



HAL
open science

Impacts des rejets de stations d'épuration sur la communauté bactérienne : études in situ et expérimentale

Géraldine Audie-Liebert

► To cite this version:

Géraldine Audie-Liebert. Impacts des rejets de stations d'épuration sur la communauté bactérienne : études in situ et expérimentale. Sciences de l'environnement. 2000. hal-03796616

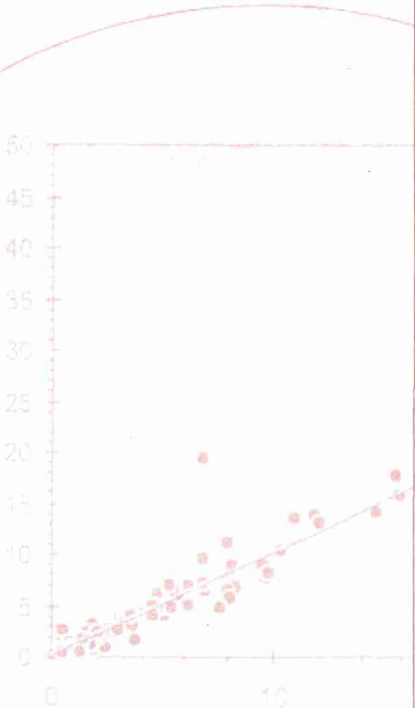
HAL Id: hal-03796616

<https://hal.inrae.fr/hal-03796616>

Submitted on 4 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.



**IMPACTS DES REJETS DE
STATIONS D'EPURATION SUR
LA COMMUNAUTE
BACTERIENNE : ETUDES IN
SITU ET EXPERIMENTALE.**

Géraldine AUDIE-LIEBERT



Département Gestion des Milieux Aquatiques
Unité de Recherche Qualité des Eaux
50, avenue de Verdun, B.P. 3
33612 CESTAS Cedex
☎ : 05 57 89 08 00
fax : 05 57 89 08 01

OCTOBRE 2000

REMERCIEMENTS

Je remercie Michel Marieu, directeur du Groupement de Bordeaux du Cemagref, et François Delmas, chef de l'unité « Qualité des Eaux », de m'avoir accueillie au sein de leur établissement.

Je remercie Henry Beuffe pour m'avoir proposé cette étude et aidé à la réaliser.

Je remercie également Matthieu Torre pour tous ses conseils, sa disponibilité et son aide précieuse tout au long de ce stage.

Je remercie vivement Régis Longeard, stagiaire à la division « Qualité des Eaux », pour son aide et sa collaboration.

Enfin, je tiens à remercier les techniciennes du laboratoire de chimie pour avoir pris en charge les mesures chimiques, ainsi que tout le personnel de l'unité Qualité des Eaux pour leur accueil.

SOMMAIRE

	pages
① PRESENTATION DE L'ORGANISME D'ACCUEIL	
② INTRODUCTION	1
③ PRESENTATION DU PROGRAMME GIS ECOBAG	2
④ SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	
I- Le périphyton	
A) Définitions, généralités	3
B) Estimation de l'importance des peuplements périphytiques	4
① Le périphyton bactérien	
② Le périphyton algal	
③ Importance quantitative du biofilm bactérien et algal	
C) Relations bactéries / algues périphytiques	5
D) Facteurs environnementaux influençant le biofilm	
① L'éclairement	6
② Le courant	6
③ La charge nutritive de l'eau	7
E) Dynamique de croissance du périphyton sur un support artificiel	7
II- Les bactéries des milieux aquatiques	
A) Rôle des bactéries dans l'eau	7
B) Notion de bactéries autochtones et allochtones	
① Les bactéries autochtones	7
② Les bactéries allochtones	8
C) Mesure de l'impact des rejets urbains sur la communauté bactérienne	8
⑤ ETUDE EXPERIMENTALE	
I- But de l'étude et déroulement des opérations	
A) But de l'étude	10
B) Déroulement des opérations	
① Présentation du site d'étude	10
② Campagnes de terrain	11
II- Matériels et méthodes	
A) Protocole expérimental	
① Expérimentations à partir des prélèvements de terrain	11
② Expérimentations de laboratoire : les canaux	12

	pages
B) Les paramètres physicochimiques retenus pour l'analyse de l'eau	15
❶ Les formes d'azote	
❷ Les formes de phosphore	
❸ Matières en suspension et matières volatiles en suspension	
C) Les paramètres biologiques	
❶ Les bactéries	
a) Numération bactérienne et biovolumes	16
b) Mesure de l'activité bactérienne	17
❷ Les algues : la chlorophylle a	18
III- Expérimentations de terrain	
A) Campagne du 13 juin	19
B) Campagne du 18 juillet	22
C) Campagne du 08 août	26
D) Campagne du 22 août	30
E) Conclusion	33
IV- Expérimentation de laboratoire : préparation de l'inculum	
A) Protocole de l'expérimentation	36
❶ Le type de support	
❷ L'alimentation du canal	
❸ Le déroulement de l'expérimentation	
B) Prélèvement du biofilm	37
C) Résultats de l'expérimentation	
❶ Paramètres bactériologiques	37
❷ Biomasse chlorophyllienne	40
❸ Synthèse	41
V- Expérimentation sur la charge en phosphore sur le comportement du biofilm	
A) Protocole	
❶ La phase de mesure	42
❷ Les prélèvements de biofilm	42
❸ Les analyses chimiques	42
❹ Les analyses biologiques	43
B) Les résultats	
❶ Evolution des concentrations en orthophosphate et nitrate	44
a) L'orthophosphate	
b) Les nitrates	
❷ Evolution de la biomasse chlorophyllienne	46
❸ Evolution de la numération bactérienne	47
❹ Etude de la croissance bactérienne et algale en fonction de la consommation en nutriments	47
❺ Synthèse	54

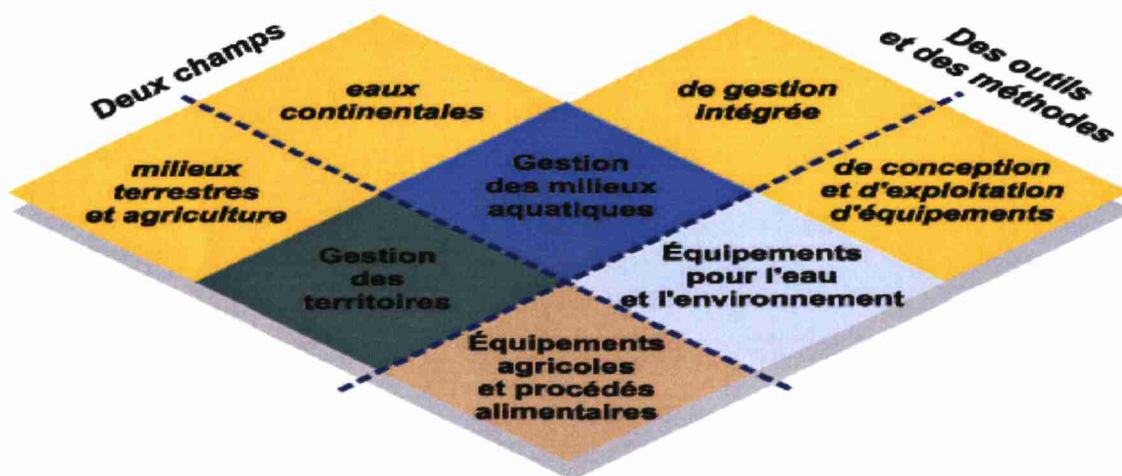
BIBLIOGRAPHIE

ANNEXES

① PRESENTATION DE L'ORGANISME D'ACCUEIL

Généralités

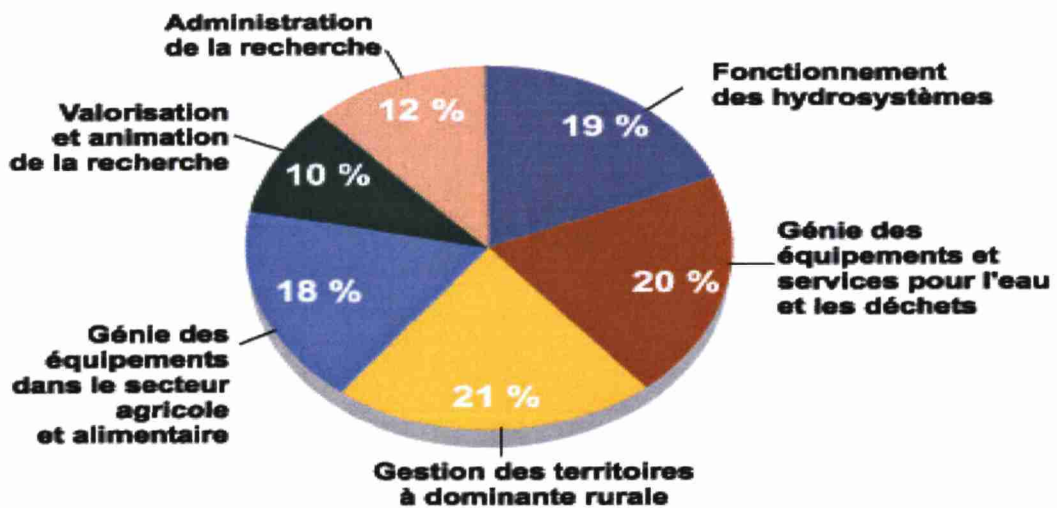
Le Cemagref est un établissement public de recherche finalisée pour l'ingénierie de l'agriculture et de l'environnement. Il intervient dans deux grands domaines : la gestion des milieux aquatiques et la gestion des territoires et de l'agriculture. Il apporte un appui aux collectivités économiques de l'agro alimentaire et une aide à la décision publique. Pour mener ses recherches, le Cemagref s'appuie sur quatre départements scientifiques complémentaires : Gestion des Milieux Aquatiques, Equipements pour l'Eau et l'Environnement, Equipements Agricoles et Alimentaires, Gestion des Territoires. Trente cinq unités de recherche sont rattachées à ces départements et sont réparties dans dix centres régionaux.



Les quatre départements scientifiques au croisement des méthodes et des champs de recherche

Le Cemagref est un institut de recherche à taille humaine avec ses 1 000 personnes dont 450 ingénieurs et chercheurs. Leurs compétences, centrées sur les sciences de l'ingénieur, intègrent les sciences de la nature et du vivant, les sciences de l'univers et mobilisent les sciences humaines et sociales. Leur origine diversifiée facilite la construction de partenariats variés. Le Cemagref accueille en moyenne une centaine de thésards et 500 stagiaires de longue durée.

Les diverses activités du Cemagref sont résumées dans le schéma suivant.

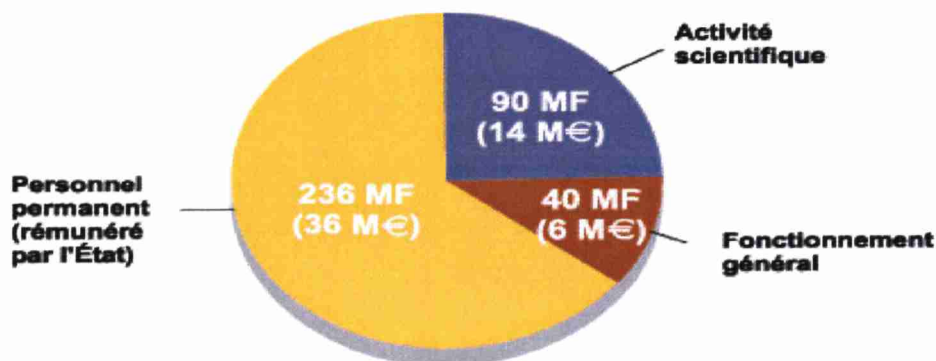


Répartition des effectifs du Cemagref

Outre la contribution au progrès des connaissances, le Cemagref diffuse des méthodes de diagnostic et de contrôle, il développe des outils de négociation et de gestion, il conçoit des technologies innovantes et apporte son expertise aux services publics et aux entreprises.

Les ressources du Cemagref

En 1999 le budget était de 366 millions de francs.



Le budget du Cemagref

Le centre de Bordeaux

Il est organisé en quatre unités de recherche : Agriculture et Dynamique de l'Espace Rural (A.D.E.R.), Ouvrages et Réseaux Hydrauliques (O.R.H.), Qualité des Eaux (Q.E.) et Ressources Aquatiques Continentales (R.A.C.). Le centre intervient également dans la logistique des transports de produits alimentaires sous température dirigée grâce à un laboratoire d'essai du Groupe d'Intérêt Economique (G.I.E.) Cemafroid.

Implanté à Bordeaux Cestas, le Cemagref conduit des recherches pour développer des méthodes de gestion et des procédés dans les domaines de l'agriculture, de l'environnement et des services collectifs au service des entreprises, des concepteurs d'équipement et des collectivités publiques.

La préservation, la restauration et la gestion des milieux aquatiques et des territoires, ainsi que la gestion technique des services publics d'eau et d'assainissement, sont les objets principaux des recherches conduites à Bordeaux.

Unité Qualité des Eaux

L'unité mène d'une part des recherches et des activités d'appui technique relatives aux altérations des milieux aquatiques continentaux, en liaison avec leurs différents usages, en vue de réduire les impacts subis et de restaurer leur qualité. Dans ce cadre, des travaux sont menés

- pour étudier les flux de pollutions (nutriments, pesticides...) à l'échelle de bassins versants, en relation avec les conditions pédo-climatiques, l'occupation du territoire et les pratiques humaines ;

- pour identifier l'impact de pollutions diffuses et ponctuelles au travers du comportement de certaines communautés végétales (bio-indication) ;

- pour évaluer la capacité d'assimilation des hydrosystèmes liée au compartiment végétal (macrophytes, algues et bactéries).

L'objectif est de mettre à profit les connaissances accumulées grâce à ces actions de recherche pour appuyer la surveillance, la gestion opérationnelle, voire la restauration des écosystèmes aquatiques.

D'autre part, en appui aux politiques publiques et aux régimes d'aide à l'investissement, elle mène des travaux sur l'épuration de certaines eaux usées, portant notamment sur le dimensionnement des ouvrages et sur l'ingénierie des procédés. Les 2 domaines principaux d'application actuels concernent les filières d'épuration des effluents vinicoles et les systèmes d'épuration à biomasse fixée. Des développements d'activités sont envisagés sur le traitement de l'azote et sur l'intérêt des systèmes à membranes pour l'épuration des eaux usées urbaines.

A terme, il est envisagé de faire converger une partie des travaux de l'équipe "Hydrobiologie des écosystèmes" et de l'équipe "E.puration" au service de recherches visant à l'adaptation des filières de traitement et de la stratégie de rejets, en fonction des caractéristiques et des potentialités du milieu récepteur.

Les approches développées au sein de l'unité conjuguent des mesures et expérimentations pratiquées sur le terrain, en systèmes aquatiques naturels d'eaux douces de surface (lacs, rivières bassins versants) ou sur stations d'épuration, et des investigations de laboratoire pratiquées en canaux, microcosmes, pilotes...

Elles s'appuient sur les analyses physico-chimiques réalisées au sein du laboratoire d'analyse des eaux et des effluents de la Division.

Des synergies inter-unités de recherche sont développées avec plusieurs équipes du Groupement de Bordeaux et d'autres groupements du Cemagref, pour appréhender de façon plus complète et pluridisciplinaire le fonctionnement intégré des bassins versants soumis à des activités humaines polluantes (agriculture, rejets urbains et industriels).

② INTRODUCTION

La Garonne entre Toulouse et Agen, présente une succession de mouilles et de radiers. Ces zones peu profondes, à fond de galets, induisent un fort taux de transfert des masses d'eau. Le phytoplancton ne trouve donc pas un milieu favorable à son développement, bien que les teneurs en azote et phosphore ne soient pas négligeables. La colonisation périphytique est par contre très importante. La chlorophylle phytoplanctonique, paramètre utilisé comme indicateur de niveau trophique, n'est pas ici un critère de choix pour évaluer la qualité du milieu.

Il faut donc développer d'autres outils pour quantifier cette eutrophisation c'est à dire d'essayer de déterminer si les charges en azote et en phosphore sont compatibles avec l'équilibre biologique du fleuve. L'étude du biofilm bactérien et, plus précisément, la vitesse de colonisation du biofilm constitue un de ces outils, le périphyton étant le principal compartiment producteur de biomasse de cet hydrosystème. Effectivement, tout changement de la qualité de l'eau des rivières provoque une perturbation de leurs biocénoses benthiques. C'est sur ce postulat que repose le concept fondamental de la surveillance biologique des cours d'eau. En effet les organismes sédentaires du benthos ou les algues du périphyton sont les mieux adaptés pour répondre rapidement aux actions anthropiques sur les écosystèmes lotiques. De récentes études ont établi que la croissance du biofilm détermine souvent le taux auquel les nutriments sont transportés et dégradés dans le milieu (Carey et al., 1984 ; Gantzer et al., 1988).

Le but de ce travail est de tenter de définir la relation taille des cellules bactériennes - niveau trophique de la masse d'eau et d'étudier l'adaptation du périphyton à des modifications de la qualité de l'eau.

Ces recherches s'inscrivent dans le programme GIS ECOBAG, plus précisément le programme scientifique P1 Hydrologie de la Garonne. Ce programme est présenté de façon succincte à la page suivante.

**③ PRESENTATION
DU PROGRAMME GIS ECOBAG**

Le GIS ECOBAG a été créé en 1995 afin d'harmoniser les recherches portant sur le Bassin Adour-Garonne et de permettre les synergies inter-équipes.

Ce programme a pour objectif de décrire les relations entre le fonctionnement du fleuve Garonne et les transformations bio-physicochimiques responsables de l'évolution des composés biogéniques. De plus il vise à analyser les relations entre les caractéristiques physiques et chimiques de l'habitat et les structures des peuplements (algues, invertébrés benthiques, poissons).

