

ACTIONS CONCERTEES EN OCEANOGRAPHIE

RAPPORT D'ACTIVITE

1978

ANNEXE N° 10

Synthèse des recherches en microbiologie

GROUPE "Matières Organiques"

Synthèse des recherches en microbiologie

(période 1977-1978)

55479

par Gilles BILLEN (ULB)
Claude JOIRIS (VUB)

PLAN :

1. Introduction
2. Stocks de matière organique
 - 2.1. Dosage direct des substrats directement utilisables
 - 2.2. Dosage de la matière organique potentiellement utilisable (BOD_{5j})
 - 2.3. Dosage de la matière organique totale (TOC)
 - 2.4. Dosage de la matière organique particulaire
 - 2.5. Discussion générale
3. Vitesse d'utilisation
 - 3.1. Utilisation des substrats directement utilisables
 - 3.2. Vitesse initiale de consommation d'oxygène
 - 3.3. Discussion générale
4. Régulation de l'activité hétérotrophe
 - 4.1. Constance des stocks de substrats directement utilisables
 - 4.2. Production de substrats directement utilisables.

1. Introduction

Dans le cadre de l'étude synécologique du fonctionnement des milieux marins, l'objet principal des recherches microbiologiques consiste à estimer l'intensité, et à comprendre le déterminisme de l'activité hétérotrophe.

La notion d'activité hétérotrophe, même limitée aux microorganismes peut avoir 2 acceptations :

- l'activité hétérotrophe au sens large (respiration totale) recouvre toute utilisation de matière organique à des fins énergétiques. Elle comprend donc la respiration par le phytoplancton de matières organiques intracellulaires et celle, quantitativement beaucoup plus faible, du zooplancton
- l'activité hétérotrophe au sens strict ne comprend quant à elle que l'utilisation de substrats organiques exogènes, prélevés directement dans le milieu.

Jusque tout récemment, les méthodes directes de mesure de l'activité hétérotrophe utilisées dans ce programme (mesure de la vitesse initiale de consommation d'oxygène, mesure de l'incorporation anaplérotique de bicarbonate) ne donnaient accès qu'à l'activité hétérotrophe au sens large ("respiration planctonique totale").

La démarche du sous-groupe "Microbiologie" a été de rendre opérationnelle la définition de l'activité hétérotrophe au sens strict, grâce

- à l'analyse spécifique de la matière organique présente dans le milieu marin : détermination des concentrations naturelles des principaux substrats.
- à la mesure spécifique de l'utilisation hétérotrophe de certaines molécules organiques représentatives.

L'avantage de cette approche, outre qu'elle permet d'accéder à la mesure de l'activité hétérotrophe au sens strict, écologiquement plus significative, est de permettre ensuite l'accès aux mécanismes de son déterminisme.

2. Stocks de matière organique.

2.1. Dosage direct des substrats directement utilisables.

2.1.1. Concept de matière organique directement utilisable.

Parmi l'énorme diversité des substances organiques constituantes de la matière organique des eaux naturelles, un petit nombre seulement peut être directement prélevées et utilisées par les microorganismes.

La pénétration d'une molécule organique à l'intérieur de la cellule des bactéries est en effet un phénomène actif, catalysé par un enzyme spécifique appelé perméase. Ne peuvent être substrats de ces perméases que des molécules de petit poids moléculaire, monomères ou di- et trimères, comme les sucres, les acides aminés (éventuellement di- ou tri peptides), les acides organiques.

Ce n'est que par l'intervention d'exoenzymes que des particules ou des molécules organiques de haut poids moléculaire peuvent finalement être utilisées par les bactéries.

Le pool de matière organique directement utilisable est donc constitué par l'ensemble des molécules organiques de petit poids moléculaire.

2.1.2. Mesure des concentrations en petits substrats organiques.

2.1.2.1. Méthodes.

Acides Aminés : chromatographie d'échange ionique sous pression (Amino acid Analyser Beckman, model 120) après concentration et désalement sur Chelex 100.

(G. Gillain : rapport d'activité ARC 1977. Lab. Océanologie ULg).

Glycollate : colorimétrie après concentration sur alumine (Shah et Wright, 1974).

Glucose, Acetate, Lactate : Dosage enzymatique direct avec détection fluorimétrique de NAD(P)H produit.
(G. Billen & J. Putman, Tech. Rep. OM 1978 04).

2.1.2.2. Résultats

Les concentrations mesurées tout au long d'un cycle annuel aux trois stations Hansweert, Ostende et Calais sont données dans les tableaux Ia (3 acides aminés représentatifs, glucose, glycollate, acétate et lactate) et Ib (tous les acides aminés).

2.1.2.3. Discussion

Ces résultats ne montrent pas de variations importantes, ni saisonnières, ni géographiques. L'interprétation de ce fait, tout à fait remarquable sera discutée plus loin.

Remarquons dès à présent que la gamme de concentration trouvée ici concorde tout à fait avec celle des dosages similaires publiés dans la littérature, qu'il s'agisse de mesures effectuées dans des eaux douces, des eaux saumâtres ou des eaux marines, côtières ou océaniques (voir tableau II).

Tableau Ia : Concentration des substrats organiques dans l'eau
des trois stations étudiées.
(en μ mole/l).

Hansweert

	Ala	Asp.	Lys.	Glyc.	Gluc.	Acet.	Lact.
19.07.77	0.084	0.033	0.021	2.0	-	0.2	0.2
21.10.77	0.042	0.013	0.014	-	0.06	0.2	0.2
07.04.78	0.044	0.024	0.010	4.5	0.08	1.5	-
21.04.78	0.020	0.015	0.010	4.5	0.08	3.3	-
19.05.78	0.054	0.010	0.010		0.05	0.2	-

Ostende

18.07.77	0.050	0.019	0.036	1.8	-	-	1.6
18.10.77	0.021	0.031	0.030	-	-	0.2	4.9
05.04.78	0.015	0.028	0.010	3.0	0.02	2.4	
19.04.78	0.010	0.020	0.010	3.1	0.02	1.3	
16.05.78 12h	0.049	0.019	0.015		0.05	0.2	0.2
							0.02
11.07.78					0.04		

