Mise au point d'une méthode de mesure in situ du processus de nitrification dans le sédiment de rivière

Eric Jague

▶ **To cite this version:**

Eric Jague. Mise au point d'une méthode de mesure in situ du processus de nitrification dans le sédiment de rivière. Sciences de l'environnement. 1996. hal-03806070

HAL Id: hal-03806070
https://hal.inrae.fr/hal-03806070

Submitted on 7 Oct 2022

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.

96/0215

Cemagref

LA RECHERCHE POUR L'INGENIERIE DE L'AGRICULTURE ET DE L'ENVIRONNEMENT

Division Qualité des eaux
Groupement de Bordeaux

Eric JAGUE
Mémoire de D.E.S. Sciences Naturelles
de L'Université Bordeaux I
réalisé du 15 février au 14 août 1996

MISE AU POINT D'UNE METHODE DE MESURE IN SITU DU PROCESSUS DE NITRIFICATION DANS LE SEDIMENT DE RIVIERE

Monsieur Pierre CAUMETTE, Président du jury
Monsieur Rutger DE WIT, Responsable de formation
Monsieur Mathieu TORRE, Maître de stage

Division Qualité des eaux
Groupement de Bordeaux

Eric JAGUE
Mémoire de D.E.S. Sciences Naturelles
de L'Université Bordeaux I
réalisé du 15 février au 14 août 1996

MISE AU POINT D'UNE METHODE DE MESURE IN SITU DU PROCESSUS DE NITRIFICATION DANS LE SEDIMENT DE RIVIERE

Monsieur Pierre CAUMETTE, Président du jury
Monsieur Rutger DE WIT, Responsable de formation
Monsieur Mathieu TORRE, Maître de stage

REMERCIEMENTS

Je remercie Messieurs les Ingénieurs Henri BEUFFE, Alain DUTARTRE et Mathieu TORRE de la Division Qualité des Eaux du CEMAGREF de Bordeaux de m'avoir confié une étude au sein de leur équipe.

Parmi eux, Monsieur Mathieu TORRE, responsable du laboratoire de microbiologie et coordinateur de cette étude m'a laissé une entière liberté dans l'orientation des expérimentations et m'a apporté son précieux concours technique sur le terrain.
Je lui exprime ici toute ma reconnaissance.

Monsieur Rutger De WIT, chargé de recherche du CNRS au Laboratoire d'Océanographie Biologique d'Arcachon a accepté d'être le responsable de ma formation de DES auprès de l'université. Son intérêt pour mes travaux et ses conseils m'ont été très profitables.
Je le remercie sincèrement pour les efforts déployés à mon égard.

Lors de chacune de mes visites au laboratoire d'Arcachon, Stéphane RIOUX a également été un interlocuteur bienveillant.
Je l'en remercie.

Monsieur François DELMAS, chef de la Division "QEB" a toujours su se rendre disponible afin de me donner les moyens logistiques dont j'avais besoins.
Je lui exprime ici ma gratitude.

Monsieur Pierre CAUMETTE, Professeur à l'Université Bordeaux I en océanographie biologique, spécialité microbiologie, a consenti à présider mon jury d'examen.
Je l'en remercie sincèrement.

Au CEMAGREF, Madame Catherine FERRIERE, Madame Christine POUDENX, Monsieur Jean-Louis KELLER et Monsieur François VERNIER ont de par leurs compétences respectives contribué au bon déroulement de ce stage.
Je leur exprime ma reconnaisance

Au cours de ces six mois, il a été formidable de pouvoir ponctuer les journées de travail par des moments de convivialité partagés par beaucoup. De ce groupe, Paul SIMON et Samuel TEISSIER m'ont régulièrement accompagné sur le terrain.
Je les remercie pour leurs aides techniques.

RESUME

Dans toutes les méthodes de mesure de la nitrification dans le sédiment de rivière, des échantillons sont prélevés sous forme de carotte puis testés au laboratoire.
Ces méthodes mettent en oeuvre des procédés de détermination qui sont soit: ➔ l'incorporation de $H^{14}CO_3^-$ par les bactéries
➔ le marquage des molécules azotées grâce à ^{15}N
➔ l'évolution de la concentration en nitrate ou en ammonium
Le système eau-sédiment systématiquement perturbé ne permet pas une quantification précise du processus.

Seule une méthode *in situ* permettrait une mesure rigoureuse de la vitesse de nitrification.
Cette étude a été amorcée au CEMAGREF en 1995 par Ferrer, qui a mis au point une méthode de mesure grâce à des dispositifs permettant d'isoler des portions de sédiment et de colonne d'eau au sein de la rivière.
Le principe repose sur <u>la comparaison</u> de l'évolution de la concentration en nitrate ou en protoxyde d'azote dans trois échantillons incubés différemment.
Nos expériences nous ont permis de démontrer que ce protocole n'est pas adapté.
Elles ont mis en évidence l'effet inhibiteur de l'acétylène à 10% (V/V) sur le processus produisant la majorité de l'ammonium dans le sédiment, et l'hétérogénéité du sédiment.

Inspiré de la littérature, nous avons développé notre propre méthode à partir du même appareillage.
Dans nos conditions d'utilisation nous n'avons pas démontré l'action inhibitrice du chlorate sur l'oxydation des ions nitrite. Par contre la N-serve, inhibiteur de l'oxydation des ions ammonium a été retenue dans notre protocole.
Notre méthode est basée sur <u>l'accumulation différentielle</u> des ions ammonium dans la colonne d'eau d'un même échantillon. Il est incubé en absence puis en présence d'inhibiteur de la première étape de la nitrification, la N-serve.

SOMMAIRE

INTRODUCTION 4

I CYCLE DE L'AZOTE 5

I.1 LES TRANSFORMATIONS DE L'AZOTE DANS LE SEDIMENT 6

I.2 LA NITRIFICATION 7

I.2.1 LA NITRIFICATION AUTOTROPHE 7

I.2.1.1 La Nitritation 8

I.2.1.2 La Nitratation 8

I.2.1.3 Facteurs influençant la nitrification 9

I.2.1.3.A Facteurs influençant les échanges eau/sédiment 9

I.2.1.3.B L'oxygène 9

❄ Besoins en oxygène 9

❄ Organismes produisant l'oxygène 10

I.2.1.3.C La température 10

I.2.1.3.D Le pH 10

I.2.1.3.E La lumière 11

I.2.1.3.F La matière organique 11

I.2.1.4 Les inhibiteurs de la nitrification 11

I.2.1.4.A L'acétylène 11

I.2.1.4.B La N-serve 11

I.2.1.4.C Le diméthyl éther et méthyl fluoride 12

I.2.1.4.D L'allylthiourée et thiourée 12

I.2.1.4.E Le chlorate 12

I.2.2 NITRIFICATION HETEROTROPHE 12

II MATERIEL ET METHODES 13

II.1 PRINCIPES DE METHODES MISES AU POINT 14

II.1.1 METHODES RAPPORTEES PAR LA LITTERATURE 14

II.1.1.1 Différentes Méthodes 14

II.1.1.1.A Méthode de Billen (1976) 14

II.1.1.1.B Méthode de Sloth et al. (1992) 14
II.1.1.1.C Méthode de Nishio et al. (1983) 15
II.1.1.1.D Méthode de Henriksen (1980) 15

II.1.1.2 Commentaires de ces méthodes 15
II.1.1.2.A Inconvénients de ces méthodes 15
II.1.1.2.B Adaptations potentielles de ces méthodes à notre appareillage 16

II.1.2 METHODE ETABLIE PAR FERRER (1995) 16

❄ Principe détaillé de la méthode 17
❄ Réflexions sur ce protocole 18

II.2 MATERIEL ET METHODE DE LA PRESENTE ETUDE 19

II.2.1 EXPERIENCE EN MICROCOSME 19

II.2.1.1 Nécessité des microcosmes 19
II.2.1.2 Création des microcosmes 19
II.2.1.3 Les systèmes expérimentaux 20
II.2.1.3.A Schéma d'un système 20
II.2.1.3.B Composition des systèmes 20
II.2.1.3.C Vue d'ensemble de ces systèmes 21

II.2.2 EXPERIENCE *IN SITU* 22

II.2.2.1 Les systèmes expérimentaux 22
II.2.2.1.A Composition des systèmes 22
II.2.2.1.B Vue d'ensemble de ces systèmes 23
II.2.2.1.C Inconvénient de ces systèmes 23

II.2.3 DEROULEMENT D'UNE EXPERIENCE 24

II.2.3.1 Matériel nécessaire à la réalisation d'une expérience : 24
II.2.3.2 Protocole de départ : 24

II.2.4 STRATEGIE DECIDEE 25

III RESULTATS DISCUSSION 26

III.1 EXPERIENCE EN MICROCOSME 27

III.1.1 EXPERIENCE M1 27
❄ Conditions expérimentales 27

❄ Résultat, discussion 27
❄ Conclusion 29

III.1.2 EXPERIENCE M2 29
❄ Résultat, discussion 29
❄ Conclusion 31

III.1.3 EXPERIENCE M3 32
❄ Conditions expérimentales 32
❄ Résultats, discussion 32
❄ Conclusion 34

III.2 EXPERIENCE *IN SITU* **35**

III.2.1 EXPERIENCE IS 1 35
❄ Conditions expérimentales 35
❄ Résultat, discussion 35
❄ Conclusion 35

III.2.2 EXPERIENCE IS 2 36
❄ Résultat, discussion 36
❄ Conclusion 36

III.2.3 EXPERIENCE IS 3 37
❄ Conditions expérimentales 37
❄ Résultat et discussion 37
❄ Calcul de la vitesse de nitrification 38
❄ Conclusion 39

III.2.4 EXPERIENCE IS 4 39
❄ Conditions expérimentales 39
❄ Résultat, discussion 40
❄ Calcul de vitesse de nitrification 40
❄ Conclusion 40

III.2.5 AUTRES EXPERIENCES 41

III.3 CONCLUSION DE CES EXPERIENCES **41**

IV SYNTHESE **44**

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES **46**

ANNEXES **49**

INTRODUCTION

Dans le cadre de l'étude du cycle de l'azote dans la rivière Charente, l'Equipe Hydrobiologie du CEMAGREF de Cestas est confrontée à un problème.
Pour s'interesser aux processus couplés de nitrification et dénitrification, une méthode de mesure sur le terrain de la dénitrification est utilisée couramment dans cette rivière.
Par contre, il n'existe aucune méthode de mesure *in situ* de la nitrification.
Ces deux processus ne peuvent donc pas être analysés simultanément dans un même milieu.

Des travaux antérieurs (Ferrer, 1995) ont posé des bases méthodologiques sur la quantification *in situ* de la nitrification et un protocole d'étude a été proposé.
Ce protocole doit être confronté à certaines expérimentations complémentaires.
Les expériences de la présente étude seront menées pour commencer dans des microcosmes puis sur le terrain.

I CYCLE DE L'AZOTE

Les principales formes de l'azote dans l'eau et dans les sédiments sont les ions nitrite, nitrate et ammonium libres ou adsorbés, l'azote gazeux et l'azote organique dissous ou particulaire. Les oxydes d'azote, N_2O et NO sont à l'état de trace dans l'atmosphère et dans l'eau.

I.1 LES TRANSFORMATIONS DE L'AZOTE DANS LE SEDIMENT

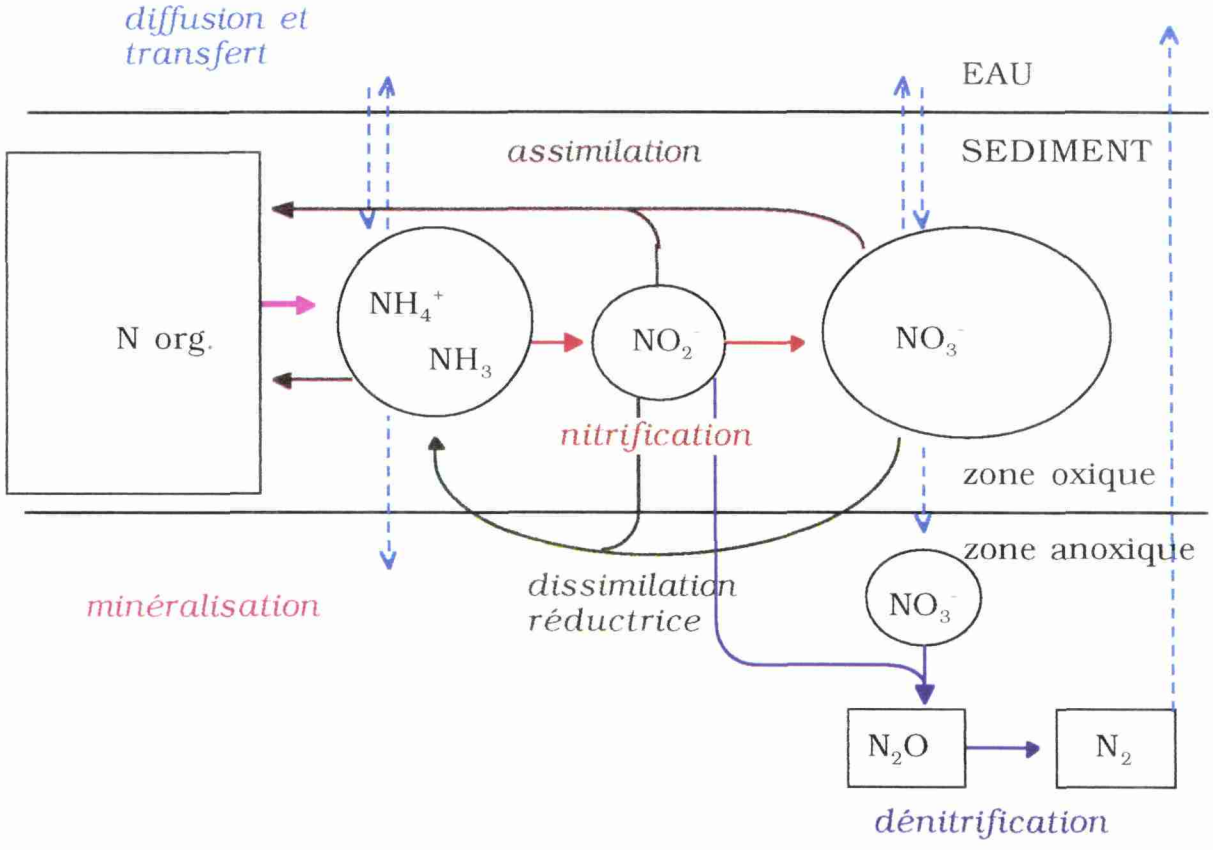


Figure 1 : transformations de l'azote dans le sédiment

Tous ces processus métaboliques font intervenir des microorganismes et éventuellement des algues et des végétaux.
La majorité de l'azote dans le sédiment étant sous forme organique, le processus d'ammonification doit être le principal processus de transformation de l'azote (Kemp et Mudrochova, 1972).
Ce mécanisme transforme l'azote organique en azote minéral NH_3 ou NH_4^+ (Jansson et Persson, 1982). Le processus inverse, la transformation de l'azote minéral (NH_4^+, NO_3^- et NO_2^-) en azote organique se fait par

assimilation de la part de différents organismes (végétaux, algues et bactéries).
Le nitrate est l'élément central du cycle de l'azote dans le sédiment. Il est majoritaire dans le pool d'azote minéral. De plus, il est impliqué dans différentes transformations métaboliques pouvant entrer en compétition. Ces transformations sont la dénitrification, l'assimilation réductrice et la dissimilation réductrice.
L'étude de compétitions pour le nitrate au sein du sédiment entre certaines transformations ont permis à Tiedje (1981) de déduire que la dénitrification est un processus dominant dans les milieux riches en nitrate et pauvres en composés organiques alors que la dissimilation réductrice a lieu essentiellement dans les milieux riches en matière organique. Ces deux processus se déroulent uniquement en anaérobiose alors que l'assimilation réductrice pratiquée par les bactéries, algues et végétaux a lieu en aérobiose comme en anaérobiose.
Dans le sédiment, la nitrification est le seul processus de production de nitrate.

I.2 LA NITRIFICATION

La nitrification est un mécanisme bactérien d'oxydation d'ions ammonium en ions nitrate. Elle peut être réalisée par des bactéries autotrophes ou hétérotrophes.

I.2.1 LA NITRIFICATION AUTOTROPHE

Les bactéries nitrifiantes sont gram-négatives et d'origines phylogénétiques variables. Elles appartiennent à la famille Nitrobacteraceae.
La nitrification a lieu en deux étapes, la nitritation (oxydation des ions ammonium en nitrites), puis la nitratation (oxydation des nitrites en nitrates).
La famille Nitrobacteraceae est composée de neuf genres (selon Bock *et al*, 1987) , cinq genres de bactérie oxydant l'ammoniaque :
- *Nitrosomonas*, dont *Nitrosomonas europaea* est la plus étudiée
- *Nitrosococcus*
- *Nitrosospira*
- *Nitrosovibrio*
- *Nitrosolobus*

et quatre genres de bactérie oxydant les nitrites :
- *Nitrobacter*
- *Nitrococcus*
- *Nitrospina*
- *Nitrospira*

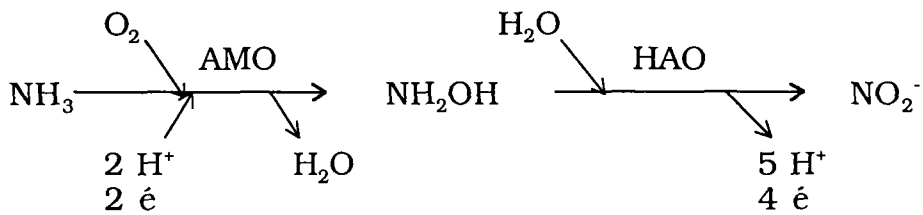
Les genres *Nitrosomonas* et *Nitrobacter* sont considérés comme responsables de la plupart de la nitrification naturelle (Anthoninsen *et al.*, 1976).

Parmi ces bactéries nitrifiantes ayant un temps de génération relativement long (7 à 13 heures), les bactéries oxydant l'ammonium se multiplient le moins rapidement. La nitritation est donc le processus limitant de la nitrification et par conséquent les ions nitrite ne s'accumulent pas dans le milieu.
Cependant les ions nitrite peuvent entrer dans des processus autres que la nitrification, tels que l'assimilation, la dénitrification et la dissimilation réductrice.

I.2.1.1 La Nitritation

Cette étape est constituée de plusieurs réactions biochimiques.
La première est catalysée par l'ammonium mono oxygénase (AMO), enzyme de la membrane plasmique. Néanmoins, ce n'est pas l'ion ammonium (NH_4^+) qui est oxydé mais l'ammoniac (NH_3).
L'ammoniac pris en charge par l'AMO est oxydé en hydroxylamine par l'oxygène. Ce composé est oxydé à son tour par l'hydroxylamine oxydoréductase (HAO) grâce à une molécule d'eau et un accepteur d'électron, ce qui permet la libération d'une molécule de nitrite.

❖ Réaction détaillée



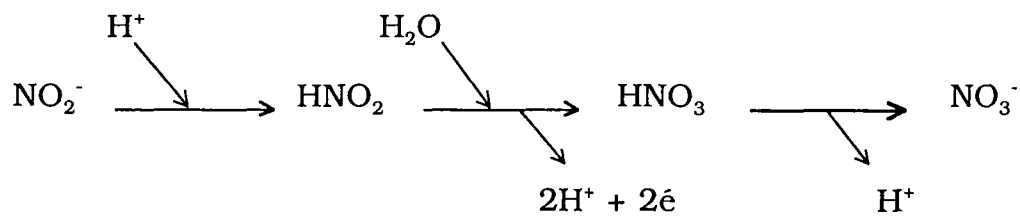
❖ Réaction bilan

$$NH_3 + O_2 \longrightarrow NO_2^- + 2é + 3H^+$$

I.2.1.2 La Nitratation

Une seule réaction biochimique permet cette étape. L'enzyme de la membrane plasmique intervenant ici est la nitrite oxydase.
Capturée par l'enzyme, la molécule de nitrite est hydrogénée par un proton H^+. Ensuite l'incorporation d'une molécule d'eau et la présence d'un accepteur d'électron permet l'oxydation aboutissant à l'acide nitrique. La dissociation du nitrate et du proton H^+ de cette acide doit se faire spontanément lors de la libération par l'enzyme.