Il regroupe 13 partenaires appartenant aux Universités, au CNRS, et à divers instituts de recherche nationaux et régionaux parmi lesquels le Cemagref de Bordeaux, le CESAC de Toulouse, l'IMFT de Toulouse ; il structure diverses actions à l'intérieur des cinq programmes suivants :

- **P1 Hydrologie de la Garonne** : ce programme scientifique vise à accroître la connaissance du fonctionnement biogéochimique du fleuve en vue de mieux le gérer. Pour cela les relations entre les débits de la Garonne à l'étiage et sa qualité bio-géochimique (azote, phosphore, carbone, oxygène) sont étudiées ainsi que la capacité d'assimilation de cet hydrosystème.

- **P2 Impacts** : il s'intéresse aux impacts sur l'hydrosystème Garonne des pollutions agricoles, des contaminants métalliques, des extractions de granulats, ainsi qu'à l'incidence de l'occupation des terres sur l'équilibre du cours d'eau et de la ripisylve.

- **P3 Hydrobag** : ce programme est relatif au bilan hydrique régionalisé du Bassin Adour-Garonne.

- **P4 Politique de l'eau et usages** : il est centré sur les acteurs, les enjeux et les outils (SDAGE, SAGE) de la planification de l'eau.

- **P5 Economie de l'eau** : il porte sur les aspects ayant trait aux économies d'eau d'une part, à l'évaluation des actifs naturels, à l'identification des bénéfices marchants et des aménités d'une politique de l'eau d'autre part.

④ SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

La communauté bactérienne des cours d'eau est très diversifiée et très hétérogène. Block et Colin (1985) distinguent schématiquement plusieurs groupes :

- une population libre ou planctonique qui concerne les individus entraînés au fil de l'eau sous forme de cellules réellement individualisées ;
- une population sous forme de petits agrégats composés d'une ou plusieurs bactéries fixées sur des matériaux particuliers de quelques dizaines de microns (support inorganique, algues, etc.) en suspension dans l'eau ;
- une population caractérisée par des bactéries fixées sur des supports immergés : pierres (population épilithique), plantes aquatiques (population épiphytique), supports artificiels (coque de bateau, pile de pont...) ;
- une population benthique fixée, comme son nom l'indique, au niveau du benthos, en surface (population épibenthique), ou en profondeur dans la masse du sédiment où prédominent des conditions d'anaérobiose (population herpobenthique).

I-Le périphyton

A) Définitions, généralités

Le périphyton est l'ensemble des organismes se développant sur un substrat immergé naturel ou artificiel, organique ou minéral, vivant ou mort. Il correspond à une communauté complexe et hétérogène pouvant inclure algues, bactéries, champignons, protozoaires, petits invertébrés et détritiques organiques ou non. L'ensemble est généralement inclus dans une matrice polysaccharidique sécrétée par les organismes du biofilm.

Différentes terminologies désignent ces communautés : biofilms, biodermes et périphyton. Le terme périphyton est très couramment employé ; il doit son origine au terme "haptobentos" qui désigne tout organisme vivant sur un substrat solide. En fonction des substrats on distingue ainsi principalement :

- le périphyton "épilithique" : se développe sur substrat dur (pierre ou tout autre substrat artificiel, céramique, métal, plastique...) ;
- le périphyton "épiphytique" : sur des plantes aquatiques ;
- le périphyton "épixilyque" : se développe sur bois ;
- le périphyton "épisamnique" : sur le sable ;
- le périphyton "épizoïque" : se développe sur un organisme animal.

Ces communautés tirent leurs ressources de l'énergie lumineuse et de la colonne d'eau où elles puisent des composés organiques et minéraux (sous forme dissoute, colloïdale ou particulaire). Grâce à sa fraction algale, le périphyton est considéré comme étant un producteur primaire important, notamment dans les écosystèmes lotiques, et donc une source non négligeable de nourriture pour les organismes brouteurs.

Le périphyton représente un microcosme fonctionnel qui inclut des processus internes autotrophes et hétérotrophes et joue le rôle d'interface entre le substrat et la colonne d'eau. En ce sens, il peut influencer notablement les cycles biogéochimiques et la dynamique de l'ensemble de l'écosystème rivière.

B) Estimation de l'importance des peuplements périphtiques

Diverses méthodes ont été développées au cours des dernières années. Elles permettent de mesurer les abondances et biomasses bactériennes ou algales. Les mesures obtenues se rapportent à une surface unitaire de support colonisé.

1- Le périphyton bactérien

Il est essentiellement quantifié par numération ou par des mesures de biomasses.

Pour les numérations bactériennes, la méthode de dénombrement par microscopie en épifluorescence est de plus en plus couramment employée. Ce mode d'observation nécessite l'emploi de fluorochromes spécifiques des acides nucléiques bactériens. Si cette méthode permet de mettre en évidence des formes cellulaires particulièrement fines, elle ne permet pas une observation très détaillée de la morphologie.

La biomasse, c'est à dire la masse de matière vivante (matière fraîche ou poids humide), peut être simplement déterminée par pesée après élimination de l'eau non constitutive. La détermination des biovolumes peut conduire à l'estimation de la biomasse ainsi que de la minéralomasse (contenu des cellules en éléments minéraux : carbone, azote, phosphore).

2- Le périphyton algal

La concentration en chlorophylle a est une mesure indirecte de la biomasse algale. Cette technique passe par l'extraction des pigments dans l'acétone. L'application des équations de Lorenzen (1967) aboutit à l'estimation de la teneur en chlorophylle a.

3- Importance quantitative du biofilm bactérien et égal

Dénombrement bactérien

Au cours de l'été 1994, Sollier réalise une étude sur le périphyton bactérien du fleuve Charente développé sur support naturel. En amont de tout rejet polluant, elle observe des densités de l'ordre de $2 \cdot 10^6$ bactéries/cm² de support. En aval du rejet de la station d'épuration d'Angoulême, le nombre de bactéries atteint un maximum de $7 \cdot 10^8$ bactéries/cm².

De même, Jones et Lock (1989), dans les études sur les biofilms épilithiques, obtiennent des densités entre 5 et $70 \cdot 10^5$ bactéries/cm².

Fry (1985), déterminent par la méthode de coloration au bleu d'aniline, la densité bactérienne développée sur trois types de plantes aquatiques (*Nasturtium officinale*, *Apium nodiflorum*, *Callitriche sp.*). Le nombre de bactéries est similaire et compris entre 0,5 et $3,5 \cdot 10^7$ bactéries/cm².

Sur support artificiel (feuilles de polypropylène), Sollier note en amont de tout rejet, des densités comprises entre $5 \cdot 10^7$ bactéries/cm² à 1,5 mètres de profondeur et $1 \cdot 10^9$ bactéries/cm² à 0,3 mètres. En aval des rejets, le nombre de bactéries est compris entre $9 \cdot 10^6$ bactéries/cm² à 1,5 mètres et $2 \cdot 10^9$ à 0,5 mètres.

Percherancier (1994) étudie les densités bactériennes développées en canaux expérimentaux alimentés par une eau de rivière (Saône) à un débit de 2,5 ml/mn. Elle obtient des biofilms dont le nombre de cellules est compris entre 1 et $20 \cdot 10^5$ bactéries/cm² quelque soit le support artificiel.

Dénombrement algal

Moss, en 1968, est le premier à avoir établi à partir de son propre travail et de données bibliographiques une échelle de biomasse algale pour différents habitats.

Nature du biofilm	Contenu en chlorophylle a (mg/m ²)
Epiphytique	110 à 2350
Epilithique	127 à 1200
Episamnique	86
Epipélique	2,1 à 66,5

Divers travaux scientifiques sur la colonisation épiphytique indiquent des biomasses algales comprises entre 33 et 888 µg chla/g de plante (poids sec).

Lahoun (1994) note que la biomasse algale maximale développée sur des feuilles de polyéthylène dans le fleuve Charente est de 49 mg chla/m² en amont de tout rejet polluant ; elle est de 70 mg chla/m² en aval.

Fairchild (1992) donne une valeur de 8 mg/m² pour l'épilithon se développant sur des pots d'argile.

Il a été mis en évidence que la biomasse épilithique théorique maximale obtenue dans des canaux en laboratoire, avec des conditions optimales de lumière, sans broutage et avec un écoulement et un substrat stable, est de 560 mg chla/m² sur des lames en plexiglas (Horner et al., 1983), 1000 mg chla/m² sur des cailloux (Walton, 1990).

C) Relations bactéries/algues périphytiques

Dans diverses situations naturelles, algues et bactéries exercent entre elles des influences considérables concourant à la stabilité de la communauté.

Beaucoup d'auteurs se sont intéressés à l'influence des algues sur les bactéries. En effet, il a été fréquemment montré que les densités bactériennes sont corrélées positivement aux biomasses algales, suggérant que les algues agissent sur les densités bactériennes. Différents travaux ont démontré que les bactéries utilisent des exsudats organiques algaux libérés dans le biofilm. Ces éléments algaux constituent des sources de carbone facilement assimilable par les bactéries. Toutefois les exsudats de poids moléculaire trop élevé doivent au préalable subir une hydrolyse exoenzymatique (Lancelot, 1984).

Pour expliquer la nature de l'action bactérienne sur les algues, plusieurs travaux ont été réalisés ; ainsi certains attribuent l'augmentation du taux de croissance algal à la libération par les bactéries de facteurs de croissance (Ukeles et Bishop, 1975). D'autres suggèrent que la décomposition par les bactéries de substrats azotés libère des produits simples utilisables par les algues comme une source d'azote (Parker et Bold, 1961).

D'autres hypothèses sont également avancées :

- les bactéries peuvent fournir une source importante de CO₂ pour les algues ;
- elles ont la faculté de modifier le pH par leur métabolisme (Parker et Bold, 1961) ;
- elles éliminent les métabolites autotoxiques produits par l'algue elle-même (Hamburger, 1958) ;
- elles servent de support pour les algues ; cette possibilité a été mise en évidence par Allanson en 1973 par microscopie électronique.

D) Facteurs environnementaux influençant le biofilm

De nombreux facteurs interviennent à des degrés divers au niveau de la formation du biofilm et de son maintien. Parmi ceux-ci, on trouve notamment le type de support, l'éclairement, les turbulences (vitesses du courant, orages), la pression de broutage (qui conduit à une diversité et une abondance périphytique très variables), la charge nutritive de l'eau. Nous ne développerons ici que l'éclairement, la vitesse du courant et la charge nutritive de l'eau.

1- L'éclairement

C'est le facteur majeur pour le développement de la communauté autotrophe, qu'elle soit fixée à un support (périphyton) ou en suspension dans la colonne d'eau (phytoplancton).

Caplanc (1979) insiste sur le fait que la profondeur d'immersion des substrats artificiels détermine en grande partie l'importance du développement des autotrophes. L'analyse des profils verticaux de la colonisation traduit une inhibition de la photosynthèse en surface, un maximum de synthèse chlorophyllienne à 0,5 mètres et généralement un minimum à 2 mètres par insuffisance de l'énergie lumineuse (Lahoun, 1994).

2- Le courant

La vitesse du courant influence directement la croissance du biofilm. En effet, diverses études ont montré que les courants forts peuvent favoriser la croissance en augmentant le transport des nutriments de la colonne d'eau vers la surface colonisée ; cependant il faut noter un décrochage d'éléments du biofilm dû aux forces érosives.

Lau (1993) est l'un des rares auteurs à s'être demandé dans quelle mesure l'accumulation de biomasse était affectée. Il a pour cela étudié la formation du biofilm pour différentes intensités de courant et note les résultats suivants :

<u>Vitesse du courant</u>	<u>Accumulation de biomasse</u>
30 cm/sec.	Biomasse * 25
Eaux stagnantes : 3,4 cm/sec.	Biomasse * 3
1,5 cm/sec	

3- La charge nutritive de l'eau

Horner (1981) pense quant à lui que l'effet de la vitesse du courant sur la croissance du périphyton est fortement lié à la concentration en éléments nutritifs.

Les éléments nutritifs carbonés, azotés ou phosphorés présents dans la colonne d'eau sont à la base du fonctionnement de la chaîne trophique et expliquent ainsi que les biomasses algale et bactérienne seraient si étroitement corrélées avec l'état trophique de l'eau.

E) Dynamique de croissance du périphyton sur un support artificiel

Des expériences destinées à définir la dynamique de colonisation des substrats artificiels par le périphyton ont été conduites en 1983 par Watanabe et Capblanc, sur des stations situées à l'amont et à l'aval de rejets de stations d'épuration en rivière.

Elles ont mis en évidence une colonisation initiale des substrats due aux communautés bactériennes hétérotrophes, celles-ci représentant plus de 70 % de poids de matière organique à l'issue de la première semaine d'immersion. Leur biomasse atteint un maximum après 15 jours d'immersion des substrats.

II- Les bactéries des milieux aquatiques

A) Rôle des bactéries dans l'eau

Les bactéries utilisent la matière organique dissoute et elles sont consommées par les micro flagellés eux même consommés par le zooplancton.

Elles ont un rôle prépondérant dans le recyclage de cette matière organique donc dans l'équilibre écologique. D'après Finance (1985), cette efficacité est due :

- à la grande diversité de leurs réactions métaboliques qui leur permet de s'adapter à diverses sources de nourriture et d'hydrolyser une grande variété de composés organiques ;
- à leur adaptation métabolique très forte selon les conditions environnementales (température, oxygénation, salinité), certaines d'entre elles pouvant même interrompre leur cycle de vie par une étape de quasi-dormance si les éléments nutritifs viennent à manquer.
- à leur petite taille et, par conséquent, à la valeur élevée du rapport surface/volume qui leur permet de transformer les matières organiques présentes à des taux faibles. Le transport rapide des substances nutritives à l'intérieur de la cellule leur assure ainsi une activité métabolique intense.

B) Notion de bactéries autochtones et allochtones

1- Les bactéries autochtones

D'après Schwartzbrod (1985), ce type de bactérie d'eau douce possède les caractères communs suivants :

- capacité de croître en présence de faibles concentrations en nutriments (rencontrés dans les eaux douces non polluées ou ne recevant pas d'apports significatifs d'origine terrestre) ;
- mobilité fréquente, soit par des flagelles, soit par différents mécanismes (glissement).

Dans nos expérimentations, nous considérerons que les populations bactériennes naturellement présentes dans l'hydrosystème sont autochtones.

2- Bactéries allochtones

Cette catégorie de bactérie est considérée comme des membres « passagers », transitoires de l'écosystème. Elles peuvent être transportées et croître dans un écosystème étranger ; leur temps de survie est variable, certaines disparaissent rapidement, d'autres sont capables d'y survivre pendant des périodes prolongées. Enfin, certaines ont des possibilités de s'adapter en formant des spores qui vont accroître leur survie. Ce sera le cas des germes pathogènes par exemple.

Il est difficile de déterminer si le micro-organisme trouvé dans un écosystème particulier est autochtone ou allochtone. Les écosystèmes sont dynamiques et présentent des changements continus, les micro-organismes peuvent être actifs, pendant une période déterminée puis dormants au cours d'une autre période. De plus quelques micro-organismes sont dans des écosystèmes situés à la frontière de leur habitat.

Ils survivent souvent pendant de longues périodes avant d'être déplacés par compétition avec les micro-organismes autochtones. Enfin, les micro-organismes allochtones qui entrent dans des écosystèmes sont capables d'y survivre mais également de s'y développer. Soit, ils colonisent alors des niches inoccupées, soit ils remplacent par compétition des micro-organismes de la communauté indigène et deviennent alors des bactéries autochtones.

Dans nos travaux, la microflore apportée par les rejets d'eaux de stations d'épuration sera dite allochtone. Habitée à vivre dans un milieu riche en nutriments, elle s'adaptera souvent rapidement à son nouvel environnement.

C) Mesure de l'impact des rejets urbains sur la communauté bactérienne de la colonne d'eau

La mise en évidence de l'impact des rejets urbains et industriels sur les eaux d'une rivière peut passer par l'étude de sa communauté bactérienne. Gervais et Servais (1989) ont ainsi étudié (par des méthodes d'incorporation de thymidine et de leucine tritiées) l'abondance et la biomasse bactérienne des eaux de la Seine en différentes stations en aval et amont de Paris.

Ils ont alors constaté une augmentation de l'abondance et de la biomasse bactérienne à proximité des rejets suivie d'une rapide diminution en aval. Cette population allochtone est majoritairement constituée de cellules de grande taille qui croissent trois fois plus vite que les cellules de taille inférieure (biovolume moyen de $0,2 \mu\text{m}^3$).

Letarte et Hansen (1992) analysent l'abondance et la production bactérienne en fonction de différentes classes de taille des cellules dans des échantillons d'eaux de lacs à différents états trophiques. L'abondance est déterminée par comptages microscopiques et la production par mesure du taux d'incorporation de thymidine dans l'ADN bactérien. Ils mettent alors en évidence l'importance de la prise en compte de la taille des bactéries pour expliquer les phénomènes de transfert d'énergie et de consommation de la matière organique. En effet, la comparaison de la production bactérienne avec l'abondance, montre qu'il existe une très bonne corrélation pour les bactéries de petite taille, ce qui indique un taux de division plus fort chez ces cellules.

Des études réalisées sur la rivière Charente (Torre et Rebillard, 1992) donnent des indications sur les caractéristiques de la microflore bactérienne sur un secteur subissant les rejets de l'agglomération d'Angoulême. Les cellules observées ont été comptées et mesurées par la méthode DAPI-INT. Cette étude met en évidence une modification des volumes cellulaires moyens, les modifications spatio-temporelles des numérations et de l'activité bactérienne. Ces résultats peuvent correspondre au mélange de deux populations bactériennes, celles de la rivière (autochtones) et celles des rejets (cellules de grande taille, allochtones).