Calais

26.07.77	0.141	0.065	0.028	0.9			
19.10.77	0.176	0.100	0.034	-	0.04	4.0	
04.04.78	0.036	0.020	0.031	2.3	0.01	0.2	
18.04.78 12h	0.036	0.010	0.010	2.3	0.005	0.2	
	24h	0.010	0.015	0.020		0.005	
17.05.78	0.015	0.012	0.020		0.01	0.2	1.6
12.07.78							0.6

Mesures effectuées par :

Ala, Asp, Lys : G. Gillain, ULg

Glycollate, Acet., Lact. : G. Billen, ULB

Glucose : J. Wijnant, VUB

Tableau Ib : Dosage des acides aminés libres (en µmoles/1)

	Asp	Thr	Scr	GluNH ₂	Pro	Gly	Ala	Val	Cys	Met	Isolev	Lev	Tyr	Phe	Lys	His	TOTAL
<i>Hannover</i>																	
19.07.77	.033	.040	.240	.036	.052	.243	.084	.030	<.010	.015	.018	.022	.014	.021	.013	.881	
21.10.77	.013	.079	.080	.030	.034	.133	.042	.030	<.010	.010	.020	.014	.010	.015	.015	.536	
07.04.78	.024	.012	.124	<.010	<.010	.096	.044	.025	.013	<.010	.015	.018	<.010	.010	.010	.420	
21.04.78	.015	.050	.070	.022	.014	.062	.020	.015	.010	.010	<.010	<.010	<.010	<.010	<.010	.300	
19.05.78	.010	.020	.017	.010	.010	.052	.054	.010	.010	.010	.012	.015	.015	.010	.010	.275	
<i>Ostende</i>																	
18.07.77	.019	.020	.140	.060	.21	.060	.050	.020	<.010	.010	.018	.012	.020	.020	.029	.545	
18.10.77	.031	.030	.123	.079	.029	.046	.021	.028	<.010	.010	.020	.018	.020	.025	.030	.021	
05.04.78	.028	.015	.030	.010	.016	.160	.015	<.010	<.010	<.010	.010	.010	.010	.010	.010	.330	
19.04.78	.020	.016	.030	<.010	<.010	.160	.010	<.010	<.010	<.010	<.010	<.010	<.010	<.010	<.010	.230	
16.05.78																	
12h	.019	.016	.090	.154	.041	.383	.049	.019	<.010	.010	.010	<.010	.010	.010	.015	.922	
<i>Calais</i>																	
26.07.77	.065	.066	.392	.030	.047	.350	.141	.048	<.010	<.010	.028	.034	.023	.014	.028	1.314	
19.10.77	.100	.084	.508	.085	.186	.426	.176	.024	<.010	<.010	.034	.044	.052	.040	.034	1.843	
04.04.78	.020	.052	.040	.030	<.010	.100	.036	<.010	<.010	<.010	.020	.024	.018	.015	.031	.450	
18.04.78																	
12h	.010	.025	.010	<.010	<.010	.030	.036	<.010	<.010	<.010	.025	.010	.012	.016	.010	.300	
23h	.015	.025	.010	<.010	<.010	.412	.010	<.010	<.010	<.010	.025	.020	.015	.010	.020	.586	
17.05.78																	
12h	.012	.010	.032	.010	.010	.213	.015	.015	.012	.010	<.010	.010	.010	.010	.010	.402	
24h	.010	.010	.020	.010	.010	.015	.015	.015	.010	<.010	<.010	.010	.020	.013	.013	.203	

Tableau II : Revue de la littérature sur les dosages de petits substrats organiques.

Substrat	Milieu	concentration (uM)	Auteurs	
<u>Acides aminés</u>				
		ac. am. indiv. ac.am. totaux		
	Pacifique	0 - 0.38	0.16 - 1.24	Degens et al. 1964
	Mer Noire	0 - 0.09	0.02 - 0.37	Starikova & al., 196
	Mer d'Irlande	0 - 0.08	0.04 - 0.31	Riley & Segar, 1970
	German Bight	0 - 0.15	0.08 - 0.70	Bohling, 1970
	Atlantique	0 - 0.16	0.06 - 0.47	Pocklington, 1971
	Manche	0 - 0.08	0.10 - 0.80	Andrews & Williams, 7
	York estuary	0.005-0.17	0.38	Hobbie et al., 1968
	Baie de Tokyo	1.5		Seki et al., 1975
	Pacifique	0 - 0.03	0.02 - 0.08	Williams et al., 1976
	Mer d'Irlande	0.02-0.16	0.52	Chau & Riley, 1966
	Mer Baltique		0.13 - 0.39	Dawson & Gocke, 1978
<u>Glucose</u>				
	Atlantique	0 - 0.33	Vaccaro & Jannasch, 6	
	Atlantique	0 - 1.1	Vaccaro et al., 1968	
	Pacifique	0.03 - 0.08	Degens, 1964	
	Fjord Scandinave	0.05 - 0.25	Josefson, 1970	
	Manche	0.002- 0.03	Andrews & Williams, 7	
	Baie de Tokyo	0.06 - 0.64	Seki et al., 1975	
<u>Acide Glycollique</u>				
	Baie d'Ipswich	0 - 0.5	Wright & Shah, 1975	
	Estuaire de l'Essex	0.26	Wright & Shah, 1975	
	Estuaire de l'Essex	1.2	Anitia et al., 1963	
	Mer d'Irlande	0.7	Al-Hassan, 1975	
	Baie d'Ipswich	1.0	Shah & Wright, 1974	
<u>Urée</u>				
	Atlantique	0 - 0.5	Mc Carthy, 1970	
	Atlantique	0.25 - 2.5	Remsen, 1971	
	Atlantique	0.02 - 0.3	Newell et al., 1967	
	Baie de Mikawa	0.5 - 3	Mitamura et al., 197	
<u>Acetate</u>				
	Pacifique	0.1 - 40	Koyana et al., 1959	
	lagune d'aération	1.7 - 12	Stanley & Staley, 77	
<u>Formate</u>				
	Pacifique	1 - 20	Koyana et al., 1959	
<u>Lactate</u>				
	Pacifique	0.2 - 1.2	--	

2.1.3. Estimation du stock total de substrats directement utilisable

A partir des dosages présentés ci-dessus, nous tentons, dans le tableau III, d'évaluer grossièrement l'ordre de grandeur du stock total des substrats directement utilisables, en $\mu\text{grC}/1$.