❖ Réaction détaillée



❖ Réaction bilan

$$NO_2^- + H_2O \longrightarrow NO_3^- + 2H^+ + 2\acute{e}$$

I.2.1.3 Facteurs influençant la nitrification

I.2.1.3.A Facteurs influençant les échanges eau/sédiment

Au sein du sédiment les bactéries nitrifiantes autotrophes disposent de productions locales de substrats essentiels, ammonium, nitrite, dioxyde de carbone et oxygène (produit par les bactéries, algues et végétaux). Néanmoins, l'apport en substrat de la colonne d'eau reste indispensable. Les échanges entre l'eau et le sédiment conditionnent en partie l'approvisionnement des bactéries du sédiment en substrat et donc l'activité nitrifiante.
Deux phénomènes permettent ces échanges entre l'eau et le sédiment :
- la diffusion moléculaire entre la colonne d'eau et le sédiment est un phénomène très lent, qui engendre des échanges peu importants.
- la circulation d'eau dans le sédiment assure la majorité des transferts de substrat.

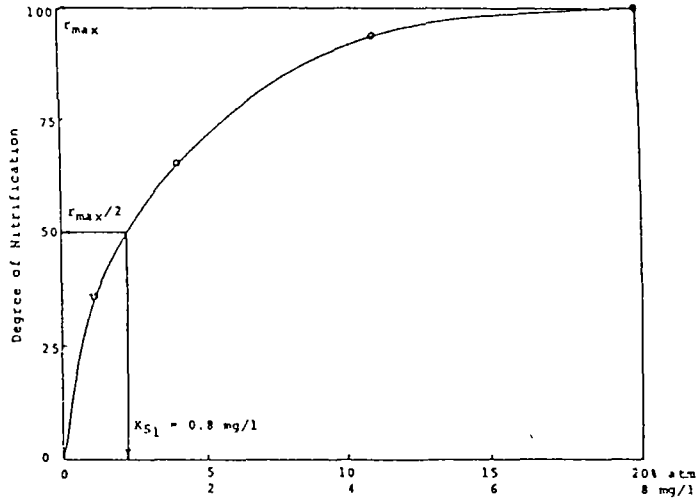
Il existe deux types de sédiment. Le sédiment de type vase dont la faible granulomètrie permet uniquement des déplacements très lents de l'eau interstitielle.
Par contre, dans le sédiment de type sable formé de particules de taille très supérieure, les déplacements d'eau sont importants (comparativement à la vase).
Par conséquent, les échanges entre l'eau et le sédiment sont plus importants dans le sédiment de type sable.
Les organismes bioturbateurs du sédiment ont une influence non négligeable sur la pénétration de substrat. Ces animaux entretiennent des courants d'eau dans leurs galeries de plusieurs centimètres de profondeur (Rysgaard *et al.*, 1995). Le sédiment plus profond se trouve alors en contact directe avec la colonne d'eau.

I.2.1.3.B L'oxygène

❄ Besoins en oxygène

Les bactéries nitrifiantes autotrophes ont une constante de demi saturation pour l'oxygène beaucoup plus faible que les bactéries hétérotrophes. L'activité nitrifiante maximale enregistrée dans des cultures de *Nitrosomonas* et *Nitrobacter* a été obtenue avec des concentrations en oxygène supérieures ou égales à 6 mg/l (figure suivante). Ainsi, la quantité d'oxygène, substrat de ces bactéries, conditionne le processus de nitrification.

Figure 2 : taux de nitrification en fonction de la concentration en oxygène (Shah and Coulman,1978)



❄ Organismes produisant l'oxygène

Les macrophytes libèrent de l'oxygène dans la colonne d'eau et dans le sédiment. En effet, les zones oxyques créées autour des racines sont le siège d'une active nitrification (Reddy *et al.*, 1989).
Les algues participent également à l'enrichissement en oxygène de l'eau. De plus, des microalgues benthiques composant en partie le périphyton entretiennent dans un environnement limité une abondance d'oxygène favorable aux bactéries nitrifiantes (Rysgaard *et al.*, 1995).
Les zones oxiques du sédiment constituent l'habitat des bactéries nitrifiantes. Ainsi, l'étendue de ces zones détermine en partie la quantité de bactérie nitrifiante et par conséquent le processus de nitrification.

I.2.1.3.C La température

La nitrification est très sensible à la température (Berousky et Nixon, 1990). La température optimale de croissance des bactéries semble se situer entre 28 et 36°C (Painter, 1970).

I.2.1.3.D Le pH

Le pH optimum pour l'oxydation de l'ammoniac est de environ 8,5 alors que celui de l'oxydation des nitrites est compris entre 8,5 et 9 (Guichard 1989). La nitrification entraine une acidification du milieu.
Le pH du milieu influence la transformation du stock d'ammonium dans le milieu en conditionnant l'équilibre du couple acide/base formé par NH_4^+/NH_3.

$$NH_4^+ + H_2O \rightleftharpoons H_3O^+ + NH_3 \qquad pKa = 9,2$$

Ainsi, plus le milieu est basique est plus l'équilibre est déplacé vers la formation d'ammoniac.

I.2.1.3.E *La lumière*

Les UV peuvent inactiver la monooxygénase des bactéries nitrifiantes. La lumière visible a également un effet inhibiteur sur les bactéries oxydant l'ammonium ou le nitrite.
Hooper et Terry (1974) montrent qu'une intensité lumineuse de 200 Watts inhibe l'activité de *Nitrosomonas*.
La lumière représente un facteur discriminant pour la distribution des bactéries nitrifiantes dans les systèmes aquatiques.

I.2.1.3.F *La matière organique*

L'augmentation de matière organique dans un milieu diminue la nitrification. Cette inhibition est indirecte. En effet, les bactéries hétérotrophes en quantité proportionnelle à celle de la matière organique peuvent entrer en compétition avec les bactéries nitrifiantes pour consommer l'oxygène (Kiff 1972).

I.2.1.4 Les inhibiteurs de la nitrification

La nitrification peut être inhibée par un excés de substrat ou bien par des composés extérieurs au cycle de l'azote.
Ces composés inhibiteurs couramment utilisés dans les études de la nitrification sont l'acétylène, le 2-chloro 6-(trichloro méthyl) pyridine appellé communément N-serve, le diméthyl éther, le méthyl fluoride, le chlorate, l'allylthiouré et le thiourée.

I.2.1.4.A *L'acétylène*

Ce composé a la capacité d'inhiber plusieurs processus métaboliques du cycle de l'azote au sein du sédiment.
Dans les méthodes de mesure de la dénitrification, il permet d'inhiber la réduction de N_2O en N_2. Il est également utilisé dans une méthode de mesure de la nitrification car inhibiteur de celle-ci (Sloth, 1992). L'ammonium mono oxygénase est une enzyme très sensible à l'acétylène (Hooper, 1978). De plus, l'acétylène a la capacité d'empêcher l'oxydation du méthane par les bactéries méthanotrophes (Bédard, 1989). L'acétylène aurait un effet inhibiteur sur d'autres processus métaboliques.

I.2.1.4.B *La N-serve*

Ce composé inhibe spécifiquement la première étape de la nitrification (Goring, 1962) et plus précisément l'oxydation de l'ammoniac en hydroxylamine (Campbell et Aleem, 1965). L'ammonium monooxygénase est la cible de l'inhibiteur.
Ce composé volatil est très peu soluble en solution aqueuse. Il doit donc être dissout dans un solvant organique pour être utilisé.

I.2.1.4.C *Le diméthyl éther et méthyl fluoride*

Ces composés sont inhibiteurs de la nitrification au sein d'une culture pure de *Nitrosomonas* mais également au sein du sédiment.
Il a été démontré qu'ils agissent sur l'ammonium monoxygénase (Miller, 1993).

I.2.1.4.D *L'allylthiourée et thiourée*

Ils inhibent l'oxydation de l'ammoniac en hydroxylamine (Hooper et Terry, 1973).
Néanmoins, il est démontré que leur effet inhibiteur peut être géné par le sédiment (Hall et Jeffries, 1984).

I.2.1.4.E *Le chlorate*

Il a la capacité n'inhiber des étapes différentes de la nitrification suivant sa concentration. Une forte concentration (0,01M) inhibe l'oxydation de l'ammonium alors que l'oxydation des nitrites l'est par une plus faible (10^{-5}M) (Lees et Simpson, 1957).
Selon certains auteurs la nitratation est inhibée par le chlorate à 10mM (Belser et Mays, 1980).
L'effet inhibiteur du chlorate serait dû au chlorite, produit de la réduction de ce composé par les bactéries nitrifiantes. Ce chlorite a la capacité d'inhiber la nitritation comme la nitratation (Hynes et Knowles, 1983).
En 1993, une équipe rapporte avoir obtenu des accumulations de nitrite par inhibition de la nitrification au chlorate (Feliatria et Bianchi, 1993).

I.2.2 NITRIFICATION HETEROTROPHE

La nitrification engendrée par les bactéries hétérotrophes a été peu étudiée. Ces bactéries microaérophiles ayant besoin de matière organique occupent des niches écologiques différentes des bactéries nitrifiantes autotrophes. Ce processus hétérotrophe est considéré comme négligeable devant l'autotrophe dans différents travaux (Sloth *et al.*, 1992, Billen *et al.*, 1976, Henriksen 1980). Néanmoins, la nitrification hétérotrophe pourrait jouer un rôle significatif dans le cycle de l'azote de plan d'eau peu oxygéné (Van Niel *et al.*,1992).

II MATERIEL ET METHODES

II.1 PRINCIPES DE METHODES MISES AU POINT

II.1.1 METHODES RAPPORTEES PAR LA LITTERATURE

La littérature nous rapporte la mise au point de plusieurs techniques de mesure de la nitrification dans le sédiment de rivière. Les méthodes de mesure décrites ici présentent les trois principes de détermination rencontrés sur l'ensemble des études :

- ➛ incorporation de $H^{14}CO_3^-$ par les bactéries
- ➛ marquage des molécules azotées grâce à ^{15}N
- ➛ évolution de la concentration en nitrate ou en ammonium

II.1.1.1 Différentes Méthodes

II.1.1.1.A Méthode de Billen (1976)

Cette méthode s'applique à la mesure de la nitrification dans le sédiment de rivière.
Des échantillons de sédiment sont collectés grâce à des tubes en plastique. Au laboratoire 5 cm^3 de sédiment sont additionnés à une faible quantité de ^{14}C-carbonate.
Après une agitation au vortex, deux lots d'échantillons sont constitués. Dans l'un d'eux la N-serve est ajoutée.
Les échantillons sont incubés en aérobiose pendant 2 à 5 heures. Ainsi, toutes les bactéries se developpant vont incorporer $H^{14}CO_3^-$.
Dans les échantillons sans inhibiteur toutes les bactéries incorporent le marqueur, alors que dans les échantillons additionnés d'inhibiteur, seules les bactéries non nitrifiantes l'incorporent.
La différence d'incorporation entre ces deux types échantillons permet de connaître l'incorporation dûe aux bactéries nitrifiantes. Ce marquage étant proportionnel à l'activité nitrifiante, un coefficient permet le calcul du taux de nitrification autotrophe à partir de la donnée précédente.

II.1.1.1.B Méthode de Sloth et al. (1992)

Les expériences ont été faites sur du sédiment d'estuaire.
Des carottes de sédiment sont prélevés et conservés dans des tubes en plexiglass. Les échanges dans le système eau-sédiment sont entretenus par une agitation magnétique de la phase aqueuse.
Les tubes sont incubés 14h à 25°C à l'obscurité. Au bout de 6h d'incubation, l'acétylène (inhibiteur de la nitrification) est introduit dans le milieu.

Ainsi ces deux périodes sont caractérisées par des processus métaboliques différents, et donc, les évolutions de la concentration de différentes molécules sont différentes.
Dans un premier temps (fonctionnement normal du système), NH_4^+ est produit à vitesse constante.
Ensuite, la nitrification étant inhibée, la fraction d'ammonium normalement consommé dans cette voie ne l'est plus. Alors, la concentration augmente avec une vitesse supérieure.
La différence d'accumulation entre ces deux phases d'incubation permet de calculer le taux de nitrification.

II.1.1.1.C Méthode de Nishio et al. (1983)

Le sédiment est collecté sous forme de carotte.
Les tubes sont reliés à un réservoir d'eau additionnée à une faible quantité d'ammonim marqué par ^{15}N.
Ainsi le sédiment est alimenté en continu et l'effluant fractionné est recueilli pendant 50h.
La détermination des teneurs de ^{15}N dans les lots de nitrite et nitrate est réalisée grâce à un spectromètre de masse.
Ces teneurs permettent de calculer le taux de nitrification.

II.1.1.1.D Méthode de Henriksen (1980)

Le sédiment est prélevé grâce à des tubes en plexiglass.
La carotte de sédiment marin et la colonne d'eau surnageante sont prélevées en respectant les quantités définies. Les tubes sont fermés hermétiquement dans leurs parties inférieures.
Dans un lot d'échantillon, l'inhibiteur de l'oxydation de l'ammonium, la N-serve est introduit. Il est d'une part injecté à la microseringue dans le sédiment et d'autre part additionné dans la colonne d'eau.
Puis les tubes sont incubés de 20 h à 4 jours à la température du sédiment lors du prélèvement .
Le sédiment sans inhibiteur consomme les ions ammonium de la colonne d'eau.
Dans les échantillons contenant la N-serve, la fraction des ions ammonium habituellement nitrifiés persiste dans le milieu.
Ainsi, la différence de vitesse de consommation établie sur les 48 premières heures permet de déterminer la vitesse de consommation des ammoniums par les bactéries nitrifiantes et donc le taux de nitrification.

II.1.1.2 Commentaires de ces méthodes

II.1.1.2.A Inconvénients de ces méthodes

Globalement, nous pouvons reprocher à toutes ces techniques de bouleverser l'hydraulique du système eau/sédiment.
Dans un cas le sédiment est mixé dans l'eau. Alors ni la diffusion moléculaire, ni le déplacement d'eau dans le sédiment ne sont reproduits.
Dans les autres, le sédiment est conservé dans des tubes en plexiglass de quelques centimètres de diamètre dans lesquelles la colonne d'eau est agitée de façons différentes.

La rotation de la phase aqueuse permet l'agitation dans la méthode de Sloth *et al.* (1992). Alors seul la diffusion moléculaire conditionne les échanges.
Dans la méthode de Nishio et *al.* (1983) la perfusion du sédiment permet d'établir dans le système eau-sédiment un courant d'eau vertical. Ce dernier dispositif ne mime pas rigoureusement le système eau-sédiment de la rivière.
De tels bouleversements modifient les échanges entre l'eau et le sédiment, ce qui se traduit par une variation de la concentration des substrats dans le sédiment. Ainsi, les bactéries dans un environnement modifié peuvent présenter des différences dans leur métabolisme.
De plus, l'hétérogénéité spatiale du sédiment et les faibles surfaces des échantillons exigent de travailler sur un nombre important d'échantillon afin que l'expérience soit représentative.
Ces raisons rendent nécessaires les travaux de mise au point d'une méthode de mesure *in situ* dans laquelle de plus amples portions de sédiment seraient testées dans les essais.
Pour cela, nous disposons de quatre dispositifs permettant d'isoler au sein de la rivière des portions de sédiment et de colonne d'eau beaucoup plus importantes. Cet appareillage utilisé dans l'étude de la dénitrification (Torre *et al.*, 1992) sera décrit ultérieurement.

II.1.1.2.B Adaptations potentielles de ces méthodes à notre appareillage

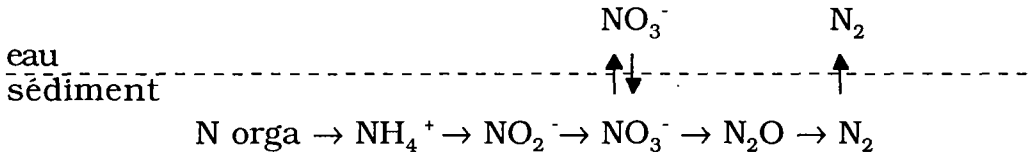
Il n'est pas envisageable de manipuler un élément radioactif tel que $H^{14}CO_3^-$ dans le milieu naturel pour des raisons évidentes de sécurité pour les manipulateurs, comme pour le milieu naturel.
L'utilisation d'isotope lourd de l'azote ne pose pas de problème dans le principe. Néanmoins, celui-ci ne peut être utilisé car sa quantification nécessite un spectromètre de masse, appareil très coûteux dont nous ne disposons pas.
Les deux méthodes basées sur la comparaison de bilans moléculaires en présence et en absence d'inhibiteur semblent adaptables à nos dispositifs. La N-serve et l'acétylène pourront être testées.

II.1.2 METHODE ETABLIE PAR FERRER (1995)

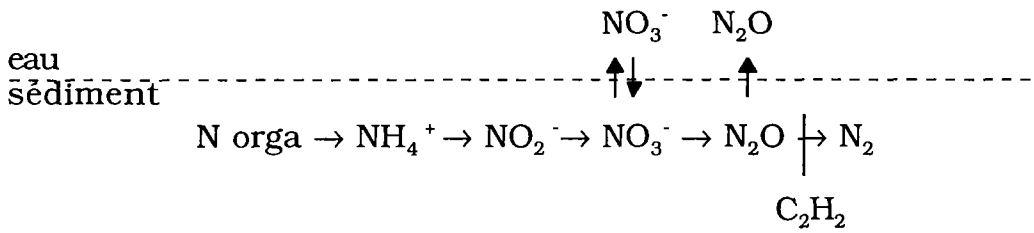
Le dispositif expérimental utilisé, identique au notre est décrit dans le paragraphe II.2.1.3.
Les trois échantillons de sédiment nécessaires sont incubés dans des conditions différentes.
L'évolution de la concentration en nitrate est mesuré dans l'eau d'un dispositif alors que la concentration en protoxyde d'azote est suivie dans les deux autres.
La combinaison des résultats de ces dosages permet de quantifier la nitrification.

❄ Principe détaillé de la méthode

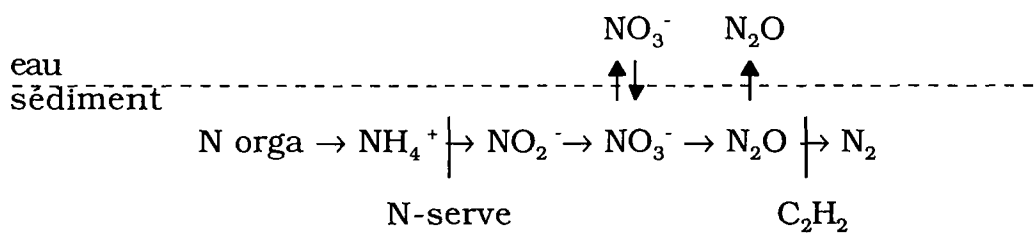
✈ dispositif 1 : Le taux d'oxygène dissous dans l'eau est maintenu. Dans ces conditions, le fonctionnement du système eau/sédiment est assimilable à celui naturellement établi dans la rivière. Ce dispositif permet de quantifier l'évolution normale de la concentration en nitrate de la colonne d'eau par dosage de ceux-ci.



✈ dispositif 2 : L'ajout d'acétylène à 10% du volume total empêche la dénitrification complète par inhibition de la réduction de N_2O en N_2. Ainsi, dans le sédiment les nitrates provenant de la colonne d'eau et les nitrates apparus par nitrification sont transformés en protoxyde d'azote. Le milieu n'est pas oxygéné pour éviter une inhibition de la dénitrification.



✈ dispositif 3 : L'acétylène à 10% et la N-serve (2-chloro 6-(trichloro méthyl)pyridine) à 0,5 mg/l sont ajoutés. L'acétylène agit sur la dénitrification et la N-serve inhibe la nitritation. Les nitrates ne pouvant plus être produits par nitrification, dans le sédiment seuls les nitrates provenant de la colonne d'eau sont dénitrifiés. Ce milieu n'est pas oxygéné.



Dans chacun de ces dispositifs les prélèvements réalisés toutes les heures pendant cinq heures permettent de mesurer l'évolution des concentrations en nitrate ou en protoxyde d'azote en fonction du temps. Au cours des premières heures où ces phénomènes sont linéaires, les vitesses d'accumulation sont déterminées. Dans les deux derniers dispositifs, la vitesse de production de N_2O est converti en nitrate transformé par unité de surface du sédiment et de temps. Cette conversion prend en compte le rapport stoechiométrique entre ces deux

espèces moléculaires (1 N_2O correspond à 2 NO_3^-). La différence de vitesse de transformation du nitrate entre le milieu 2 dans lequel a lieu la nitrification, et le n°3 où elle est inhibée, nous donne la part de nitrate produite par nitrification et dénitrifiée, par mètre carré et par heure. L'autre part de nitrate produite par nitrification passe dans la colonne d'eau. La vitesse de leur formation et de leur transfert dans la colonne d'eau est donnée par la vitesse d'accumulation de NO_3^- dans le systéme 1.