⑤ ETUDE EXPERIMENTALE

I- But de l'étude et déroulement des opérations

A) But de l'étude

Ce travail comporte deux parties que nous pouvons définir comme une de terrain et l'autre de laboratoire. Dans la première partie, nous allons évaluer l'impact des rejets de stations d'épuration (situées sur un tronçon de 140 km de la Garonne) sur la communauté bactérienne de la colonne d'eau en liaison avec la qualité de l'eau. De façon plus précise, nous allons déterminer le volume cellulaire moyen des bactéries présentes en amont et en aval de ces rejets ; ainsi nous essayerons d'établir si ces cellules bactériennes proviennent du rejet ou s'il s'agit de bactéries présentes normalement dans le milieu mais qui ont un volume plus important du fait de teneurs en nutriments (phosphore et azote principalement) plus élevées. Dans la seconde partie nous travaillerons sur des canaux alimentés en eau de la Garonne. Nous étudierons alors l'adaptation du biofilm naturel (périphyton bactérien et algal) à des modifications expérimentales de la qualité de l'eau (à savoir concentrations croissantes en phosphore).

B) Déroulement des opérations

1- Présentation du site d'étude

La Garonne est un fleuve de 520 km de long qui naît en Espagne et se termine peu après Bordeaux où elle rejoint la Dordogne.

Le régime irrégulier de la Garonne (tributaire de la fonte des neiges) en fait un cours d'eau aux crues fréquentes et redoutées. Elle subit à longueur d'année des prélèvements et des rejets susceptibles de modifier fortement son fonctionnement écologique. Les principales influences subies sont :

- prélèvements d'eau (industrie, eau potable et principalement prélèvements pour l'irrigation agricoles),
- pollutions diffuses qui résultent essentiellement de l'impact des activités agricoles (fertilisation, traitements, élevages),
- pollutions ponctuelles : industrielles, effluents urbains.

La Garonne rencontre deux périodes traditionnelles d'étiage :

- une période hivernale où la température basse et l'oxygénation de l'eau sont de nature à limiter les effets néfastes des pollutions ;
- une période estivale aggravée par les importants prélèvements réalisés (notamment les prélèvements saisonniers d'irrigation agricole).

Le site d'étude concerne plus précisément un tronçon du fleuve Garonne de 140 km entre Toulouse et Agen. Ce tronçon a été retenu pour les raisons suivantes :

- il est soumis à une eutrophisation non négligeable ;
- il nous permet d'étudier l'impact des rejets de l'agglomération toulousaine ;
- il peut nous indiquer si, sur une telle distance, le fleuve est capable de résorber une partie de cette charge polluante (celle de l'agglomération toulousaine).

2- Campagnes de terrain et expérimentations de laboratoire

Quatre campagnes de terrain ont été menées : le 14 juin, le 18 juillet, le 8 août et le 22 août dans des conditions qui se devaient être identiques, à savoir fleuve à l'étiage, ce qui n'a pas été le cas en juin (fortes pluies).

Pour chaque série de prélèvements nous avons choisi de suivre la masse d'eau dans cinq stations différentes. Les sites de prélèvements se situent en amont et en aval de rejets d'effluents de stations d'épuration et sont présentés à la figure 1.

Station 1 (Pinsaguel) : ce site constitue le point témoin ; il se trouve à environ 12 km en amont de Toulouse.

Station 2 (Gagnac) : située à 28,6 km de Pinsaguel, en aval de la station d'épuration de Toulouse (Ginestous).

Station 3 (Sauveterre St Denis) : à une distance de 128,5 km de la station 1.

Station 4 (Pont Layrac) : à une distance de 134 km de la station 1, en aval d'un rejet de station d'épuration (St Pierre de Gaubert).

Station 5 (Boé) : à 136 km de Pinsaguel.

Après un examen de l'évolution chimique et biologique de la qualité des eaux sur l'ensemble du tronçon, on s'attachera à interpréter ces évolutions en deux secteurs :

- un amont de 30 km avec les stations 1 et 2 et les rejets de l'agglomération toulousaine ;
- un aval de 10 km avec les stations 3, 4 et 5 dont les caractéristiques ont une charge déjà forte en tête de secteur et un petit rejet de station d'épuration.

On notera qu'entre ces deux secteurs, outre la confluence du Tarn, se trouve la retenue de Malauze qui ralentit le régime et a sans doute une incidence sur la qualité des eaux en aval.

Pour les expérimentations sur canaux, nous avons, lors de la campagne de juillet et celle du 08 août, prélevés 100 L d'eau à la station 1 ainsi que des galets recouverts de biofilm. L'eau stockée en chambre froide servira à alimenter et à réapprovisionner les canaux durant plusieurs semaines. Le biofilm des galets constituera l'inoculum de départ.

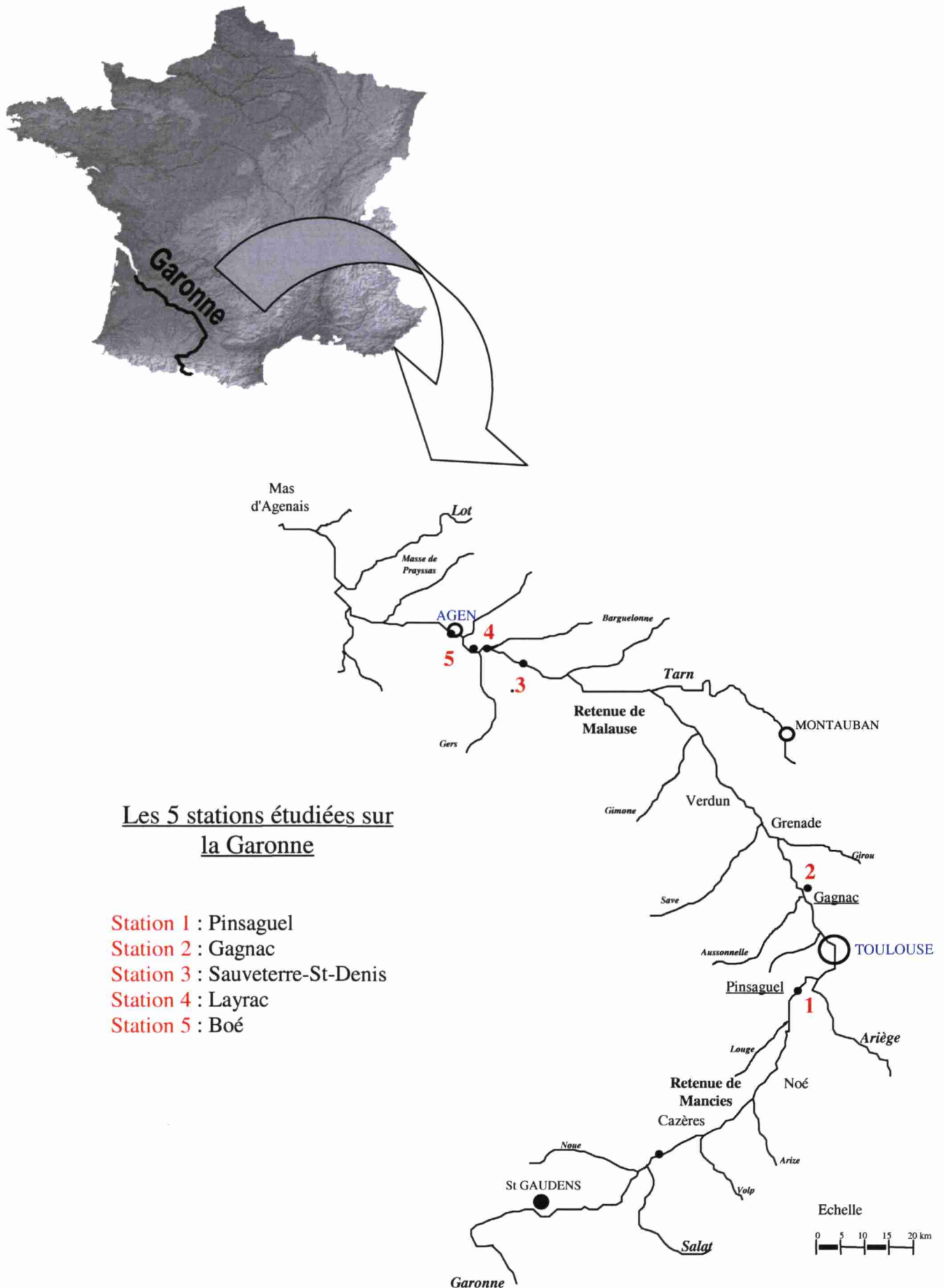
II- Matériel et méthode

A) Protocole et matériel

1- Expérimentations à partir des prélèvements de terrain

Le but est de dénombrer et de mesurer les bactéries de la masse d'eau, par la méthode DAPI - INT.

Localisation de la Garonne et des stations retenues pour l'étude



Pour chaque campagne de terrain, 50 ml d'eau de Garonne ont été prélevés dans des flacons en plastique et stockés au froid jusqu'au retour au laboratoire. 10 ml d'échantillon sont alors prélevés et introduits dans un autre flacon dans lequel on ajoute 1 ml d'INT, 1 ml de KCN et, après 1 heure d'incubation, 0,5 ml de formol. Les échantillons ainsi traités peuvent être stockés au réfrigérateur dans l'attente de l'analyse.

Des prélèvements d'eau ont été également réalisés en vue de l'analyse physicochimique de l'eau (2 L).

2- Expérimentations de laboratoire : les canaux

Le but est de suivre le développement du biofilm colonisant des supports en fonction de la charge en nutriments apportée.

Ce système a été mis au point par Hürlimann lors d'études sur les Diatomées du périphyton.

Le canal est en plexiglas, d'un volume courant d'environ 4,5 L et il est alimenté en eau grâce à une pompe dont le débit peut varier en fonction des conditions expérimentales souhaitées. Le recyclage de l'eau évacuée par le trop plein permet de créer un courant à proximité des supports immergés.

De petite dimension et de conception simple, ce réacteur est intéressant car il permet l'utilisation de supports colonisables de types différents ainsi qu'une mesure aisée des paramètres physicochimiques et biologiques suivis.

Il permet de recréer, en laboratoire et à une échelle réduite, les conditions d'un système en eau courante.

Le dispositif comprend quatre canaux ; chaque canal est alimenté par une pompe aquarium (Zolux Seltz) plongée dans un béccher de 5 litres. Placés dans une enceinte régulée en température, et en luminosité, les canaux sont maintenus à 20°C pour l'ensemble des expériences (cf. photo n°1). Dans chaque canal, des supports en polyéthylène sont disposés, parallèlement et en position verticale (cf. photo n°2)

Les caractéristiques des quatre canaux sont résumées dans le tableau ci dessous :

	Volume réel du canal (contenance)	Nombre de support
Canal 1	4,270 L	5
Canal 2	4,120 L	5
Canal 3	3,990 L	5
Canal 4	4,240 L	5



Photo n°1 : dispositif expérimental

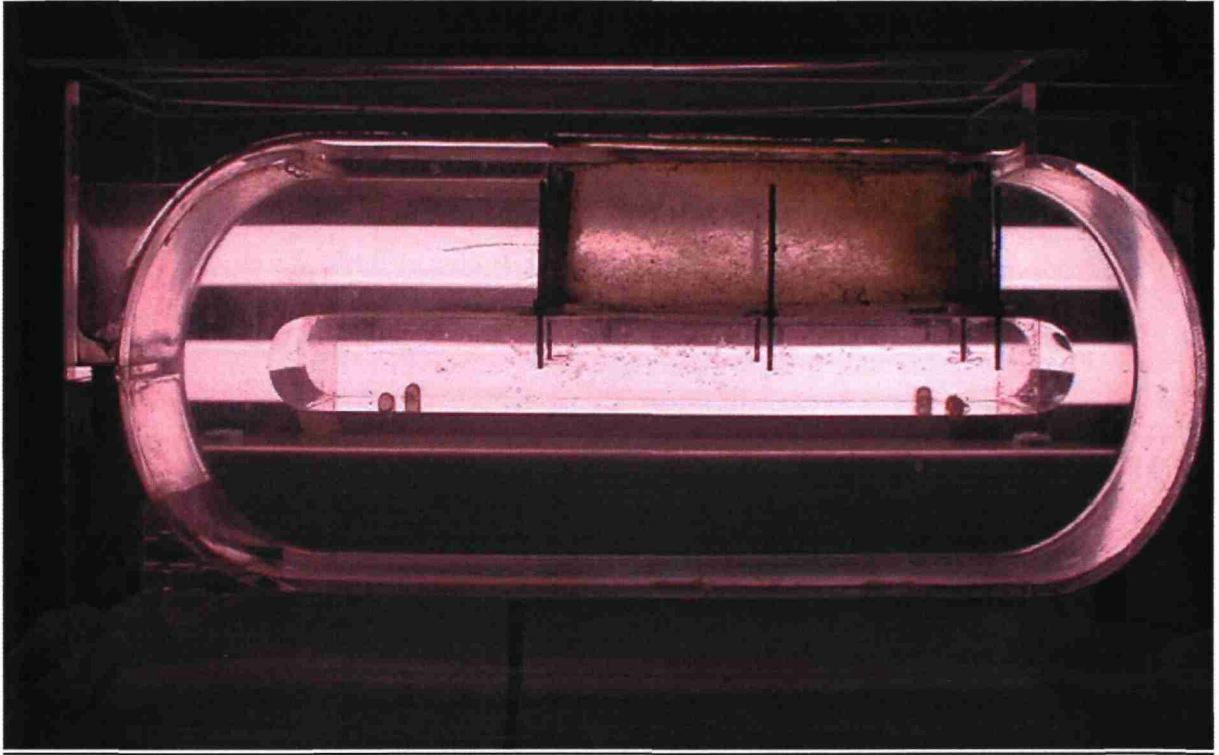


Photo n°2 : canal expérimental (avec film colonisé)

B) Les paramètres physicochimiques retenus pour l'analyse de l'eau

1- Les formes de l'azote

✓ Les ions ammonium

La méthode de dosage est présentée en annexe .

✓ Les nitrites

Le dosage est réalisé suivant la norme AFNOR NF T90.012 (1987) ; le protocole est présenté en annexe .

✓ Les nitrates

Le dosage est également effectué selon la norme AFNOR NF T90.012 (1987) ; la méthode est présentée en annexe.

✓ L'azote Kjeldahl

Le dosage est réalisé à partir de la norme AFNOR T 90-110 décrite dans l'annexe .

2- Les formes de phosphore

✓ L'orthophosphate

Le dosage est réalisé selon la norme AFNOR NF EN 1189 (1997) qui remplace la norme homologuée NF T 90-023 (1982) ; le protocole de dosage est présenté en annexe .

✓ Le phosphore total

Le dosage est également effectué selon la norme AFNOR NF EN 1189 ; la méthode est présentée en annexe.

3- Les matières en suspension et matières volatiles

La détermination des teneurs en matières en suspension et des matières volatiles en suspension n'a été effectuée que pour l'expérimentation de terrain.

Pour cette analyse, 500 ml d'eau de la Garonne (de chaque station étudiée) sont filtrés sur filtres en fibres de verre à l'aide d'une pompe à vide. Au préalable le filtre est pesé après passage au four à 500°C (P_{vierge}). Le filtre est ensuite placé au four à 150°C pendant 2 heures environ. Une fois sec, il est pesé (P_{sec}) et replacé dans un four, cette fois-ci à 500°C pendant deux heures également. Au bout de ce laps de temps, le filtre est de nouveau pesé (P_{four}). Les concentrations en matière en suspension (MES) et en matières volatiles (MVS), exprimées en g/l, sont données par les relations suivantes :

$$\text{MES (g/l)} = (P_{\text{sec}} - P_{\text{vierge}}) * 2$$

$$\text{MVS (g/l)} = (P_{\text{sec}} - P_{\text{four}}) * 2$$

C) Les paramètres biologiques

1- Les bactéries

a) Numération bactérienne et biovolumes

Principe

Un protocole de coloration par la méthode DAPI en microscopie à épifluorescence, associé à une lecture des préparations par caméra vidéo permet le dénombrement des cellules bactériennes. Ce comptage direct des microorganismes requiert l'emploi de fluorochromes spécifiques des acides nucléiques bactériens. Le complexe colorant-cellule ainsi formé, excité en lumière de courte longueur d'onde, réémet une lumière visible dans une longueur d'onde supérieure intense. Les formations bactériennes sont ainsi mises en évidence et peuvent être comptées.

Protocole

Après sonication durant deux minutes à 120 watts, 1 ml de l'échantillon à analyser est prélevé puis filtré sur une membrane noire en polycarbonate de porosité 0,2 µm (Millipore, diamètre 25 mm). La membrane est déposée sur une lame et recouverte de 0,8 ml de DAPI (solution dosée à 10µg/l). Après 10 minutes d'incubation à l'obscurité, la membrane est rincée à l'eau distillée (environ 5 ml) puis séchée à l'air. Enfin, la membrane est montée entre lame et lamelle et deux gouttes d'huile.

Les bactéries sont comptées sur 10 champs microscopiques différents, répartis sur la surface totale du filtre, au grossissement 1000 avec un microscope à épifluorescence.

Le comptage s'effectue à l'aide d'un système vidéo.

** Cas des mesures de terrain*

Pour calculer le nombre X de cellule par ml d'échantillon d'eau de la Garonne, le calcul suivant a été réalisé :

$$X = [(x/10)*100000]/1,25$$

~ Avec :

x : nombre de cellules obtenues sur les 10 champs observés ;

100000 : nombre de champ existants sur la membrane (sur laquelle a été filtré 1 ml d'échantillon) ;

1,25 : facteur de dilution (du à la préparation pour l'INT).