2.1.3.1. Amino - acides :

Les dosages présentés au Tableau Ib couvrent l'ensemble des acides aminés libres. Les résultats, convertis en $\mu\text{grC}/1$ en sont repris au Tableau III.

Les polypeptides, n'étant pas retenus sur la colonne de Chelex 100 lors de l'étape de concentration, échappent à ce dosage.

A quelques occasions, nous disposons de dosages des fonctions amines primaires libres (méthode à la fluorescamine). Outre les acides minés libres, ce dosage couvre l'extrémité amine libre des polypeptides et les éventuelles amines primaires non acides. La comparaison avec les dosages d'acides aminés est donnée dans le tableau ci-dessous:

Station		$\mu\text{M}/1$ de $\text{f}^{\text{on}}-\text{NH}_2$ dans les ac.aminés libres (dos.ac.aminés libres)	$\mu\text{M}/1$ de $\text{f}^{\text{er}}-\text{NH}_2$ libres (dos. à la fluorescamine)
Hansweert	19.07.77	.938	2.2
	21.10.77	.580	1.0
Ostende	18.07.77	.641	1.1.
	18.10.77	.649	3.81
Calais	26.07.77	1.372	3.4
	19.10.77	1.962	1.93

Il est probable que les protéines dissoutes suffisent à expliquer les valeurs environ 2x plus élevées trouvées par le dosage à la fluorescamine.

2.1.3.2. Glucides.

Nos mesures directes ne couvrent que le glucose. Dans l'avenir, il sera possible, par le même type de méthode enzymatique, et donc sans un accroissement exagéré de l'effort analytique, d'étendre nos dosages à 2 autres monosaccharides, le fructose et le galactose et à un disaccharide, le lactose.

En attendant, force nous est d'estimer le stock total de glucides de faible poids moléculaire à partir des concentrations mesurées de glucose et de quelques mesures citées dans la littérature de l'ensemble des glucides.

Des mesures concordantes effectuées par Josephson (1970) dans un fjord scandinave et par Degens et al (1964) est possible de tirer une répartition moyenne des principaux monosaccharides dans l'eau de mer (en % du total des monosaccharides) :

	Gullmarfjord (Josephson 1970)				Pacifique (Degens et al, 1964)			Black sea (Mopper cité par Dawson)
	35 m	2 m	35 m	2 m	0 m	2000 m	3000 m	
Glucose (C ₆)	20%	30%	25%	30%	40%	43%	43%	50%
Galactose "	25	20	7	21	40	10	8	
Fructose "	2	4	3	9	-	-	-	41%
Nannose "	17	22	7	19	20	38	49	
Arabinose (C ₅)	10	9	10	7	-	-	--	
Rhamnose "	17	13	8	13	-	5	-	

D'après ces valeurs, le glucose représenterait en moyenne 30% du total des monosaccharides.

A notre connaissance, il n'existe pas de mesure de disaccharides dans l'eau de mer. Il est pourtant certain que les disaccharides sont parmi les substrats directement utilisables pour les microorganismes.

Le tableau III ne reprend donc que le total des monosaccharides obtenu en multipliant par 3.3 la concentration mesurée en glucose.

2.1.3.3. Produits d'excrétion phytoplanctonique.

Le glycollate doit être considéré comme l'un des produits les plus typiques de l'excrétion phytoplanctonique.

De quelques études existant dans la littérature sur la spéciation de l'excrétion phytoplanctonique en conditions naturelles il apparaît que le glycollate constitue une part significative du carbone total excrété.

Authors	Environment	Part du glycollate dans le carbone organique excrété
Al-Hassan & Coughlan (1977)	Coastal sea water	35%
Watt (1966)	Fresh water	13 - 92%

Hellebust (1974) a revu récemment la littérature concernant les produits extracellulaires libérés par les algues. En dehors du glycollate et de quelques autres acides organiques, il semble que les produits d'excrétions isolés jusqu'à présent soient le plus fréquemment macromoléculaires :

Les carbohydrates excrétés sont le plus souvent des polysaccharides, les monosaccharides n'étant généralement trouvés qu'en faible quantité dans les produits d'excrétion (à quelques exceptions près, parmi lesquelles comptent les algues symbiotiques des lichens)

les protides ne constituent le plus souvent qu'une faible fraction du matériel extracellulaire des algues vertes et brunes. Les algues bleues quant à elles excrètent de grandes quantités de protéines, mais les acides aminés libres ne constituent jamais qu'une part très réduite de l'excrétion.

Les autres produits d'excrétions connus -lipides, complexes polyphénoliques, ...etc- ne sont probablement pas directement utilisables pour l'activité hétérotrophe.

Provisoirement, nous assimilerons donc le pool directement utilisable des produits d'excrétion phytoplanctonique à la concentration en glycollate.

2.1.3.4. Produits de fermentation.

L'acétate et le lactate, pour lesquels nous disposons de mesures directes, ne figurent pas parmi les composés excrétés par le phytoplancton (Fogg, 1965), mais constituent plutôt des produits de fermentation.

La présence de produits de fermentation en concentration significative (et surtout, voir plus loin, leur turnover relativement rapide) dans des eaux aérées peut sembler paradoxale. Cela indique l'existence de métabolismes fermentatifs en milieu riche en oxygène. En fait, les seuls organismes fermentatifs à n'être pas inhibés par l'oxygène, ni induit à passer à un métabolisme respiratoire en aérobiose sont les bactéries lactiques⁽¹⁾. Il est donc probable que les principaux produits de fermentation en eau de mer soient constitués par les produits de fermentation lactiques : acides lactique et acétique, éthanol.

Nous ne disposons jusqu'ici que de quelques mesures d'éthanol dans la partie aval de l'estuaire de l'Escaut, où les concentrations trouvées sont de même ordre que celles du lactate et de l'acétate.

Une estimation grossière et provisoire du stock des produits de fermentation a été obtenue dans le Tableau III en doublant la somme des concentrations en lactate et en acétate.

(1) - Si l'on exclut l'existence, en milieu naturel, d'un "contre-effet Pasteur" lié à une surabondance de substrat.

2.1.3.5. Urée.

Nous ne disposons pas de mesure de concentration de ce produit dont la présence en concentrations non négligeables a pourtant été attestée par plusieurs auteurs (voir tableau II).

Une valeur représentative semble être 0.5 $\mu\text{mole/l}$ soit 6 $\mu\text{grC/l}$.

