

COMITÉ DE MICROBIOLOGIE MARINE

Président : Dr SENEZ (France)

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DU MÉTABOLISME DE L'AZOTE MINÉRAL EN MILIEU MARIN

Étude de souches pures de bactéries dénitrificatrices et réductrices des nitrates

par E. LAGARDE et P. FORGET

INTRODUCTION

S'il est généralement admis que l'azote minéral est l'ultime source d'azote pour toutes les formes de vie, particulièrement en milieu marin, de nombreuses controverses se sont élevées entre les chercheurs, en ce qui concerne l'étape fondamentale représentée par la dénitrification et la réduction des nitrates.

Dès 1875, AUDOYNAUD (1) affirme que les nitrates et les sels d'ammonium sont assimilables par de nombreux organismes marins. La présence dans la mer de bactéries réductrices des nitrates est démontrée par BEIJERINCK (2) en 1890, par RUSSELL (3) en 1893, par FISHER (4) en 1894, par VERNON (5) en 1898. GRAN (6), en 1901, isole d'horizons riches en matière organique plusieurs espèces de bactéries réductrices des nitrates.

FEITEL (7), en 1903, montre la présence de ces organismes partout où abondent des résidus organiques et détermine expérimentalement leur activité. ISSATCHENKO (8) en trouve dans les eaux de l'Océan glacial arctique, à des températures de 1 à 3° C.

WAKSMAN et coll. (9), étudiant le cycle de l'azote dans la mer, affirment que celui-ci est comparable au cycle terrestre et que la dénitrification se rencontre plus spécialement dans les eaux tropicales.

Les travaux de PARLANDT (10) et le LLOYD (11) mettent en lumière le grand nombre de bactéries marines capables de réduire les nitrates en nitrites, ammoniacque et azote, ces bactéries appartenant à de nombreuses espèces.

Sur les 60 souches étudiées par ZOBELL et UPHAM (12) en 1944, 34 réduisaient les nitrates en nitrites, 2 seulement les réduisaient en azote, et ces auteurs estiment que moins de 5 % des bactéries marines sont susceptibles de réduire les nitrates en azote.

Selon WOOD (13), la balance azotée du milieu marin est liée étroitement aux processus de dénitrification et de fixation de l'azote, problèmes non encore résolus, car on ne sait toujours pas s'il y a gain net ou perte d'azote dans la mer.

En contribution à ces divers travaux, nous avons déterminé les bilans azotés, au cours de la croissance, en culture pure de 4 souches de bactéries marines.

Matériel et Méthodes.

Origine des prélèvements.

Nous avons étudié 4 souches, dénommées : D 6, D 16, D 18, D 22, dont les caractères morphologiques, biochimiques et la position taxinomique feront l'objet d'une publication ultérieure.

D6 et D16 ont été isolées de sédiments méditerranéens du large ; D18 d'eau de l'Aber de Roscoff; D22 de sédiment de l'Aber de Roscoff.

Techniques d'isolement; milieux de culture.

Les sédiments et l'eau de mer, préalablement dilués selon la méthode habituelle, ont été inoculés dans un milieu de composition suivante : eau de mer vieillie : 750 ml; eau distillée : 250 ml; KNO_3 : 10 g; glucose : 10g; CaCO_3 ; 10g; FeCl_3 en solution: 2,5 ml; K_2HPO_4 : 0,500g; solution d'oligo-éléments : 10 gouttes. Le pH du milieu est amené à 7,6. Le milieu est réparti sur 10 cm de hauteur dans des tubes à cloche et stérilisé à 115°C pendant 20 minutes. L'inoculum consiste en 1 ml d'eau diluée ou de suspension de sédiment. L'incubation a été faite à 20°C.

Dès le 2^e jour d'incubation, on recherche les nitrites à l'aide du réactif de Griess. Dans les tubes présentant du nitrite, on prélève 2 gouttes de culture que l'on étale à la surface d'une boîte de Pétri dans laquelle on a coulé un milieu nitraté et gélosé (12 pour 1000 d'agar) ayant la même composition que le milieu d'enrichissement, mais ne comportant pas de CaCO_3 . Les boîtes de Pétri sont incubées à 20°C et les diverses colonies qui s'y développent prélevées après 3 ou 4 jours. Ces colonies sont alors entretenues sur le milieu initial dans lequel les diverses recherches qualitatives et quantitatives sont effectuées.

Techniques de dosage.

1^o) Dosage des nitrates.

Nous nous sommes inspirés de la méthode de Devarda (14) qui consiste en une réduction alcaline des nitrates par l'hydrogène naissant, les nitrates étant alors transformés en NH_4 . Par ce procédé, on dose également les nitrites, eux aussi réduits en NH_4 .