V de Nitrification = V de transformation des NO_3^- dispositif 2 - V trans. des NO_3^- disp. 3 + V accumulation des NO_3^- disp. 1

V : vitesse

❄ Réflexions sur ce protocole

Dans le dispositif 1, l'évolution de la concentration en nitrate est assimilée à la part de nitrates apparus par nitrification et tranferrée dans la colonne d'eau. Cette hypothèse n'est pas acceptable car la variation de cette concentration résulte d'un équilibre entre plusieurs processus (échanges eau/sédiment, nitrification, dénitrification, réduction dissimilative, assimilation) et non pas seulement de la nitrification et du transfert du sédiment vers l'eau.
La nitrification est mesurée dans le dispositif 2 dans lequel le taux d'oxygène n'est pas maintenu. La nitrification n'est elle pas limitée par manque d'oxygène ?
De plus, la différence faite entre les milieux 2 et 3 permet de calculer la part de nitrate produite et investie dans le processus de dénitrification.
L'ammonium monooxygènase, responsable de la première étape de la nitrification étant très sensible à l'acétylène (Hooper, 1978), la nitrification est elle perturbée dans le système 2 ?

II.2 MATERIEL ET METHODE DE LA PRESENTE ETUDE

II.2.1 EXPERIENCE EN MICROCOSME

II.2.1.1 Nécessité des microcosmes

Nous avons commencé les expériences au mois d'avril, période où la nitrification est très limitée par la faible température de l'eau. Il était alors difficile d'étudier ce processus *in situ*.
La création de microcosme dans le laboratoire permet de contrôler ce facteur physique déterminant.
De plus, une expérience en microcosme est moins contraignante en temps et en moyen qu'une expérience au sein de la rivière.
Dans les microcosmes, le système eau-sédiment reproduit n'est pas identique à l'original. Aussi, les résultats obtenus dans les expérimentations au laboratoire doivent être considérés avec prudence.

II.2.1.2 Création des microcosmes

Les microcosmes sont créés dans deux aquariums de deux cent litres. Ils sont remplis d'eau, de sable et de sédiment prélevés dans la rivière Charente sur la commune de Nersac.
Le prélèvement du sédiment a été réalisé en plongée à l'aide d'une petite pelle et de sacs en plastique. Les jerricanes d'eau ont été remplis depuis la berge.
Dans les aquariums, le mélange homogénéisé doit décanter trois jours afin que l'eau se décharge de toutes les matières en suspension.
Ainsi, les aquariums contiennent trois couches reconstituants la rivière, environ 10cm de sable et de petits cailloux, 2 à 3cm de sédiment organique puis 50cm d'eau.
Un équipement classique d'aquarium permet l'oxygénation, le maintien d'un courant d'eau et l'éclairage grâce à des lampes fluorescentes allumées 12h sur 24h.
Au bout de cinq jours, la température de l'eau augmentée par l'air ambiant et l'éclairage se stabilise à 21°C.
L'entretien de ce milieu consiste à renouveler la moitié de la colonne d'eau tous les quinze jours. Après chaque expérience le sédiment est aplani et homogénéisé.
Nous avons utilisé ces microcosmes pendant un mois et demi.

II.2.1.3 Les dispositifs expérimentaux

Nous avons mis au point quatre dispositifs pourvus de cloches benthiques de petite taille, adaptées au microcosme.

II.2.1.3.A Schéma d'un dispositif

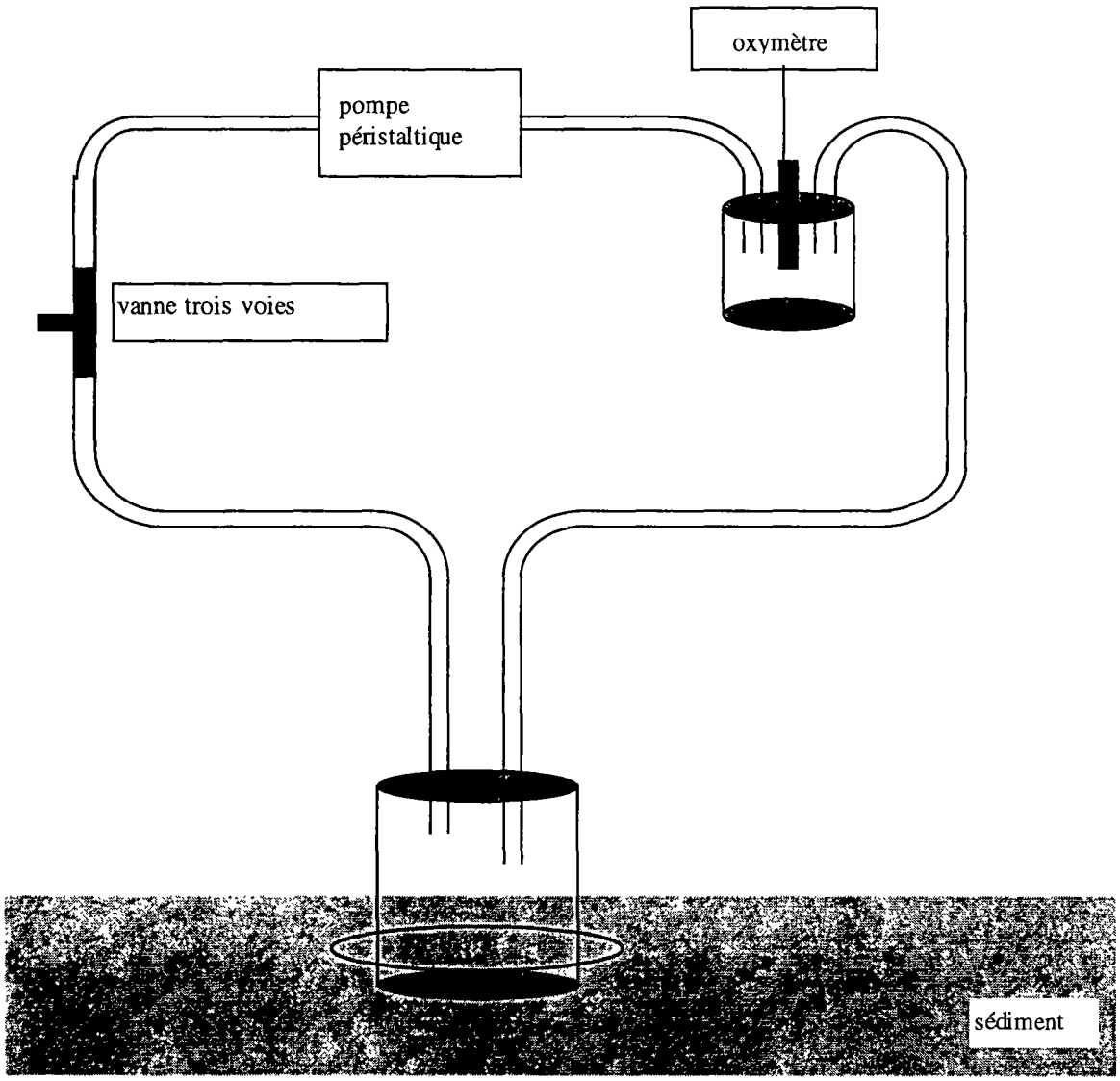


Figure 3

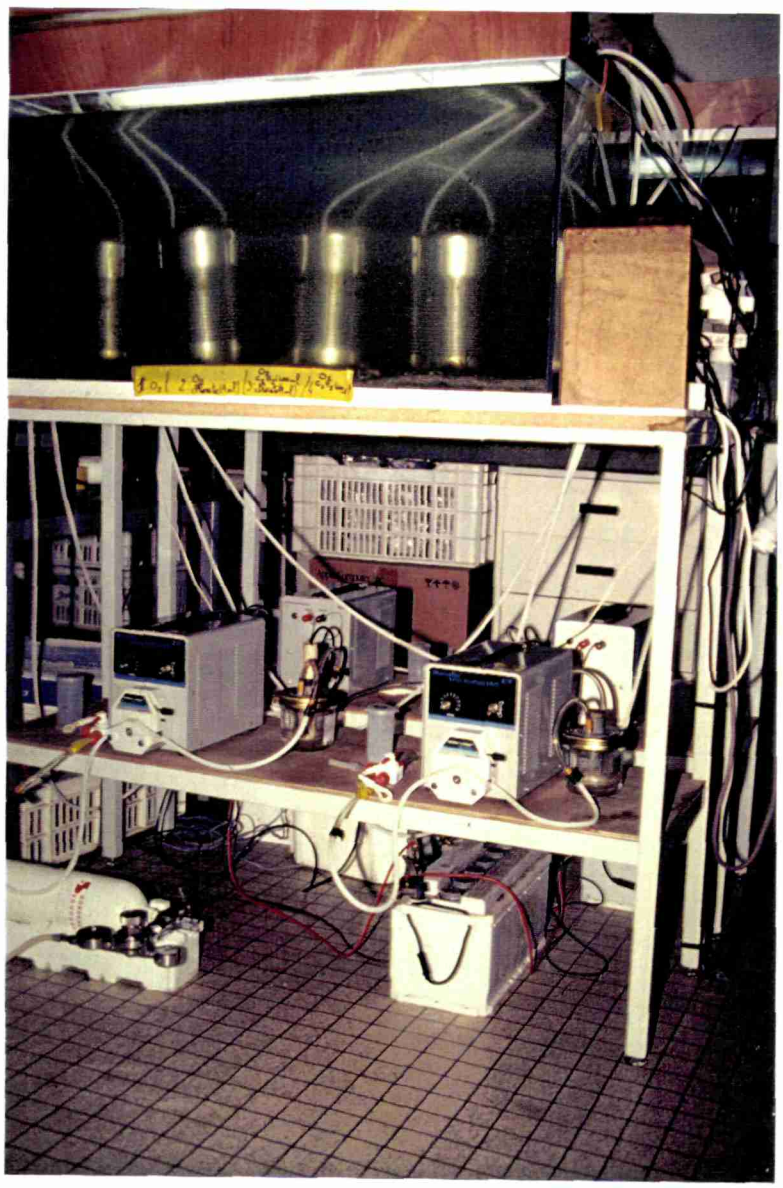
II.2.1.3.B Composition d'un dispositif

➢ la cloche benthique a un diamètre de 15cm pour une hauteur de 24cm. La collerette à 5 cm de l'extrémité ouverte permet de stopper la cloche dans le sèdiment et assure l'étanchéité.
Installée sur le fond de l'aquarium, la cloche permet l'isolement d'une surface de sédiment de 1,8 dm^2 et d'une portion de colonne d'eau de 3,3 litres.

➢ par une vanne trois voies nous réalisons les prélèvements, l'oxygénation et l'injection des inhibiteurs.
➢ les tuyaux en plastique souple (1 cm de diamètre) relient tous les éléments.
➢ la pompe péristaltique alimentée par une batterie 12V entretient un courant d'eau continu au travers du circuit hydraulique.
➢ la concentration en oxygène dans l'eau de ce dispositif est suivie grâce à un oxymètre dont la sonde est placée dans une petite cuve de 0,5 litres positionnée juste avant la pompe.

II.2.1.3.C *Vue d'ensemble de notre appareillage*

Figure 4



II.2.2 EXPERIENCE *IN SITU*

Les expériences in situ ont été réalisées à partir du mois de mai où la température de l'eau dans le site choisi était de 16°C.
Le choix de mener les expériences dans la rivière Dordogne sur la commune du Fleix, site éloigné de 150km du laboratoire est motivé par les travaux de Ferrer (1995). Les expériences réalisées sur des rivières plus proches (L'Eau Bourde et La Jalle de Blanquefort) avaient donné des résultats non satisfaisants. La faible quantité de sédiment organique avait été mise en cause. Le site du Fleix avait alors été retenu.

II.2.2.1 Les dispositifs expérimentaux

Nous disposons de quatre dispositifs identiques.

II.2.2.1.A Composition des dispositifs

Ils présentent quelques différences par rapport à ceux utilisés dans les microcosmes (paragraphe II.2.1.3.B).
La cloche benthique est de plus grande taille. Son diamètre est de 30cm et sa hauteur est de 35cm. A l'intérieur, la surface du sédiment est de 7 dm^2 et le volume de la colonne d'eau est de 21 litres.
De plus, l'extrémité de la sonde de l'oxymètre est introduite dans un orifice percé dans le toît de la cloche.
La longueur des tuyaux permet de placer la cloche à quatre mètres des éléments posés sur la berge.
Dans la rivière la cloche est lestée par une chaine de 10kg pour éviter qu'elle soit retournée par le courant.

II.2.2.1.B *Vue d'ensemble de l'appareillage*

Figure 5

II.2.2.1.C *Inconvénient de ces dispositifs*

Dans le paragraphe II.1.1.2 nous avons reproché au autres dispositifs de bouleverser l'hydrodynamique du système eau-sédiment.
Dans les échantillons isolés par nos dispositifs l'eau est agitée par un courant vertical. L'écoulement d'une rivière étant horizontal, nous pensons que ce changement de dynamique modifie les échanges entre l'eau et le sédiment.
Néanmoins, ce courant vertical créé par pompage nous permet de conserver les phénomènes de diffusion moléculaire et de déplacement d'eau dans le sédiment. Parmi tous les dispositif, les notres sont les moins traumatisant pour le système eau-sédiment.
Des cloches benthiques permettant d'entretenir un courant d'eau horizontal à la surface du sédiment permettraient de mimer rigoureusement la dynamique de la rivière.

II.2.3 DEROULEMENT D'UNE EXPERIENCE

II.2.3.1 Matériel nécessaire à la réalisation d'une expérience :

➢ les quatre dispositifs tels qu'ils ont été décrits précédement
➢ pilluliers en plastique de 60 ml marqués à 45 ml
➢ glacière contenant de la glace pilée (conditionnement de prélèvement)
➢ bouteille d'oxygène
➢ eau déminéralisée (2 litres)
➢ inhibiteurs

II.2.3.2 Protocole de départ :

➢ les oxymètres étalonnés par la méthode de Winkler (annexe 1) au laboratoire doivent être branchés une heure avant l'expérience.
➢ sur le terrain le site dans lequel est réalisé l'expérience doit avoir un fond sans forte pente, ni gros cailloux ni macrophytes. Une hauteur d'eau minimale de 0,5m est nécessaire.
➢ l'ensemble des composants des dispositifs sont connectés.
➢ les tuyaux sont remplis d'eau par pompage et les cloches partiellement immergées sont posées sur le flanc au fond de la rivière.
➢ ainsi la fin du remplissage des cloches et leurs installations dans le sédiment se fait en 5 minutes environ. Elles sont enfoncées dans le sédiment jusqu'à la collerette. *In situ* chaque installation est suivie par le lestage (chaines de 10 kg).
➢ ensuite les inhibiteurs éventuellement nécessaires sont introduits par la vanne trois voies.
Rq : le temps de transfert dans le sédiment doit être pris en compte dans les résultats.
➢ les prélèvements correspondants au temps zéro de l'expérience sont effectués. Chacun des prélèvements sera suivi de l'injection du même volume d'eau déminéralisée pour compenser la perte.
➢ les pompes fonctionnent pratiquement à plein régime sachant que le renouvellement d'eau obtenu pour la section de sédiment isolé est toujours plus faible que celui occasionné par le courant de la rivière.
➢ entre les prélèvements réalisés toutes les heures pendant cinq heures la concentration en oxygène est surveillée. Elle est maintenu approximativement à sa valeur initiale. Lorsque qu'elle chute de 0,5 mg/l, nous injectons l'oxygène à pression modérée par la vanne trois voies pendant 20 secondes. Le réglage de la pression nécessaire est évaluée par la vitesse de déplacement du train de bulle engendré dans les tuyaux. Cette opération pourra être renouveler 15 minutes plus tard, la dissolution dans ces systèmes étant lente.
Nous avons vu précédement que la nitrification varie peu au delà de 6mg/l. Ceci nous donne une marge d'intervention confortable.
➢ les pilluliers ayant reçus les prélèvements sont immédiatement introduits dans la glacière.
➢ de retour au laboratoire les échantillons sont conservés au froid. Le dosage de l'ammonium est réalisé le soir même, alors que celui des

nitrates et nitrites attend le lendemain. Les méthodes AFNOR sont mises en oeuvre pour ces trois dosages (annexe 2).

Rq : le déroulement général des expériences est inspiré de celui mise en pratique par Ferrer (1995).

II.2.4 STRATEGIE DECIDEE

D'aprés l'observation des méthodes de mesure de la nitrification rapportées par la littérature, nous pouvons reprendre un seul des trois principes exposés. Il consiste à comparer les bilans moléculaires de deux lots d'échantillons, dont un seul contient un inhibiteur de la nitrification.
La concentration en nitrite de l'ordre de la micromole par litre est un paramètre trés stable au cours des expériences (Ferrer, 1995). Une inhibition de la nitratation engendrerait une accumulation des nitrites et permettrait de quantifier la nitrification avec précision.
Nous connaissons un seul inhibiteur potentiel, le chlorate que nous allons tester.
Afin de répondre à une question posée dans le paragraphe II.1.2, nous allons essayer de démontrer l'effet inhibiteur de l'acétylène à 10% (v/v) sur la nitrification.
Selon les résultats, la N-serve, inhibiteur de la nitritation, sera à son tour testée.

III RESULTATS

DISCUSSION

III.1 EXPERIENCE EN MICROCOSME

III.1.1 EXPERIENCE M1

Dans cette expérience, nous allons tester l'effet du chlorate et de l'acétylène sur l'évolution des différentes molécules d'azote.
Le chlorate à 10 mM est annoncé inhibiteur de la nitratation par Belser et Mays (1980).

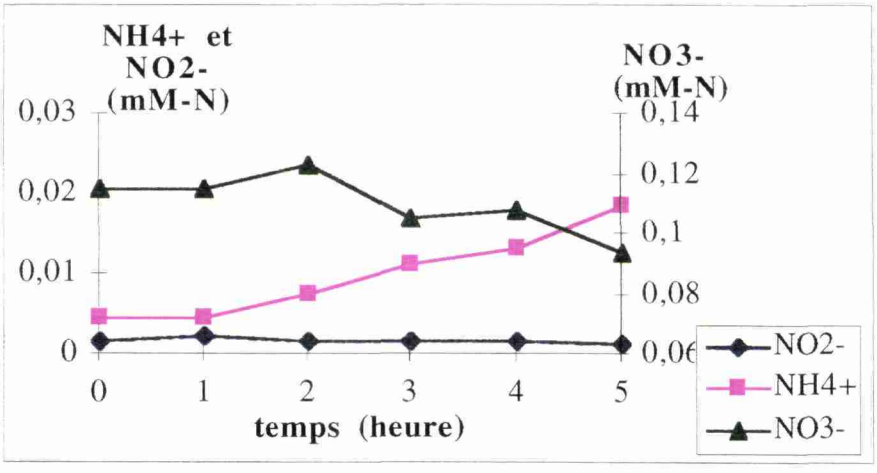
❄ Conditions expérimentales

Le taux d'oxygène dissous est maintenu à 8mg/l.
Au temps zéro, les dispositifs reçoivent :
- n°1 rien (témoin)
- n°2 du chlorate à 10mM (concentration finale)
- n°3 de l'acétylène à 10% (conc. fin.)
- n°4 du chlorate à 10mM et de l'acétylène à 10% (conc. fin.)

❄ Résultat, discussion

Rq : les résultats bruts de toutes les expériences peuvent être consultés en annexe 3.