2.1.3.6. Total provisoire.

Aucune certitude n'existe jamais quant au caractère exhaustif d'une énumération telle que celle que nous venons de faire des composés organiques directement utilisables. Par ailleurs, les incertitudes concernant l'extrapolation des dosages de substrats représentatifs au total de tous les substrats de cette catégorie ont été mentionnées (carbohydrates, produits de fermentation notamment).

Nous ne présentons donc le total provisoire du tableau III qu'à titre d'hypothèse de travail.

Elle constitue, dans l'état actuel de nos connaissances, la meilleure estimation par défaut du total des substrats directement utilisables par l'activité hétérotrophe.

Tableau III : Stock total des substrats directement utilisables ($\mu\text{grC/1} \text{)}$

Date	Protides Σ Ac. Am.	Glucides Σ Mono'sach	Pdts d'excr. phytoplanct. Glycollate	Pdts de ferment.		TOTAL provisoire (Urée) (Urée)
				Acét+Lact	0-200	
<u>Hansweert</u>						
19.07.77	25	-	48	< 12	24	6
21.10.77	22	10	-	< 12	24	6
07.04.78	14	15	33	36	72	6
21.04.78	10	15	50	79	158	6
19.05.78	-	10	108	< 12	24	6
moyenne (m - M)	18	13	43	30	60	6
	10-25	10-15	33-50	0-100	0-200	215
<u>Ostende</u>						
18.07.77	29	-	-	43	58	120
07-08.10.77	-	-	-	-	180	360
18.18.77	30	-	-	-	-	-
05.04.78	15	9 (2)	30 (2)	72	58	120
02-19.04.78	7	7 (9)	23 (9)	-	-	6
19.04.78	10	33	74	31	62	6
16.05.78	9	30	-	< 12	24	6
11.07.78	8	26	-	-	-	6
moyenne (m - M)	20	8	26	63	68	136
	7-30	1-20	3-60	40-75	0-200	0-400
<u>Calais</u>						
26.07.77	55	-	-	22	-	6
09-10.10.77	-	-	23	-	96	6
19.10.77	77	7	7	55	< 12	192
04.04.78	22	2	10 (7)	-	24	6
03.18.04.78	-	3 (7)	3	55	< 12	114
18.04.78	12h	11	1	7	58	-
17.05.78	24h	-	2	-	-	99
12.07.78	-	-	-	-	-	-
moyenne (m - M)	41	4	13	44	45	90
	10-80	1-10	3-30	20-50	0-100	0-200
						194

2.2. Dosage de la matière organique potentiellement utilisable (BOD₅)

2.2.1. Signification.

La mesure de la BOD₅, c'est à dire de la consommation d'oxygène après 5 jours d'incubation à l'obscurité, est la méthode classique de mesure de la matière organique potentiellement utilisable pour l'activité hétérotrophe au sens large.

Cette consommation d'oxygène comprend :

- la consommation relative à l'utilisation du stock des petits substrats directement utilisables;
- la consommation relative à l'utilisation des petits substrats produits au cours des 5 jours d'incubation par l'hydrolyse exoenzymatique de matières organiques non directement utilisables;
- la consommation relative à la respiration de matériel intracellulaire par le phytoplancton (généralement négligé dans les travaux classiques).

2.2.2. Résultats.

Les mesures de BOD₅ effectuées aux 3 stations utilisées au cours du cycle annuel juillet 1977 - juillet 1978 sont reprises au tableau IV.

2.2.3. Discussion.

La comparaison des valeurs de BOD avec l'estimation du stock de petits substrats directement utilisables montre que ceux-ci représentent environ 1/10 de la BOD. Si on suppose que la liste des petits substrats est presque complète et que peu de substrats quantitativement importants ont échappé à nos analyses, ce résultat peut être compris de deux manières : il montre l'importance du renouvellement du stock de ces substrats pendant les 5 jours d'incubation et/ou de la part de la respiration phytoplanctonique dans les mesures de BOD.

Une étude détaillée des phénomènes se déroulant au cours des mesures de BOD est nécessaire pour mieux comprendre la signification de cette mesure ; elle est prévue au programme de l'année prochaine.

Tableau IV. : BOD et TOC

Date	BOD ₅ µgrC/1	TOC µgrC/1	Carbohydrates totaux
<u>Hansweert</u>			
19.07.77	-		
21.10.77	988		3140
07.04.78	-		4980
21.04.78	-		2612
19.05.78	2680		3146
moyenne (n)	1830 (2)		3469 (4)
m - M	1000-3000		(2500-5000)
<u>Ostende</u>			
18.07.77	780		
07-10.10.77	535	5700	
15.10.77	1140	14100	
05.04.78	698) 4000	
08-19.04.78	609		4033
16.05.78	1230		4280
11.07.78	1520		1280
moyenne (n)	987 (25)	7900 (15)	3197 (3)
m - M	500-2000	(1500-1400)	(1300-4300)
<u>Calais</u>			
26.07.77	330	10300	
05-10.10.77	350 (3)	6900	
19.10.77	690	10800	2300
03-04.04.78	587 (3)) 1800	
01-18.04.78	410 (7))	2254
17.05.78	20		3040
12.07.78	450		
moyenne (n)	411 (17)	7450 (4)	2530 (3)
m - M	(20-1200)	(1600-10000)	(2000-3000)

mesures effectuées par C.JOIRIS, R. SWAELENS et R. VAN THOMME, VUB (BOD, TOC
J.WIJNANT, VUB (Carbohydrates)

2.3. Dosage de la matière organique totale

2.3.1. Signification.

Le principe de mesure de la matière organique totale consiste en une pyrolyse à haute température (850°C) et la détection du méthane ainsi libéré. Compte tenu des conditions de mesure, les matières dosées sont essentiellement sous la forme dissoute: 30 µl d'un échantillon d'eau de mer non filtré, dont le CO₂ a été éliminé par acidification et bullage.

Il est bien connu que cette méthode de pyrolyse (dry oxidation) fournit toujours des résultats plus élevés que les méthodes d'oxydation en milieu aqueux (wet oxidation). Les résultats obtenus comprennent sans doute l'ensemble du carbone organique, y compris les matières à turnover extrêmement lent parfois appelées "matières organiques fossiles".

