

# Inhibition de la dénitrification par les hydrocarbures dans les sédiments marins. Rôle de *Nereis diversicolor*

## *Inhibition of denitrification by hydrocarbons in marine sediments. Role of Nereis diversicolor*

FRANCK GILBERT\*, FRÉDÉRIQUE FRANÇOIS, GEORGES STORA, JEAN-CLAUDE BERTRAND

*Laboratoire d'océanographie et de biogéochimie, UMR 6535 du CNRS, Centre d'océanologie de Marseille (OSU), université de la Méditerranée, campus de Luminy, case 901, 13288 Marseille cedex 9, France*

### RÉSUMÉ

Une expérimentation *in vitro* a été conduite à l'aide d'une population de polychètes galéricoles *Nereis diversicolor* afin de mettre en évidence le rôle du macrobenthos sur l'expression de la dénitrification en présence d'hydrocarbures. La comparaison de l'activité dénitrifiante entre des sédiments témoins (sans macrofaune) et expérimentaux (avec macrofaune) contaminés ou non par des hydrocarbures a été réalisée après 15 et 45 j d'expérimentation. Dans les sédiments témoins contaminés, la dénitrification est uniquement inhibée dans la couche de surface du sédiment (0–2 cm). En présence de macrofaune, l'enfouissement des hydrocarbures à l'intérieur des galeries de polychètes entraîne une inhibition en profondeur de la dénitrification. Cette inhibition qui est fonction de la quantité d'hydrocarbures enfouis est respectivement détectée à 6 et 10 cm après 15 et 45 j d'expérimentation.

**Mots clés :** polychètes, bioturbation, hydrocarbures, bactéries, dénitrification, sédiments marins

### ABSTRACT

*An in vitro experiment has been carried out in order to illustrate the influence of the burrowing polychaete *Nereis diversicolor* on denitrification in hydrocarbon-loaded sediments. After 15 and 45 days, the denitrification activity in the different contaminated or non-contaminated control (without macrofauna) and experimental (colonized by polychaetes) sediments was compared. In control contaminated sediments, the inhibition of denitrification is solely located in the surface layer (0–2 cm). In the presence of polychaetes, the hydrocarbon buried in the burrows extends the inhibition of denitrification in the sediment. As a function of the quantity of buried hydrocarbon, the inhibition of denitrification is observed up to a depth of 6 and 10 cm, after 15 and 45 days, respectively.*

**Key words:** polychaetes, bioturbation, hydrocarbons, bacteria, denitrification, marine sediments

## Introduction

Depuis plusieurs années, il apparaît clairement que la macrofaune joue un rôle important, par le remaniement sédimentaire qu'elle induit, sur l'activité microbienne et les échanges à l'interface eau-sédiment [1–3].

Parmi les différents métabolismes bactériens étudiés dans les sédiments, la régulation de la dénitrification par la présence et l'activité du macrobenthos a fait l'objet d'une attention privilégiée [4–7].

De même, plusieurs travaux ont montré l'influence de la bioturbation sur l'enfouissement de matériel particulaire d'origine naturelle et anthropique dans des sédiments marins, notamment les hydrocarbures [8–13].

Compte tenu de l'effet inhibiteur des hydrocarbures sur la dénitrification [14–16], un travail expérimental *in vitro* a été entrepris afin d'étudier les conséquences de l'activité du macrobenthos en présence d'hydrocarbures sur l'expression de la dénitrification dans la colonne sédimentaire

Dans ce but, une série d'expérimentations *in vitro* ont été conduites à l'aide d'une population de polychètes galéicoles *Nereis diversicolor*, espèce choisie pour sa capacité à provoquer à la fois un remaniement sédimentaire [17, 18] entraînant un enfouissement rapide d'hydrocarbures [12] et des échanges de solutés à l'intérieur de ses galeries [19].

## Matériels et méthodes

Les dispositifs et protocoles expérimentaux utilisés au laboratoire, la technique relative à la mesure de la dénitrification, ainsi que les méthodes d'analyse des nitrates et des hydrocarbures ont été préalablement décrits par Gilbert et al. [6, 12].