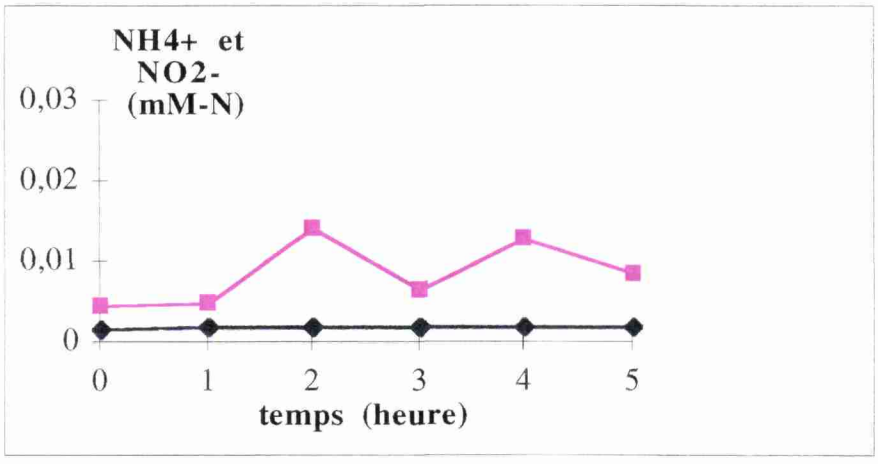
➢ Dispositif 1 (O_2)



Ce graphique nous montre l'évolution naturelle des différentes concentrations en ammonium, nitrite, nitrate dans la colonne d'eau, en absence de lumière.
La concentration en ammonium (de l'ordre de µM) augmente régulièrement jusqu'à la cinquième heure (elle est multipliée par 4).
La concentration en nitrite est trés faible et ne varie pratiquement pas au cours de l'expérience.

La concentration en nitrate (de l'ordre de mM) chute irrégulièrement au cours des cinq heures.
Le système eau-sédiment a donc tendance à consommer des nitrates et à relarguer des ions ammonium.

➢ Dispositif 2 (O_2+Chlorate)

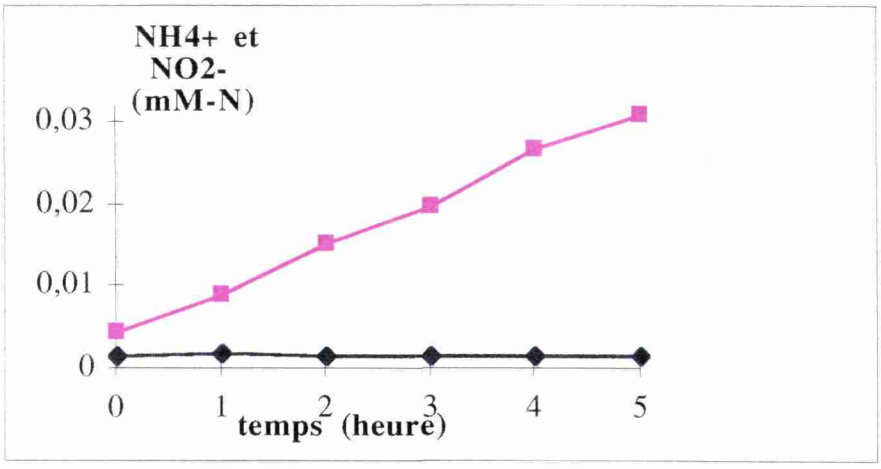


Dans les dispositifs contenant du chlorate l'évolution des nitrates ne peut être suivie car le chlorate perturbe la réaction chimique de révélation de leur dosage.
La concentration en ammonium évolue de façon très irrégulière. La concentration en nitrite ne varie pas alors que nous nous attendions à une accumulation de ceux-ci. Il semblerait que le chlorate n'ait pas d'effet inhibiteur sur l'oxydation des nitrites dans ces conditions.

➢ Dispositif 3 (O_2+ C_2H_2)

La perte de deux prélèvements n'a pas permis l'exploitation des données restantes.

➢ Dispositif 4 (O_2+Chlorate+C_2H_2)



Le taux de nitrite ne varie pas.
La concentration en ammonium augmente très régulièrement dès la première heure avec une vitesse supérieure à celle du témoin. Au bout de

cinq heures cette concentration est multipliée par 6,5. Ce résultat semble logique puisque le système contient deux inhibiteurs potentiel de la nitrification. Pourtant, n'ayant pû déterminer l'influence de ces inhiteurs isolés sur l'évolution de la concentration en ammonium, nous ne pouvons interpréter ce résultat.

❄ Conclusion

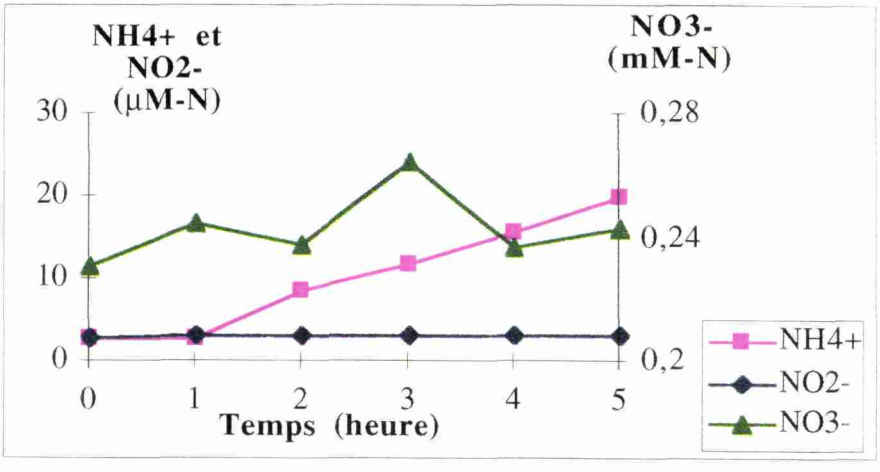
Le chlorate à 10mM dans la colonne d'eau parait ne pas avoir d'effet inhibiteur sur le processus d'oxydation des nitrites.
L'expérience devra être refaite.

III.1.2 EXPERIENCE M2

Cette expérience est réalisée de la même façon que la première.

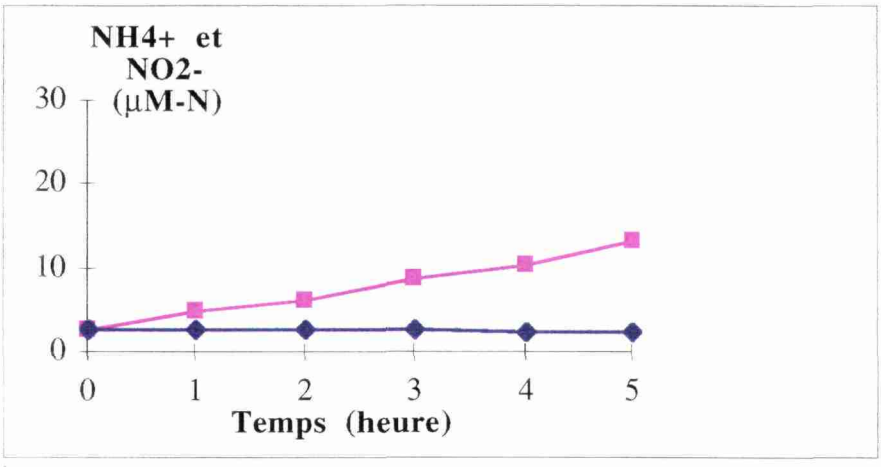
❄ Résultat, discussion

➢ Dispositif 1 (O_2)



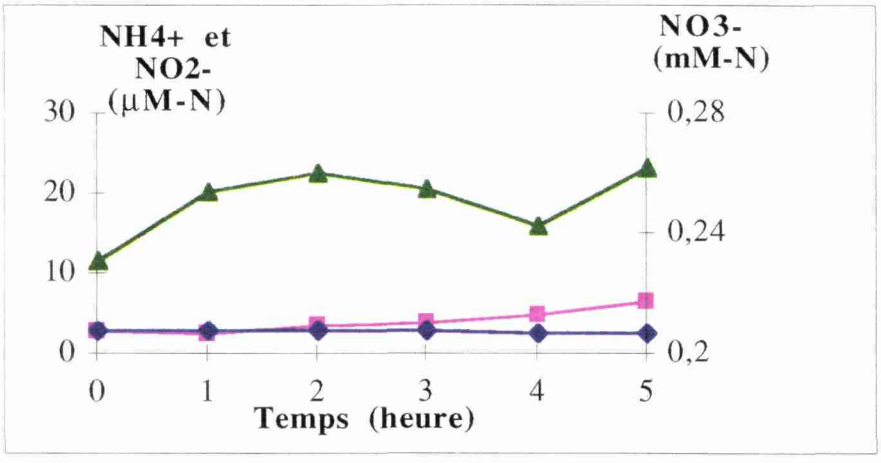
Les évolutions des concentrations en ammonium et nitrite sont identiques à celles observées dans la première expérience. La concentration en ammonium est multipliée par six en cinq heures. Par contre la concentration en nitrate croît puis décroît irrégulièrement dans le temps.

➢ Dispositif 2 (O_2+Chlorate)



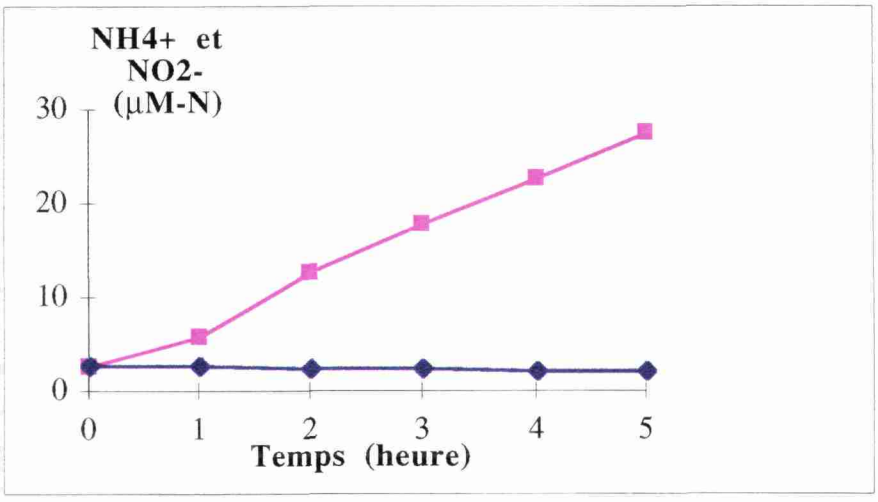
La concentration en nitrite n'est toujours pas affectée par la présence du chlorate. Nous pouvons dire que le chlorate à 10 mM n'inhibe pas le processus d'oxydation des nitritres. L'oxydation de l'ammonium ne parait pas non plus affectée par l'inhibiteur puisque l'accumulation est plus faible que dans le témoin.

➢ Dispositif 3 (O_2+ C_2H_2)



Les résultats obtenus ne sont pas ceux auxquels nous nous attendions. En effet l'acétylène est connu pour inhiber l'oxydation de l'ammonium à moins de 10% en volume. Nous pensions qu'il permettrait une accumulation en ammonium supérieure au témoin. Il n'en est rien, au contraire la concentration en ammonium double seulement alors qu'elle est multipliée par six dans le système témoin au cours des cinq heures.
La concentration en nitrate évolue toujours irrégulièrement.

➢ Dispositif 4 (O_2+Chlorate+C_2H_2)



Dans le cas où le chlorate aurait inhibé l'oxydation de nitrite, l'acétylène aurait dû permettre de masquer cette inhibition par celle de l'oxydation de l'ammonium. L'effet inhibiteur du chlorate étant remis en cause et l'acétylène ayant des cibles diverses, nous ne pouvons interpréter cette représentation graphique.

❄ Conclusion

Dans nos conditions expérimentales le chlorate n'inhibe pas, même partiellement, l'oxydation des nitrites ou l'oxydation de l'ammonium, à la concentration de 10mM annoncée comme suffisante. Par conséquent le chlorate ne sera plus utilisé dans les expériences.

L'effet inhibiteur de l'acétylène sur la première étape de la nitrification n'a pas pû être mis en évidence par les dosages d'ammonium. Au contraire, cette accumulation a été particulièrement faible par rapport au témoin d'où l'hypothèse suivante : la voie métabolique à l'origine de la production d'ammonium est coupée par l'acétylène. Cette voie est soit l'ammonification, soit la dissimilation réductrice des nitrates en ammonium. Par conséquent, la nitrification privée de subtrat est forcément affectée par la présence d'acétylène, et ce dès les premières heures de l'expérience.
Une confirmation expérimentale est nécessaire.

Dans les deux expériences précédentes, les dispositifs témoin présentent des évolutions en nitrite, nitrate et ammonium en accord avec celles enregistrées *in situ* par Ferrer (1995).
Ne possédant pas d'inhibiteur spécifique de l'oxydation des nitrites, nous ne pouvons pas faire de bilans moléculaires sur ceux-ci.
L'accumulation d'ammonium au cours du temps est dans chaque témoin régulière de la deuxième à la cinquième heure. L'inhibition de la première étape de la nitrification devrait permettre une augmentation décelable de la vitesse d'apparition des ions ammonium.

L'évolution de la concentration en nitrate est systématiquement irrégulière dans les témoins. Néanmoins, l'inhibition de la nitritation permettra peut-être de noter une disparition de nitrate.
La N-serve, inhibiteur qui serait spécifique de l'oxydation de l'ammonium mérite d'être testée.

III.1.3 EXPERIENCE M3

La N-serve est utilisée à 0,5 mg/l tel que le préconise le protocole de Ferrer (1995) d'aprés les travaux de Powell et Prosser (1986).
L'acétylène est à nouveau utilisé afin de confirmer les résultats précédents.

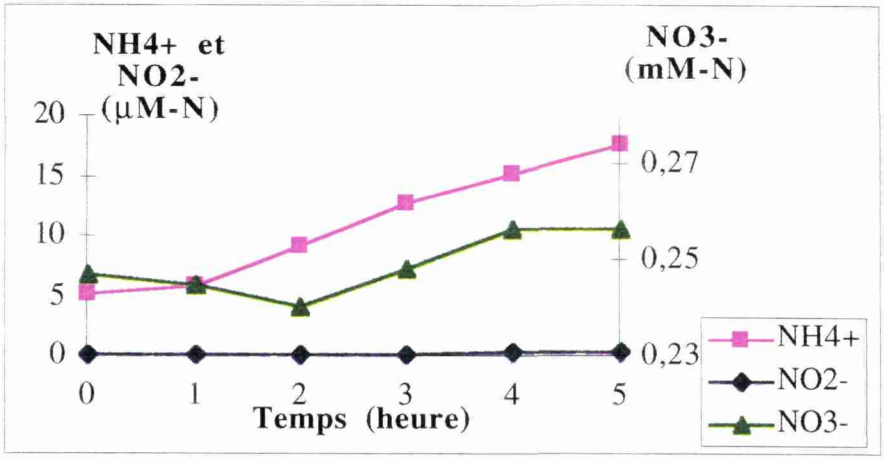
❄ Conditions expérimentales

Le taux d'oxygène dissous est de 7,5 mg/l.
Au temps zéro, les dispositifs reçoivent:
- n°1 rien
- n°2 N-serve à 0,5 mg/l (conc. fin.)
- n°3 C_2H_2 à 10% en volume (conc. fin.)
- n°4 N-serve à 0,5 mg/l et C_2H_2 à 10% en volume (conc. fin.)

Rq : la préparation de la solution de N-serve est rapportée en annexe 4.

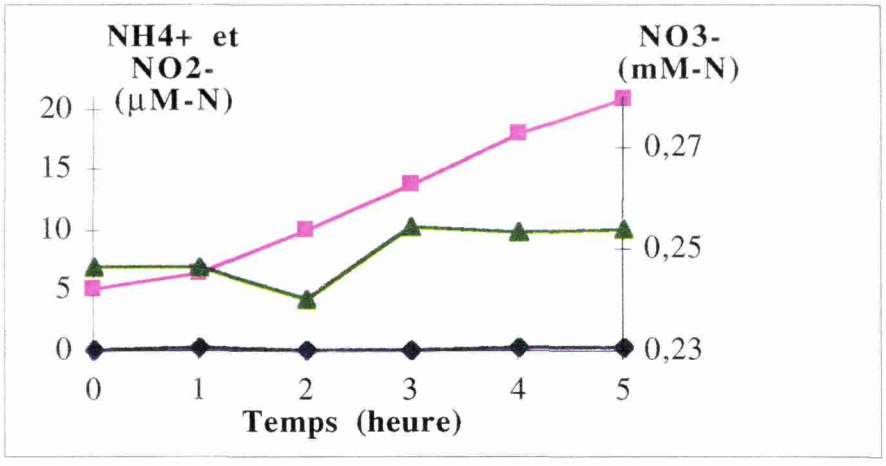
❄ Résultats, discussion

➢ Dispositif 1 (O2)



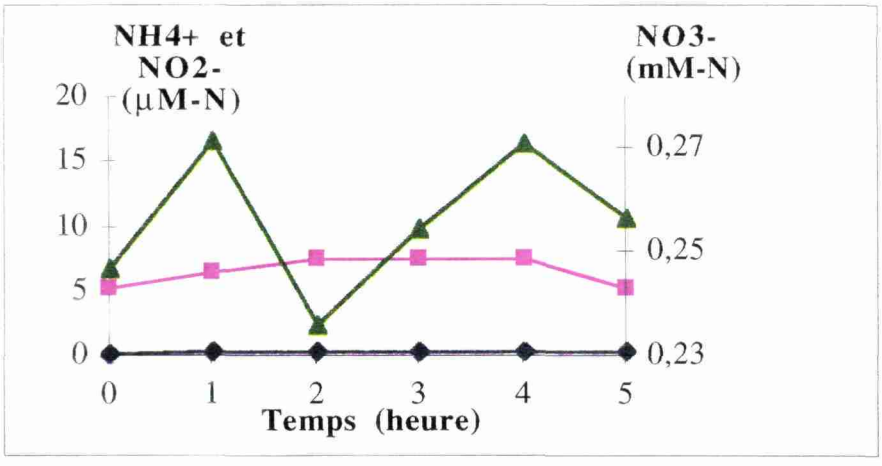
Les évolutions des concentrations en nitrite et ammonium sont identiques à celles observées dans les deux premières expériences. Ici la concentration en $NH4^+$ passe de 5,3 à 17,7 µM. La concentration en nitrate décroît pendant les deux premières heures puis croît pendant les deux suivantes.

➢ Dispositif 2 (O2 + N-serve)



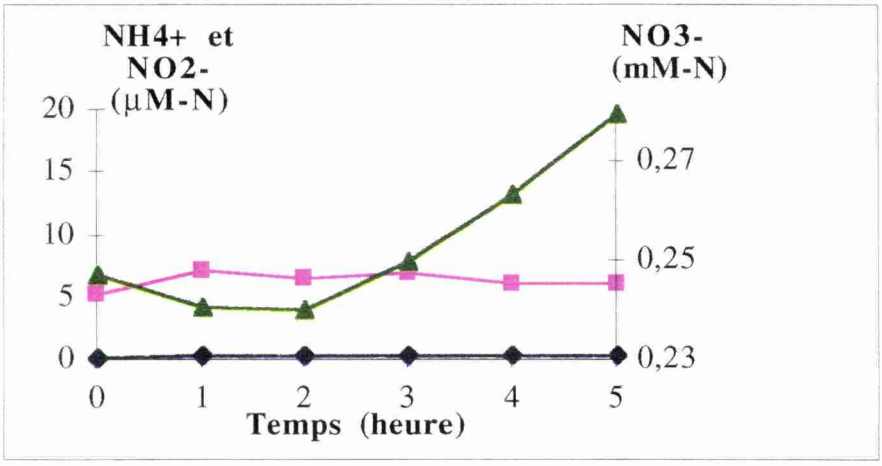
L'évolution de la concentration en nitrate est identique à celle du témoin.
La concentration en ammonium augmente régulièrement de 5,3 à 21,0 µM en cinq heures. Nous obtenons ici les résultats attendus, à savoir que la N-serve permet une accumulation en ammonium supérieure à celle du témoin.

➢ Dispositif 3 (O_2 + C_2H_2)



Bien que souvent irrégulière, l'évolution de la concentration en nitrate dans ce cas doit être entachée d'erreurs liées au dosage. Nous avons ici la confirmation que l'acétylène inhibe la production d'ammonium.

➢ Dispositif 4 (O_2 + N-serve + C_2H_2)



Entre ces deux inhibiteurs l'acétylène est celui qui conditionne l'évolution de l'ammonium. Ceci est normal puisqu'il agit sur un processus métabolique en amont de l'oxydation de l'ammonium inhibé par la N-serve. Nous ne pouvons expliquer l'accumulation des nitrates.