** Cas des mesures de laboratoire*

Avant de réaliser la numération bactérienne, il faut tout d'abord récupérer le périphyton bactérien présent sur le biofilm. Pour cela, chaque bout de polyéthylène est gratté à l'aide d'une pipette stérile. Pour faciliter le décrochage des algues et des bactéries, l'échantillon est soumis à une sonication à 125 watts pendant 2 minutes. Le biofilm est récupéré dans les 10 ml de solution de Ringer ¼ stérile. L'échantillon ainsi obtenu est alors traité comme décrit précédemment (c'est à dire 1ml d'INT + 1 ml de KCN + 0,5 ml de formol).

Afin de déterminer le nombre X de cellules bactériennes présentes sur le biofilm (par cm²) nous avons effectué le calcul suivant :

$$X = (x * 100000 * 12,5) / S$$

~Avec :

x : nombre moyen de cellule par champ ;

100000 : nombre de champs caméra par membrane ;

12,5 : volume total de l'échantillon traité ;

S : surface du support prélevé (cm²).

L'analyse d'image couplée à la microscopie en épifluorescence permet de dénombrer les bactéries mais aussi de déterminer la taille des organismes présents dans les échantillons d'eau de la Garonne ou du biofilm. Le volume V d'une cellule est obtenu en utilisant la formule de Bratbak (1985) :

$$V = 8,5 * S^{2,5} * P^{-2}$$

~ Avec :

S : aire de la section ;

P : périmètre cellulaire

b) Mesure de l'activité bactérienne

Principe

L'utilisation du fluorochrome DAPI permet de dénombrer l'ensemble des microorganismes d'un échantillon. Parmi la totalité de ces cellules, il est possible de distinguer la fraction bactérienne active grâce à l'utilisation de l'INT-formazan qui s'accumule dans les cellules. En effet, la réduction du sel de tétrazolium à l'intérieur des cellules met en évidence l'activité respiratoire bactérienne.

L'INT traverse les parois cellulaires et intervient comme accepteur d'électrons dans les systèmes de transports électroniques respiratoires en détournant le flux de la chaîne des cytochromes de la cellule active. Ainsi, seules les cellules vivantes réduisent l'INT.

Protocole

La solution mère d'INT est dosée à 0,2 mg/100ml et conservée à 4°C à l'obscurité. On ajoute 1 ml d'INT à 10 ml d'échantillon, ainsi qu'un ml de solution de cyanure de potassium dosée à 1,4 mg CN/l. L'ajout de ce sel permet d'inhiber le dernier transporteur d'électrons de la chaîne respiratoire et améliore le marquage. L'échantillon ainsi traité est alors placé à l'obscurité, à température ambiante pendant une heure. Après cette incubation, l'échantillon est fixé avec 0,5 ml de formol.

La suite du protocole opératoire est identique à celui de la coloration au DAPI.

Un résumé des protocoles DAPI - INT est présenté sous forme de schéma en annexe 2.

c- Réserves intracellulaires : PHB

Pour l'expérimentation de terrain, nous avons également déterminé le pourcentage de bactéries polyhydroxybutyrate (PHB) positif. Le PHB est une forme de réserve chez les bactéries ; il s'agit de polymères linéaires avec des maillons de D-β-hydroxybutyrate.

La détermination du PHB donne une indication du rapport (Carbone/Azote). Plus le nombre de cellules PHB + est élevé, plus le rapport (C/N) est important. On a alors beaucoup de carbone bactérien par rapport à l'azote ou bien une carence en azote. Ce paramètre est déterminé par observation microscopique (présence de granules jaune vif).

2- Les algues : la chlorophylle a

Principe

La concentration en chlorophylle a est le paramètre le plus couramment pris en compte pour l'évaluation de la biomasse végétale planctonique et périphtyque. Le dosage a été réalisé par spectrométrie d'absorption moléculaire.

Protocole

L'extraction est réalisée dans de l'acétone à 90 %. 10 ml d'acétone sont versés dans les tubes contenant les films de polyéthylènes jusqu'alors placés au congélateur. Afin de faciliter l'extraction, les tubes sont soumis à une sonication (traitement aux ultrasons) puis placés au réfrigérateur pendant au moins 8 heures.

Après agitation des tubes, le contenu est filtré sur un filtre en fibre de verre (préfiltre Sartorius, 20µm) à l'aide d'un support de filtration et d'une pompe à vide. Le filtrat est mesuré puis relevé et ensuite transféré dans un tube. La mesure de l'absorbance de l'extrait est réalisé dans des cuves en verre à l'aide d'un spectrophotomètre pour les longueurs d'onde suivantes : 630 nm, 645 nm, 665 nm et 750 nm. Le blanc est réalisé avec de l'acétone à 90%.

Les extraits sont ensuite acidifiés avec du HCl 2N afin d'obtenir une concentration finale proche de 5.10^{-3} mol/l. Le volume d'HCl ajouté dans la cuve est de l'ordre de 10 µl. Après 2 minutes, une nouvelle série de mesures de l'absorbance est réalisée.

Calcul et expression des résultats

La quantité de chlorophylle a sur le bout de film en polyéthylène prélevé ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) est déterminé grâce aux équations de Parsons et Strickland (1972).

Equation de Parsons et Strickland

$$\text{Chla } (\mu\text{g/l}) = [11.6(A_{665}-A_{750})-1.31(A_{645}-A_{750})-0.14(A_{630}-A_{750})]*V / (S*I)$$

~ Avec :

A : absorbance à la longueur d'onde λ ;

V : volume de l'extrait (filtrat) en ml ;

S : surface de polyéthylène prélevé (cm^2) ;

l : longueur de la cuve du spectrophotomètre (cm).

III- Expérimentations de terrain

L'eau prélevée aux différentes stations d'étude a été analysée à chaque fois ; les paramètres suivis sont les suivants : nitrates, nitrites, ammonium, phosphore total, orthophosphate, teneurs en matières en suspension et en matières volatiles, conductivité et pH.

Pour les paramètres biologiques, nous nous sommes attachés à déterminer la biomasse bactérienne.

Les résultats sont présentés campagne par campagne car à chaque fois les conditions environnementales sont différentes.

L'objectif est ici de corréler la présence d'une population bactérienne présentant un biovolume important à une enrichissement des eaux lié à des rejets de stations d'épuration.

A) Campagne du 13 juin

L'ensemble des analyses est exécuté comme explicité dans la partie précédente.

Lors de cette campagne, nous étions dans des conditions particulières puisque la Garonne était en crue donc très loin des conditions expérimentales définies de départ, à savoir, à l'étiage.

Les résultats de numération, de pourcentage de cellules actives, de volume cellulaire moyen sont présentés à la figure n°. Le tableau n°1 reprend l'ensemble des données d'analyse physicochimique de l'eau.

	Pinsaguel	Gagnac	Sauveterre	Pont Layrac	Boé
Distance (en km)	0	28,6	128,5	133,9	135,8
Orthophosphates (mg/l)	0,1	0,11	0,17	0,19	0,18
Phosphore total (mg/l)	0,59	0,85	1,7	1,75	1,75
Nitrate (mg/l)	8,1	8,8	14	14	14
Nitrite (mg/l)	0,08	0,09	0,2	0,2	0,22
Ammonium (mg/l)	0,09	0,21	0,23	0,24	0,51
Azote Kjeldahl (mg/l)	0,28	0,98	1,6	1,55	1,6
Azote organique (mg/l)	0,21	0,82	1,45	1,35	1,2
Azote minéral sol (mg/l)	1,9	2,2	3,45	3,35	3,6
Conductivité (μS/cm)	260	290	315	315	315
pH (laboratoire)	8	8	7,9	7,9	7,9
MES (g/l)	0,0948	0,2032	0,3368	0,3588	0,3184
MVS (g/l)	0,0092	0,0164	0,0268	0,0272	0,0264
Chlorophylle a (μg/l)	0,68324	0,986	3,397352	2,812956	7,179744

Tableau n°1

Les concentrations en phosphore total, ammonium et azote organique sont significativement supérieures à Gagnac par rapport à Pinsaguel. Pour les stations 3, 4 et 5 les concentrations des différents éléments sont sensiblement identiques. Pour le secteur amont, cela traduit l'influence des rejets de la station d'épuration de Toulouse.

Les résultats des dénombrements bactériens ainsi que les volumes cellulaires moyens sont présentés à la figure n°2.

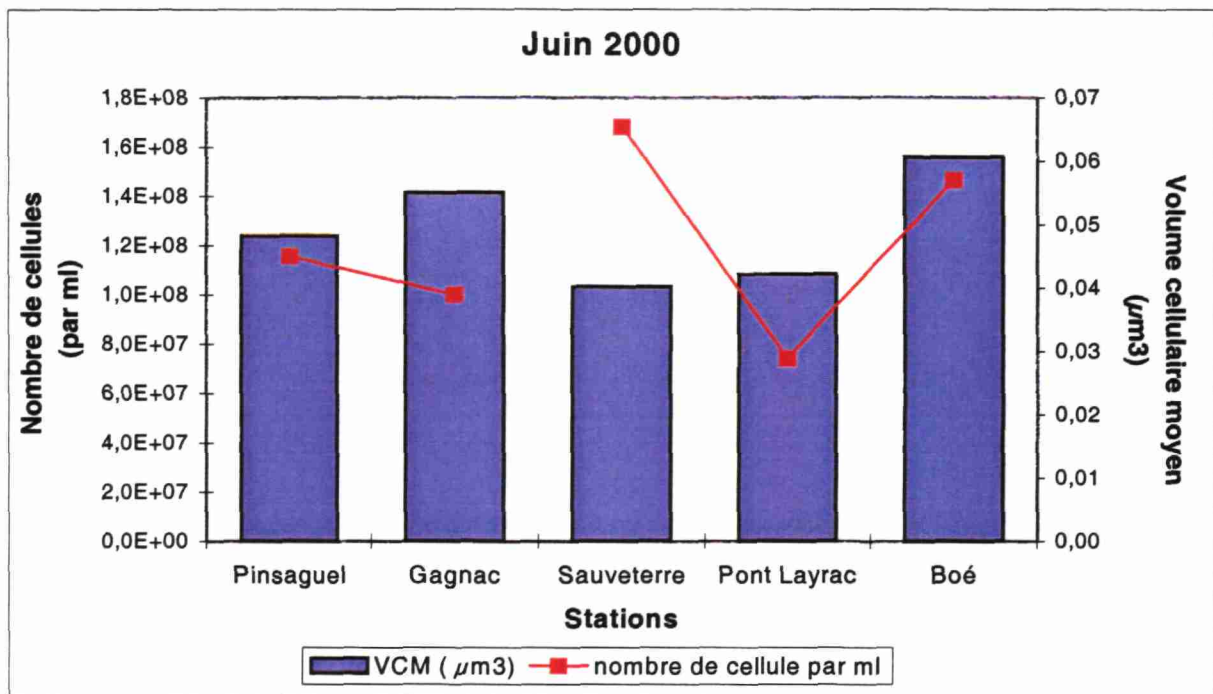


Figure n°2

Les paramètres bactériologiques indiquent à l'amont des rejets, des effectifs bactériens plus importants qu'à l'aval. Les volumes cellulaires moyens sont quant à eux légèrement plus élevés à l'aval des stations d'épuration. Pour le secteur amont, les numérations diffèrent d'un dixième d'unité logarithmique, non significatif. Pour l'aval, nous obtenons une variation de l'ordre d'une unité logarithmique entre les stations 3 et 4 qui pourrait traduire l'influence de la retenue de Malause au dessus de Sauveterre.

L'ensemble de ces résultats ne permet pas de mettre en évidence de façon significative l'impact des rejets des stations d'épuration. Ceci est sans doute dû aux conditions particulières rencontrées lors de cette campagne, à savoir une crue importante de la Garonne quelques jours avant les prélèvements. Les vitesses d'écoulement varient selon le morphisme du lit du fleuve et masquent ainsi l'éventuel impact des rejets aux stations 2 et 4.

La figure n°3 reprend les volumes cellulaires obtenus aux différentes stations en relation avec certains paramètres physicochimiques.

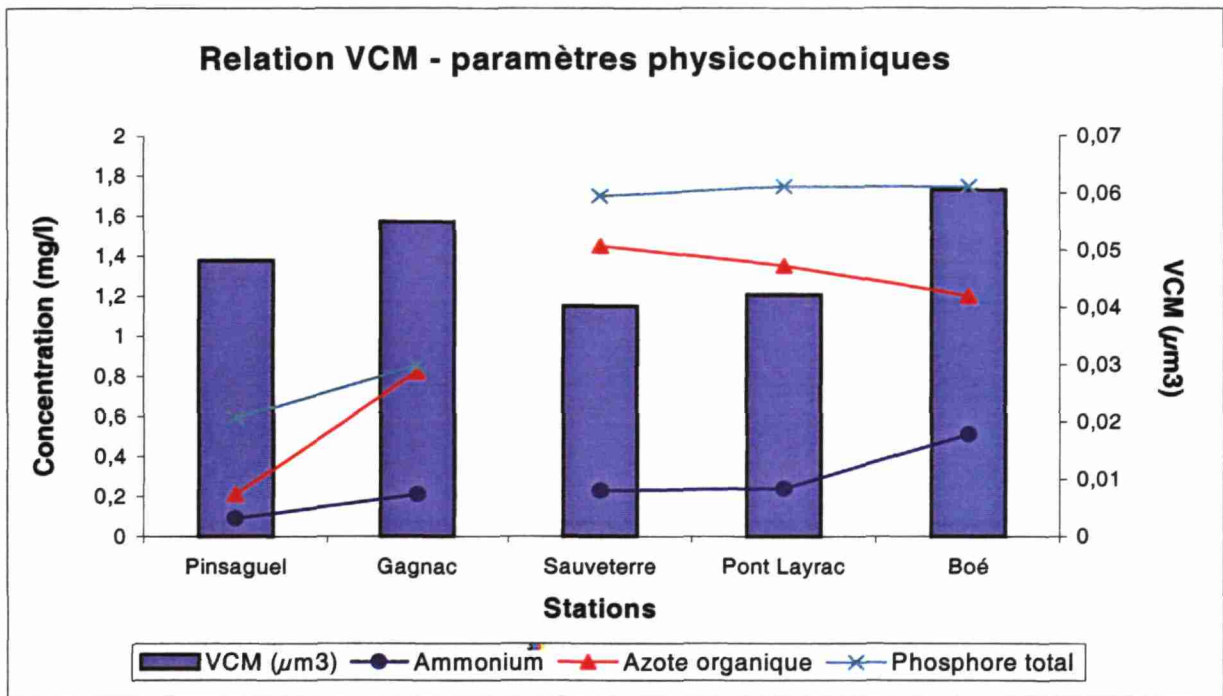


Figure n°3

On constate qu'à l'augmentation du volume cellulaire moyen entre Pinsaguel et Gagnac, correspond une augmentation nette des concentrations en ammonium, en azote organique et en phosphore total. Pour les autres stations, seule l'augmentation de la concentration en ion ammonium peut être mise en relation avec l'augmentation du volume cellulaire observée pour la station de Boé. Ici, une source de contamination interfère à la station 5.

B) Campagne du 18 juillet

Cette fois ci nous étions plus proche des conditions expérimentales souhaitées, à savoir Garonne à l'étiage.

Les résultats de l'analyse des paramètres physicochimiques sont présentés dans le tableau n°2.

	Pinsaguel	Gagnac	Sauveterre	Pont Layrac	Boé
Distance (en km)	0	28,6	128,5	133,9	135,8
Orthophosphates (mg/l)	0,17	0,15	0,18	0,28	0,19
Phosphore total (mg/l)	0,21	0,25	0,38	0,4	0,3
Nitrate (mg/l)	3,8	5,3	7,4	7,8	7,6
Nitrite (mg/l)	0,02	0,15	0,17	0,16	0,15
Ammonium (mg/l)	0,15	0,19	0,14	0,14	0,14
Azote Kjeldahl (mg/l)	0,28	0,49	0,49	0,56	0,35
Azote organique (mg/l)	<0,20	0,34	0,38	0,45	0,24
Azote minéral sol (mg/l)	0,97	1,4	1,85	1,9	1,85
Conductivité (μS/cm)	220	290	295	330	305
pH (laboratoire)	8	7,6	8	8,1	8
MES (g/l)	0,0076	0,0148	0,0144	0,0192	0,0148
MVS (g/l)	0,0028	0,004	0,0032	0,004	0,0036
Chlorophylle a (μg/l)	4,091612	7,80024	6,938596	7,557052	6,531616

Tableau n°2

Dans l'ensemble, les valeurs des paramètres physicochimiques sont plus élevées à l'aval du rejet et ce pour les deux stations d'épuration étudiées. Cette augmentation concerne principalement, pour les stations 1 et 2, les nitrates, les nitrites et l'azote organique. Pour les stations 3, 4 et 5 on note une augmentation significative à l'aval du rejet des concentrations en orthophosphate et l'azote organique.

Les paramètres bactériologiques sont à la figure n°4.