Lors de ce travail, du fait d'une activité dénitrifiante réelle très faible dans le sédiment, l'activité dénitrifiante a été mesurée selon la méthode de l'AED (activité des enzymes dénitrifiantes) [20]. L'AED est une mesure de l'expression des enzymes associées à la dénitrification présentes dans le sédiment au moment du prélèvement. Le principe de cette mesure est d'optimiser, dans chaque tranche de sédiment isolée, la réaction enzymatique par un apport de substrat (glucose : 1 mM ; nitrate : 1 mM) afin que la production de  $N_2O$  soit proportionnelle à la quantité d'enzymes dénitrifiantes [21].

Les prélèvements de polychètes et de sédiments ont été réalisés dans le canal Saint-Antoine qui relie le Rhône et l'anse de Carteau (golfe de Fos, mer Méditerranée). La profondeur moyenne  $y$  est de 0,8 m.

La contamination des sédiments a été réalisée en déposant, en début d'expérience dans des carottiers, une galette de sédiment de 10 cm de diamètre et de 1 cm d'épaisseur contenant des hydrocarbures (pétrole brut Arabe léger). L'analyse gravimétrique a montré que la concentration de chaque « galette-hydrocarbures », expri-

mée en  $mg \cdot kg^{-1}$  sédiment sec (moyenne  $n = 6$ ), était de 6 437 action hydrocarbures saturés (FS), et de  $2 452 \pm 18 mg \cdot kg^{-1}$  sédiment sec en fraction hydrocarbures aromatiques. Afin d'avoir des conditions expérimentales identiques, les carottiers non contaminés ont reçu une galette de sédiment sans hydrocarbures.

Lors de cette expérimentation, en fonction du traitement appliqué au sédiment (dont un témoin non traité), quatre conditions expérimentales différentes ont été mises en place :

- sédiment témoin (sans macrofaune) : T,
- sédiment témoin contaminé (sans macrofaune, et ayant reçu un apport d'hydrocarbures en surface) : TH,
- sédiment expérimental (contenant une population de six *N. diversicolor*) : E,
- sédiment expérimental contaminé (contenant une population de six *N. diversicolor*, et ayant reçu un apport d'hydrocarbures en surface) : EH.

Après 15 et 45 j, les sédiments ont été prélevés, découpés en tranches de 2 cm d'épaisseur depuis la surface en tenant compte de la galette jusqu'à 10 cm, et les différentes analyses effectuées.

Les différences entre les sédiments et les variations spatio-temporelles de l'activité dénitrifiante ont été analysées à l'aide d'une analyse de variance (Anova) à trois facteurs. Le test de Bartlett a été employé pour tester l'homogénéité de variance.

## Résultats et discussion

Le tableau I présente les profils d'activité dénitrifiante (moyenne  $n = 3$ ) mesurées dans les différents sédiments, après 15 et 45 j.

L'analyse de variance (Anova) réalisée à partir des mesures d'activité dénitrifiante a permis de mettre en évidence des évolutions différentes des activités dénitrifiantes en fonction du type de sédiment (sédiment), de la profondeur de sédiment (niveau) et du temps (temps) (tableau II). En ce qui concerne les interactions entre les différents facteurs (sédiment, niveau et temps), aucune d'entre elles n'apparaît significative indiquant que les activités dénitrifiantes, en fonction de ces différents facteurs, évoluent toujours de la même façon.

La figure 1 regroupe les activités dénitrifiantes et les concentrations en hydrocarbures mesurées dans les différents sédiments, après 15 et 45 j.