❄ Conclusion

L'hypothèse émise sur l'effet de l'acétylène est confirmée. Dans nos échantillons la nitrification est inhibée indirectement par l'acétylène à 10% (V/V) qui bloque la production d'ammonium.
Donc, dans le protocole de Ferrer (1995), le dispositif avec acétylène dans lequel la nitrification est sensée se dérouler, ne permet pas de mesurer l'apparition normale des nitrates par ce processus. Ce protocole de mesure de la nitrification n'est donc pas acceptable.
Cet effet indésiré de l'acétylène sur la production naturelle d'ammonium nous incite à ne pas l'utiliser comme inhibiteur de la nitrification dans les expériences suivantes. En effet, nous ne connaissons pas son action sur l'ensemble des processus de transformation des molécules azotées, ni les conditions dans lesquelles ces effets sont significatifs.
L'évolution de la concentration en nitrate en présence de N-serve n'apporte pas de renseignement intéressant.

La N-serve à 0,5mg/l a l'effet inhibiteur attendu sur la nitrification.

III.2 EXPERIENCE *IN SITU*

III.2.1 EXPERIENCE IS 1

(Réalisée sur la commune de Sainte Foix La Grande, rivière Dordogne)

L'accumulation différentielle des ions ammonium entre un milieu témoin et un milieu contenant un inhibiteur de l'oxydation de l'ammonium devrait nous permettre de calculer la vitesse de nitrification. Afin de constater la variabilité des résultats obtenus dans des systèmes incubés de façon identique, chacune des incubations sera réalisée en double.

❄ Conditions expérimentales

Le taux d'oxygène dans l'eau est de 7mg/l.
Au temps zéro, les dispositifs reçoivent :
- n°1 : rien
- n°2 : rien
- n°3 : N-serve à 0,5 mg/l (conc. fin.)
- n°4 : N-serve à 0,5 mg/l (conc. fin.)

❄ Résultat, discussion

Les concentrations en nitrite, nitrate et ammonium ne varient pratiquement pas dans les quatre échantillons. Le site de la rivière que nous avions choisi pour faire l'expérience serait la cause. Du fait du niveau élevé de la rivière, nous avons réalisé l'expérience sur un fond recouvert de plusieurs couches de galets. Ainsi, l'étanchéité des clohes n'a peu être établie. Le sous écoulement important dans ce type de sédiment, a certainement alimenté en eau les quatre dispositifs, tout le temps de l'expérience.

❄ Conclusion

Ces dispositifs ne permettent pas de travailler dans le cas où le lit de la rivière est composé de plusieurs couches de galet.
Il est ennuyeux de devoir exclure certains sites à cause de leur granulométrie car cela limite les possibilités d'étude.
D'autant plus que les galets permettent un développement important de biofilm, qui est une structure composée de bactéries nitrifiantes.
L'expérience telle qu'elle était prévue ici doit être renouvelée.

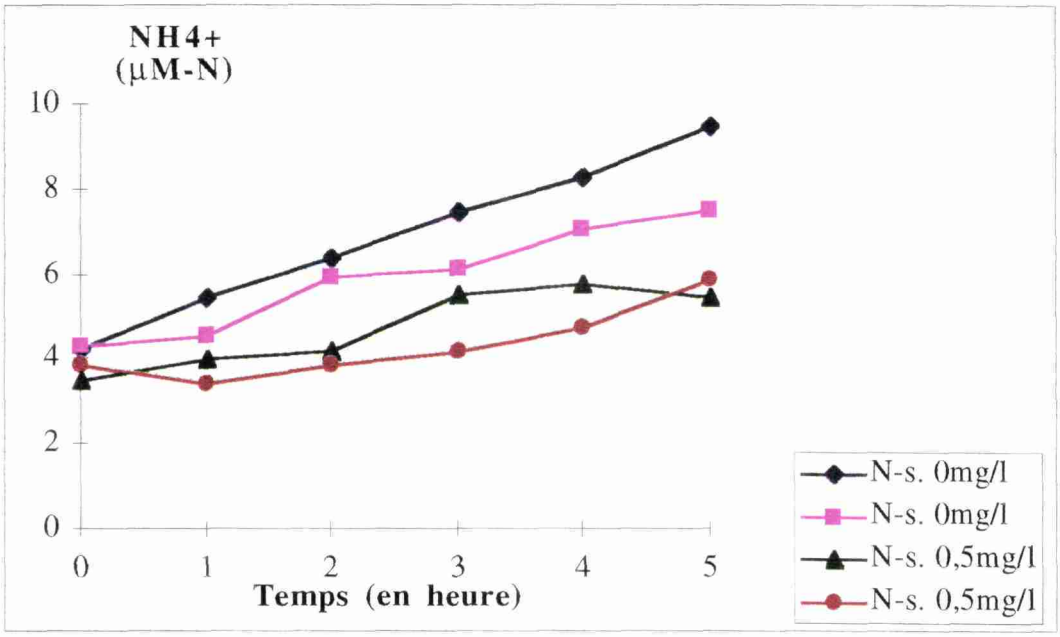
III.2.2 EXPERIENCE IS 2

(Réalisée sur la commune du Fleix, rivière Dordogne)

Les conditions expérimentales sont décrites dans l'expérience IS 1.

❄ Résultat, discussion

Evolutions des concentrations en ammonium dans les quatre dispositifs.



Nous pouvons constater une accumulation d'ammonium supérieure dans les deux dispositifs témoin par rapport à ceux additionnés d'inhibiteur. Ce résultat est l'inverse de celui attendu.
De plus, l'accumulation au bout des cinq heures dans les deux milieux sans inhibiteur varie de 37%.

❄ Conclusion

La concentration en N-serve de 0,5 mg/l est probablement trop faible pour inhiber l'oxydation de l'ammonium.
Ceci remet en question l'interprétation faite dans l'expérience M3.
De plus, les portions de sédiment isolées et incubées dans les même conditions engendrent des évolutions en ions ammonium d'amplitude variable. L'hétérogènéité dans la composition d'un lit de la rivière, même pour des zones très proche est l'explication.
Dans certains cas, l'effet d'un inhibiteur de nitrification est déterminé par comparaison de lots d'échantillons essais et témoins. Le problème engendré par l'hétérogénéité du sédiment est alors supprimé par la réalisation d'un grand nombre de réplicat. Disposant de seulement quatre dispositifs expérimentaux, nous ne pouvons pas réaliser les réplicats indispensables.
Nous devons donc changer la façon de procéder.

III.2.3 EXPERIENCE IS 3

(Réalisée sur la commune du Fleix, rivière Dordogne)

Pour pallier le problème révélé par l'expérience IS 2, le protocole est modifié. Dans la méthode de mesure de la nitrification établie par Sloth (1992) l'inhibiteur est introduit à mi-temps de l'incubation.
Ainsi, deux modifications sont apportées au protocole d'origine :

- ➤ l'inhibiteur est introduit en milieu d'expérience
- ➤ les prélèvement sont réalisés chaque demi-heure

Dans ce cas la différence d'accumulation de NH_4^+ avant et aprés l'introduction de l'inhibiteur dans un même échantillon permettra le calcul du taux de nitrification.
Plusieurs concentrations en N-serve sont testées. En effet, certains auteurs ont démontré que le processus de nitrification était inhibé par la N-serve à 10mg/l, 0,1mg/l étant une concentration insuffisante (Roy et Knowles, 1995).

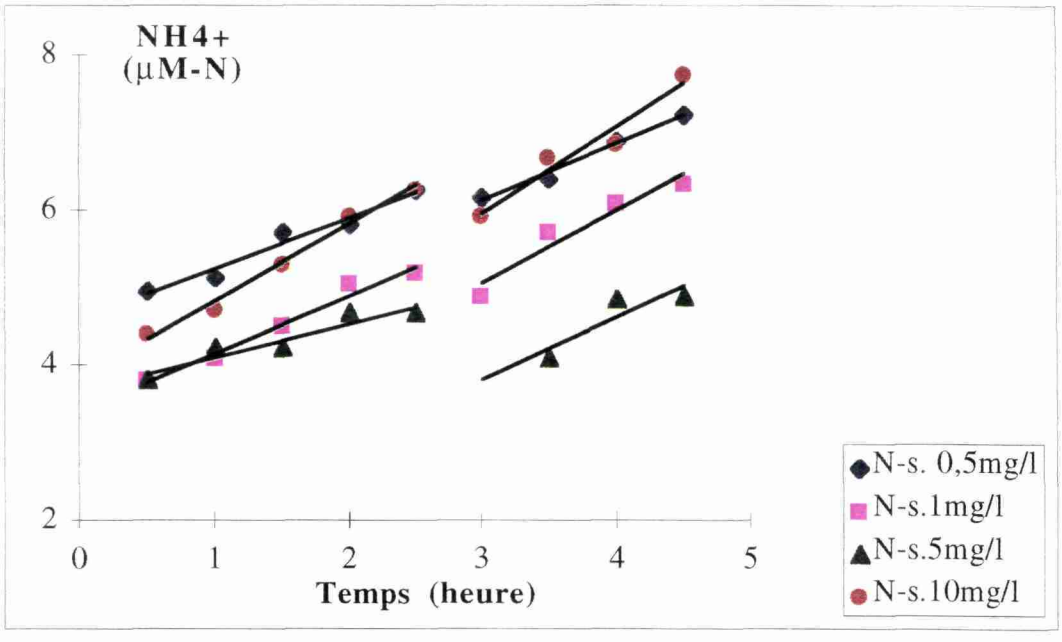
❄ Conditions expérimentales

Le taux d'oxygène dissous est de 8mg/l.
Au bout de 2,5h les dispositifs reçoivent :

- n°1 N-serve (N-s.)0,5 mg/l (conc. fin.)
- n°2 N-serve 1 mg/l (conc. fin.)
- n°3 N-serve 5 mg/l (conc. fin.)
- n°4 N-serve 10 mg/l (conc. fin.)

❄ Résultat et discussion

Evolutions des concentrations en ammonium dans les quatre dispositifs.



Les courbes de ce graphique ont des allures qui mettent en évidence la nitrification et permettent sa quantification.

En effet, nous constatons une production d'ammonium à vitesse constante pendant les 2,5 premières heures. L'introduction de l'inhibiteur est suivi par une chute de la concentration de l'ion. L'activité de bactéries hétérotrophes favorisée par l'ajout de substrat organique, l'alcool solvant de la N-serve, peut expliquer cette diminution. Effectivement, une croissance bactérienne engendre une consommation d'ions.
Puis l'accumulation reprend avec une amplitude supérieure à la première partie de la courbe.

❄ Calcul de la vitesse de nitrification

Chaque courbe est composée de deux phases correspondant aux incubations en absence puis en présence d'inhibiteur. Pour chaque phase, la vitesse d'accumulation de l'ammonium est donnée par la pente de la droite de régression linéaire.
La vitesse d'oxydation de l'ammonium est calculée par différence entre les vitesses d'accumulation de la phase 2 et 1.
L'oxydation de l'ammonium étant le facteur limitant de la nitrification, nous pouvons admettre que la majeure partie des ions nitrite produits est oxydée par la deuxième étape de la nitrification.
Ainsi, Henriksen (1980) et Sloth (1992) considèrent que la vitesse de la nitritation est égale à la vitesse de nitrification.
Cependant, nous ne connaissons pas exactement la part des ions nitrite qui est prise en charge dans les processus de dénitrification, d'assimilation ou de dissimilation réductrice.
Par conséquent, nous assimilons la vitesse d'oxydation des ions ammonium à une vitesse potentielle de nitrification qui est une surestimation de la vitesse réelle de ce processus.

Tableau 1 : évolution des concentrations en ammonium et calcul de la vitesse de nitrification.

Conc. finale N-ser. (x) mg/l	Acc.NH4+ phase1 (µM/h)	Acc.NH4+ phase2 (µM/h)	Diff. Acc. NH4+ (µM/h)	Vitesse oxydation de NH_4^+ (µmol N-NH_4^+/m2/h) *
syst.1 (0,5)	0,66	0,73	0,07	20
syst.2 (1)	0,74	0,94	0,19	57
syst.3 (5)	0,43	0,80	0,37	108
syst.4 (10)	1,00	1,13	0,14	41
				Vitesse potentielle de nitrification (µmol N-NO_3^- /m2/h)

Calcul voir annexe 5.
* dans certains systèmes l'inhibiteur provoque peut-être une inhibition partielle de l'oxydation de l'ammonium. Alors la quantification de ce processus serait sous évaluée.

❄ Conclusion

La vitesse potentielle maximale de nitrification est obtenue pour une concentration en N-serve de 5 mg/l. Une seule expérience ne permet pas de conclure que cette concentration est optimale.
Néanmoins, Roy et Knowles (1995) rapporte que la concentration de 10mg/l est efficace.
La concentration de 5mg/l paraissant suffisante est donc retenue.
En fait, quel que soit l'inhibiteur, la concentration optimale de celui-ci ne peut être déterminée dans de tels systèmes, puisque la composition du sédiment est hétérogène. Par contre, il est envisageable de réaliser cette détermination au laboratoire, dans des récipients de grand volume (bécher de 3 litres) contenant du sédiment homogénéisé.

III.2.4 EXPERIENCE IS 4

(Réalisée sur la commune du Fleix, rivière Dordogne)

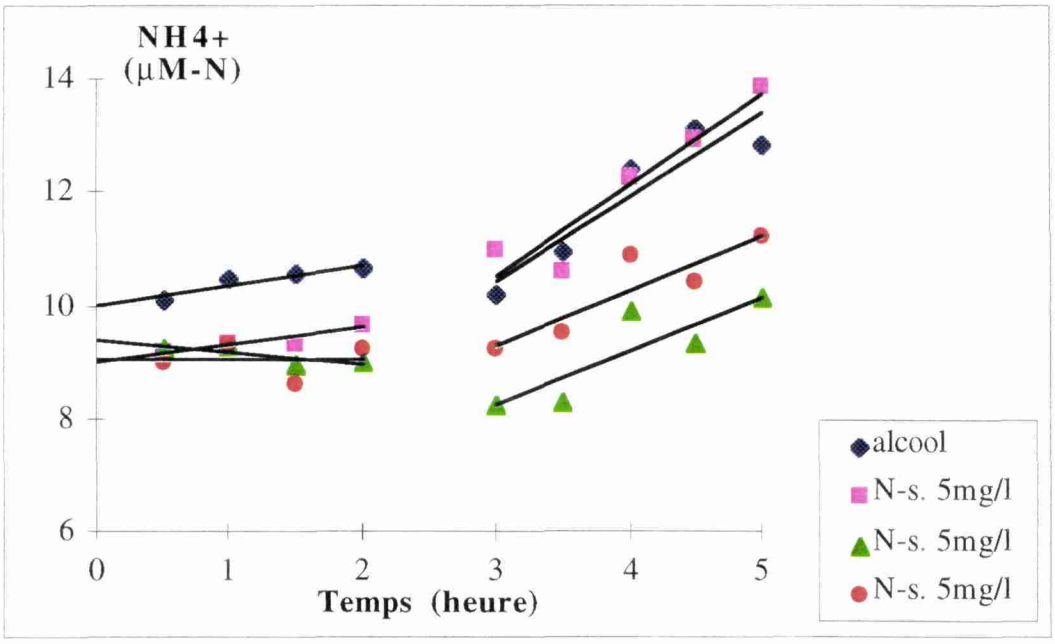
Nous désirons constater la variabilité de la nitrification dans trois échantillons rapprochés sur un site et vérifier que l'alcool n'a pas d'influence sur ce processus.
Rq : cette expérience est la dernière réalisée

❄ Conditions expérimentales

La concentration en oxygène est maintenue à 6,5mg/l.
Au bout de deux heures, les dispositifs reçoivent 5ml d'alcool pur ou contenant la N-serve à 20 mg/l:
- n°1 : N-s. 0 mg/l (témoin avec alcool)
- n°2 : N-s. 5mg/l (conc. fin.)
- n°3 : N-s 5mg/l (conc. fin.)
- n°4 : N-s 5mg/l (conc. fin.)

❄ Résultat, discussion

Evolutions des concentrations en ammonium dans les quatre dispositifs.



Les différences d'évolution de la concentration en ammonium entre les deux phases sont très marquées dans chacun des systèmes.

❄ Calcul de vitesse de nitrification

Tableau 2 : évolution des concentrations en ammonium et calcul de la vitesse de nitrification.

N-ser. conc.fin. (x) mg/l d'eau	Evolution NH4+ phase 1 (µM/h)	Acc. NH4+ phase 2 (µM/h)	Diff. phase 1 et 2 Acc. NH4+ (µM/h)	Vitesse oxydation de NH_4^+ (µmol N-NH_4^+/m2/h)
syst.1 (0)	0,35	1,49	1,13	335
syst.2 (5)	0,31	1,61	1,30	386
syst.3 (5)	-0,21	0,96	1,17	345
syst.4 (5)	-0,01	0,98	1,00	294
				Vitesse potentielle de nitrification (µmol N-NO_3^- /m2/h)

❄ Conclusion

Les résultats obtenus dans les trois milieux contenant l'inhibiteur sont homogènes. La valeur moyenne des vitesses potentielles de nitrification déterminées ici est de 342 µmol N-NO_3^-/m^2/h. Par contre le résultat du témoin est surprenant. En effet, la vitesse potentielle de nitrification déterminée est de 335 µmol N-NO_3^-/m^2/h alors qu'une valeur proche de zéro était attendue.

L'effet de l'éthanol sur certains métabolismes bactériens doit être soupçonné. L'effet inhibiteur du méthanol sur la nitrification est connu mais nous n'avons pas de renseignement sur l'action de l'éthanol qui est le solvant utilisé ici.
Cette expérience demande confirmation.

III.2.5 AUTRES EXPERIENCES

Deux autres expériences (non détaillées ici) réalisées sur le commune du Fleix montrent des résultats surprenants. Les concentrations initiales en ammonium dans les quatre dispositifs varient du simple au double. De plus, les évolutions des concentrations en ammonium sont complètement anarchiques, croissant puis décroissant au cours des cinq heures.
La proximité d'un rejet de cave coopérative en amont dans la rivière est l'explication la plus logique avancée. Nos mesures sont réalisées à partir d'une eau de composition chimique et bactériologique différente de l'eau de la rivière.

Par ailleurs, sur le site du Fleix, nous avons observé de rapides diminutions du niveau de la rivière, jusqu'à 0,5 m en cinq heures, dûes à la régulation du débit du barrage de Bergerac en amont. Si les cloches benthiques sont découvertes, elles peuvent se vider d'une partie de leur contenu, compromettant ainsi l'expérience.

III.3 CONCLUSION DE CES EXPERIENCES

Nous nous sommes rendu compte lors de l'expérience IS 1, que nous ne pouvions pas faire de comparaisons entre les résultats obtenus dans des échantillons incubés différemment, les portions de sédiment isolées n'étant pas identiques.
La solution est d'incuber successivement un même échantillons dans les conditions pour lesquelles la comparaison doit être établie.
Par contre, dans les aquariums, le sédiment débarrassé des éléments volumineux (cailloux, bois, ...) est homogénéisé quelques jours avant chaque expérience. Nous admettons alors que les portions de sédiment isolées par les dispositifs sont proches dans leur composition.
Ceci nous permet de prendre en compte certains résultats obtenus dans les expérimentations en microcosme.

Nous disposons de quatre arguments nous permettant d'affirmer que le protocole de mesure de la nitrification de Ferrer (1995) n'est pas acceptable :

➔ la mesure de l'évolution de la concentration en nitrate dans son dispositif 1 est assimilée à la part de nitrate produite par nitrification et transferrée dans la colonne d'eau. Cette hypothèse sous entend que le flux de nitrate est unidirectionnel du sédiment vers la colonne d'eau. En fait, la variation de cette concentration dans la colonne d'eau est le résultat de

l'intervention de nombreux processus (échange eau-sédiment, nitrification, assimilation, dissimilation, dénitrification). Cette hypothèse n'est donc pas valable.

➛ son dispositif 2 dans lequel est introduit l'acétylène est sensé permettre la détection des nitrates présents dans le milieu et apparus par nitrification. Nous avons mis en évidence l'effet inhibiteur de l'acétylène à 10% (V/V) sur la production d'ammonium au sein du sédiment. Ainsi, la nitrification est inhibée au moins indirectement par l'acétylène car privée de substrat.

➛ la concentration de N-serve utilisée, 0,5 mg/l, est insuffisante pour inhiber la nitrification au sein du sédiment .

➛ les différences quantitatives dans les processus métaboliques de portions voisines de sédiment n'ont pas été prises en compte dans la réalisation expérimentale.

Nous pouvons faire les remarques suivantes sur les inhibiteurs utilisés lors de nos expérimentations.

Nous n'avons pas constaté les effets inhibiteurs du chlorate. Celui-ci aurait dû nous permettre le blocage de la deuxième étape de la nitrification voire de la première (paragraphe I.2.1.4.E).