Les sources d'erreur possible se situent du côté de la sous-estimation : d'une part par la soustraction de "blancs" d'eau distillée qui peuvent contenir de la matière organique, d'autre part par la perte de matières volatiles lors de l'élimination du CO₂.

La méthode au tryptophane, appliquée à des échantillons d'eau préfiltrés, permet le dosage des carbohydrates dissous; les résultats sont exprimés par rapport à un étalon glucose. Par rapport aux autres méthodes citées dans la littérature, celle-ci fournit les résultats les plus élevés et permet donc de doser les carbohydrates "totaux". Des tests ont montré que la cellulose est entièrement dosée par la méthode au tryptophane, mais pas l'amidon.

Des interférences ont été détectées au niveau des nitrates et des nitrites, qui réagissent également avec le tryptophane; aux concentrations maximales rencontrées en mer, une surestimation d'environ 20% des valeurs obtenues n'est pas exclue.

2.3.2. Résultats.

Les résultats obtenus dans le cadre des croisières "matières organiques" sont repris dans le tableau IV. En ce qui concerne les TOC, l'ordre de grandeur des valeurs citées dans la littérature pour des méthodes comparables est de 2 mg C l^{-1} en milieux océaniques (voir synthèse dans Williams, 1975). Il est vraisemblablement normal de trouver des concentrations égales et supérieures dans les eaux côtières que nous avons visitées. L'ordre de grandeur de ces mesures de TOC est en outre confirmé par les valeurs de carbohydrates totaux, qui se situent dans la même gamme.

2.4. Dosage de la matière organique particulaire

Les concentrations et la composition biochimique de la matière organique particulaire (POM) ont été discutées dans le rapport de synthèse du sous groupe "Phytoplancton".

Le tableau VI résume les dosage disponibles lors des campagnes "matière organique".

Tableau IV. : Dosage de la matière organique particulaire

en $\mu\text{grC/l}$

	POC	Σ protéines + hydrates de C + lipides
<u>Hansweert</u>		
19.07.77		895
21.10.77		346
07.04.78		2548
21.04.78		880
19.05.78		463
moyenne (n)	-	1196 (5)
m - M		350-2500
<u>Ostende</u>		
18.07.77		1931
07-10.10.77		-
13.10.77		358
05.04.78		1280
08-19.04.78		-
10.05.78		461
11.07.78		-
moyenne (n)	1320	1007 (4)
m - M	(530-2700)	350-2000
<u>Calais</u>		
26.07.77		233
08-10.10.77		-
19.10.77		146
03-04.04.78		121
07-18.04.78		83
12.07.78		
moyenne (n)	320	163 (5)
	(200-600)	80-240

Mesures effectuées par Chr. Lancelot, ULB (Σ protéines, hydrates de C et lipides)

et par (Helgoland) (POC)

2.5. Discussion générale des mesures de stock

2.5.1. En ce qui concerne les dosages de type "global" (TOG, BOD, POM, Carbohydrates totaux), l'ensemble des résultats obtenus forment un ensemble cohérent, par rapport aux données de la littérature.

Ainsi, le rapport entre la matière organique particulière (POM) et la matière organique totale dissoute est de l'ordre de 1/10 dans les 3 milieux, conformément à ce qui est généralement observé tant en milieu océanique qu'en milieu côtier.

Le rapport entre la matière organique potentiellement utilisable (BOD) et la matière organique totale dissoute (TOC) est également de l'ordre de 1/10, ce qui est conforme aux données citées dans la littérature concernant les milieux marins les plus divers.

2.5.2. En ce qui concerne les dosages individuels de substrats directement utilisables, nos mesures sont dans la gamme des valeurs trouvées par d'autres auteurs tant en milieu côtier ou estuarien qu'océanique.

L'estimation que nous avons faite du stock total des substrats directement utilisables est, par nature même, très sujette à sous-estimation. Un moyen de contrôle consisterait dans le dosage du carbone organique total après ultrafiltration. Cette étude est prévue dans le programme de l'année 1979. Il est probable en effet que les substrats directement utilisables constituent la fraction de faible poids moléculaire (<500) de la matière organique dissoute dans les milieux naturels. On sait déjà par la littérature que cette fraction est faible (voir tableau VI).

Table VI. : Ultrafiltration ou dialyse de la matière organique.

Biotope	Fraction	%	Authors
<u>Sea water</u>			
Tokio bay	< 500	27	Ogura, 1974
Georgia coastal waters	< 1000	12	Wheeler, 1976
Sea water	< 400	10	Degens, 1968
Ucha reservoir (USSR)	< 400	10	Breger, 1968
Ucha reservoir (USSR)	< 300	8	Mirkina, 1977
Black sea	< 1500	69	Mirkina, 1977
Surface film (Black sea)	< 200	38	Starikova & al, 1977

2.5.3. Sur la base des résultats actuels, une première image de la spéciation de la matière organique se dessine : elle est résumée par le tableau suivant qui présente les ordres de grandeur des dosages effectués :

en $\mu\text{grC}/1$	substrats directement utilisables	BOD	POM	TOC
Hansweert	200	2000	1000	(10000)
Ostende	250	1000	1000	8000
Calais	200	500	200	7000
Milieu océanique typique (1)	(100)?	200	100	2000

(1). - Synthèse des résultats présentés par Williams (1975); Parsons (1975) et Dawson (1975).

Les substrats directement utilisables sont présents à des concentrations remarquablement similaires dans tous les milieux étudiés. Ils ne constituent qu'une fraction très réduite de la matière organique totale.

La différence entre les 3 milieux semble se marquer surtout par la quantité de matériel organique potentiellement utilisable (BOD).

3. Vitesse d'utilisation.

3.1. Utilisation directe des vitesses relatives de turnover.

3.1.1. Détermination directe des vitesses relatives de turnover.

3.1.1.1. Méthode (voir détails dans BILLEN, JOIRIS, WIJNANT & GILLAINE, à paraître dans ECMS).

Les vitesses d'incorporation, d'une part, et de respiration d'autre part, de petits substrats organiques individuels ont été déterminées grâce à l'usage de substrats marqués de haute radioactivité spécifique, ajoutés en concentration négligeable par rapport aux concentrations naturelles.

On suit en cinétique sur des temps courts l'incorporation de radioactivité dans les cellules d'une part, et la production de CO_2 marqué d'autre part.