Au cours de l'expérience, indépendamment des pertes plus ou moins importantes liées à un départ des hydrocarbures dans la colonne d'eau touchant l'ensemble des carottiers [12], l'étude de la fraction saturée des hydrocarbures dans les sédiments expérimentaux contaminés, montre tout d'abord que dans les carottiers témoins (TH) sans organismes les hydrocarbures restent localisés à la surface du sédiment. Dans les carottiers expérimentaux

**Tableau I. Moyennes ( $\pm$  IC,  $n = 3$ ) de l'activité dénitrifiante dans les différents sédiments en fonction de la profondeur, après 15 et 45 j**

Profondeur (cm)	T	TH	E	EH
À 15 j				
0-2	179,3 (9,2)	104,3 (6,2)	203,9 (11,8)	148,7 (25,9)
2-4	170,7 (0,9)	169,1 (24,1)	150,7 (20,4)	77,1 (2,5)
4-6	162,5 (28,5)	141,6 (30,0)	148,0 (34,7)	142,8 (8,8)
6-8	156,0 (35,0)	177,6 (1,8)	113,3 (38,5)	127,4 (1,7)
8-10	148,4 (1,2)	153,3 (2,0)	107,3 (6,3)	153,9 (28,3)
À 45 j				
0-2	174,7 (3,4)	109,9 (9,7)	95,9 (1,9)	96,5 (11,5)
2-4	89,3 (1,9)	101,8 (24,2)	79,3 (13,4)	62,1 (2,1)
4-6	80,8 (3,5)	102,5 (13,5)	116,9 (3,1)	75,2 (3,6)
6-8	79,5 (11,5)	95,8 (15,1)	85,8 (2,8)	53,8 (6,2)
8-10	91,8 (4,9)	99,2 (4,8)	110,3 (4,0)	47,3 (22,4)

Pour le nom des différents sédiments, se référer au texte.

**Tableau II. Résultats de l'analyse de variance (Anova) à trois facteurs réalisée à partir des mesures d'activité dénitrifiante dans les différents sédiments**

Source de variation	p
Sédiment (S)	*
Temps (T)	***
Niveau (N)	*
Interaction S-T	NS ( $p = 0,55$ )
Interaction S-N	NS ( $p = 0,17$ )
Interaction T-N	NS ( $p = 0,63$ )
Interaction S-T-N	NS ( $p = 0,46$ )

NS : non significatif ; \*\*\*  $p < 0,001$  ; \*  $p < 0,05$ .

colonisés par les polychètes, on observe en revanche un enfouissement de ces hydrocarbures (figure 1).

Les concentrations en hydrocarbures saturés enfouis dans les sédiments bio-remaniés par la macrofaune sont variables en fonction de la profondeur et du temps.

Après 15 j, on note des concentrations allant de 555 à 35 mg.kg<sup>-1</sup> séd. sec de 0 à 6 cm ; plus profondément seules des traces d'hydrocarbures sont détectées.

Après 45 j, l'enfouissement des hydrocarbures se manifeste jusqu'à 10 cm de profondeur où des concentrations de 22 mg.kg<sup>-1</sup> séd. sec sont mesurées.

En l'absence d'hydrocarbures, la comparaison des activités dans les carottiers T et E montre que l'influence de *N. diversicolor* sur la dénitrification est limitée à la couche de surface du sédiment [22]. Dans les 15 premiers jours, le remaniement sédimentaire lié à la construction des galeries stimule la dénitrification (14 %) en favorisant

l'apport de nitrate dans le sédiment [6]. Après 45 j, l'augmentation de la surface de galeries, induisant une oxydation de la zone, entraîne l'inhibition de la dénitrification (-45 %) [6].