Nous avons néanmoins dû modifier la méthode initiale pour la rendre applicable aux dosages dans des milieux complexes tels que les milieux de culture, et finalement le protocole adopté a été le suivant :

a) *Elimination de l'ammoniaque par ébullition.* On met dans un ballon une prise d'essai renfermant une quantité de nitrate comprise entre 0,2 et 0,5 mg. On ajoute 2 ml de lessive de soude à 30 % et 50 ml d'eau distillée. On concentre par ébullition jusqu'à 10 ml. (Le pH de la solution est suffisamment élevé (11,5) pour éviter toute perte de nitrate et de nitrite.)

b) *Réduction des nitrates et des nitrites en ammoniaque.* Après avoir refroidi le ballon, on y introduit un morceau d'aluminium pur (1 à 2 gr) et on laisse la réaction se poursuivre pendant 6 heures au moins. Pour éviter une perte de l'ammoniaque entraînée par le dégagement gazeux au cours de la réduction, il est nécessaire de recueillir ce dernier par barbotage dans de l'eau distillée exempte d'ammoniaque et acidifiée (2 ml de SO_4H_2 , N/10).

c) *Extraction.* L'ammoniaque formé par réduction des nitrates et éventuellement des nitrites est entraîné par la vapeur dans l'appareil de Parnas. On recueille, dans un excès d'acide, au moins 20 ml de distillat auxquels on ajoute les eaux de barbotage obtenues lors de la réduction et on complète à 250 ml. On mesure au photocolorimètre à 525 μ la coloration obtenue grâce au réactif de Nessler et on obtient la quantité de nitrate correspondante à l'aide d'une courbe de référence préalablement établie.

Cette méthode nous a donné entière satisfaction. A l'origine, il est ainsi possible de doser le nitrate par réduction alcaline puisque le milieu ne renferme aucune trace d'azote organique. Au cours de la croissance, la méthode reste applicable, il suffit d'éliminer les bactéries par filtration et l'ammoniaque pouvant avoir été formé dans la culture par ébullition.

Il est nécessaire toutefois de procéder au dosage des nitrites par une autre méthode afin d'obtenir la quantité de nitrate présent dans le milieu en procédant par différence.

2^o) Dosage des nitrites.

Les nitrites ont été dosés par l'excellente méthode de RIDER et MELLON (15).

3^o) Dosage de l'ammoniaque.

Le dosage de l'ammoniaque par la méthode colorimétrique directe, à l'aide du réactif de Nessler, n'a pu être pratiqué sur le milieu de culture, car de nombreux ions (Mg, PO₄, etc) en précipitant, masquent la réaction colorée.

Nous avons donc procédé à une extraction préalable de l'ammoniaque par entraînement à la vapeur, mais il est nécessaire d'opérer avec certaines précautions pour éviter toute erreur due à l'hydrolyse de composés azotés (amines par exemple) formés au cours de la culture.

Nous avons opéré en milieu tamponné par l'acide borique et la soude, à pH :9,8 (prise d'essai contenant 0,2 à 0,5 mg de N-NH₄ et 10 ml de tampon), l'entraînement de l'ammoniaque a été réalisé sous vide à l'aide d'une trompe à eau et le produit dosé colorimétriquement dans le distillat selon la méthode utilisée pour le dosage des nitrates.

Nous avons au préalable effectué quelques essais de dosage d'ammoniaque, en présence d'urée ou de divers acides aminés. Les résultats obtenus dans ces conditions ne diffèrent pas de plus de 2 % de ceux obtenus avec l'ammoniaque seul, on peut donc en conclure que l'urée ou les acides aminés ne subissent lors de ce procédé opératoire aucune dégradation.

4^o) Dosage de l'azote organique.

Le dosage de l'azote organique peut se faire par micro-Kjeldahl. Cependant, quand on est en présence d'une certaine quantité de nitrate, cette technique est inutilisable, car dans ces conditions, à des pH très bas, le nitrate est détruit et transformé en composés azotés volatils qui provoquent, par leur combinaison avec l'azote ammoniacal que l'on cherche à doser, une perte importante de celui-ci.

Nous avons donc utilisé la méthode de Rauterberg et Knipperberg, modifiée par VERHOEVEN (16) qui comporte une destruction préalable du nitrate.

L'azote organique a été dosé dans les corps bactériens obtenus par centrifugation, puisque nous avons cultivé nos souches sur des milieux ne comportant aucune trace de composés azotés organiques.

Résultats.

Nous avons tout d'abord effectué sur chacune de nos souches des tests de croissance en anaérobiose sur divers milieux.

Les résultats de ces expériences sont résumés dans le tableau I.