L'effet de l'acétylène est testé dans la phase expérimentale utilisant les microcosmes. Les résultats très marqués obtenus dans ce cas permettent de conserver l'hypothèse faite à son sujet : l'acétylène à 10%(v/v) inhibe le processus de production de l'ammonium.
L'effet inhibiteur de ce composé sur la première étape de la nitrification aurait dû être mis en évidence grâce à l'accumulation de l'ammonium. Cette démonstration n'a donc pas été réalisable.
Par conséquent, l'utilisation de l'acétylène en tant qu'inhibiteur de la nitrification, ne pourra être envisagée qu'aprés vérification des doses inhibitrices du processus de production de l'ammonium et de la nitrification.

Bien que la N-serve soit un inhibiteur reconnu de la nitrification (paragraphe I.2.1.4.B). nous n'avons pas clairement mis en évidence cet effet dans nos expériences. La solution de N-serve (N-serve étant dissous dans l'éthanol) introduite dans les milieux afin d'obtenir une concentration 5 mg/l parvient effectivement à inhiber l'oxydation de l'ammonium. Cependant le même résultat est obtenu en ajoutant le même volume d'éthanol pur. Cette démonstration est faite dans la dernière expérience réalisée et n'a donc pas été confirmée par répétition de l'expérience. Nous n'avons pas d'hypothèse à avancer pour expliquer une telle réaction dans le sédiment.
L'étude de la N-serve en tant qu'inhibiteur de la nitrification dans une telle méthode n'a pas donc été achevée, faute de temps.

Les résultats des expériences reposant sur l'accumulation différentielle des ions ammonium dans un même échantillon, incubé en absence puis en présence d'inhibiteur de la nitrification, sont satisfaisant.

Il nous démontrent que notre appareillage est compatible avec le principe de détermination sélectionné.
Le tableau suivant nous permet uniquement de constater que nos résultats ont le même ordre de grandeur que ceux observés dans ces autres études.

Tableau 3 : valeurs de mesure de la nitrification dans différentes études

Auteur	Origine du sédiment	Traitement des échantillons	Vitesse de nitrification
Sloth (1992)	Kysing Fjord	au laboratoire comparaison de carottes de sédiment incubées en présence ou absence d'acétylène	17 à 33 µmol $NO_3^-/m^2/h$
Ferrer (1995)	rivière Dordogne	*in situ* comparaison de portions de sédiment sans inhibiteur, additionnées de C_2H_2 et additionnées de C_2H_2 et N-serve	mesure juin 274 µmol $NO_3^-/m^2/h$ mesure août 109 µmol $NO_3^-/m^2/h$
Notre étude	rivière Dordogne	*in situ* comparaison d'une même portion de sédiment incubée sans inhibiteur puis avec la N-serve	mesure juin 108 µmol $N\text{-}NO_3^-/m^2/h$ mes. juillet 342 µmol $N\text{-}NO_3^-/m^2/h$

IV SYNTHESE

Le but de notre étude étant de mettre au point une méthode de mesure *in situ* de la nitrification dans le sédiment, nous avons réalisé certaines vérifications expérimentales du protocole de Ferrer (1995) et nous avons analysé des méthodes exposées dans la littérature.
Ceci nous a permis de sélectionner un principe de méthode adapté à notre appareillage.
Ce principe consiste à quantifier au cours du temps les ions ammonium qui ne sont pas transformés lorsque le processus de nitrification est inhibé.
Cette mesure est réalisée par comparaison de l'accumulation des ions ammonium dans des échantillons de sédiment incubés en absence puis en présence d'inhibiteur.
Les expériences ont révélé un point essentiel du protocole : les incubations permettant d'enregistrer l'accumulation différentielle des ions ammonium doivent être faites sur une même portion de sédiment.

Parmi les inhibiteurs utilisés, la N-serve est celui qui a donné les résultats les plus satisfaisants.
Pourtant, à cause de l'effet potentiel de l'alcool sur la nitrification, nous ne pouvons pas affirmer que cette inhibiteur soit le plus adapté.
A l'issu de ce travail, nous proposons donc une méthode de mesure *in situ* de la nitrification en enceinte benthique dans laquelle l'inhibiteur utilisé, la N-serve, n'est peut-être pas d'une totale efficacité.

Notre méthode permet de calculer la vitesse d'oxydation de l'ammonium, qui est assimilée à une vitesse potentielle nitrification.

Par conséquent, une étude complémentaire devrait comporter deux axes d'orientation :

➛ quel est l'effet de l'éthanol sur la nitrification ? Et éventuellement, quel solvant de la N-serve convient le mieux ?

➛ peut-on vraiment assimiler la vitesse d'oxydation de l'ammonium à une vitesse de nitrification ?

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Anthoninsen A.C., Loehr R.C., Prakasam T.B.S. and Srinath E.G 1976 - Inhibition of nitrification by ammonia and nitrous acid. *Journal Watter Pollution.* Control Fed 48 (835-852)

Bédard C. and Knowles R. 1989 -Physiology, biochemistry, and specific inhibitors of CH_4, NH_4^+ andCO oxidation by methanotrophs and nitrifiers. *Microbiol. Rev.* 53 (68-84)

Belser L.W. and Mays L. 1980 -Specific inhibiton of nitrite oxidation by chlorate and its use in assessing nitrification in soils and sediments. *Appl. Env. Micro.* 39 (505-510)

Billen G. 1976 -Evaluation of nitrifying activity in sediments by dark ^{14}C-bicarbonate incorporation. *Water Research* 10 (51-57)

Brounsky V.M. and Nixon S.W. 1990 -Temperature and the annual cycle of nitrification in waters of Narragansett Bay. *Limmol. Oceanog.* 35 (1610-1617)

Campbell N.E.R. and Aleem M.I.H 1965 -The effect of 2-chloro 6-(trichloromethyl) pyridine on the chemoautotrophic metabolism of nitrifying bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoeck* 31 (124-136)

Feliatria F. and Bianchi M. 1993 -Rates of nitrification and carbon uptake in the Rhône river plume. *Microb. Eco.* 26 (21-28)

Ferrer S. 1995 -Mise en place d'un protocole expérimental pour l'estimation du taux de nitrification en eau courante. *Rapport de D.E.S.S. Université de Bordeaux II* (91 pages)

Goring C.A.I. 1962 -Control of nitrification by of 2-chloro 6-(trichloromethyl) pyridine . *Soil Sci.* 93 (211-218)

Hall G.H. and Jeffries C. 1984 -The contribution of nitrification in the water column and profundal sediments to the total oxygen deficit of the hypolimnion of a mesotrophic lake. *Microb. Eco.* 10 (37-46)

Henriksen K. 1980 -Measurement of in situ rates of nitrification in sediment. *Microb. Eco.* 6 (329-337)

Hooper A.B. and Terry K.R. 1974 -Specific inhibitors of ammonia oxidation in Nitrosomonas. *Journal of Bacteriology* 115 (480-485)

Hooper A.B. 1978 -Nitrogen oxidation and electron transport in ammonia oxidizing bacteria. *In Microbiology Letters* (229-304)

Hooper A.B. and Terry 1974 -Photoinactivation of ammonia oxidation in Nitrosomonas. *J. Bacteriol.* 119 (899-906)

Hynes R.K. and Knowles R. 1983 -Inhibition of chemoautotrophic nitrification by chlorate and sodium chlorite : a reexamination. *App. and Env. Microb.* Vol 45 n°4 (1178-1182)

Jansson S.L. and Persson J. 1982 -Mineralization and immobilisation of soil nitrogen. *In F.J. Stevenson (ED)* (229-252)

Jorgernsen K.S. 1989 -Annual pattern of denitrification and nitrate ammonification in estuarine sediment. *App. Env. Micro.* 55 (1841-1847)

Kemp A.L. and Mudrochova A. 1972 -Distribution and fotms in a lake Ontario sediment core. *Limmol. Oceanogr.* 17 (855-867)

Kiff R.J. 1972 -The ecology of nitrification/denitrification systems in actived sludge. *Water Pollut.* Control 71 (475-484)

Lees H. and Simpson R. 1957 -The biochemistry of the nitrifying organisms. Nitrite oxidation by Nitrobacter. *Biochemistry J.* 65 (297-305)

Miller M.G., Coutlakis M.D., Oremland R.S. and Ward B.B. 1993 -Selective inhibition of ammonium oxidation and nitrification linked N2O formation by methyl fluorid and dimethyl ether. *Applied and Environmental Microbiology* 59 (2457-2464)

Nishio T., Koike I. and Hattori A. 1983 -Estimates of denitrification in coastal and estuarine sediments. *App. and Env. Micro.* fev. (444-450)

Painter H.A. 1970 -A review of literature on inorganic nitrogen metabolism in microorganisms. *Water Res.* 4 (393-450)

Powell S.J.and Prosser J.I. oct.1986 -Inhibition of ammonia oxidation by nitrapyrin in soiland liquid culture. *App. and Env. micro.* (782-787)

Reddy K.R, Patreick W.H. and Linedau C.W. 1989 -Nitrification-denitrification at the plant root-sediment interface in wetlands. *Limmology Oceanography* 34(6) (1004-1013)

Rysgard S., Christensen P.B. and Nielsen L.P. 1995 -Seasonal variation in nitrification and in estuarine sediment colonized by benthic microalgae and bioturbing infauna. *Marine Ecology Progress Series* 126 (111-121)

Shah D.B. and Coulman G.A. 1978 -Kinetic of nitrification and denitrification reactions. *Biotech. Bioeng.* 20 (897-925)

Sloth N.P., Nielsen L.P. and Blackburn T.H. 1992 -Nitrification in sediment cores measured with acetylene inhibition. *Limm. Ocean.* 37(5) (1108-1112)

Torre M., Rebillard J.P., Ayphassorho H., Labroue L. et Helmer C. 1992 -Etude expérimentale de la dénitrification à la rivière Charente. *Annls Limmol.* 28-3 (263-271)

Van Niel E.W.J., Arts P.A.M., Wesselink B.J., Robertson L.A. and Kuenen J.G. 1992 -Competition between heterotrophic and autotrophic nitrifiers for ammonia in chemostat cultures. *FEMS Microbiology Ecology* 102 (109-118)

ANNEXES

Oxygène

ANNEXE 1

MERCK

Méthode: par titrage selon Winkler

Prod. n° 11 107 Coffret de réactifs avec pipette de titrage graduée (graduation: 0,1 mg/l) pour environ 100 déterminations

Prod. n° 11 152 Emballage de rechange avec réactifs

Généralités

Sans oxygène, aucune vie biologique normale ne peut se développer dans les eaux naturelles. Des eaux provenant de nappes favorables à la vie, des eaux souterraines et des eaux de surface polluées par des eaux résiduaires présentent un déficit plus ou moins élevé en oxygène. Par déficit en oxygène, on entend la quantité d'oxygène manquante correspondant à la différence entre la teneur en oxygène effectivement déterminée et la valeur de saturation théorique en oxygène qui correspond à la température de l'eau au moment de la prise de l'échantillon. Les valeurs théoriques de saturation en oxygène peuvent être prises dans le tableau à la fin de cette notice.

Les eaux potables et les eaux industrielles devraient contenir au moins 2 mg/l d'oxygène pour assurer la formation d'une couche de protection suffisante sur la paroi des canalisations. L'eau d'alimentation des chaudières ne doit pratiquement pas contenir d'oxygène.

L'oxygène dissous dans l'eau peut être dosé rapidement et simplement au moyen du coffret Aquamerck® pour le dosage de l'oxygène. Le coffret convient à l'application d'une méthode sur le terrain d'une précision suffisante pour le contrôle d'eaux souterraines et de surface, d'eaux potables, d'eaux industrielles et d'eaux d'aquarium.

Méthode de dosage

On utilise la méthode de Winkler.

Les ions manganèse(II) sont oxydés en solution alcaline par l'oxygène dissous pour former des hydroxydes de manganèse de valence supérieure.

En milieu fortement acide, il se forme des ions manganese(III).

Des ions manganèse(III) oxydent les ions iodure en iode élémentaire. Dans ce cas, une quantité d'iode équivalente à l'oxygène dissous est libérée, cet iode étant titré par le thiosulfate de sodium:

$$2\,Mn^{3+} + 2\,I^- \longrightarrow 2\,Mn^{2+} + I_2$$

$$I_2 + 2\,S_2O_3^{2-} \longrightarrow 2\,I^- + S_4O_6^{2-}$$

Mode d'emploi

1. Rincer le flacon en verre, dans lequel se trouvent quatre billes en verre, plusieurs fois avec l'eau à examiner et le remplir, jusqu'à débordement.
2. Ajouter successivement **cinq gouttes de Réactif 1 et cinq gouttes de Réactif 2.** Fermer le flacon avec le bouchon en verre biseauté, bien agiter et laisser reposer pendant **une minute** à l'état fermé.
3. Ajouter **dix gouttes de Réactif 3,** refermer et bien agiter à nouveau.
4. Rincer le récipient à essais avec la solution ainsi obtenue et le remplir jusqu'au repère (correspondant à 5 ml).
5. Ajouter **une goutte de Réactif 4** et agiter. Selon la teneur en oxygène, la solution se colore en une teinte allant du violet au bleu.
6. Poser simplement le dispositif de titrage et le remplir avec la **Réactif 5 (solution de titrage)** en tirant lentement la seringue, jusqu'à ce que le bord **inférieur** du joint noir coïncide avec le 0 de l'échelle mg/l d'oxygène.
7. Sortir la pipette de titrage et frotter brièvement la pointe du tube sur le bord du flacon. A l'échantillon d'eau préparé, ajouter alors la solution de titrage goutte à goutte, jusqu'à ce que la couleur de l'échantillon d'eau vire du **bleu à l'incolore.**
8. Lire la teneur en oxygène de l'eau en mg/l sur l'échelle de la pipette de titrage.
9. Lorsque l'analyse est terminée, pousser le piston de la pipette de titrage vers le bas et visser solidement cette dernière sur le flacon de réactifs.

Perturbations

La plupart des substances oxydantes et réductrices, par exemple les substances organiques dissoutes (consommation en permanganate de potassium supérieure à 60 mg/l), les composés de manganèse de valence supérieure, le chlore actif, les ions sulfures et sulfites, les ions fer(II) et fer(III) ont un effet gênant.

[illegible] des substances organiques dissoutes peut être éliminée par transformation des hydroxydes de manganèse en carbonates insensibles à l'oxygène, ce qui a lieu par addition postérieure de 4 ml d'une solution d'hydrogenocarbonate d'ammonium (35 g d'hydrogénocarbonate d'ammonium se dissolvent dans 90 ml d'eau distillée).

On dose les ions fer(II) (coffrets Aquamerck® n° 11 136) et on en tient compte lors du calcul du la teneur en oxygène, 1 mg de Fe^{2+}/l correspondant à une consommation de 0,14 mg de O_2/l. Les ions fer(III) sont rendus inactifs lors du dosage par l'addition d'acide phosphorique.

Tableau pour déterminer la saturation en oxygène

Détermination de la saturation en oxygène en fonction de la température à une pression totale de 760 Torr de l'atmosphère saturée de vapeur d'eau selon Truesdale, Downing et Lowden

J. Appl. Chem. 5 (1955) 53

t_{H_2O}	0,0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9
					mg O_2/l					
0	14,16	14,12	14,08	14,04	14,00	13,97	13,93	13,89	13,85	13,81
1	13,77	13,74	13,70	13,66	13,63	13 59	13,55	13,51	13,48	13,44
2	13,40	13,37	13,33	13,30	15,26	13,22	13,19	13,15	13,12	13,08
3	13,05	13,01	12,98	12,94	12,91	12,87	12,84	12,81	12,77	12,74
4	12,70	12,67	12,64	12,60	12,57	12,54	12,51	12,47	12,44	12,41
5	12,37	12,34	12,31	12,28	12,25	12,22	12,18	12,15	12,12	12,09
6	12,06	12,03	12,00	11,97	11,94	11,91	11,88	11,85	11,82	11,79
7	11,76	11,73	11,70	11,67	11,64	11,61	11,58	11,55	11,52	11,50
8	11,47	11,44	11,41	11,38	11,36	11,33	11,30	11,27	11,25	11,22
9	11,19	11,16	11,14	11,11	11,08	11,06	11,03	11,00	10,98	10,95
10	10,92	10,90	10,87	10,85	10,82	10,80	10,77	10,75	10,72	10,70
11	10,67	10,65	10,62	10,60	10,57	10,55	10,53	10,50	10,48	10,45
12	10,43	10,40	10,38	10,36	10,34	10,31	10,29	10,27	10,24	10,22
13	10,20	10,17	10,15	10,13	10,11	10,09	10,06	10,04	10,02	10,00
14	9,98	9,95	9,93	9,91	9,89	9,87	9,85	9,83	9,81	9,78
15	9,76	9,74	9,72	9,70	9,68	9,66	9,64	9,62	9,60	9,58
16	9,56	9,54	9,52	9,50	9,48	9,46	9,45	9,43	9,41	9,39
17	9,37	9,35	9,33	9,31	9,30	9,28	9,26	9,24	9,22	9,20
18	9,18	9,17	9,15	9,13	9,12	9,10	9,08	9,06	9,04	9,03
19	9,01	8,99	8,98	8,96	8,94	8,93	8,91	8,89	8,88	8,86
20	8,84	8,83	8,81	8,79	8,78	8,76	8,75	8,73	8,71	8,70
21	8,68	8,67	8,65	8,64	8,62	8,61	8,59	8,58	8,56	8,55
22	8,53	8,52	8,50	8,49	8,47	8,46	8,44	8,43	8,41	8,40
23	8,38	8,37	8,36	8,34	8,33	8,32	8,30	8,29	8,27	8,26
24	8,25	8,23	8,22	8,21	8,19	8,18	8,17	8,15	8,14	8,13
25	8,11	8,10	8,09	8,07	8,06	8,05	8,04	8,02	8,01	8,00
26	7,99	7,97	7,96	7,95	7,94	7,92	7,91	7,90	7,89	7,88
27	7,86	7,85	7,84	7,83	7,82	7,81	7,79	7,78	7,77	7,76
28	7,75	7,74	7,72	7,71	7,70	7,69	7,68	7,67	7,66	7,65
29	7,64	7,62	7,61	7,60	7,59	7 58	7,57	7,56	7,55	7,54
30	7,53	7,52	7,51	7,50	7,48	7,47	7,46	7,45	7,44	7,43
31	7,42	7,41	7,40	7,39	7,38	7,37	7,36	7 35	7 34	7,33
32	7,32	7,31	7,30	7,29	7,28	7,27	7,26	7,25	7,24	7,23
33	7,22	7,21	7,20	7,20	7,19	7 18	7,17	7,16	7,15	7,14
34	7,13	7,12	7,11	7,10	7,09	7,08	7,07	7,06	7,05	7,05
35	7,04	7,03	7,02	7,01	7,00	6,99	6,98	6,97	6,96	6,95
36	6,94	6,94	6,93	6,92	6,91	6,90	6,89	6,88	6 87	6,86
37	6,86	6,85	6,84	6,83	6,82	6,81	6,80	6,79	6,78	6,77
38	6,76	6,76	6,75	6,74	6,73	6,72	6,71	6,70	6,70	6,69
39	6,68	6,67	6,66	6,65	6,64	6,63	6,63	6,62	6,61	6,60
40	6,59	6,58	6,57	6,56	6,56	6,55	6,54	6,53	6,52	6,51

Exemple

Température mesurée de l'eau:	10,5° C
Valeur de saturation en oxygène selon le tableau:	10,80 mg/l
Oxygène lors du prélèvement:	9,3 mg/l
Déficit en oxygène:	1,5 mg/l

Bibliographie

E. Merck, L'analyse de l'eau

DEV (Deutsche Einheitsverfahren zur Wasseruntersuchung – Méthodes normalisées allemandes pour l'analyse de l'eau)
Verlag Chemie GmbH, Weinheim (R. F. A.)

Rolf K. Freier, Wasseranalyse
Walter de Gruyter et Co., Berlin

Karl Höll, Wasser
Walter de Gruyter et Co., Berlin

Pour l'analyse de l'eau, de nombreux autres coffrets de réactifs pour l'examen rapide et des bandelettes tests Merckoquant® spécifiques d'ions sont disponibles.

Veuillez demander les notices correspondantes.