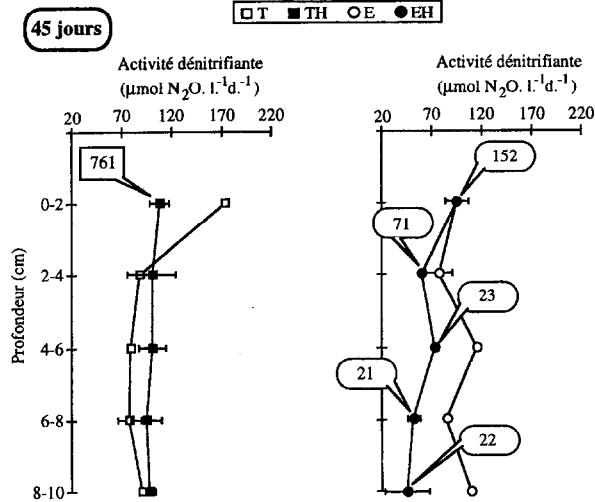
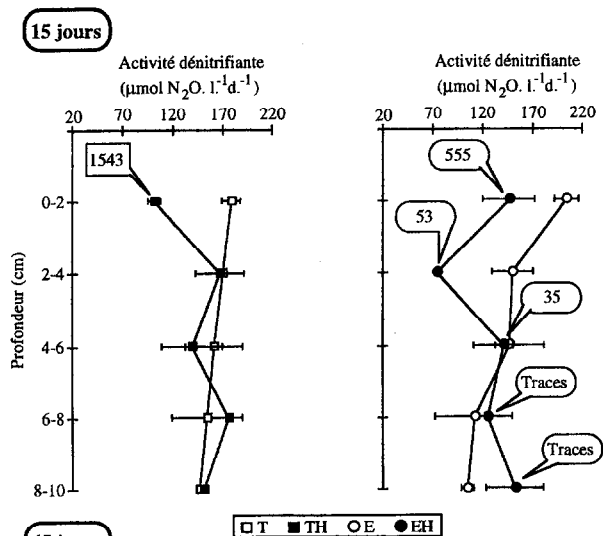
Un apport massif d'hydrocarbures dans les carottiers sans organismes (comparaison des carottiers T et TH) entraîne, dans la couche de surface, tout au long de l'expérience, une baisse de la concentration en nitrate (figure 2) et une inhibition (-40 %) de la dénitrification (figure 1). Dans les couches plus profondes, les concentrations en nitrate et les valeurs de production de N<sub>2</sub>O restent équivalentes en présence ou absence d'hydrocarbures.

La présence simultanée des polychètes et du pétrole brut (comparaison carottiers E et EH) entraîne dans les 15 premiers jours une inhibition du taux de production de N<sub>2</sub>O jusqu'à 6 cm de profondeur dans le sédiment (-22,4 %). En surface, cette inhibition de la dénitrification par les hydrocarbures est moins importante que celle mesurée dans les sédiments témoins car est en partie compensée par le caractère stimulant de la macrofaune. Dans le carottier expérimental contaminé (EH), on retrouve également des valeurs plus faibles en nitrate.

Après 45 j, on peut tout d'abord observer, à partir de 2 cm de profondeur dans le sédiment, une chute générale de la concentration en nitrate et de l'activité dénitrifiante, et ceci indépendamment des conditions expérimentales (figures 1 et 2).

Dans les sédiments témoins sans organisme, l'inhibition de la dénitrification en présence d'hydrocarbures (TH) reste localisée dans la couche de surface (figure 1).

Dans les sédiments expérimentaux contenant des polychètes, l'inhibition de la dénitrification (-40,5 % en moyenne sur tout le sédiment) liée à l'enfouissement des

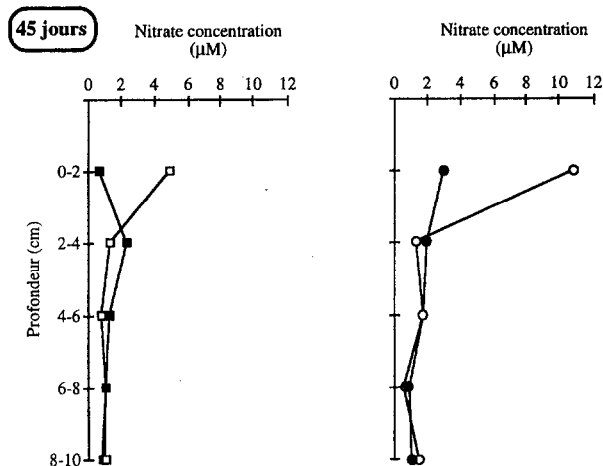
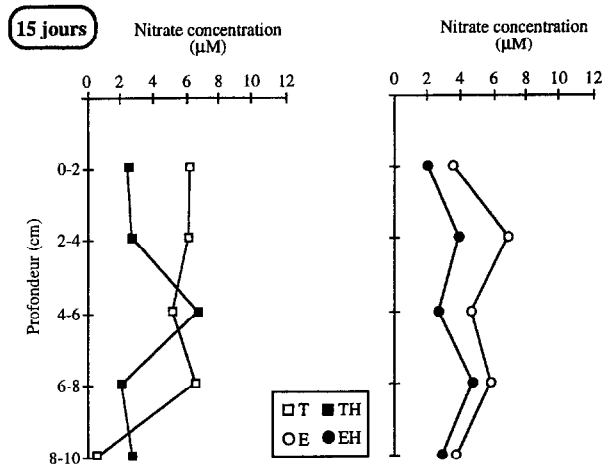