TABLEAU I

Souches	(1) Milieu liquide glucosé (1 %)			(2) Milieu gélosé, glucosé (1 %) peptoné (1 %)		(3) Milieu liquide peptoné (1 %)	
	Source d'azote			avec NO ₃ ⁻	sans NO ₃ ⁻	avec NO ₃ ⁻	sans NO ₃ ⁻
	NO ₃ ⁻	NO ₂ ⁻	NH ₄ ⁺				
D 6	+	+	—	+	±	+	—
D 16	+	+	—	+	±	+	—
D 18	+ gaz	+	—	+ gaz	±	+	—
D 22	+ gaz	+	—	+ gaz	±	+	—

Les 4 souches poussent facilement sur milieu liquide (1), glucosé à 1 %, lorsque la source d'azote est représentée par du nitrate ou du nitrite. On n'observe pas de croissance en présence de chlorure d'ammonium.

Sur milieu gélosé (2), peptoné (1%), glucosé (1%), la culture est abondante en présence de nitrate, beaucoup plus grêle en son absence.

En milieu (3) peptoné (1%) comportant du nitrate comme seul accepteur d'hydrogène, on observe une culture des 4 souches, et pas de culture en l'absence de nitrate.

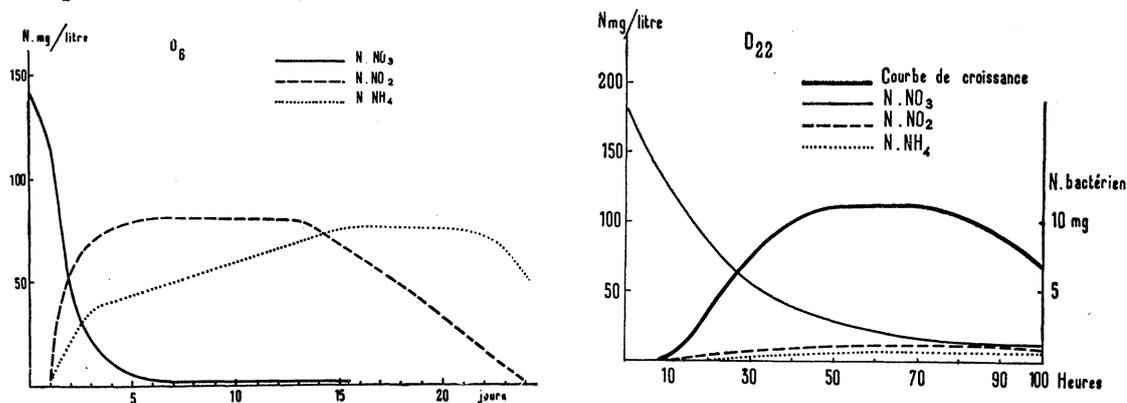
Les souches D18 et D22 montrent, au cours de leur croissance, un dégagement gazeux important pour D22, plus faible pour D18. L'analyse qualitative des gaz formés au cours de la croissance par ces 2 souches a montré qu'il s'agissait d'un mélange de composés nitrés, sans qu'il nous ait été toutefois possible de préciser les proportions dans lesquelles ces gaz coexistaient.

Nous avons ensuite établi des bilans métaboliques des 4 souches, sur milieu liquide, en anaérobiose, et les résultats de ces expériences sont rapportés dans le tableau II.

Souches	Incubation jours	N-NO ₃		N-NO ₂ (mg)	N-NH ₄ (mg)	N-organique (mg)	Total N ₂ combiné (mg)	N ₂ combiné retrouvé (%)
		Initial (mg)	Final (mg)					
D 6	8	140	traces	80	50	4	134	95,71
D 16	8	138	95	24	8,75	9,5	137,25	99,45
D 18	6	138	8,5	80	7	7	102,5	74,27
D 22	3	69,3	traces	2	5,25	11	18,25	26,33

TABLEAU II. — Bilans azotés

Ces résultats permettent de définir exactement l'activité des souches considérées et confirment parfaitement ceux, qualitatifs, du tableau I.



D6, après 8 jours d'incubation a consommé entièrement le nitrate qui lui avait été fourni, les produits finaux de son métabolisme étant le nitrite (80 mg) et l'ammoniaque (50 mg), on retrouve en fin d'expérience 95,71 % de l'azote initial.

D16, au contraire, consomme peu de nitrate, forme peu de nitrite et d'ammoniaque, avec cependant un excellent rendement, puisqu'en fin de culture on a par litre 9,5 mg d'azote organique. La balance azotée est ici encore équilibrée, car on retrouve 99,45 % de l'azote initial.