E. Merck, Postfach 41 19, D-6100 Darmstadt 1, (Allemagne Fédérale)
Téléphone (0 61 51) 7 20, Télex 4 19 328 em d

ANNEXE 2

NORME FRANÇAISE HOMOLOGUÉE	ESSAIS DES EAUX DOSAGE DE L'AZOTE AMMONIACAL	NF T 90-015 Août 1975

AVANT-PROPOS

Les concentrations en azote ammoniacal dans les eaux sont très variables; il en est de même des besoins et des possibilités des laboratoires qui effectuent les analyses correspondantes. En outre, la nature et la concentration des éléments contenus dans l'eau et qui sont susceptibles de perturber le dosage, sont également très diverses. Ce dosage est donc justiciable de techniques différentes : trois d'entre elles sont décrites ci-après :

1ère PARTIE :

MÉTHODE PAR ACIDIMETRIE APRÈS DISTILLATION

1. OBJET ET DOMAINE D'APPLICATION

La présente partie a pour objet la description d'une méthode de dosage de l'azote ammoniacal dans les eaux, par acidimétrie après distillation. Elle est applicable aux teneurs en azote ammoniacal, exprimées en NH_4, supérieures à 4 mg/l (avec une prise d'essai de 50 ml).

Elle est perturbée par la présence de composés acides ou basiques volatils, tels que les amines, et par les produits hydrolysables en ammoniac (urée, etc.).

2. PRINCIPE

Entraînement à la vapeur en milieu alcalin de l'ammoniaque libre ou salifiée. Dosage acidimétrique de l'ammoniaque recueillie.

3. RÉACTIFS

Au cours de l'analyse n'utiliser que de l'eau récemment déminéralisée sur résine cationique forte ou de l'eau de pureté équivalente dont la teneur en azote ammoniacal est négligeable.

3.1 **Carbonate de sodium,** solution à 100 g/l,

3.2 **Acide borique,** solution à 10 g/l,

3.3 **Acide sulfurique,** solution titrée 0,1 N ou 0,02 N,

3.4 **Indicateur de Tashiro** (rouge de méthyle + bleu de méthylène). Voir NF T 01-011 "Indicateurs de pH - Liste des solutions préférentielles".

4. APPAREILLAGE

Matériel courant de laboratoire.

Appareil de distillation en courant de vapeur (type Parnas et Wagner par exemple). Il est conseillé d'équiper la base du réfrigérant d'une coupelle en verre destinée à éviter que d'éventuelles condensations coulent dans la fiole où est recueilli le distillat.

Lorsque l'appareil est exposé à l'atmosphère du laboratoire, ses parois peuvent absorber des traces d'azote ammoniacal qui ne s'éliminent pas par rinçage à l'eau. Il est indispensable, pour le dosage des faibles teneurs, de nettoyer l'appareil en effectuant avant chaque série de mesures une ou deux distillations "à blanc" d'une solution d'hydroxyde de sodium. Entre les essais, maintenir l'appareil à l'abri de l'atmosphère du laboratoire.

Homologuée par arrêté du 75-07-30 J.O. du 75-08-13

Cette norme remplace la norme de même indice homologuée le 30 novembre 1956

© AFNOR 1975 Droits de reproduction et de traduction réservés pour tous pays.

5. ÉCHANTILLON

Les échantillons destinés au laboratoire d'analyse doivent, aussitôt que possible après leur prélèvement être refroidis à une température voisine de 5 °C. L'analyse doit être effectuée aussitôt que possible après le prélèvement.

6. MODE OPÉRATOIRE

1 PRISE D'ESSAI

Prélever un volume V_2 d'échantillon de laboratoire tel qu'il contienne entre 0,2 et 20 mg d'azote ammoniacal, exprimé en NH_4.

2 DOSAGE

Introduire la prise d'essai (6.1) dans le ballon de l'appareil à distillation. Ajouter 20 ml de la solution de carbonate de sodium (3.1) et, si nécessaire un agent antimoussant. Admettre la vapeur durant au moins 20 min en recueillant le distillat dans 5 ml de solution d'acide borique (3.2) additionnés de quelques gouttes d'indicateur (3.4) et d'une quantité suffisante d'eau pour assurer un barbotage.

Vérifier l'absence d'ammoniaque dans les dernières fractions de distillat.

Titrer avec l'acide sulfurique (3.3) en utilisant :

- une solution titrée 0,1 N si la prise d'essai contient entre 2 et 20 mg d'azote ammoniacal, exprimé en NH_4,
- une solution titrée 0,02 N si la prise d'essai contient entre 0,2 et 2 mg d'azote ammoniacal, exprimé en NH_4.

3 ESSAI À BLANC

Effectuer, un essai à blanc dans les mêmes conditions que le dosage.

7. EXPRESSION DES RÉSULTATS

Soient :

V_1 le volume en millilitres de solution d'acide sulfurique utilisé pour le dosage,

V_0 le volume en millilitres de solution d'acide sulfurique utilisé pour l'essai en blanc,

T la normalité de la solution titrée d'acide sulfurique utilisée (0,1 N ou 0,02 N),

V_2 le volume, en millilitres, de la prise d'essai.

La teneur en azote ammoniacal, exprimée en milligrammes de NH_4 par litre est donnée par l'expression :

$$\frac{(V_1 - V_0)\, T \times 1\,000 \times 18}{V_2}$$

2ème PARTIE : (méthode utilisée)

MÉTHODE SPECTROPHOTOMÉTRIQUE AU BLEU D'INDOPHÉNOL

1. OBJET ET DOMAINE D'APPLICATION

La présente partie a pour objet la description d'une méthode de dosage de l'azote ammoniacal dans les eaux par mesure spectrophotométrique au bleu d'indophénol.

Elle est applicable aux teneurs en azote ammoniacal, exprimées en NH_4, supérieures à 2 µg/l.

Elle ne présente pas d'interférences en présence des éléments majeurs des eaux douces naturelles et des eaux de mer.

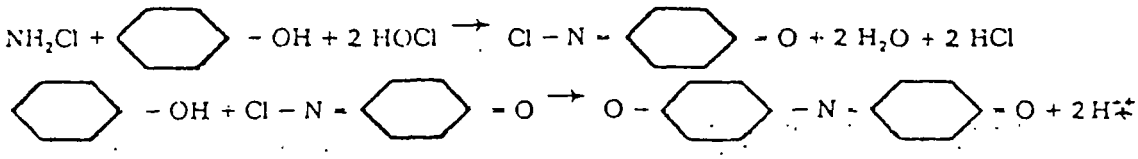
Elle n'est pas applicable en présence de sulfures si leur concentration exprimée en S^{2-} est supérieure à 2 mg/l, ni, en règle générale, en présence de fortes teneurs en réducteurs.

Elle n'est également pas applicable aux eaux troubles ou colorées (sauf si une dilution est possible et supprime ce trouble ou cette coloration).

2. PRINCIPE

Formation, en milieu alcalin (10,4 < pH < 11,5) d'un composé type indophénol par réacti des ions ammonium avec du phénol et de l'hypochlorite, en présence de nitroprussiate comr catalyseur.

$$NH_3 + HOCl \rightleftharpoons NH_2Cl + H_2O$$



Mesure spectrophotométrique, à une longueur d'onde voisine de 630 nm, de la coloration obtenue.

3. RÉACTIFS

Au cours de l'analyse n'utiliser que de l'eau récemment déminéralisée sur résine cationique forte ou de l'eau de pureté équivalente dont la teneur en azote ammoniacal est négligeable.

.1 **Solution alcaline, complexante et chlorée**

Dissoudre dans environ 800 ml d'eau, 20 g d'hydroxyde de sodium en pastilles et 380 g citrate trisodique ($Na_3C_6H_5O_7$. 2 H_2O). Porter à ébullition et maintenir une ébullition douce pen dant 20 min. ou 5,179 du sel sodique.

Refroidir, ajouter 4 g d'acide dichlorocyanurique ($C_3HCl_2N_3O_3$) et amener le volume à 1 000 r Conserver cette solution à une température de 4 °C environ.

.2 **Solution de phénol et de nitroprussiate** Sodium pentacyanonitrosyl.

Dissoudre dans de l'eau 35 g de phénol et 0,4 g de ~~nitroprussiate de sodium~~ Na_2 [Fe $(CN)_5NO$] . 2 H_2O. et amener le volume à 1 000 ml.

Conserver cette solution dans un flacon en verre brun et à une température de 4 °C environ Ne jamais la placer à la lumière directe du soleil. La manipuler en lumière atténuée.

.3 **Azote ammoniacal,** solutions étalons

.3.1 Solution mère à 100 mg de NH_4 par litre.

Dissoudre 297 mg de chlorure d'ammonium dans de l'eau et amener à 1 000 ml en fiole jaugée

.3.2 Solution étalon à 10 mg de NH_4 par litre. Diluer au moment de l'emploi au dixième la solution 3.3.

.3.3 Solution étalon à 1 mg de NH_4 par litre. Diluer au moment de l'emploi au dixième la solu tion 3.3.2.

4. APPAREILLAGE

Matériel courant de laboratoire.

Spectrophotomètre (longueur d'onde : 630 nm).

La verrerie utilisée pour la préparation des réactifs et pour effectuer le dosage ne doit pas servir à d'autres dosages, ni entrer en contact avec de l'ammoniaque (vapeur ou liquide) ou de sels d'ammonium en forte concentration. Lorsqu'un nouveau matériel est utilisé, il est bon d'effectuer deux fois la réaction à blanc dans les fioles jaugées ou les tubes où sera développée la coloration

Entre les analyses conserver les fioles ou les tubes bouchés, remplis d'eau et à l'obscurité

5. ÉCHANTILLON

Les échantillons destinés au laboratoire d'analyse doivent, aussitôt que possible après le prélèvement, être refroidis à une température voisine de 5 °C.

L'analyse doit être effectuée aussitôt que possible après le prélèvement.

6. MODE OPÉRATOIRE

.1 **PRISE D'ESSAI**

Si la teneur de l'échantillon en NH_4 est inférieure à 1 mg/l, prélever une prise d'essai de 20 ml

Si la teneur de l'échantillon en NH_4 est supérieure à 1 mg/l, prélever un volume plus petit ajuster à 20 ml avec de l'eau

COURBE D'ÉTALONNAGES

Introduire dans une série de fioles jaugées de 100 ml, les volumes de solution étalon (3.3.2 ou 3.3.3) indiqués dans le tableau ci-après, en choisissant entre les deux possibilités prévues suivant les teneurs à doser :

GAMME I POUR MESURES EN CUVES DE 50 mm		GAMME II POUR MESURES EN CUVES DE 10 mm	
Volume de solution 3.3.3 ml	correspondant à une teneur de : $\mu g\ NH_4/l$	Volume de solution 3.3.2 ml	correspondant à une teneur de : mg NH_4/l
1	10	1	0,1
2	20	2	0,2
5	50	4	0,4
10	100	6	0,6
15	150	8	0,8
20	200	10	1,0

Compléter au volume avec de l'eau et homogénéiser.

Prélever 20 ml de chacune des solutions obtenues et les introduire dans une série de 6 tubes à essai. Introduire également 20 ml d'eau dans un 7ème tube à essai (terme zéro).

Ajouter dans l'ordre et sans attendre entre chaque ajout :

- 1,0 ml de la solution de phénol et nitroprussiate (3.2) ; agiter.
- 1,0 ml de la solution alcaline (3.1).

Agiter et placer à l'obscurité pendant au moins 6 h.

Effectuer les mesures spectrophotométriques, au maximum de la courbe d'absorption (longueur d'onde généralement voisine de 630 nm) après avoir réglé l'appareil au zéro d'absorbance par rapport au terme zéro.

DOSAGE

Introduire la prise d'essai (6.1) dans un tube à essai. Ajouter dans l'ordre et sans attendre entre chaque ajout :

- 1,0 ml de la solution de phénol et nitroprussiate (3.2) ; agiter.
- 1,0 ml de la solution alcaline (3.1).

Agiter et placer à l'obscurité pendant au moins 6 h.

Effectuer la mesure spectrophotométrique, au maximum de la courbe d'absorption (longueur d'onde généralement voisine de 630 nm) après avoir réglé l'appareil au zéro d'absorbance par rapport à l'essai témoin.

ESSAI TÉMOIN

Effectuer parallèlement au dosage un essai témoin : si l'échantillon est analysé sans dilution, confectionner ce témoin à partir des réactifs seuls et n'introduire les 20 ml d'eau remplaçant la prise d'essai qu'après le temps d'attente de 6 h à l'obscurité. Si l'échantillon est analysé après dilution, confectionner ce témoin en remplaçant la prise d'essai par 20 ml d'eau.

7. EXPRESSION DES RÉSULTATS

Déduire de la courbe d'étalonnage la teneur en azote ammoniacal de l'échantillon et l'exprimer en milligrammes de NH_4 par litre.

PROCÈS-VERBAL D'ESSAI

Le procès-verbal d'essai doit mentionner les indications suivantes :

- la référence de la méthode employée,
- les résultats ainsi que la forme sous laquelle ils sont exprimés,
- tous détails particuliers éventuels relevés au cours de l'essai,
- toutes opérations non prévues dans la présente norme ou toutes opérations facultatives.

NORME FRANÇAISE HOMOLOGUÉE	ESSAIS DES EAUX DOSAGE DES NITRITES	NF T 90-013 Août 1975

1. OBJET ET DOMAINE D'APPLICATION

La présente norme a pour objet la description d'une méthode de dosage spectrophotométrique des nitrites dans les eaux.

Elle est applicable aux eaux dont la teneur en nitrites, exprimée en NO_2, est supérieure à 1 µg/l.

2. PRINCIPE

Diazotation de la sulfanilamide par les nitrites, en présence de dichlorure de N—(1—napthtyl) éthylène-diamine.

Mesure spectrophotométrique à une longueur d'onde voisine de 537 nm de la coloration du complexe rose formé.

3. RÉACTIFS

Au cours de l'analyse n'utiliser que de l'eau récemment distillée ou de l'eau de pureté équivalente.

3.1 Réactif de diazotation :

A 800 ml d'eau, ajouter 100 ml d'acide orthophosphorique concentré, puis 40 g de sulfanilamide ($C_6H_8O_2N_2S$). Laisser dissoudre, puis ajouter 2 g de dichlorure de N—(1—naphtyl) éthylène-diamine ($C_{10}H_7NHCH_2CH_2$; 2 HCl).

Agiter jusqu'à dissolution complète et ajuster à 1 000 ml avec de l'eau. Cette solution conservée dans un flacon brun au réfrigérateur est stable plusieurs mois.

3.2 Solution étalon de nitrite à 1 mg de NO_2 par litre :

Peser, à 0,1 mg près, 150 mg de nitrite de sodium, les dissoudre dans de l'eau et ajuster à 1 000 ml en fiole jaugée. La solution mère ainsi obtenue est une solution à 100 mg de NO_2 par litre.

Au moment de l'emploi, diluer au centième cette solution mère.

4. APPAREILLAGE

Matériel courant de laboratoire,

Spectrophotomètre (longueur d'onde 537 nm).

Nettoyer très soigneusement la verrerie utilisée, et de préférence, réserver son usage au seul dosage des nitrites.

5. ÉCHANTILLON

Les échantillons destinés au laboratoire d'analyse doivent aussitôt que possible après leur prélèvement être refroidis à une température voisine de 5 °C. L'analyse doit être effectuée aussitôt que possible après le prélèvement.

Homologuée
par arrêté du 75-07-30
J.O. du 75-08-13

© AFNOR 1975
Droits de reproduction
et de traduction réservés
pour tous pays.

J. BRARD - 60110 Méru

6. MODE OPÉRATOIRE

6.1 PRISE D'ESSAI

Si l'échantillon contient moins de 1 mg de NO_2 par litre, introduire 50 ml de l'échantillon de laboratoire dans une fiole jaugée de 50 ml. Si l'échantillon contient plus de 1 mg de NO_2 par litre, diminuer la prise d'essai et ajuster à 50 ml avec de l'eau distillée.

6.2 COURBE D'ÉTALONNAGE (valable pour un parcours optique de 10 mm).

Introduire dans des fioles jaugées de 50 ml, respectivement :

0 - 1 - 2 - 5 - 10 - 20 - 30 - 40 - 50 ml de solution étalon (3.2),

correspondant à :

0 - 1 - 2 - 5 - 10 - 20 - 30 - 40 - 50 µg de NO_2

Compléter si nécessaire au volume avec de l'eau et homogénéiser.

Dans chaque fiole, ajouter 1,0 ml de réactif de diazotation (3.1) et homogénéiser. Attendre 10 min environ et effectuer les mesures photométriques, au maximum de la courbe d'absorption (généralement voisin de 537 nm) après avoir réglé l'appareil au zéro d'absorbance par rapport à l'eau.

6.3 DOSAGE

Ajouter à la prise d'essai (6.1) 1,0 ml de réactif de diazotation (3.1) et homogénéiser. Attendre 10 min environ et effectuer la mesure photométrique dans les mêmes conditions que pour l'établissement de la courbe d'étalonnage.

7. EXPRESSION DES RÉSULTATS

Déduire de la courbe d'étalonnage la teneur en nitrites de l'échantillon et l'exprimer en milligrammes de NO_2 par litre.

8. PROCÈS-VERBAL D'ESSAI

Le procès-verbal d'essai doit mentionner les indications suivantes :

- la référence de la méthode employée,
- les résultats ainsi que la forme sous laquelle ils sont exprimés,
- tous détails particuliers éventuels relevés au cours de l'essai,
- toutes opérations non prévues dans la présente norme ou toutes opérations facultatives.

normalisation française

T 90-045
Juin 1989
ISO 7890-3

Essais des eaux

Dosage des nitrates

Méthode spectrométrique avec l'acide sulfosalicylique

E : Testing water — Determination of nitrate — Spectrometric method using sulfosalicylic acid
D : Wasserbeschaffenheit — Bestimmung von Nitrat — Spectrometrisches Verfahren mit Sulfosalizylsäure

Fascicule de documentation publié par l'afnor en juin 1989.

correspondance

Le présent fascicule de documentation reproduit intégralement la Norme internationale ISO 7890-3 : 1988.

analyse

Le présent fascicule de documentation s'adresse aux laboratoires ayant à doser des nitrates dans les eaux destinées à la consommation humaine et les eaux de surface sans être en mesure de mettre en œuvre la méthode automatique par spectrométrie d'absorption moléculaire qui fait l'objet de la norme NF T 90-012 et qui constitue la méthode de référence au plan français.

descripteurs

Thésaurus International Technique : essai des eaux, eau d'alimentation humaine, eau de surface, analyse chimique, dosage, nitrate, spectrométrie d'absorption moléculaire.

modifications

corrections

dité et diffusé par l'association française de normalisation (afnor), tour europe cedex 7 92080 paris la défense — tél. : (1) 42 91 55 55

Qualité de l'eau — Dosage des nitrates —

Partie 3 :
Méthode spectrométrique avec l'acide sulfosalicylique

Domaine d'application

1 Substance dosée

présente partie de l'ISO 7890 spécifie une méthode de sage de l'ion nitrate dans les eaux.

1 Type d'échantillon

présente méthode convient à des échantillons d'eaux brutes d'eaux potables.

1 Étendue du dosage

squ'à une concentration maximale en azote due aux nitrates, = 0,2 mg/l, en utilisant une prise d'essai maximale de ml. La gamme peut être étendue vers le haut par des prises ssai inférieures.

1 Limite de détection[1]

ec des cuves de 40 mm d'épaisseur et une prise d'essai de ml, la limite de détection est comprise dans la gamme = 0,003 à 0,013 mg/l.

Sensibilité[1]

e concentration en azote due aux nitrates, ϱ_N = 0,2 mg/l, rnit une absorbance d'environ 0,68 unité, en utilisant une e d'essai de 25 ml dans des cuves de 40 mm d'épaisseur.

1.6 Interférences

On a pratiqué des essais sur un ensemble de substances souvent présentes dans les échantillons d'eau, afin de déterminer les interférences possibles avec la présente méthode. Des détails complets figurent dans l'annexe A. Les principaux agents d'interférence potentiels sont le chlorure, l'orthophosphate, le magnésium et le manganèse(II), comme l'indique l'annexe A.

D'autres essais montrent qu'avec cette méthode on peut admettre une couleur d'échantillon maximale de 150 mg/l Pt, à condition que la méthode de correction d'absorption de la prise d'essai décrite ci-dessous soit appliquée. (Voir 6.5.)

2 Principe

Mesurage spectrométrique du composé jaune issu de la réaction des nitrates avec l'acide sulfosalicylique (formé par addition à l'échantillon de salicylate de sodium et d'acide sulfurique) après traitement à l'alcali.