**Figure 1. Activité dénitrifiante (moyenne  $\pm$  IC,  $n = 3$ ) et concentration en hydrocarbures (indiquée dans les bulles) dans le sédiment en fonction des conditions expérimentales et de la profondeur, après 15 et 45 j.**

Les concentrations en hydrocarbures sont exprimées en mg de fraction saturée des hydrocarbures.  $\text{kg}^{-1}$  sédiment sec. L'absence de « bulle » indique une concentration en hydrocarbures nulle. Pour le nom des différentes conditions expérimentales, se référer au texte.

hydrocarbures (EH) se maintient et se manifeste jusqu'à 10 cm de profondeur, pour des concentrations en nitrate équivalentes à celles mesurées dans les sédiments non contaminés (T et TH) (figure 2). En surface, les valeurs de dénitrification sont équivalentes pour les sédiments contaminés avec (EH) ou sans polychètes (TH).

Bien que, dans certaines conditions expérimentales, l'effet négatif des hydrocarbures sur la dénitrification ne soit pas toujours vérifié [23], ce phénomène a souvent été démontré. Dans le cadre de nos travaux, l'inhibition de la dénitrification a été observée en présence ou non d'une baisse de la concentration en nitrate dans les sédiments. De ce fait, elle peut être attribuée : i) au caractère toxique des hydrocarbures contenus dans le pétrole brut et notamment des hydrocarbures aromatiques ; ii) à la mise en



**Figure 2. Concentration en nitrate dans le sédiment en fonction des conditions expérimentales et de la profondeur, après 15 et 45 j.**

Pour le nom des différentes conditions expérimentales, se référer au texte.

place de conditions anoxiques limitant la nitrification et donc la production de  $\text{NO}_3^-$  et stimulant la sulfato-réduction dont la production de sulfures inhibe la dénitrification [14-16, 24, 25]. En effet, les mesures de potentiel d'oxydo-réduction effectuées dans les sédiments contaminés [26], s'échelonnant entre  $-122$  et  $-197$  millivolts, montrent que les conditions du milieu sont « compatibles » avec l'expression de la sulfato-réduction.

L'influence de *N. diversicolor* sur la dénitrification apparaît donc comme très complexe, basée à la fois sur la distribution des nitrates, la pénétration de l'oxygène et l'enfouissement des hydrocarbures, processus modifiés constamment par les différentes activités du polychète dans le sédiment (remaniement sédimentaire et bio-irrigation).

## Conclusion

Jamais prises en compte simultanément jusqu'à présent, l'étude de la dénitrification et celle de l'enfouissement

des hydrocarbures montrent l'influence majeure exercée par la polychète *Nereis diversicolor* sur la modification à la fois de la distribution des hydrocarbures et de l'expression de la dénitrification.

Le transport et le stockage des hydrocarbures dans les galeries entraînent une inhibition en profondeur de la dénitrification. Cette inhibition est variable au cours du temps en fonction du degré d'installation des organismes et des quantités de contaminants enfouis dans les sédiments.

## ABRIDGED VERSION

Numerous works have demonstrated the influence of bioturbation on both denitrification activity in sediment and adsorbed hydrocarbon reworking. However, the link between the two processes has not yet been established. The aim of this work was to investigate the impact of hydrocarbons on denitrification in *in vitro* bioturbated experimental sediments.