Le comportement de D18 et surtout de D22, est très différent. D18 consomme presque entièrement le nitrate, donne beaucoup de nitrite, très peu d'ammoniaque. On ne retrouve que 74,27 % de l'azote initial, 25 % donc de cet azote ont été métabolisés en produits gazeux.

D22 a une activité plus intense; en effet, il lui suffit de 3 jours pour réduire complètement le nitrate en donnant 74 % de produits gazeux, très peu de nitrite (2 mg) et très peu d'ammoniaque (5,25 mg).

Nous avons enfin établi, pour les souches D6 et D22, les courbes de consommation de nitrates, d'apparition de nitrites et d'ammoniaque, ainsi que la courbe de croissance pour D22 (fig. 1 et 2).

Conclusion.

Ces diverses expériences, conduites avec 4 souches bactériennes apparemment très différentes, nous permettent de conclure que D16 et D6 doivent être considérées comme des réducteurs de nitrate. D18 et D22 au contraire, sont des dénitrificateurs vrais.

Ainsi donc, nous référant aux travaux de VERHOEVEN (16) (17) et de KLUYVER (18), nous distinguerons, parmi ces souches, deux types essentiels :

D6 et D16 : qui seront considérés comme dissimilatifs accidentels, puisque le métabolisme de ces germes aboutit en anaérobiose au nitrite et à l'ammoniaque, le nitrate jouant dans ce cas le rôle d'un accepteur d'hydrogène non essentiel.

D18 et D22 : qui seront considérés comme des dissimilatifs vrais, le nitrate étant ici accepteur d'hydrogène essentiel, et les produits du métabolisme spécialement de l'azote et des protéines microbiennes.

Centre national de la Recherche scientifique — Marseille.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) AUDOYNAUD (A.), 1875. — Recherches sur l'ammoniaque contenue dans les eaux marines et dans celles des marais salants du voisinage de Montpellier. — *C.R. Acad. Sci.*, **81**, p. 619.
- (2) BEIJERINCK (M.W.), 1890. — Over lichtvoedsel en plastisch voedsel van lichtbacterien. — *Meddel. K. Acad. Wetensch.*, **7**, p. 239.
- (3) RUSSEL (H.L.), 1892. — Bacterial investigation of the sea and its floor. — *Bot. Gaz.*, **17**, p. 312.
- (4) FISHER (B.), 1894. — *Centr. Bakt.*, **15**, p. 657.
- (5) VERNON (H.M.), 1898. — The relations between marine animals and vegetable life. — *Mitt. Zool. Stat. Neapel.*, **13**, p. 341.
- (6) GRAN (H.D.), 1901. — Studien über Meeresbakterien. I — Reduktion von Nitraten und Nitriten. — *Bergens Mus. Aarb.*, **10**, p. 1.
- (7) TEITEL (R.), 1903. — Beiträge zur Kenntnis denitrifizierender Meeresbakterien. — *Wiss. Meeresunters. Kiel.*, **7**, p. 89.
- (8) ISSATCHENKO (B.), 1914. — Recherches sur les microbes de l'Océan glacial arctique. — Petrograd.
- (9) WAKSMAN (S.A.), HOTCHKISS (M.) et CAREY (C.L.), 1933. — Marine bacteria and their role in the cycle of life in the sea. — *Biol. Bull.*, **65**, p. 137-167.
- (10) PARLANDT (D.A.), 1911. — On several denitrifying bacteria from the baltic sea. — *Bull. Jard. Bot. St-Petersbourg.*
- (11) LLOYD (B.), 1931. — A marine denitrifying organism. — *J. Bact.*, **21**, p. 89.
- (12) ZOBELL (C.E.) et UPHAM (H.C.), 1944. — A list of marine bacteria including descriptions of sixty new species. — *Bull. Scripps Inst. océanogr.*, **5**, p. 239-292.
- (13) FERGUSON WOOD (E.J.), 1958. — The significance of marine microbiology. — *Bact. Rev.*, **22**, p. 1-19.
- (14) DEVARDA in CHARLOT et BEZIER, 1949. — Méthodes modernes d'analyse quantitative minérale. — Paris. Masson Edit.
- (15) RIDER (B.F.) and MELLON (M.G.), 1946. — Colorimetric determination of nitrites. — *Ind. Eng. Chem.*, **18**, p. 96.
- (16) VERHOEVEN (W.), 1952. — Aerobic sporeforming nitrate reducing bacteria. — Thèse, Delft.
- (17) — 1956. — Some remarks on nitrate and nitrite metabolism in microorganisms. — *Inorg. Nitrogen Metabolism.*, p. 61-86.
- (18) KLUYVER (A.J.) 1953. — Some aspects of nitrate reduction. — Symp. met. Microbico. Rome.