Les courbes obtenues en fonction du temps présentent le plus souvent une convexité (courbe d'incorporation) et une concavité (courbe de respiration) dans leur partie initiale (\approx 1ère heure d'incubation), avant de devenir linéaires.

L'analyse de ces courbes permet la détermination :

- de la vitesse totale d'utilisation (incorporation + respiration) : vitesse initiale d'incorporation;
- de la vitesse d'incorporation : vitesse d'incorporation dans la partie linéaire de la courbe;
- de la vitesse de respiration : vitesse de production de CO_2 marqué dans la partie linéaire de la courbe.

La concordance entre ces 3 déterminations indépendantes est montrée pour une série de situations dans le tableau VII.

Les rapports trouvés entre respiration et incorporation sont repris dans le tableau VIII. Les valeurs obtenues du rapport d'incorporation/utilisation totale sont en général plus faibles que celles citées dans la littérature, peut-être à cause d'une sous-estimation de la respiration dans la plupart des travaux antérieurs.

Tableau VII. : Comparaison entre la vitesse totale d'utilisation(en % h⁻¹) de quelques substrats organiques.

- a. par la somme de vitesse d'incorporation (estimée à partir de la pente de la courbe d'incorporation dans sa partie linéaire), plus la vitesse de respiration (estimée à partir de la pente de la courbe de respiration dans sa partie linéaire).
- b. pour la pente de la tangente de la courbe d'incorporation du temps initial.

Station	Substrate	a		Total utilisation	Total uptake
		Incorpora- tion	Respira- tion		
Ostende 18.07.77	Glycollate	0.096	1.03	1.13	1.12
Hansweert 19.07.77	Glycollate	0.32	1.80	2.12	2.00
Hansweert 21.10.77	Glucose	1.23	4.60	5.83	4.60
Ostende 18.07.77	Acetate	2.81	1.75	4.56	4.85
Hansweert 21.10.77	Acetate	2.10	7.90	10.00	5.07
Ostende 18.07.77	Lactate	0.68	0.92	1.60	1.63

Tableau VIII. : Rapport entre la vitesse d'incorporation et la vitesse d'utilisation totale pour différents substrats.

Substrate	Mean	Range	Number of determination
Amino acids (1)	0.32	0.16-0.50	17
Glycollate	0.15	0.05-0.25	8
Glucose	0.35	0.20-0.50	7
Acetate	0.41	0.20-0.60	12
Lacate	0.38	0.15-0.60	7

(1) - mesuré avec Alanine, Apartate et Lysine.

3.1.1.2. Résultats

L'ensemble de nos mesures de vitesse relative d'utilisation totale des substrats est repris au tableau IX.

3.1.1.3. Discussion

Dans l'ensemble, ces résultats montrent une différence considérable entre les différents milieux étudiés :

A Hansweert, les vitesses d'utilisation sont de l'ordre de $2-5\% h^{-1}$;

A Ostende, elles sont de l'ordre de $0.5-2\% h^{-1}$

A Calais, elles sont le plus souvent de l'ordre de 0.05 à $1\% h^{-1}$

Des variations saisonnières claires ne peuvent pas être déduites de nos mesures.

Tableau IX. : Vitesse relative (% h⁻¹) d'utilisation totale (I+R) des substrats.

Hansweert

	Ala	Asp	Lys	Glycol	Glucose	Acet	Lact
19.07.77	-	-	-	1.80(0) 2 (+)	-	27 (0)	5.40(0)
21.10.77	4.90(+)	5.10(+)	7.60(+)	0 (0)	5.80(0) 4.60(+)	10 (0) 5.10(+)	0.67(+)
07.04.78 10h	2.30(★)	1.20(+)	3.20(+)	1.60(+)	3.10(★)	5.10(+)	0.85(+)
21.04.78 10h	4.10(★)	4.40(+)	3.60(+)	3.00(★)	2.70(★)	10.20(+)	1.30(★)
19.05.78 10h	7.20(★)	0 (+)	0 (+)	2.00(★)	6.50(+)	11.80(★)	1.50(★)
MOYENNE	4.60	2.70	3.60	1.70	4.40	12.30	1.90

Ostende

18.07.77	-	-	-	1.10(+)(0)	-	4.56(0) 4.85(+)	1.60(0) 1.63(+)
07-08. 10.77	0 (+)	0.39(+)	0 (+)	0.44(+)	0.46(+)	0 (+)	0 (+)
18.10.77	0 (+)	0.93(★)	1.80(★)	0 (+)	1.70(★)	0.24(★)	0.24(★)
05.04.78	0.75(+)	0.72(★)	3.30(+)	0.18(+)	1.10(+)	0.15(+)	0.11(+)
02-19.04.78	-	-	-	-	-	-	0.20(+)
19.04.78	5.00(+)	5.70(+)	0.65(★)	0.20(★)	1.30(★)	0.17(★)	0.03(★)
16.05.78 12h	1.90(★)	3.90(★)	7.10(★)	0 (+)	12.30(+)	1.70(★)	4.80(★)
24h	-	-	-	-	-	-	-
11.07.78	0 (+)	0 (+)	0.26(+)	0 (+)	0 (+)	0.04(+)	0 (+)
MOYENNE	1.20	1.90	2.20	0.27	2.80	1.00	0.87

Calais

26.07.77	-	-	-	0 (+)	-	0.07(+)	0.05(0)
09-10.10.77	2.40(★)	0.62(+)	1.50(★)	0.46(+)	0.21(+)	0.16(+)	0.13(★)
19.10.77	0	0 (+)	0.22(★)	0 (+)	0 (+)	0.04(+)	0.04(★)
04.04.78	0.44(★)	0 (+)	1.10(+)	0 (+)	0.83(★)	0.07(+)	0.01(★)
03-18.04.78	0.50(★)	-	-	-	-	-	0.05(★)
18.04.78 12h	0 (+)	0 (+)	0.19(★)	0 (+)	0 (+)	0 (+)	0.01(★)
24h	0.12(+)	0 (+)	0.56(+)	0 (+)	0 (+)	0.10(+)	0.03(★)
17.05.78	0 (+)	0 (+)	0 (+)	0 (+)	0 (+)	0 (+)	0 (+)
12.07.78	0 (+)	-	4.80(★)	0 (+)	0.49(★)	-	0.03(★)
MOYENNE	0.43	0.10	1.20	0.06	0.22	0.06	0.04

0 somme de I et R, mesurés séparément.