The experimental design was based on the comparison of four types of sediments: i) control sediment, without-macrofauna sediment (T); ii) control contaminated sediment, without-macrofauna sediment which has received a 1-cm hydrocarbon loading (hydrocarbon-sediment mixing at the concentration of 3 215 mg hydrocarbon saturated fraction. kg<sup>-1</sup> dry sed.) at the surface (TH); iii) experimental sediment, sediment colonized by a six *Nereis diversicolor* population (E); iv) experimental contaminated sediment, experimental sediment which has received a hydrocarbon loading at the sediment surface (EH). In order to standardize the experimental conditions, a 1-cm sediment loading was deposited at the sediment surface of non-contaminated sediments. The different sediments were disposed into a continuous seawater flow-through system under controlled salinity, temperature

and light-dark cycle conditions. The denitrification rate measurements and hydrocarbon analyses were realized in sediments from the top to a depth of 10 cm, after 15 and 45 days.

In non-hydrocarbon-contaminated sediments, the presence of *Nereis diversicolor* (E) induced a stimulation (15 days), then an inhibition (45 days) of denitrification in the surface layer (0–2 cm), without any effect down the sedimentary column in the case of the control (without macrofauna) ones (T). In control contaminated sediments (TH), hydrocarbons were kept at the sediment surface and a reduction of the denitrification rate was found at the surface layer. On the other hand, in polychaete-colonized sediments (EH), hydrocarbons were buried into the sedimentary column down to a depth of 6 and 10 cm, after 15 and 45 days, respectively. While the inhibition of denitrification was reduced in the surface layer, it was then extended down the sediment as a function of the contaminant presence in the polychaete burrows.

In the presence of hydrocarbons at the sediment surface, the polychaete *Nereis diversicolor* plays an important role in denitrification by burying hydrocarbons and extending down the sediment their impact on denitrification.

**Remerciements :** Ce travail a été réalisé dans le cadre du Groupement de recherche « GDR HYCAR n°1123 : « Cycles biogéochimiques des hydrocarbures naturels et anthropiques en milieu marin » (CNRS, universités, Elf Aquitaine).

## RÉFÉRENCES

1. Aller R.C. 1980. Quantifying solute distributions in the bioturbated zone of marine sediments by defining an average microenvironment. *Geochim. Cosmochim. Acta* 44, 1955-1965
2. Jørgensen B.Ø., Revsbech N.P. 1985. Diffusive boundary layers and the oxygen uptake of sediments and detritus. *Limnol. Oceanogr.* 30, 111-122
3. Binnerup S.J., Jensen K., Revsbech N.P., Hjorth Jensen M., Sørensen J. 1992. Denitrification, dissimilatory reduction of nitrate to ammonium, and nitrification in a bioturbated estuarine sediment as measured with <sup>15</sup>N and microsensor techniques. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 303-313
4. Kristensen E., Blackburn T.H. 1987. The fate of organic carbon and nitrogen in experimental marine sediment systems: Influence of bioturbation and anoxia. *J. Mar. Res.* 45, 231-257
5. Pelegri S. P., Nielsen L. P., Blackburn T. H. 1994. Denitrification in estuarine sediment stimulated by the irrigation activity of the amphipod *Corophium volutator*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 105, 285-290
6. Gilbert F., Bonin P., Stora G. 1995. Effect of bioturbation on denitrification in a marine sediment from the West Mediterranean littoral. *Hydrobiologia* 304, 49-58
7. Rysgaard S., Christensen P.B., Nielsen L.P. 1995. Seasonal variation in nitrification and denitrification in estuarine sediment colonized by benthic microalgae and bioturbating infauna. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 126, 111-121
8. Gordon D.C. Jr, Dale J., Veizer P.D. 1978. Importance of sediment working by the deposit-feeding polychaete *Arenicola marina* on the weathering rate of sediment-bound oil. *J. Fish. Res. Board. Can.* 35, 591-603
9. Gardner W., Lee R.F., Tenore K., Smith L. W. 1979. Degradation of selected polycyclic aromatic hydrocarbons in coastal sediments : importance of microbes and polychaete worms. *Water Air Soil Pollut.* 11, 339-347
10. Karickhoff S.W., Morris K.R. 1985. Impact of turbidic oligochaetes on pollutant transport in bottom sediments. *Environ. Sci. Technol.* 19, 51-56
11. Koerting-Walker C., Buck J. D. 1989. The effect of bacteria and bioturbation by *Clymenella torquata* on oil removal from sediment. *Water Air Soil Pollut.* 43, 413-4
12. Gilbert F., Rivet L., Bertrand J.C. 1994. The fate of petroleum hydrocarbons in marine sediments: Influence of the burrowing polychaete *Nereis diversicolor*. *Chemosphere* 29, 1-12
13. Gilbert F., Stora G., Bertrand J.C. 1996. In situ bioturbation and hydrocarbon fate in an experimental contaminated Mediterranean coastal ecosystem. *Chemosphere* 33, 1449-1458
14. Haines J.R., Atlas R.M., Griffiths R.P., Morita R.Y. 1981. Denitrification and nitrogen fixation in Alaskan continental shelf sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 41, 412-421
15. Griffiths R.P., Caldwell B.A., Broich W.A., Morita R.Y. 1982. The long-term effects of crude oil on microbial processes in subarctic marine sediments. *Estuar. Coast. Shelf. Sci.* 15, 18198

