'activité des microorganismes nitreux.

Par contre les bactéries nitriques dépendraient plutôt de la présence des germes nitreux. En effet, le nitrite formé serait plus ou moins rapidement oxydé en nitrate par les représentants du genre *Nitrobacter*.

RHEINHEIMER (1965) dans un récent travail indique l'existence d'une grande dépendance des bactéries nitreuses vis-à-vis de la température : il précise qu'il faut franchir le seuil situé entre 10 °C et 15 °C pour obtenir une augmentation de potentiel. Par contre, il ne relève pour les germes nitriques aucun rythme conditionné par les saisons. Dans les sédiments que nous avons étudiés, si la température semble être un facteur intervenant dans le déclenchement et le déroulement du phénomène, il ne semble pas être le seul, car il n'explique pas les brusques variations enregistrées lors de la période printanière.

En dehors de ce fait, nous avons aussi remarqué que les germes nitreux se trouvaient, non seulement à la surface du sédiment, mais souvent en profondeur dans une zone apparemment anaérobie. Cette constatation rejoint celle de VARGUES et BRISOU (1963) qui ont mentionné une forte nitrification dans les niveaux profonds de sédiment marin des côtes d'Algérie. Dans notre étude, il apparaît qu'en profondeur seuls les germes nitreux seraient responsables de ce processus car les microorganismes nitriques voient leur activité devenir presque nulle dès les vingt-cinq premiers centimètres.

Les études que nous poursuivons actuellement nous permettront peut-être de mieux définir ces notions souvent paradoxales, ce premier travail ayant seulement pour objet de dégager le cycle annuel d'activité des microorganismes nitrifiants. Ces résultats seront complétés par des investigations hydrologiques et physico-chimiques, ainsi que par des recherches, actuellement en cours sur la fixation de l'azote.

RÉSUMÉ

Cette note préliminaire est consacrée à la méthodologie et à la mise en évidence de l'activité des microflores nitrifiantes des sédiments du complexe lagunaire Bages - Sigean (Aude). Six stations ont été régulièrement suivies durant 8 mois (février - septembre 1966). Une méthode d'estimation du pouvoir nitrifiant a été mise au point. Elle a permis de noter des variations dans les activités des populations nitrifiantes autotrophes et hétérotrophes. Une étude plus détaillée, alliée à une appréciation de facteurs écologiques compléteront ultérieurement ces recherches.

SUMMARY

This preliminary paper is devoted to the methodology and evidencing of nitrogenous abilities of the sediment's microflora in the lagoon complex Bages - Sigean (Aude). Six stations have been regularly investigated during 8 months (February - September 1966). A method of evaluation the nitrifying capacities has been developed. It enables to trace out the variations of activity in the population of both autotrophic and heterotrophic microorganisms. A more detailed study concerning with the ecological factors will follow later on.

ZUSAMMENFASSUNG

In dieser vorläufigen Mitteilung wird die Methodologie beschrieben und die Aktivität der nitratbildenden Mikroflora der Ablagerungen des Lagunenkomplexes Bages - Sigean (Aude) gezeigt. Während 8 Monaten (Februar - September 1966) wurden regelmäßig 6 Stationen untersucht. Wir konnten eine Methode zur Schätzung der Wirksamkeit der nitratbildenden Mikroflora ausarbeiten. Es konnten Unterschiede in der Aktivität der autotrophen und der heterotrophen Populationen festgestellt werden. Eine grössere Arbeit, in welche auch die oekologischen Faktoren mit einbezogen werden, wird diesen ersten Untersuchungen folgen.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ALEXANDER, M., K.C. MARSHALL et P. HIRSCH, 1960. Autotrophy and heterotrophy in nitrification. Trans. 7th internation. Congr. Soil. Sci. III. Soil Biol. Madison : 586-591.
- ALEEM, M.I.H. et M. ALEXANDER, 1960. Nutrition and physiology of *Nitrobacter agilis*. *Appl. Micr.*, 8 (2) : 80-84.
- BRISOU, J. et H. VARGUES, 1962. Relations entre groupes physiologiques microbiens hétérotrophes et processus de nitrosation. *C.R. Soc. Biol. Fr.*, 156 (8-9) : 1487-1489.
- CAHET, G., 1965. Contribution à l'étude des eaux et des sédiments de l'étang de Bages-Sigean. III. Réduction des composés soufrés. *Vie Milieu*, XVI (2B) : 917-981.
- FISHER, T., E. FISHER et M.D. APPLEMAN, 1952. Nitrification by certain heterotrophic bacteria present in soil. *J. Bact.*, 64 : 596.
- KALINENKO, V.O., 1948. Heterotrophic bacteria as nitrifiers. *Pedology* : 357-363.
- LAGARDE, E., 1964. Méthode d'estimation du pouvoir dénitrifiant des eaux et des sédiments marins. *Vie Milieu*, 15 (1) : 213-217.
- LAGARDE, E., G. CAHET et M. MOURRUT, 1964. Contribution à l'étude des eaux et sédiments de l'étang de Bages-Sigean. I. Données climatiques. *Vie Milieu*, Suppl. n° 17 : 35-40.
- LAGARDE, E., et G. CAHET, 1964. Contribution à l'étude des eaux et des sédiments de l'étang de Bages-Sigean. II. Recherches physico-chimiques et microbiologiques. *Vie Milieu*, Suppl. n° 17 : 41-60.
- LAGARDE, E. et J. CASTELLVI, 1964. Quelques aspects de la pollution bactérienne d'un milieu saumâtre du littoral méditerranéen. *Comm. int. Explor. sci. Mer, Medit., Symp. Pollut. mar. Microorgan. Prod. petrol.*, 43-54.
- LEWIS, R.F. et D. PRAMER, 1958. Isolation of *Nitrosomonas* in pure culture. *Jour. Bact.*, 76 (5) : 524-528.
- PETIT, G. et R. MIZOULE, 1962. Contribution à l'étude du complexe lagunaire Bages-Sigean. *Vie Milieu*, 12 (2) : 205-230.
- POCHON, J., 1954. Manuel technique d'analyse microbiologique du sol. Paris, Masson et Cie.
- RHEINHEIMER, G., 1965. Mikrobiologische Untersuchungen in der Elbe zwischen Schnackenburg und Cuxhaven. *Arch. Hydrobiol.*, Suppl. 29 (2), 3-4 : 182-251.
- RIDER, B.F. et M.G. MELLON, 1946. Colorimetric determination of nitrites. *Ind. Eng. Chem.*, 18 : 96.

Reçu le 13 février 1967