+ pente initiale de la courbe d'incorporation en f^{er} du temps.

★ estimation de (I+R) à partir de la valeur de I et d'un coeff. moyen $\frac{I}{(I+R)}$

3.1.2. Vitesse absolue d'utilisation des substrats directement utilisables.

Le produit de la vitesse relative de turnover d'un substrat par la concentration de ce substrat représente la vitesse absolue d'utilisation de ce substrat.

Le tableau VIII présente par catégorie de substrat, le stock total tel qu'estimé au tableau III, la vitesse moyenne de turnover et la vitesse absolue d'utilisation.

La colonne total présente la somme des vitesses absolues d'utilisation de chaque catégorie de substrats directement utilisables (pour l'urée, on a choisi une vitesse relative de turnover égale à la moyenne des vitesses relatives de turnover des autres substrats).

Il s'agit là, dans l'état actuel de nos connaissances, de la meilleure estimation par défaut de l'activité hétérotrophe vraie.

Tableau X. : Vitesse absolue d'utilisation des substrats directement utilisables.

	Acides Aminés			Glucides libres			Glycolate			Produits de fermentation		
	Σ AA	util. rel. util. dis.	$\mu\text{grC}/1\text{h}$	Gluc. Lib.	util. rel. util. dis.	$\mu\text{grC}/1\text{h}$	Glycol.	util. rel. util. dis.	$\mu\text{grC}/1\text{h}$	Glycolate	util. rel. util. dis.	$\mu\text{grC}/1\text{h}$
	Σ AA	util. rel. util. dis.	$\mu\text{grC}/1\text{h}$	Gluc. Lib.	util. rel. util. dis.	$\mu\text{grC}/1\text{h}$	Glycol.	util. rel. util. dis.	$\mu\text{grC}/1\text{h}$	Glycolate	util. rel. util. dis.	$\mu\text{grC}/1\text{h}$
<i>Hansweert</i>												
19.07.77	25	—	5.90	1.30	33	5.20	—	4.8	1.90	0.91	24	16
21.10.77	22	—	2.20	0.31	50	3.10	1.70	—	0	0	24	4.10
07.04.78	14	—	4.00	0.40	50	2.70	1.60	108	1.60	1.70	72	3.00
21.04.78	10	—	2.40	—	33	6.50	1.40	108	3.00	3.20	158	5.80
19.05.78	—	—	—	—	—	2.10	—	—	2.00	—	24	6.60
moyenne	18	3.60	0.67	0.65	42	4.40	1.70	88	1.70	1.50	—	6.58
<i>Ostende</i>												
18.07.77	29	—	0.13	0.27	—	0.46	—	43	1.10	0.47	120	3.10
7-8.10.77	—	0.91	0.24	1.60	30	1.70	1.10	—	0	0	360	0
18.10.77	30	—	—	—	23	0.33	—	72	0.18	0	—	0.24
05.04.78	15	—	3.80	0.26	23	—	—	—	0.13	0.13	120	0.13
2-19.04.78	—	7	0.26	0.26	23	1.30	0.30	74	0.20	0.15	62	0.20
19.04.78	7	—	4.30	4.30	30	12.30	3.70	—	0	0	0.10	0.14
16.05.78	12h	—	0.09	0.09	26	0	0	0	0	0	0.06	0.06
11.07.78	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
moyenne	20	1.80	0.26	0.36	26	2.80	1.10	63	0.27	0.13	136	0.88
<i>Calais</i>												
26.07.77	55	—	1.50	0.05	23	0.21	—	22	0	0	0	0.06
9-10.10.77	77	0.07	0.51	0.11	7	0.83	0	—	0.46	0	0	0.15
19.10.77	22	—	0.50	0.01	10	—	—	55	0	0	24	192
04.04.78	—	—	0.06	—	—	—	—	55	0	0	0	0.04
3-18.04.78	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	24	0.05
18.04.78	12h	11	0.06	0.22	0	0	0	0	0	0	0	0.01
24h	—	—	—	—	7	0	0	0	0	0	0	0.07
17.05.78	0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0	0
12.07.78	1.60	—	—	—	—	0.49	—	—	—	—	0.03	0
moyenne	41	0.56	0.06	0.22	11	0.22	0.01	44	0.06	0	90	0.05
						0.22	0.02	—	—	—	0.05	0.90
						0.02	—	—	—	—	0.05	2.50

3.2. Vitesse initiale de consommation d'oxygène.

3.2.1. Signification

La vitesse de consommation d'oxygène, mesurée à l'obscurité, sur des temps courts représente l'activité hétérotrophe au sens large, c'est-à-dire y compris la respiration du phytoplancton.

3.2.2. Résultats

L'ensemble des résultats disponibles relatifs aux campagnes "matière organique" est présenté dans le tableau IX. Les résultats y sont donnés en $\mu\text{grC/l.h}$, tenant compte d'un quotient respiratoire moyen de 0.85.

Tableau IX. : Vitesse initiale de consommation d'oxygène.

μgrC/l.h

Hansweert

19.07.77	11
21.10.77	11.50
07.04.78	-
21.04.78	-
19.05.78	-

moyenne 11.30

Ostende

18.07.77	1.30
03-08.10.77	10.00
18.10.77	8.80
05.04.78	-
02-19.04.78	-
19.04.78	-
16.05.78	-
11.07.78	-

moyenne 6.70

Calais

26.07.77	-
09-10.10.77	0
19.10.77	-
04.04.78	17.70
03-18.04.78	25.50
18.04.78	-
12h	-
24h	-
17.05.78	2.00
12.07.78	0.80

moyenne 9.20

Mesures effectuées par C. Joiris, R. Swaelens et R. Van Thomme.

3.3. Discussion générale.

L'estimation de l'activité hétérotrophe au sens strict obtenue par mesure de l'utilisation des petits substrats directement utilisables est dans tous les cas nettement inférieure à l'activité hétérotrophe au sens large, estimée sur base de la consommation initiale d'oxygène. La différence est d'un ordre de grandeur dans le cas de la Station de Calais.

Il faut se souvenir toutefois que l'activité hétérotrophe au sens strict est une estimation par défaut dans la mesure où certains petits substrats éventuellement utilisés avec une grande vitesse de turnover, peuvent avoir échappé à l'analyse.