16. Bonin P., Gilewicz M., Rambeloarisoa E., Mille G., Bertrand J.C. 1990. Effect of crude oil on denitrification and sulfate reduction in marine sediments. *Biogeochem.* 10, 161-174
17. Meadows P. S., Tait J., Hussain S. A. 1990. Effects of estuarine infauna on sediment stability and particle sedimentation. *Hydrobiologia* 190, 263-266
18. Gérino M., Stora G. 1991. Analyse quantitative in vitro de la bioturbation induite par la Polychète *Nereis diversicolor*. *C. R. Acad. Sci. Ser. III, Paris* 313, 489-494
19. Lee H., Swartz R.C. 1980. Biological processes affecting the distribution of pollutants in marine sediments. Part II. Biodeposition and bioturbation. In : *Contaminants and Sediments* (Baker R.A., ed.), Ann Arbor Science Publ, Ann Arbor, 2, 555-606
20. Bonin P., Raymond N., Bertrand J.C. 1992. Comparison of methods for measuring denitrifying activity in marine sediments from the Western Mediterranean coast. *O. Acta* 15, 137-143
21. Tiedje J. M. 1982. Denitrification. In : *Methods of Soil Analysis, Part 2* (Page A.L., ed.), Agron. Monogr. Amer. Soc. Agron., Madison, WI, 9, 1011-1026
22. Sayama M., Kurihara Y. 1983. Relationship between burrowing activity of the polychaetous annelid, *Neanthes japonica* (Izuka) and nitrification-denitrification processes in the sediments. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 72, 233-241
23. Li Y., Morris J.T., Yoch D.C. 1990. Chronic low level hydrocarbon amendments stimulate plant growth and microbial activity in salt-marsh microcosms. *J. Appl. Ecol.* 27, 159-171
24. Bauer J.E., Montagna P.A., Spies R.B., Prieto M.C., Hardin D. 1988. Microbial biogeochemistry and heterotrophy in sediments of a marine hydrocarbon seep. *Limnol. Oceanogr.* 33, 1493-1513
25. Sloth N.P., Blackburn T.H., Hansen L.S., Risgaard-Petersen N., Lomstein B.A. 1995. Nitrogen cycling in sediments with different organic loading. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 116, 163-170
26. Gilbert F. 1994. Influence de la bioturbation sur l'activité dénitrifiante dans des sédiments marins côtiers. Effet d'un apport exogène de matière organique : les hydrocarbures. Thèse de l'université d'Aix-Marseille-II, ANRT-Grenoble : 94/AIX2/2053