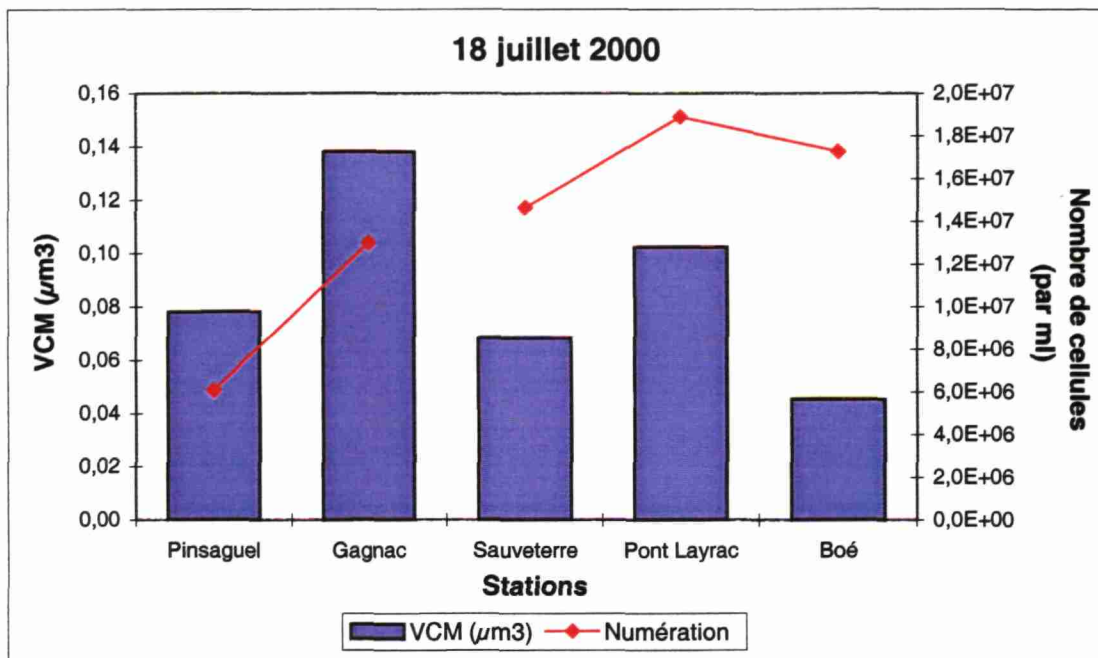


Figure n°4

Le résultat des dénombrements cellulaires indique à l'aval des rejets (c'est à dire à Gagnac et Pont Layrac) des effectifs bactériens beaucoup plus importants. Les volumes cellulaires moyens (VCM) sont également plus élevés à l'aval et ce de façon significative.

On peut dire, au vu des résultats obtenus lors de cette campagne, que l'on a mis en évidence la présence de bactérie de taille supérieure à l'aval des deux rejets de stations.

Dans la figure n°5 nous avons reporté l'évolution des volumes cellulaires moyens en fonction de certains paramètres physicochimiques.

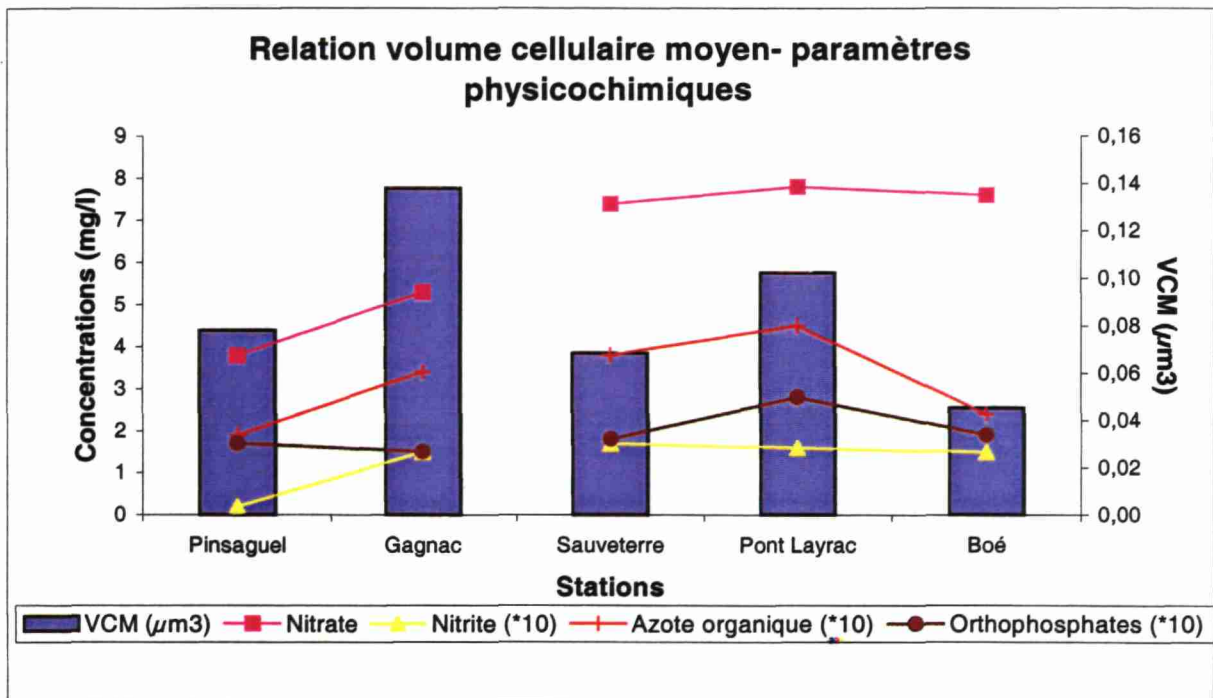


Figure n°5

L'augmentation du volume cellulaire moyen entre Pinsaguel et Gagnac semble traduire l'apport de cellules allochtones et s'accompagne de l'augmentation des concentrations en différentes formes d'azote. Pour les stations 3 et 4, nous notons l'augmentation des concentrations en orthophosphate.

Nous avons également déterminés pour cette campagne le pourcentage de cellules bactériennes actives (méthode INT). Les résultats sont présentés dans la figure n°6 et on peut dire que l'activité bactérienne est relativement constante (entre 10 et 15 %).

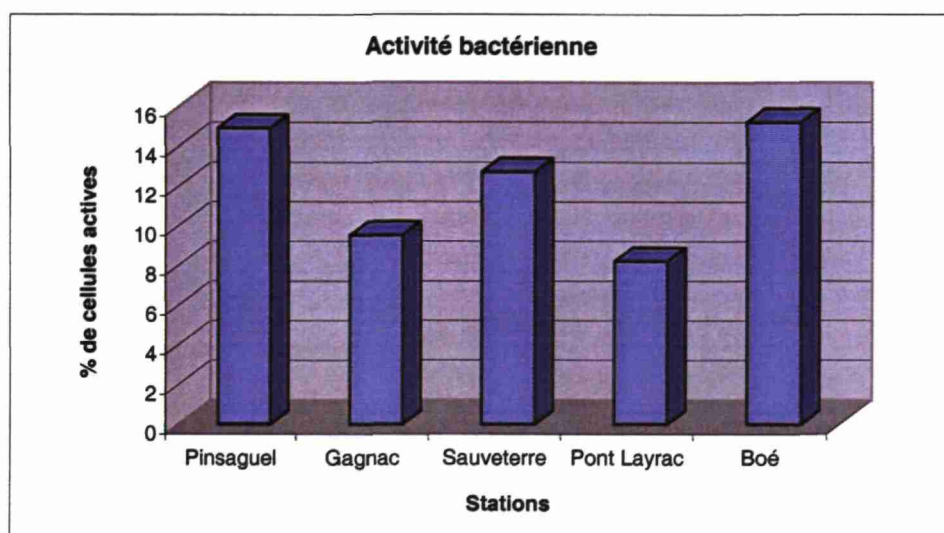


Figure n°6

C) Campagne du 8 août

Comme pour les campagnes précédentes nous avons déterminé un certain nombre de paramètres sur l'eau brute de chaque station ; les résultats obtenus sont présentés dans le tableau n°3.

	Pinsaguel	Gagnac	Sauveterre	Pont Layrac	Boé
Distance (en km)	0	28,6	128,5	133,9	135,8
Orthophosphates (mg/l)	0,078	0,187	0,31	0,418	0,362
Phosphore total (mg/l)	0,18	0,32	0,47	0,56	0,49
Nitrate (mg/l)	3,21	5,78	8,16	8,17	8,43
Nitrite (mg/l)	0,032	0,258	0,138	0,128	0,124
Ammonium (NH₄⁺) (mg/l)	0,048	0,326	0,048	0,045	0,049
Azote Kjeldahl (mg/l)	0,21	0,7	0,35	0,77	0,42
Azote organique (mg)	0,17	0,45	0,31	0,74	0,38
Azote minéral sol (mg/l)	0,77	1,64	1,92	1,92	1,92
Conductivité (μS/cm)	238	262	311	325	317
MES (g/l)	0,007	0,009	0,0122	0,0118	0,0112
MVS (g/l)	0,002	0,0022	0,0024	0,0026	0,0024
Chlorophylle a (μg/l)	4,643224	4,426908	5,469748	7,41576	5,540976

Tableau n°3

Les valeurs des différents paramètres physicochimiques entre Pinsaguel et Gagnac sont significativement plus élevées à l'aval des rejets pour l'orthophosphate, le phosphore total, l'azote minéral et organique. Pour les stations 3 et 4, les concentrations en orthophosphate et en azote organique sont plus importantes à l'aval des rejets par rapport à l'amont.

Les résultats des numérations bactériennes ainsi que les volumes cellulaires sont présentés à la figure n°7.

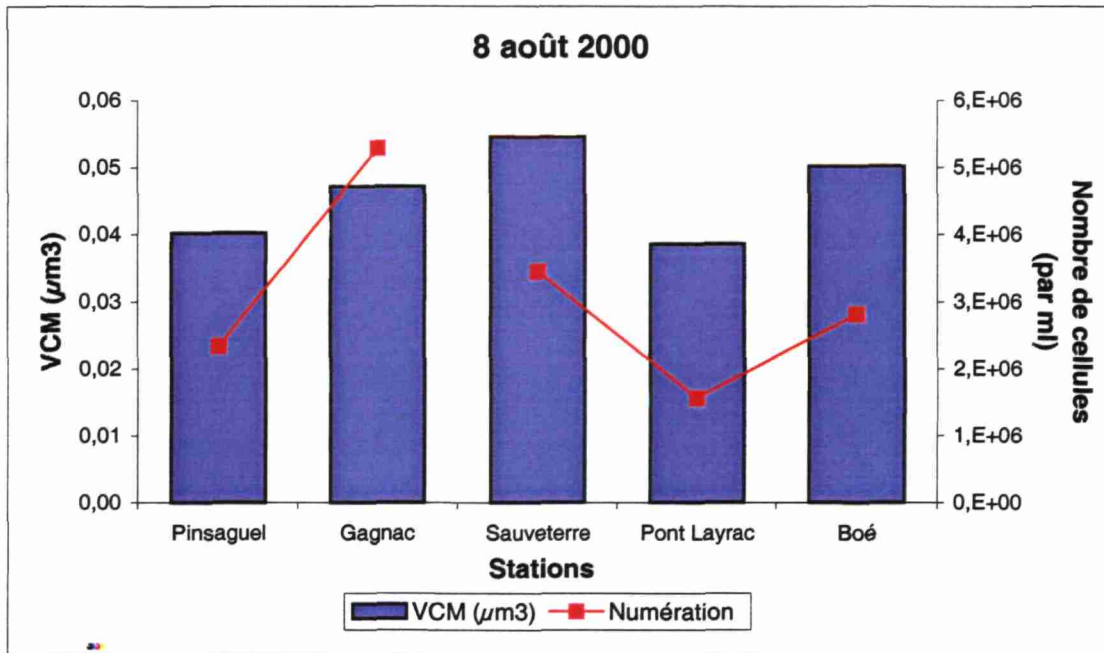


Figure n°7

Pour Pinsaguel et Gagnac on observe une augmentation du nombre de cellules bactériennes ainsi qu'un léger accroissement du VCM (augmentation peu significative). Pour les stations 3, 4 et 5 nous observons une diminution des effectifs bactériens ainsi que du VCM à Pont Layrac.

Bien que la physicochimie montre nettement une dégradation de la qualité des eaux en aval de l'agglomération toulousaine, on aurait un impact relativement peu important des rejets sur la communauté bactérienne. Les rejets de la station d'épuration de Saint Pierre de Gaubert ne semblent pas avoir d'effet sur la population bactérienne, du moins on ne peut pas les mettre en évidence lors de cette campagne à Pont Layrac.

La figure n°8 représente l'évolution des volumes cellulaires moyens en fonction des paramètres physicochimiques (cités précédemment).

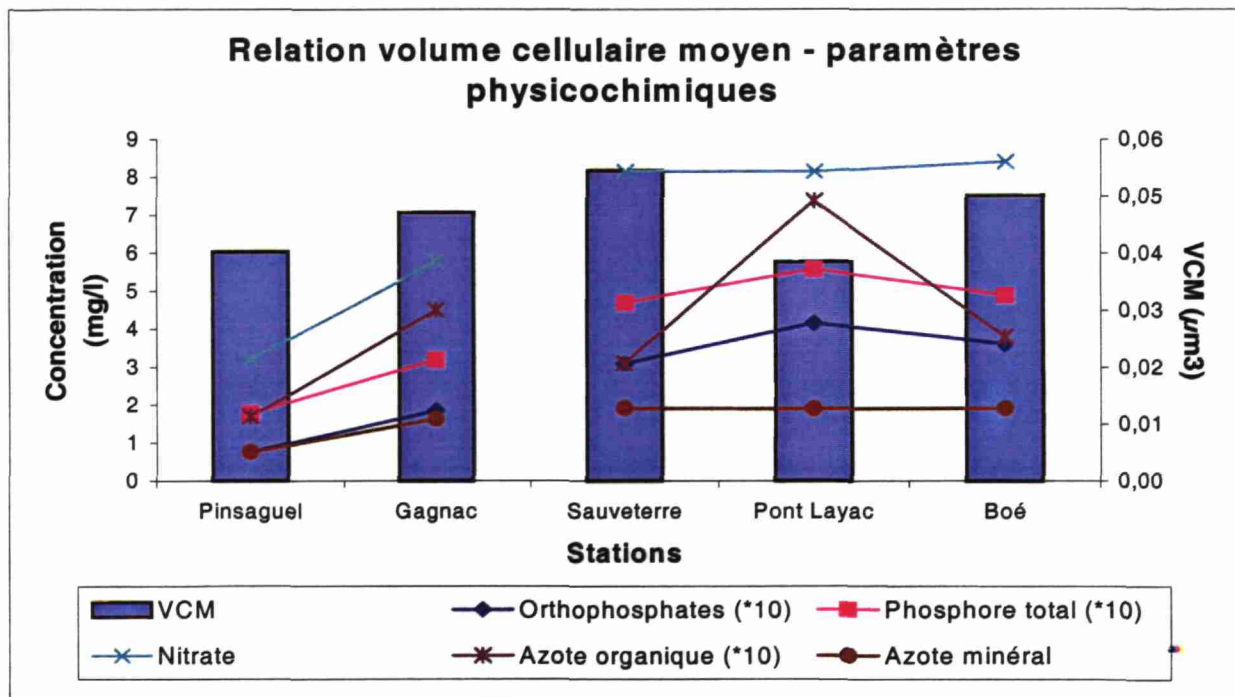


Figure n°8

Malgré l'augmentation significative de l'ensemble des paramètres physicochimiques représentés dans la figure précédente, le volume des cellules bactériennes augmente de façon peu significative à Pinsaguel. Pour les autres stations la diminution de ce volume s'explique difficilement. Bien que n'ayant pas d'informations sur les débits relatifs rejets – rivière, il semblerait que les apports de la station d'épuration soient soumis à une rapide dilution. L'azote organique en augmentation à la station 4 pourrait provenir de décrochements de biofilm., les rejets de la station d'épuration de Saint Pierre de Gaubert ne semblent pas avoir d'impact sur la communauté bactérienne.

Il semble difficile pour cette campagne de mettre en évidence une quelconque relation entre la qualité de l'eau et la taille des cellules bactériennes.

Pour l'activité métabolique des bactéries on constate d'après la figure n°9 que celle-ci est relativement constante (15 %).

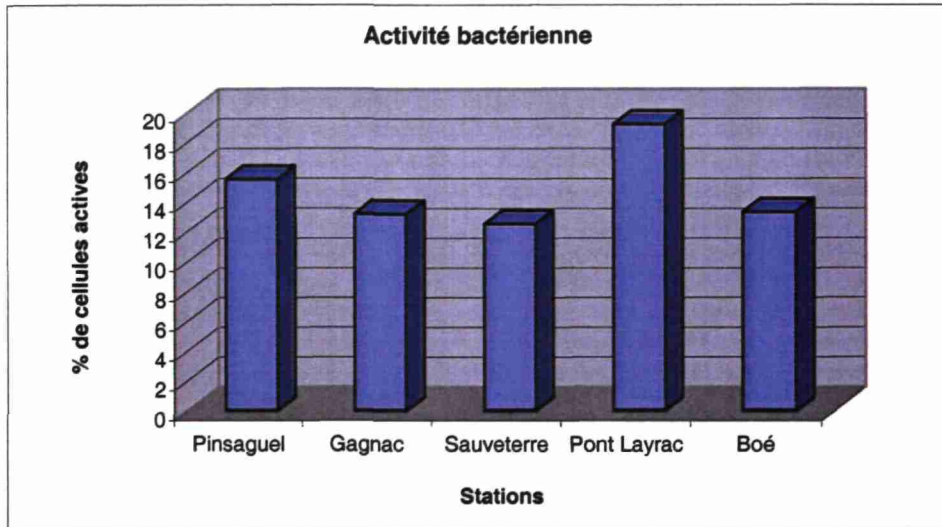


Figure n°9

Nous avons déterminé cette fois-ci le pourcentage de bactéries polyhydroxybutyrate positif ; les résultats sont présentés dans la figure n°10.