En même temps que l'alcali, on ajoute du sel disodique de l'acide éthylènediamine-tétraacétique (Na_2EDTA) pour empêcher la précipitation des sels de calcium et de magnésium. L'adjonction d'azoture de sodium vise enfin à neutraliser l'interférence des nitrites.

3 Réactifs

Au cours de l'analyse, utiliser uniquement des réactifs de qualité analytique reconnue, et de l'eau distillée ou de l'eau de pureté équivalente.

---

[1] Résultats d'un essai interlaboratoire effectué au Royaume-Uni et qui rassemblait quatre participants. La limite de détection a été prise égale à 3 fois l'écart-type du blanc au sein d'un lot.

3.1 Acide sulfurique, $c(H_2SO_4)$ = 18 mol/l, ϱ = 1,84 g/ml.

AVERTISSEMENT — Lors de l'utilisation de ce réactif, il est indispensable de disposer d'une protection oculaire et de vêtements de protection.

3.2 Acide acétique cristallisable, $c(CH_3COOH)$ = 17 mol/l, ϱ = 1,05 g/ml.

AVERTISSEMENT — Lors de l'utilisation de ce réactif, il est indispensable de disposer d'une protection oculaire et de vêtements de protection.

3.3 Alcali, solution, ϱ_{NaOH} = 200 g/l, ϱ $(CH_2\text{-}N(CH_2COOH)CH_2\text{-}COONa)_2.2H_2O$ = 50 g/l.

Dissoudre avec précaution 200 ± 2 g de pastilles d'hydroxyde de sodium dans environ 800 ml d'eau. Ajouter 50 g ± 0,5 g de sel disodique de l'acide éthylènediaminetétraacétique (Na_2EDTA) dihydraté {$(CH_2\text{-}N(CH_2COOH)CH_2\text{-}COONa)_2.2H_2O$} et dissoudre. Laisser refroidir à la température ambiante et compléter à 1 litre avec de l'eau dans une éprouvette graduée. Conserver dans une bouteille en polyéthylène. Ce réactif est stable indéfiniment.

AVERTISSEMENT — Lors de l'utilisation de ce réactif, il est indispensable de disposer d'une protection oculaire et de vêtements de protection.

3.4 Azoture de sodium, solution, ϱ_{NaN_3} = 0,5 g/l.

Dissoudre avec précaution 0,05 g ± 0,005 g d'azoture de sodium dans environ 90 ml d'eau puis compléter à 100 ml avec de l'eau dans une éprouvette graduée. Conserver dans une bouteille en verre. Ce réactif est stable indéfiniment.

AVERTISSEMENT — Ce réactif est très toxique; ne pas en avaler. Le contact du réactif solide et des acides libère un gaz très toxique.

NOTE — Une solution d'acide sulfamique, $\varrho_{NH_2\cdot SO_3H}$ = 0,75 g/l, peut être également utilisée à la place de la solution d'azoture de sodium.

3.5 Salicylate de sodium, solution, $\varrho_{HO\text{-}C_6H_4\text{-}COONa}$ = 10 g/l.

Dissoudre 1 g ± 0,1 g de salicylate de sodium ($HO\text{-}C_6H_4\text{-}COONa$) dans 100 ml ± 1 ml d'eau. Conserver dans une bouteille en verre ou en polyéthylène. Préparer cette solution chaque jour au moment de l'emploi.

3.6 Nitrate, solution mère étalon, ϱ_N = 1 000 mg/l.

Dissoudre 7,215 g ± 0,001 g de nitrate de potassium (KNO_3), (préalablement séché à 105 °C pendant au moins 2 h) dans environ 750 ml d'eau. Transférer quantitativement dans une fiole jaugée de 1 litre et compléter au volume avec de l'eau.

Conserver la solution dans une bouteille en verre pendant une durée ne dépassant pas 2 mois.

3.7 Nitrate, solution étalon, ϱ_N = 100 mg/l.

Transvaser à la pipette 50 ml de la solution mère (3.6) dans une fiole jaugée de 500 ml et compléter au volume étalon avec de l'eau.

Conserver cette solution dans une bouteille en verre pendant une durée ne dépassant pas 1 mois.

3.8 Nitrate, solution étalon d'essai, ϱ_N = 1 mg/l.

Dans une fiole jaugée de 500 ml, ajouter à la pipette 5 ml de la *solution étalon de nitrate* (3.7). *Compléter au volume* avec de l'eau. Préparer la solution au moment de l'emploi.

4 Appareillage

Matériel courant de laboratoire, et

4.1 Spectromètre, permettant d'effectuer des mesurages à une longueur d'onde de 415 nm et équipé de cuves de 40 ou de 50 mm d'épaisseur.

4.2 Capsules d'évaporation, de faible volume (environ 50 ml). Si ces capsules sont neuves ou ne sont pas couramment utilisées, les rincer soigneusement à l'eau avant l'essai et suivre la procédure indiquée dans les deux premiers alinéas de 6.3.2 pour les nettoyer.

4.3 Bain d'eau bouillante, pouvant recevoir au moins six capsules d'évaporation (4.2).

4.4 Bain d'eau, thermoréglable, pouvant maintenir une température de 25 °C ± 0,5 °C.

5 Échantillonnage et échantillons

Les échantillons pour laboratoire doivent être prélevés dans des bouteilles en verre et doivent être analysés dès que possible après leur prélèvement. Le stockage des échantillons à une température comprise entre 2 °C et 5 °C peut permettre de conserver de nombreux types d'échantillons, mais il faut vérifier que c'est bien le cas pour chaque type d'échantillon.

6 Mode opératoire

AVERTISSEMENT — Ce mode opératoire suppose l'utilisation de solutions concentrées d'acide sulfurique, d'acide acétique, d'hydroxyde de sodium et d'azoture de sodium. Il est indispensable de disposer d'une protection oculaire et de vêtements de protection pour manipuler ces réactifs. Ces derniers ne doivent jamais être pipettés à la bouche.

6.1 Prise d'essai

Le volume maximum de la prise d'essai pouvant servir au dosage des nitrates jusqu'à ϱ_N = 0,2 mg/l est de 25 ml. Utiliser des prises d'essai plus petites, le cas échéant, pour tenir

ıpte de concentrations plus élevées en nitrates. Avant de ever la première prise d'essai, laisser décanter les échantil- . pour laboratoire contenant des matières en suspension, les trifuger ou les filtrer sur un papier filtre en fibres de verre '. Les échantillons présentant un pH supérieur à 8 doivent neutralisés à l'acide acétique (3.2) avant le prélèvement de rise d'essai.

Essai à blanc

ctuer un essai à blanc, parallèlement au dosage, en utilisant) ml ± 0,05 ml d'eau à la place de la prise d'essai. Soit A_b és l'absorbance mesurée.

Étalonnage

.1 Préparation de la série de solutions étalons

s une série de capsules d'évaporation propres (4.2), introe à la burette, respectivement, 1; 2; 3; 4 et 5 ml de la solu- étalon d'essai de nitrate (3.8) correspondant respectivet à des quantités de nitrate de m(N) = 1; 2; 3; 4 et 5 µg s les capsules respectives.

2 Développement de la coloration

uter 0,5 ml ± 0,005 ml de solution d'azoture de sodium) et 0,2 ml ± 0,002 ml d'acide acétique (3.2). Attendre au ns 5 min, puis faire évaporer le mélange à sec dans le bain au bouillante (4.3). Ajouter ensuite 1 ml ± 0,01 ml de solu- de salicylate de sodium (3.5), homogénéiser et faire à nou- évaporer à sec. Retirer la capsule du bain d'eau et laisser oidir à la température ambiante.

uter 1 ml ± 0,01 ml d'acide sulfurique (3.1), puis dissoudre résidu dans la capsule en agitant légèrement. Laisser le ange reposer pendant environ 10 min. Ajouter alors ml ± 0,1 ml d'eau, puis 10 ml ± 0,1 ml de la solution cali (3.3).

nsvaser quantitativement le mélange dans une fiole jaugée 25 ml, sans compléter au volume. Placer la fiole dans le bain au (4.4) à 25 °C ± 0,5 °C pendant 10 min ± 2 min. Retirer ıole et compléter au volume avec de l'eau.

.3 Mesurages spectrométriques

surer l'absorbance de la solution à 415 nm dans des cuves 40 ou 50 mm d'épaisseur, par rapport à de l'eau dans la cuve référence. Soit A_s unités l'absorbance mesurée.

TE — Les essais montrent que l'absorbance des solutions colorées neure constante pendant au moins 24 h.

.4 Établissement de la courbe d'étalonnage

ustraire l'absorbance de l'essai à blanc des absorbances de aque solution étalon et tracer la courbe d'étalonnage faisant paraître l'absorbance en fonction de la masse de nitrate, N), en microgrammes. Contrôler si la courbe est linéaire et sse par l'origine. Dans le cas contraire, répéter l'étalonnage.

6.4 Dosage

Introduire dans une petite capsule d'évaporation (4.2) la prise d'essai choisie (6.1) de volume V ml, tel que le prélèvement contienne une masse d'azote dû aux nitrates comprise entre m(N) = 1 µg et 5 µg.

Poursuivre comme indiqué en 6.3.2 et 6.3.3.

6.5 Correction tenant compte de l'absorption de la prise d'essai

Si l'on sait, ou si l'on suppose, que l'absorption de la prise d'essai à la longueur d'onde d'analyse peut constituer une interférence (ce qui peut se produire avec des échantillons très colorés), effectuer les opérations prévues en 6.3.2 et 6.3.3 sur une seconde prise d'essai, en l'absence toutefois de solution de salicylate de sodium. Soit A_t l'absorbance mesurée.

7 Expression des résultats

7.1 Calcul

Calculer l'absorbance due aux nitrates dans la prise d'essai, A_r, à l'aide de l'équation

$$A_r = A_s - A_b$$

ou, si l'on a apporté une correction pour tenir compte de l'absorption de l'échantillon, à l'aide de l'équation

$$A_r = A_s - A_b - A_t$$

Dans les deux équations, A_s, A_b et A_t correspondent respectivement à l'absorbance de l'échantillon, du blanc et à l'absorbance après correction (voir 6.2, 6.3.3 et 6.5).

Déduire de la courbe d'étalonnage (6.3.4) la masse de nitrate m(N), exprimée en microgrammes, correspondant à la valeur A_r de l'absorbance.

La teneur en nitrate de l'échantillon, ϱ_N, exprimée en milligrammes par litre, est donnée par la formule

$$\frac{m(N)}{V}$$

où V est le volume, en millilitres, de la prise d'essai.

Tableau 1 — Tableau de conversion

Nitrate	$c(NO_3)$	ϱ_{NO_3}	ϱ_N
	mmol/l	mg/l	mg/l
$c(NO_3)$ = 1 mmol/l	1	62	14,01
ϱ_{NO_3} = 1 mg/l	0,016 1	1	0,226
ϱ_N = 1 mg/l	0,071 4	4,427	1

Exemple :

ϱ_{NO_3} = 1 mg/l correspond à ϱ_N = 0,226 mg/l.

7.2 Répétabilité et reproductibilité [1)]

Les écarts-types de répétabilité et reproductibilité sont indiqués dans le tableau 2.

8 Procès-verbal d'essai

Le procès-verbal d'essai doit contenir les indications suivantes :

a) la référence à la présente partie de l'ISO 7890;

b) l'identification précise de l'échantillon;

c) des informations concernant la conservation de l'échantillon de laboratoire avant l'analyse;

d) des résultats de répétabilité obtenus par le laboratoire par emploi de la méthode;

e) le résultat obtenu, exprimé sous forme ϱ_N, en milligrammes par litre, ou sous forme ϱ_{NO_3}, en milligrammes par litre ou $c(NO_3)$, en millimoles par litre;

f) toute modification du mode opératoire normalisé ou tout autre incident pouvant avoir agi sur le résultat.

Tableau 2 — Écarts-types de répétabilité et reproductibilité

Échantillon	Teneur en nitrates ϱ_N	Volume de la prise d'essai	Écart-type*) Répétabilité	ϱ_N Reproductibilité
	mg/l	ml	mg/l	mg/l
Solution étalon (solution à blanc)	0,00	25	0,001 à 0,005	———
Solution étalon	0,20	25	0,003 à 0,011	0,005 à 0,011
Eau de rivière	4,40	1,0	0,07 à 0,22	0,07 à 0,43
Eau de rivière	9,18	0,5	0,13 à 0,54	0,16 à 0,98
Eau de rivière	10,0	0,5	0,06 à 0,09	0,05 à 0,12

*) Valeurs maximales et minimales obtenues par l'essai. Toutes les valeurs ont 9 degrés de liberté.

ANNEXE 3

RESULTATS BRUTS DES EXPERIENCES

Expérience 1

Système 1

Temps (heure)	NH4+ (µM)	NO2- (µM)	NO3- (mM)
0	4,6	1,7	0,115
1	4,6	2,4	0,115
2	7,7	1,7	0,123
3	11,4	1,7	0,105
4	13,4	1,6	0,108
5	18,6	1,5	0,094

Système 2

Temps (heure)	NH4+ (µM)	NO2- (µM)
0	4,6	1,7
1	5,1	1,9
2	14,2	1,9
3	6,7	2,0
4	13,0	2,0
5	8,5	2,0

Système 4

Temps (heure)	NH4+ (µM)	NO2- (µM)
0	4,6	1,7
1	9,3	1,8
2	15,4	1,7
3	19,9	1,7
4	26,9	1,7
5	30,9	1,7

Expérience 2

Syst. 1

Temps (heure)	NH4+ (µM)	NO2- (µM)	NO3- (mM)
0	2,9	2,9	0,231
1	2,9	3,1	0,245
2	8,6	3,1	0,238
3	12,1	3,1	0,265
4	15,9	3,1	0,237
5	19,9	3,2	0,243

Syst.2

Temps (heure)	NH4+ (µM)	NO2- (µM)
0	2,9	2,9
1	5,0	3,0
2	6,3	2,8
3	8,9	2,7
4	10,6	2,6
5	13,5	2,6

Syst. 3

Temps (heure)	NH4+ (µM)	NO2- (µM)	NO3- (mM)
0	2,9	2,9	0,231
1	2,7	3,0	0,254
2	3,7	2,9	0,261
3	4,1	2,9	0,255
4	5,1	2,8	0,243
5	6,7	2,8	0,263

Syst. 4

Temps (heure)	NH4+ (µM)	NO2- (µM)
0	2,9	2,9
1	5,9	2,9
2	12,9	2,6
3	17,9	2,5
4	22,9	2,3
5	27,6	2,3

Expérience 3

Syst. 1

Temps (heure)	NH4+ (µM)	NO2- (µM)	NO3- (mM)
0	5,3	0,3	0,247
1	6,1	0,3	0,245
2	9,3	0,3	0,240
3	12,9	0,3	0,248
4	15,3	0,3	0,257
5	17,7	0,4	0,257

Syst. 2

Temps (heure)	NH4+ (µM)	NO2- (µM)	NO3- (mM)
0	5,3	0,3	0,247
1	6,5	0,3	0,247
2	10,1	0,3	0,240
3	14,0	0,3	0,255
4	18,1	0,3	0,254
5	21,0	0,4	0,254

Syst. 3

Temps (heure)	NH4+ (µM)	NO2- (µM)	NO3- (mM)
0	5,3	0,3	0,247
1	6,5	0,3	0,272
2	7,6	0,3	0,236
3	7,7	0,3	0,255
4	7,7	0,4	0,271
5	5,3	0,4	0,257

Syst. 4

Temps (heure)	NH4+ (µM)	NO2- (µM)	NO3- (mM)
0	5,3	0,3	0,247
1	7,3	0,4	0,241
2	6,6	0,4	0,240
3	7,2	0,4	0,250
4	6,2	0,4	0,263
5	6,3	0,5	0,279

Expérience 5
Seules les concentrations en ammonium (µM) sont rapportées.

Temps (heure)	N-s. 0 mg/l	N-s. 0 mg/l	N-s. 0,5 mg/l	N-s. 0,5 mg/l
0	4,3	4,3	3,5	3,9
1	5,5	4,6	4,0	3,4
2	6,4	6,0	4,2	3,9
3	7,5	6,2	5,6	4,2
4	8,3	7,1	5,8	4,7
5	9,5	7,6	5,5	5,9

Expérience 6
Concentrations en ammonium (µM).

Temps (heure)	N-s. 0,5mg/l	N-s.1mg/l	N-s.5mg/l	N-s.10mg/l
0,5	5,0	3,8	3,8	4,4
1	5,1	4,1	4,2	4,7
1,5	5,7	4,5	4,2	5,3
2	5,8	5,1	4,7	5,9
2,5	6,3	5,2	4,7	6,3
3	6,2	4,9	4,7	5,9
3,5	6,4	5,7	4,1	6,7
4	6,9	6,1	4,9	6,9
4,5	7,2	6,3	4,9	7,8

Expérience 7
Concentrations en ammonium (µM).

Temps (heure)	alcool	N-s. 5mg/l	N-s. 5mg/l	N-s. 5mg/l
0	11,4	10,3	10,3	9,8
0,5	10,1	9,2	9,3	9,0
1	10,5	9,4	9,3	9,4
1,5	10,6	9,4	9,0	8,6
2	10,7	9,7	9,0	9,3
2,5	10,5	9,9	9,4	10,2
3	10,2	11,0	8,3	9,3
3,5	11,0	10,6	8,3	9,5
4	12,5	12,3	9,9	10,9
4,5	13,1	13,0	9,4	10,5
5	12,9	13,9	10,2	11,3

ANNEXE 4

PREPARATION DE LA SOLUTION DE N-SERVE

La N-serve est généralement dissous dans un mélange d'eau et de solvant organique (acétone ou alcool), exemple :

5 % d'éthanol dans l'eau (Powell and Prosser, 1986)

Nous avons préparé une solution de N-serve à 4 mg/l dans un solvant composé d'éthanol à 10% et d'eau déminéralisée. Dans cette solution une partie du soluté cristallise à la surface de la solution. Alors, il n'est plus possible de prélever une quantité précise de N-serve, une erreur par défaut étant introduite.

Nous avons fait des essais en modifiant les proportions d'alcool et d'eau dans le solvant. L'alcool pur est le seul solvant qui permet une dissolution complète du soluté.

Une solution de N-serve à 20 mg/l est la plus concentrée que nous ayons préparée.

Les concentrations des solutions de N-serve utilisées dépendent de la quantité que l'on veux prélever, sachant que la précision augmente avec le volume et que ce volume doit être réduit puisque le solvant est un substrat de bactéries hétérotrophes. Le développement bactérien éventuellement engendré est succeptible d'immobiliser de l'azote minérale.

Nous avons choisi d'introduire dans les systèmes de terrain des volumes d'alcool de environ 5 ml.

ANNEXE 5

CALCUL DE LA VITESSE DE NITRIFICATION

Conc. finale N-ser. (x) mg/l	Acc.NH4+ phase1 (µM/h)	Acc.NH4+ phase2 (µM/h)	Diff. Acc. NH4+ (µM/h)	Vitesse oxydation de NH_4^+ (µmol N-NH_4^+/h/m2)
syst.1 (0,5)	0,66	0,73	0,07	20
syst.2 (1)	0,74	0,94	0,19	57
syst.3 (5)	0,43	0,80	0,37	108
syst.4 (10)	1,00	1,13	0,14	41
				Vitesse potentielle de nitrification (µmol N-No_3^-/h/m2)

Diff. Acc. NH_4^+ (entre phases 2 et 1) = Acc. NH_4^+ (ph. 2) - Acc. NH_4^+ (ph. 1)

Le diamètre d'une cloche benthique grand modèle est de 30 cm. Donc la surface de sédiment enfermé dans celle-ci est de :
$0,15^2 * 3,14 = 0,071\ m^2$

La hauteur d'eau dans la cloche est de 30 cm. Donc le volume d'eau enfermé dans une cloche est de :
$0,071*0,30 = 0,0213\ m^3$ soit 21,3 litres

Vitesse oxydation NH_4^+ = Diff. Acc. NH_4^+(ph. 2-1) / Surface sédiment ($0,071\ m^2$)

exemple : $0,07 * 21,3 / 0,071 = 20$ µmol N-$NH_4^+/m^2/h$

RQ : Une molécule de NH_4^+ est transformée en une molécule NO_3^- par la nitrification.

Vitesse oxydation de l'ammonium = Vitesse potentielle de nitrification
(µmol N-$NH_4^+/m^2/h$) (µmol N-$NO_3^-/m^2/h$)