La validité des hypothèses sur lesquelles s'appuie cette estimation pourrait être testée par quelques expériences réalisées sur de l'eau de mer ultrafiltrée (fraction < 500D):

1° Tout d'abord le stock total des substrats directement utilisables estimé par dosages spécifiques doit être égal au dosage du TOC dans la fraction ultrafiltrée (voir plus haut).

2° La vitesse initiale de consommation d'oxygène dans une eau ultrafiltrée après réensemencement bactérien doit être égale à la vitesse initiale de consommation d'oxygène dans une eau témoin filtrée sur 0.2μ mais non ultrafiltrée, reensemencée de façon identique; le BOD_5 dans l'eau ultrafiltrée doit être considérablement plus basse que dans l'eau filtrée témoin.

4. Régulation de l'activité hétérotrophe.

La plupart des modèles classiques utilisés jusqu'ici pour modéliser l'interaction matière organique-bactéries dérivent essentiellement du modèle de Streeter et Phelps (1925) selon lequel l'activité hétérotrophe globale est supposée proportionnelle à la charge organique totale (ou potentiellement utilisable). La reconnaissance de ce que seule une petite fraction de la matière organique totale est directement utilisable par les microorganismes avait fait naître l'espoir de trouver dans la concentration des substrats directement utilisables le facteur déterminant les différences d'activité hétérotrophe globale entre milieux. Paradoxalement, cependant, et c'est l'un des résultats les plus importants du travail du groupe, la concentration en substrats directement utilisables ne varie pratiquement pas dans la gamme des milieux étudiés, alors que des différences considérables s'observent dans leur taux d'utilisation. L'explication de cet apparent paradoxe est fournie par un modèle très simple qui sera discuté ci-dessous.

Ce modèle suggère aussi que l'intensité de l'activité bactérienne hétérotrophe est déterminée en fait par la vitesse de production des substrats directement utilisables, soit par excrétion phytoplanctonique, soit par hydrolyse exoenzymatique de polymères organiques. Une rapide discussion des données existant dans la littérature sur la cinétique des réactions exoenzymatiques en milieu naturel est abordée ci-après.

4.1. Constance des concentrations de substrats directement utilisables.

Considérons un substrat directement utilisable S , produit à une vitesse p , soit par hydrolyse exoenzymatique, soit par excrétion phytoplanctonique, et prélevé par la population bactérienne présente, de densité B , selon une loi Michaelienne.

$$\frac{dS}{dt} = p - \frac{V_{max} S}{K_m + S} B \quad (1)$$

Si l'on suppose que les bactéries croissent avec un rendement constant Y par rapport à leur utilisation de substrat, et que leur mortalité est de type aléatoire, c'est à dire proportionnelle à la densité, on peut écrire

$$\frac{dB}{dt} = Y \frac{V_{max} S}{K_m + S} B - kB \quad (2)$$

A l'état stationnaire, le système (1) et (2) a pour solution:

$$B = Y/k \quad p \quad (3)$$

$$S = \frac{K_m}{\left(\frac{V_{max} Y}{k} - 1 \right)} \quad (4)$$

On voit que la densité bactérienne stationnaire est proportionnelle au flux de production ce substrat, tandis que la concentration de ce substrat est indépendante de ce flux. Elle ne dépend que de paramètres purement physiologiques de la souche bactérienne qui l'utilise.

La validité de l'hypothèse de stationnarité a été testée en calculant l'évolution du système au cours du temps (voir Billen et al, en préparation). Après une perturbation, les conditions stationnaires sont restaurées en une période de l'ordre du jour. Lorsqu'interviennent des fluctuations journalières de la vitesse de production des substrats, la concentration en substrat et la population bactérienne varient peu autour de leur valeur stationnaire.

Le modèle permet aussi de rendre compte de l'ordre de grandeur des concentrations mesurées des substrats organiques, lorsque des valeurs numériques raisonnables pour les constantes physiologiques des bactéries sont introduites dans la relation (4).

4.2. Données sur l'action des exoenzymes.

L'autolyse spontanée des macromolécules organiques est un phénomène extrêmement lent au pH de la plupart des milieux naturels. Ce n'est donc que par l'action des exoenzymes que la matière organique de haut poids moléculaire peut être source de substrats directement utilisables.

Par filtration douce sur membranne de 0.2μ de porosité d'échantillons de 0.5 à 1 l d'eau de mer, d'estuaire ou d'eau interstitielle de sédiments marins, puis concentration par dialyse contre du polyéthylène glycol, Kim et Zobell (1974) ont réussi à mettre en évidence la présence d'exophosphatase, d'exoamylase et d'exoprotéase dans la plupart des milieux naturels testés.

La production d'exoenzymes par les bactéries est soumise à une série de mécanismes de régulation physiologique mis en évidence en cultures pures.

La production d'exoenzymes est réprimée par la présence du produit de leur activité: ainsi, chez *Bacillus subtilis*, le glucose réprime la production d'amylase (Green & Colarusso, 1964) et les acides aminés, celle de la protéase (May & Eliott, 1968; Neumark & Citri, 1962).

La production d'exoenzymes peut également être soumise à la répression atabolique: ainsi, les exoprotéases de *Bacillus subtilis* sont réprimées par le glucose (Hoften, 1965).

Très peu de données existent concernant la cinétique d'action des exoenzymes dans les milieux naturels. Kailov & Finenko (1970), lors d'expériences sur des polysaccharides et des protéines naturelles marquées (extraites de cultures d'algues) ont montré l'importance des surfaces dans la dégradation exoenzymatique des macromolécules. À des concentrations en macromolécules proches des concentrations naturelles, 50 à 60 % des polysaccharides et des protéines s'adsorbent sur de la matière en suspension naturelle ou sur de la poudre de verre. L'hydrolyse des macromolécules absorbées est rapide (33% par jour) et aboutit à la désorption des monomères qui sont ensuite absorbés par les microorganismes.

La mise en évidence semi-quantitative des exoenzymes dans les milieux marins étudiés est prévue au programme des campagnes prochaines.

Il n'est pas exclu en effet que se soient des différences au niveau de la vitesse d'hydrolyse exoenzymatique de la matière organique qui expliquent en dernier ressort les différences d'intensité de l'activité hétérotrophe dans les milieux côtiers, estuariens et de haute mer.