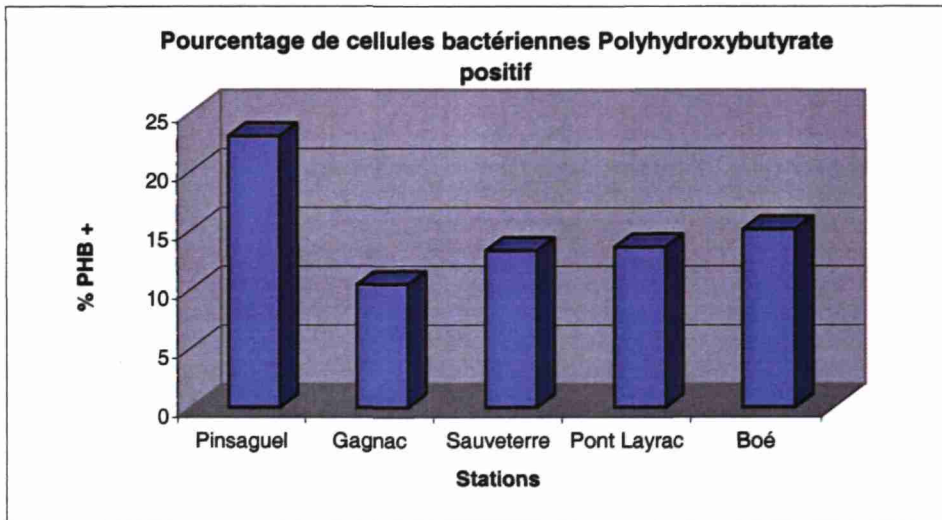


Figure n°10

On observe une diminution du pourcentage de cellules PHB + entre Pinsaguel et les autres stations. Ces réserves de PHB dépendent du rapport C/N et la station 1 présente les plus faibles concentrations en éléments azotés.

Lors de cette campagne de terrain nous n'avons pas mis en évidence un quelconque impact des rejets des deux stations d'épuration étudiée sur la communauté bactérienne.

D) Campagne du 22 août

Les résultats des analyses des paramètres physicochimiques sont présentés dans le tableau n°4.

	Pinsaguel	Gagnac	Sauveterre	Pont Layrac	Boé
Distance (en km)	0	28,6	128,5	133,9	135,8
Orthophosphates (mg/l)	0,12	0,3	0,33	0,45	0,38
Phosphore total (mg/l)	0,16	0,39	0,32	0,54	0,46
Nitrate (mg/l)	3,78	7,2	8,68	8,52	8,65
Nitrite (mg/l)	0,046	0,7	0,102	0,099	0,091
Ammonium (mg/l)	0,09	0,645	0,081	0,076	0,074
Azote Kjeldahl (mg/l)	0,28	0,49	0,49	0,56	0,35
Azote organique (mg/l)	0,42	0,62	0,64	0,57	0,5
Azote minéral sol (mg/l)	0,94	2,34	2,05	2,01	2,04
Conductivité ($\mu\text{S/cm}$)	290	300	325	331	329
pH (laboratoire)	7,9	7,75	7,9	7,85	7,75
MES (g/l)	0,0024	0,0048	0,0024	0,0068	0,0008
MVS (g/l)	0,0016	0,0018	0,0016	0,0018	0,0022
Chlorophylle a ($\mu\text{g/l}$)	4,662448	4,619748	2,417072	2,388848	1,553854

Tableau n°4

On observe une augmentation significative de l'ensemble des paramètres physicochimiques en aval des rejets de la stations d'épuration de Ginestous. Pour les stations 3, 4 et 5 on note plutôt une diminution des paramètres en aval des rejets exceptés pour l'orthophosphate et le phosphore total.

La figure n°11 représente les dénombrements bactériens ainsi que les volumes cellulaires moyens pour les différentes stations.

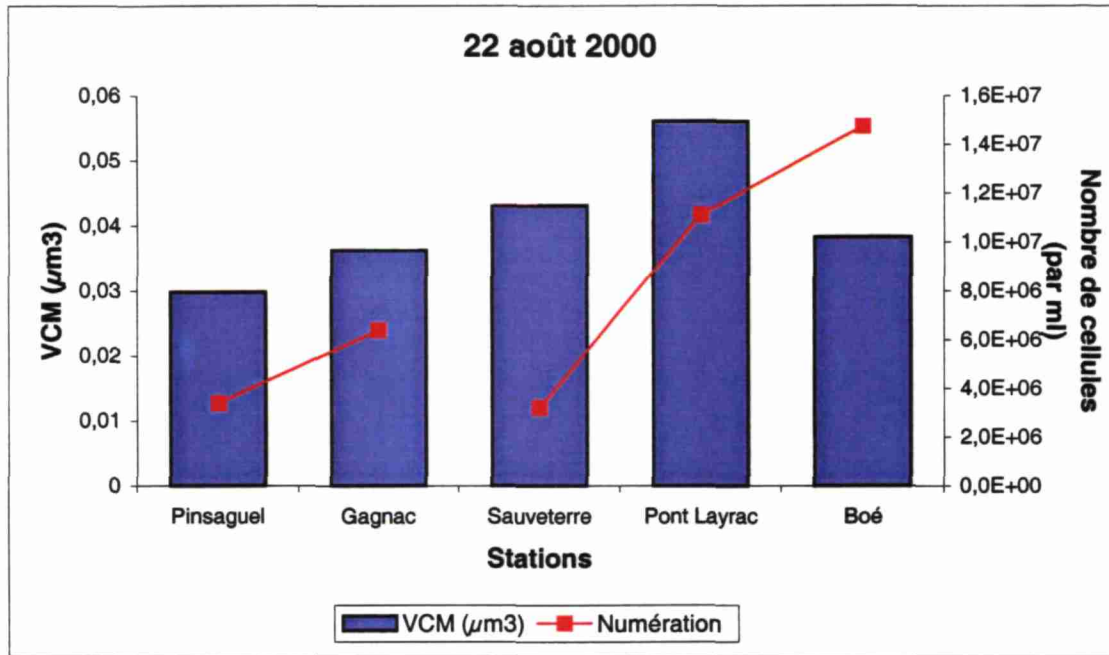


Figure n°11

On a une augmentation des effectifs bactériens (réellement significative pour Gagnac et Pont Layrac) et des VCM plus élevés à l'aval des rejets.

On a donc bien mis en évidence, à aval des deux stations d'épurations étudiées, la présence de bactéries de taille supérieure à celles présentes à l'amont.

La figure n°12 représente l'évolution des volumes cellulaires moyens en fonction des paramètres physicochimiques suivants : orthophosphates et le phosphore total.

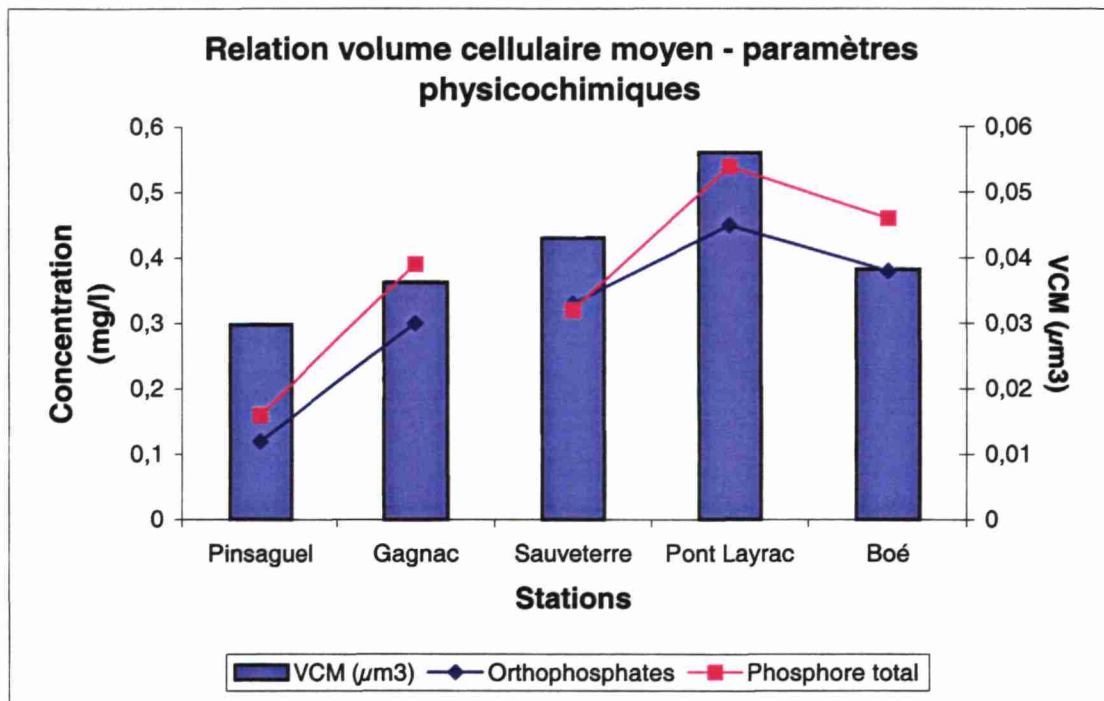


Figure n°12

Pour les stations de Gagnac et Pont Layrac il semble donc que l'on ait une relation entre la qualité physicochimique de l'eau (pour les paramètres présentés dans la figure) et taille des cellules des bactériennes.

Pour les activités bactériennes on note une diminution du nombre de cellules actives à Gagnac par rapport à Pinsaguel alors que pour les stations de Sauveterre et Pont Layrac on note une augmentation de l'activité métabolique bactérienne.

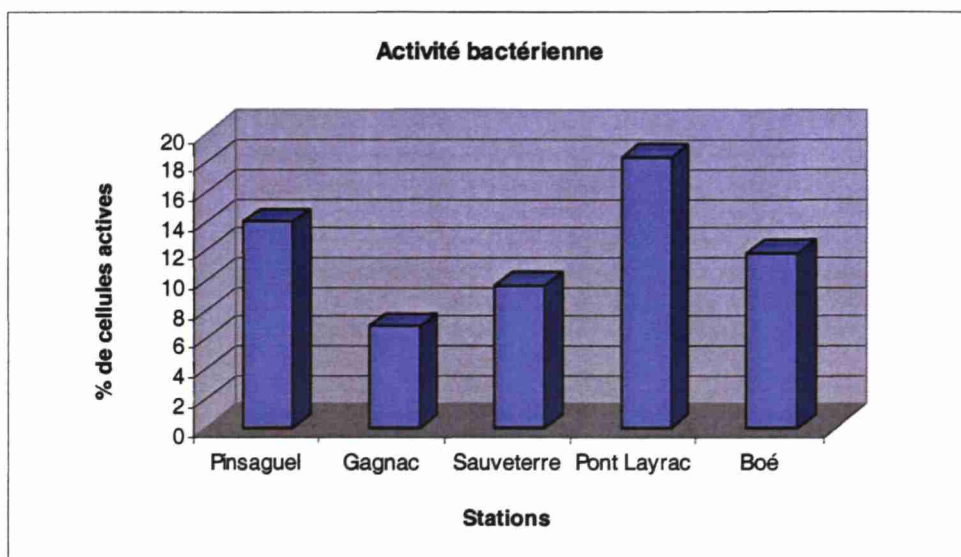


Figure n°13

On observe le même type d'évolution pour le pourcentage de cellules PHB +.

Par rapport à la campagne du 8 août, la station 1 présente de plus fortes valeurs en éléments azotés ce qui expliquerait les faibles réserves intracellulaires en PHB. Par contre, le 22 août, la station 4 est moins riche en azote que la station 3 et montre que plus de 30 % de cellules ont des réserves de PHB.

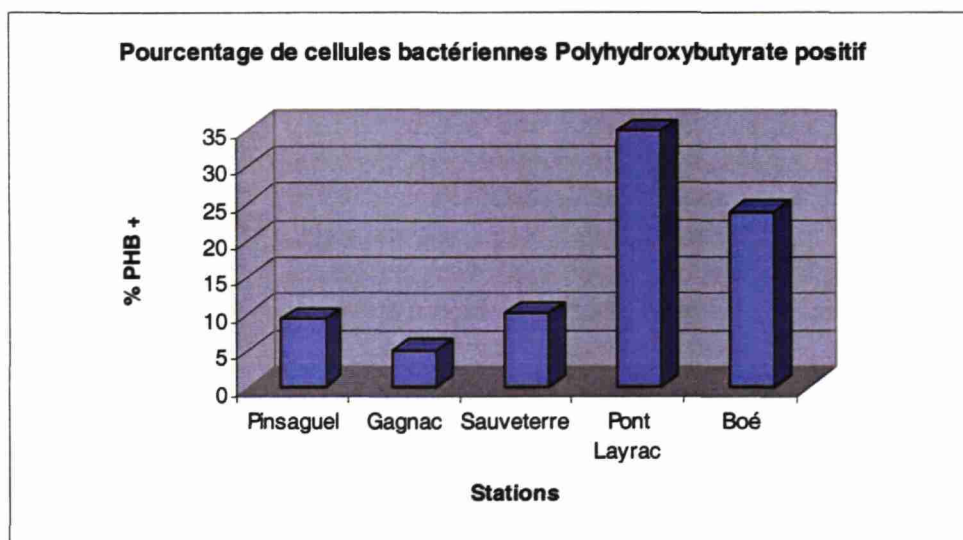


Figure n°14

Pour cette campagne de terrain on a mis en évidence l'impact des rejets sur la communauté bactérienne.

E) Conclusion

Nous tenterons d'interpréter graphiquement les évolutions des effectifs bactériens et des volumes cellulaires moyens pour les campagnes de juillet à août.

La figure n°15 reprend les résultats des volumes cellulaires et des dénombrements bactériens obtenus pour les trois campagnes Pinsaguel et Gagnac.

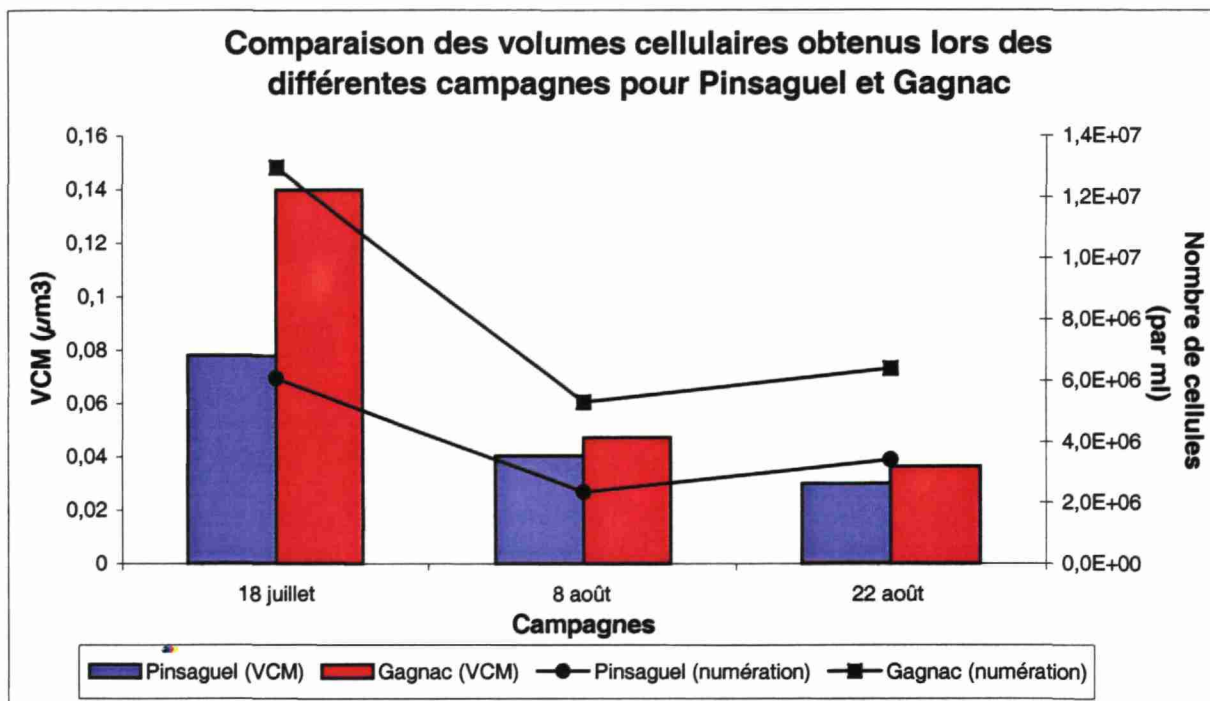


Figure n°15

On obtient toujours un VCM supérieur en aval du rejet, cependant les différences sont peu significatives pour les deux dernières campagnes. Quant aux effectifs bactériens qui décroissent entre juillet et août, ils sont peut être à mettre en relation avec le régime hydraulique (dilution)

On a donc des résultats reproductibles pour ce site d'étude mais pour mettre réellement en évidence l'impact des rejets de la station d'épuration de Ginestous, nous aurions peut être du choisir une station aval plus proche que Gagnac.

La figure n°16 représente le même type de résultat mais pour les stations de Sauveterre, Pont Layrac et Boé.

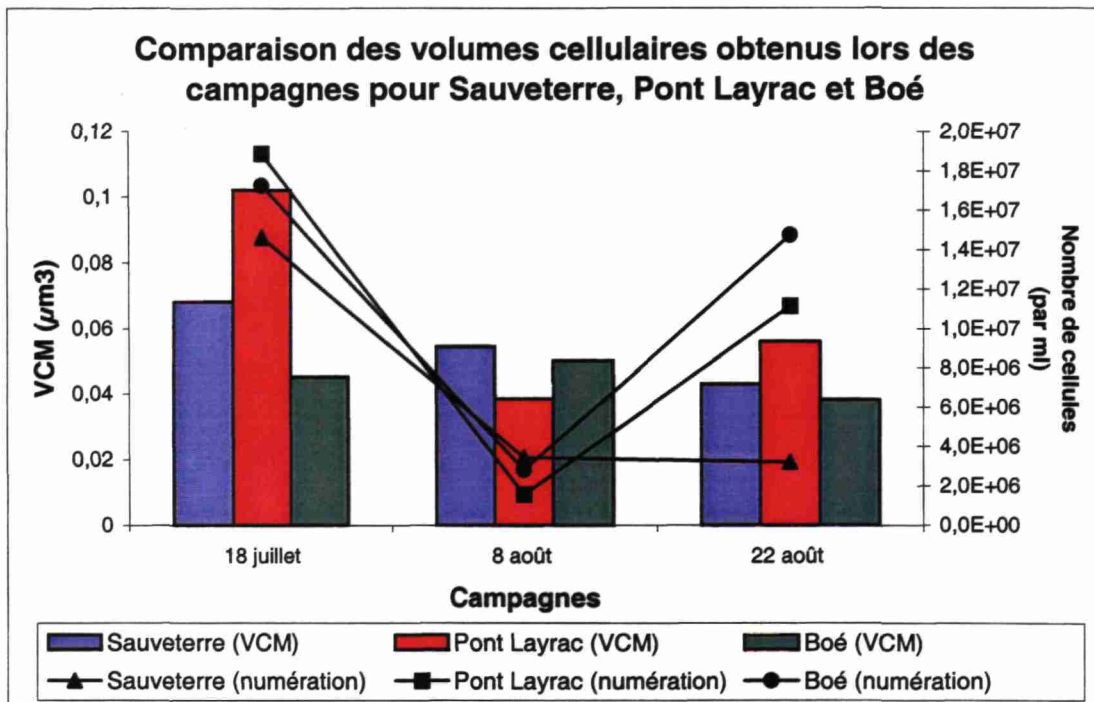


Figure n°16

Pour ce site d'étude les résultats ne sont pas reproductibles et les volumes cellulaires ne sont pas toujours significativement différents. Ce résultat ne nous permet pas de conclure quant à la présence de bactéries allochtones en aval du rejet de cette station d'épuration. Soit l'impact de la station est négligeable, soit hypothèse plus probable, les rejets à l'endroit où ont été effectués les prélèvements sont dilués au point de ne pas être décelables.

Globalement, pour les campagnes des 18 juillet et 22 août, les volumes cellulaires moyens et les effectifs bactériens montrent une tendance à l'augmentation à l'aval des deux rejets (stations 2 et 4).

Deux aspects limitants de notre travail ont nui à la mise en évidence nette de l'impact des rejets urbains sur des changements au sein de la population bactérienne du fleuve : le faible nombre de campagnes de terrain et le nombre réduit de stations de mesures encadrant les rejets. D'autre part, aucune mesure des débits n'a été associée aux données recueillies ; ces données aurait pu contribuer aux explications des baisses des numérations pour le 8 août.

Le tronçon de 140 km retenu dans cette étude ne nous permet pas de mettre en évidence l'impact des rejets sur la communauté bactérienne pour les deux stations d'épuration. Au vu des résultats obtenus pour Pinsaguel et Gagnac, nous aurions du étudier l'impact des rejets de la station de Ginestous en différentes stations (proches les unes des autres) afin de suivre l'évolution de la communauté bactérienne.

IV- Expérimentation de laboratoire : préparation de l'inoculum

Une première expérimentation a été menée afin de déterminer la quantité nécessaire de biofilm à inoculer dans les canaux pour observer une colonisation suffisamment importante au bout d'une semaine, tester l'aptitude du biofilm à se développer sur deux types de supports en polyéthylène, et pour observer le mode de colonisation du support (colonisation homogène ou hétérogène).

A) Protocole de l'expérimentation préliminaire

1- Le type de support

Deux types de films en polyéthylène ont donc été utilisés comme support, un lisse et un rugueux. En fait, trois films rugueux et deux lisses ont été disposés dans chaque canal, en position verticale.

2- L'alimentation du canal

Pour assurer la colonisation, les quatre canaux sont alimentés par de l'eau brute de la station 1 de la rivière Garonne, station se situant pour rappel en amont de l'agglomération toulousaine. Chaque système (c'est à dire canal + béccher) contient un volume total de 7 litres. La réserve d'eau est stockée en chambre froide durant toute la durée de l'expérimentation sert, outre au remplissage de départ, aux appoints périodiques

3- Déroulement de l'expérimentation

La phase de colonisation

Après avoir mis en eau les canaux, ces derniers sont inoculés avec un extrait de périphyton à partir des galets recouverts de biofilm (prélevés à la station 1). Le biofilm est récupéré (grattage d'une vingtaine de galets) avec une brosse à dent et une lame de rasoir ; l'extrait ainsi prélevé est mis dans un béccher de 1 litre. Chaque canal est inoculé avec 250 ml de cet extrait. Cette phase de colonisation dure une semaine pendant laquelle aucune intervention n'a lieu sur les canaux.

La phase d'expérimentation

Au bout de 7 jours de colonisation, les canaux sont vidés, nettoyés ainsi que les tuyaux, les pompes et les bécchers. Chaque canal est alors réalimenté avec de l'eau brute de la station 1, à raison de 7 litres par système. Au préalable, les supports et le biofilm sont placés en attente, à l'obscurité et en atmosphère humide.

Cette phase commence dès le remplissage des canaux et la mise en place des supports avec la mesure des paramètres suivants : nitrates, nitrites, phosphore total, orthophosphate. Elle dure aussi 7 jours.

B) Prélèvements du biofilm

Des prélèvements de polyéthylène, d'une surface d'environ 1 cm² (deux répétitions : R1 et R2) sont effectués à l'aide de ciseaux pour la numération bactérienne. Les morceaux prélevés sont ensuite placés dans des récipients contenant 10 ml de solution de Ringer ¼ stérile et stockés au réfrigérateur dans l'attente de l'analyse.

Parallèlement, des prélèvements de polyéthylène d'une surface de 2 cm² environ sont également effectués pour l'analyse de la chlorophylle a. Les échantillons sont immédiatement placés au congélateur dans l'attente de l'analyse. Les prélèvements de biofilm sont effectués une fois par semaine durant l'expérimentation, soit 2 prélèvements (un à la fin de la phase de colonisation et un à la fin de la phase d'expérimentation). Des prélèvements de 250 ml d'eau contenue dans les béciers sont réalisés pour l'analyse des paramètres chimiques et physico-chimiques précédemment cités (à chaque fois que nous avons prélevés du biofilm dans les canaux).

Les surfaces de polyéthylène grattées sont mesurées par l'intermédiaire du système d'analyse d'images : acquisition de l'image, traitement et calcul de la surface après étalonnage. Ces mesures permettent de ramener dénombrements bactériens et teneurs en chlorophylle à une unité de surface de support.

C) Résultats de l'expérimentation

Au bout de 14 jours, nous avons arrêté les canaux. Nous avons fait alors les remarques suivantes :

- la colonisation du biofilm sur le support en polyéthylène n'est pas homogène sur toute la surface du film ;
- la colonisation se fait essentiellement d'un seul côté, à savoir celui qui se trouve près de la lumière. De plus, on constate que les films de polyéthylène colonisés font ombrage entre eux, en effet, une fois qu'ils sont colonisés, la lumière diffuse moins bien vers les autres films ;
- la quantité d'extrait de périphyton inoculé a permis une colonisation rapide du support.

1- Paramètres bactériologiques

La figure n°16 reprend les résultats des dénombrements dans les quatre canaux pendant les 14 jours de l'expérimentation.

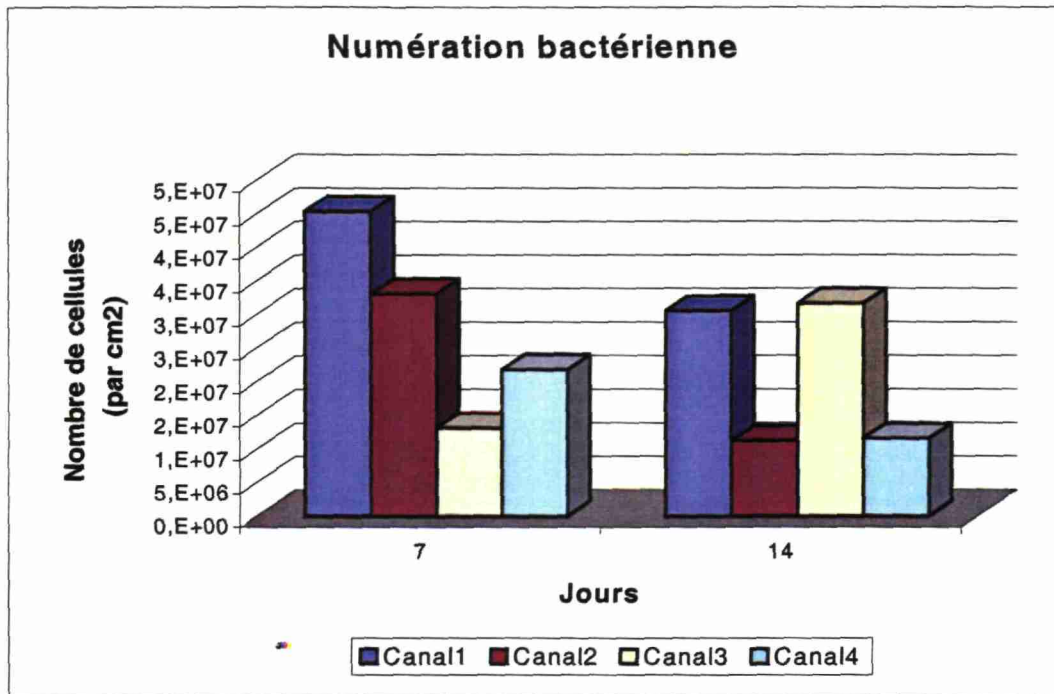


Figure n°16

NB : Les résultats représentés correspondent à la moyenne des répétitions (R1 et R2).

On constate qu'au bout de 7 jours on a une colonisation significative du biofilm mais les résultats varient légèrement dans les quatre canaux alors que ceux ci sont placés dans les mêmes conditions expérimentales, c'est à dire une même qualité de l'eau, un même débit, un même inoculum mais un éclaircissement sensiblement différent. Ceci s'explique par la colonisation hétérogène du support ; selon l'endroit où est effectué le prélèvement de biofilm, les résultats varient légèrement.

La figure n°17 représente le nombre de cellules obtenues pour chaque canal à la fin de la phase de colonisation avec l'écart moyen calculé pour les deux répétitions.

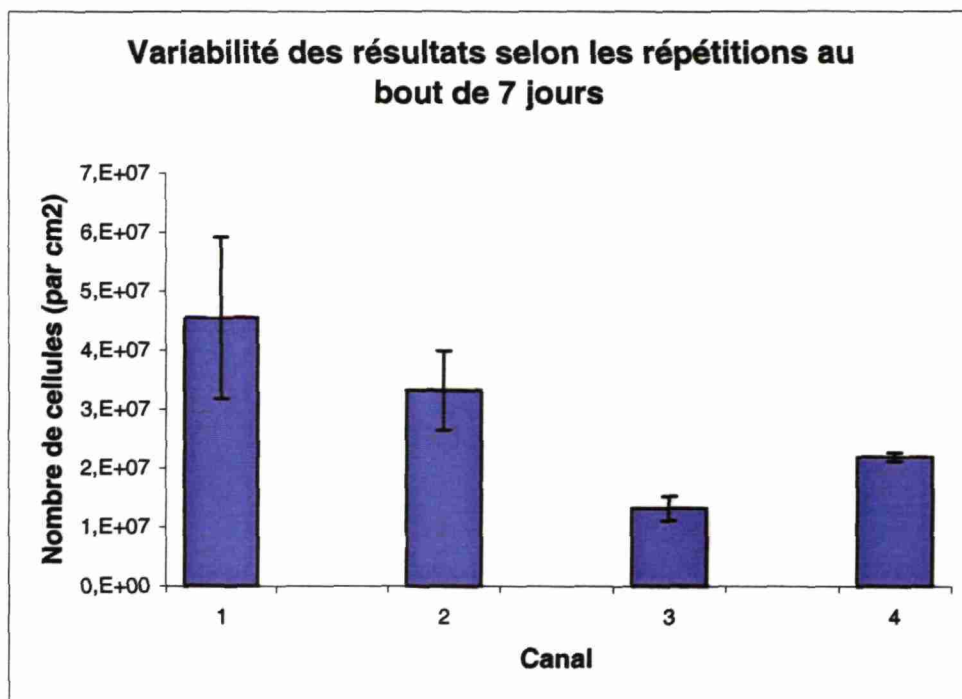


Figure n°17

L'écart moyen calculé est relativement important pour les canaux 1 et 2 mais cependant peu significatif en terme de numération bactérienne. Cependant afin d'éviter ce type de résultats, il convient de réaliser les prélèvements en des endroits représentatifs de l'ensemble du support (colonisation homogène).

Pour étudier l'influence du type de support (lisse ou rugueux) sur la colonisation du périphyton bactérien, nous avons réalisé plusieurs prélèvements à la fin de la phase de mesure. La figure n°18 nous montre que le nombre de cellules par cm² ne varie pas de façon significative selon le type de support.

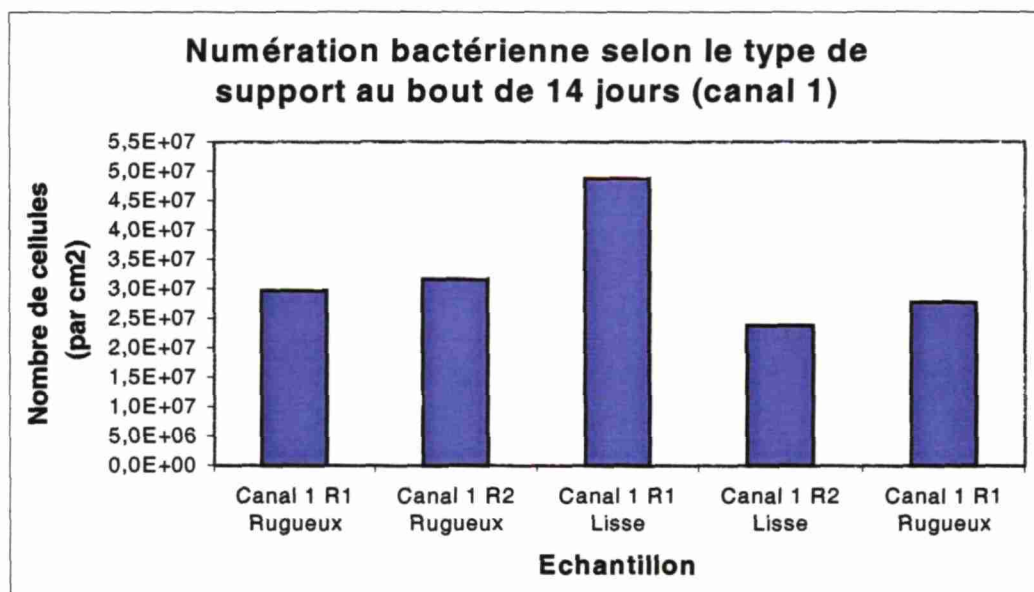


Figure n°18

2- Biomasse chlorophyllienne

Nous avons vu avec le périphyton bactérien que la colonisation n'était pas homogène sur l'ensemble du support et que l'on obtenait des variations entre répétitions. La figure n°19 nous permet de constater que l'on obtient des biomasses chlorophylliennes sensiblement différentes entre les répétitions, pour un même échantillon au bout de 7 jours.

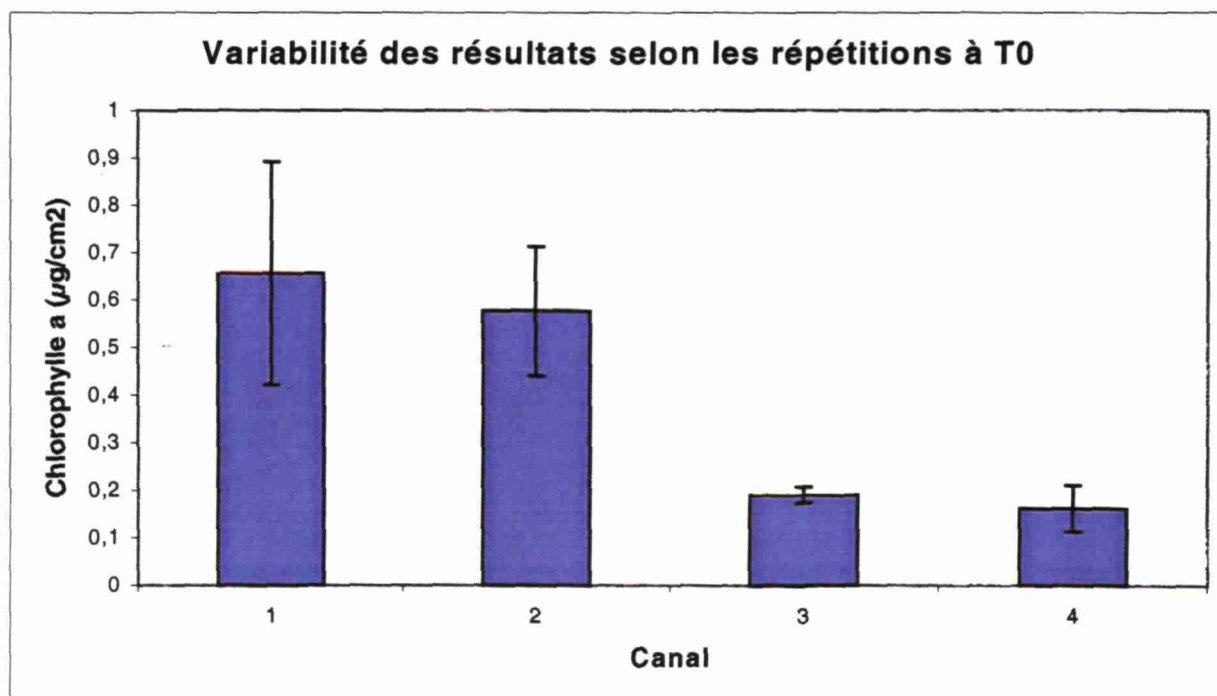


Figure n°19

La figure n°20 montre que les biomasses chlorophylliennes obtenues à la fin de la phase de mesure varient sensiblement en fonction du type de support utilisé. Afin d'éviter cela, il semble nécessaire pour l'expérimentation suivante d'utiliser un seul type de support de façon à limiter les variations au sein d'un même canal.

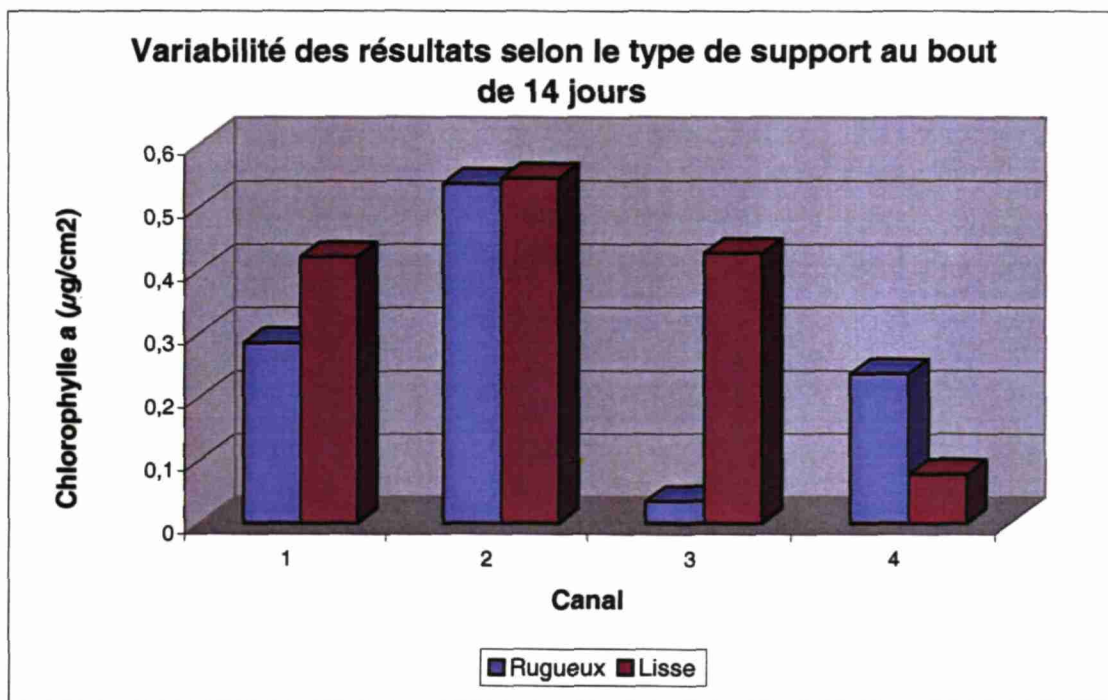


Figure n°20

3- Synthèse

Cette première expérience nous montre que :

- l'inoculation d'un extrait de périphyton de 250 ml permet une colonisation rapide et significative au bout de 7 jours ;
- le type de film en polyéthylène (lisse ou rugueux) ne semble pas avoir une influence trop marquée sur la colonisation du périphyton, cependant pour l'expérimentation suivante nous utiliserons un seul type de film (rugueux) afin d'obtenir des résultats reproductibles ;
- la colonisation du support est hétérogène ; pour la suite des opérations nous préleverons un support entier de film en polyéthylène et nous en choisirons des morceaux destinés aux analyses (numération bactérienne et chlorophylle a) à l'endroit où la colonisation semble être la plus homogène.

V- Expérimentation sur la charge en phosphore

A) Protocole

Le protocole expérimental est identique à celui sur le comportement du biofilm pour la phase de colonisation. Cette phase se termine également par le nettoyage de l'ensemble du dispositif expérimental (canaux, pompes, tuyaux).

1- La phase de mesure

Cette fois-ci elle s'étend sur 36 jours et des ajouts en PO_4 ont été effectués chaque semaine dans les canaux 2, 3, et 4 - le canal 1 étant le canal témoin - de façon à maintenir une concentration « permanente » déterminée en phosphore. Les concentrations sont les suivantes :

Canal	Concentration en PO_4
1	0 $\mu\text{g/L}$
2	150 $\mu\text{g/L}$
3	500 $\mu\text{g/L}$
4	1000 $\mu\text{g/L}$

Les quatre canaux sont alimentés avec de l'eau de Garonne provenant de la station 1.

Au vu des résultats de la première expérience, seul du polyéthylène de type rugueux a été placé dans les canaux, à raison de 5 bandes par canal (nous avons effectué 6 prélèvements durant l'expérimentation, la dernière ayant servi à deux reprises).

2- Les prélèvements de biofilm

Grâce à la première expérience, nous avons pu constater que la colonisation n'était pas homogène sur l'ensemble de la bande en polyéthylène ; nous avons alors décidé de prélever cette fois ci une bande entière par semaine de façon à obtenir un échantillon plus représentatif pour l'analyse de la chlorophylle a. Par contre pour l'analyse de numération bactérienne, des bouts de polyéthylène d'environ 1 cm^2 ont été découpés cette fois encore.

Le traitement des échantillons est identique à celui de l'expérimentation préliminaire.

3- Analyses chimiques

Chaque fois que des échantillons de biofilms ont été récupérés, nous avons effectué une analyse chimique de l'eau (volume prélevé dans chaque béccher : 250 ml). Après avoir obtenu le résultat d'analyse du phosphore, nous avons déterminé la concentration en PO_4 qu'il était nécessaire d'apporter dans les canaux afin de maintenir les concentrations précédemment citées, tout en réajustant chaque système à un volume de 7 litres.

Après avoir apporté la bonne concentration en PO_4 dans les canaux, nous avons prélevé 250 ml d'eau dans les bécchers pour vérification.

Les pertes en eau, dues à l'évaporation et aux prélèvements pour les analyses chimiques sont compensées par ajout d'eau brute de la station 1, de façon à maintenir un volume constant de 7 litres dans chaque système.

Le déroulement de la manipulation (prélèvements et analyses chimiques pour les quatre canaux) est résumé ci-dessous :

✓ *Phase de colonisation*

Le 08/08/2000 : mise en eau des canaux (7 litres par canal).

Le 09/08/2000 : mesures chimiques de l'eau avant ajout du périphyton dans les canaux, colonisation des quatre canaux.

✓ *Phase de mesure*

Le 16/08/2000 - T0 mesures chimiques de l'eau après ajout de phosphore et prélèvements de biofilm ;

Le 23/08/2000 (7 jours) - à T1.1 : mesures chimiques de l'eau et prélèvement de biofilm ;
- à T1.2 : mesures chimiques de l'eau après ajout de phosphore.

Le 30/08/2000 (14 jours) - à T2.1 : mesures chimiques de l'eau et prélèvement de biofilm ;
- à T2.2 : mesures chimiques de l'eau après ajout de phosphore.

Le 06/09/2000 (21 jours) - à T3.1 : mesures chimiques de l'eau et prélèvement de biofilm ;
- à T3.2 : mesures chimiques de l'eau après ajout de phosphore ;
ajout de 15 mg/l de nitrate dans tous les canaux.

Le 15/09/2000 (29 jours) - à T4.1 : mesures chimiques de l'eau et prélèvement de biofilm ;
- à T4.2 : mesures chimiques de l'eau après ajout de phosphore ; ajout
de 15 mg/l de nitrate.

Le 21/09/2000 (36 jours) - à T5 : mesures chimiques de l'eau et prélèvement de biofilm ; arrêt
de l'expérimentation.

4- Analyses biologiques

Tout comme pour l'expérience préliminaire, nous avons déterminé la biomasse de chlorophylle a ainsi que le nombre de cellules bactériennes (avec volume cellulaire, % de bactéries actives). Les méthodes sont celles décrites précédemment.

B) Résultats

Les figures n°21 et n°22 nous permettent d'étudier l'évolution des concentrations en orthophosphate et en nitrate durant toute la période d'expérimentation. On peut visualiser les ajouts et les consommations de ces deux éléments indispensables au développement du périphyton.

Ces graphiques nous permettent également de vérifier qu'il y a effectivement les concentrations souhaitées en orthophosphates, et ce pour toute la durée de l'expérimentation, pour les canaux 2, 3 et 4 (à savoir : 150, 500 et 1000 µg/l).

1- Evolution des concentrations en orthophosphate et nitrates
a) L'orthophosphate

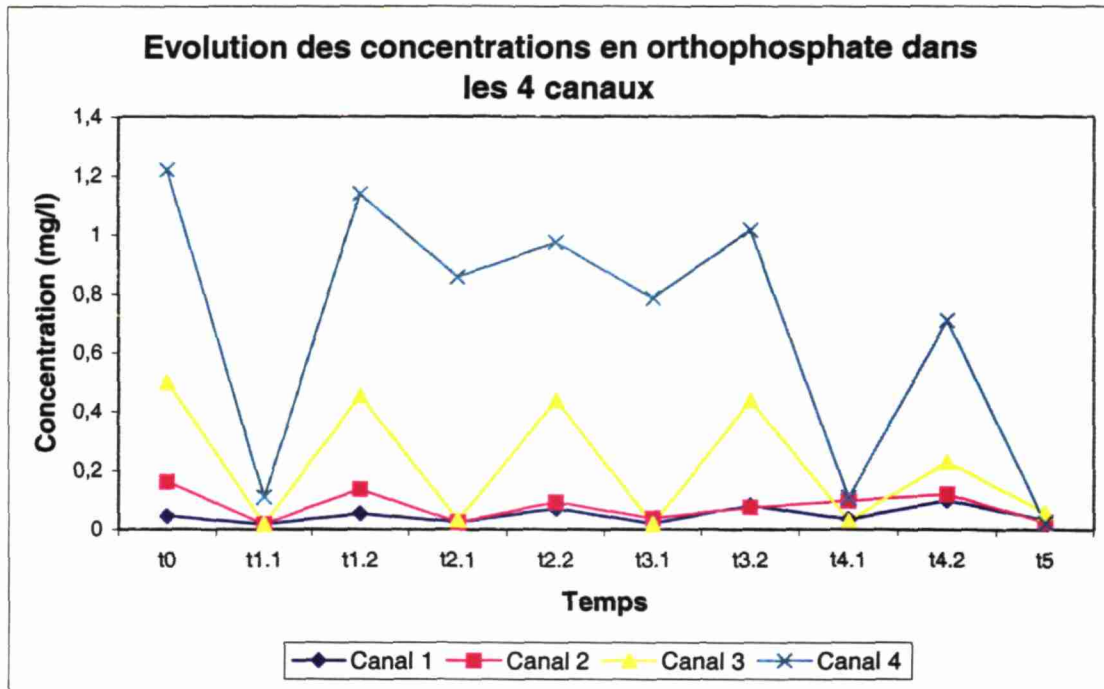


Figure n°21

Cette figure met en évidence que l'on a une importante consommation en orthophosphate lorsque les nitrates sont limitants dans le milieu c'est-à-dire au 7^{ème}, 29^{ème} et 36^{ème} jours.

b) Les nitrates

Cette évolution est représenté dans la figure n°22.

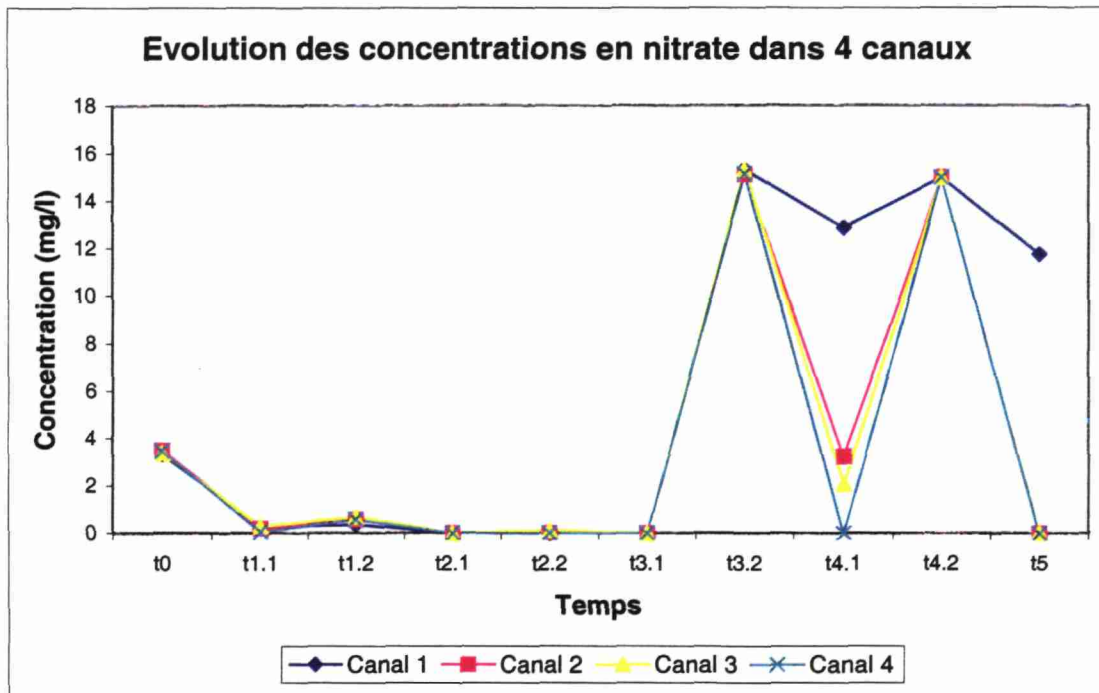


Figure n°22

Au bout de 14 jours d'expérimentation, les nitrates sont épuisés. Après ajout de nitrate au 21ème jour, (à une même concentration pour tous les canaux) on constate que plus l'ajout en phosphore est important, plus il y a de consommation en nitrate dans le milieu. Pour le canal 1, carencé en phosphore en permanence, la baisse en nitrate observée au 29^{ème} jour semble être imputable à l'activité bactérienne, les algues étant peu actives.

2- Evolution de la biomasse chlorophyllienne dans les 4 canaux

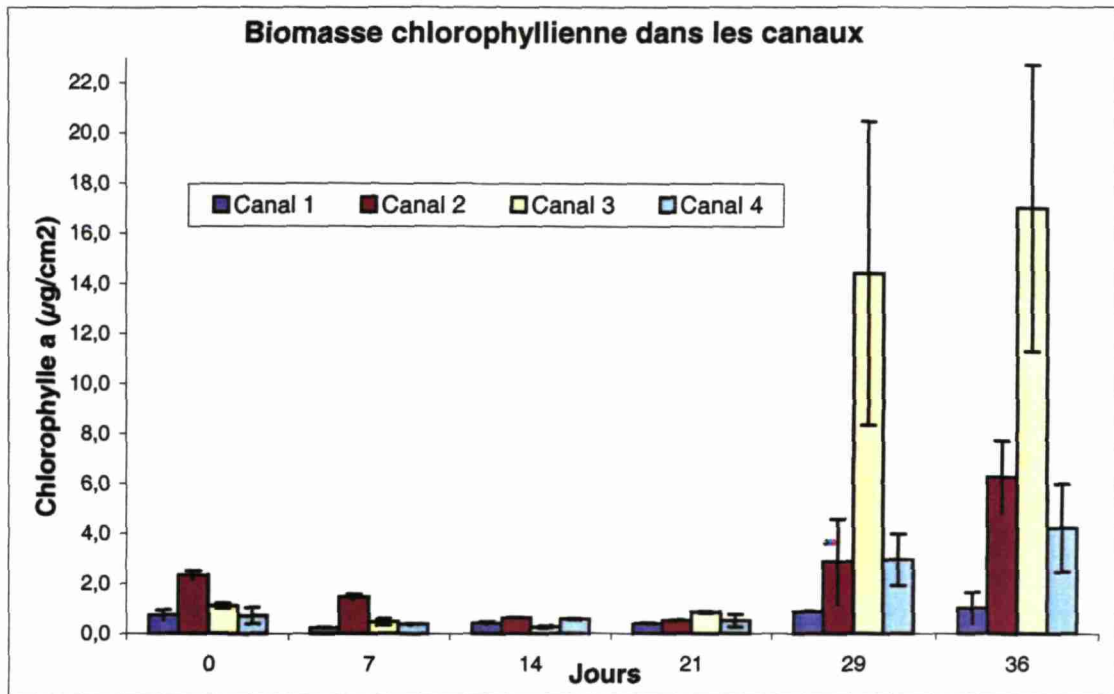


Figure n°23

D'après la figure n°23, on constate, sur l'ensemble des 4 canaux, après la phase de colonisation, une chute de la biomasse chlorophyllienne au 7^{ème} jour d'expérimentation. Ensuite, on observe une phase de stabilisation suivie d'une augmentation de la quantité de chlorophylle pour le 29^{ième} et le 36^{ième} jour. Cette reprise de croissance peut s'expliquer par l'ajout de 15 mg/l de nitrate dans tous les canaux au 21^{ème} jour. En effet, nous nous sommes rendus compte d'une carence en nitrate pendant les 2 semaines précédentes. Ceci pouvait s'observer à l'œil nu mais il a fallu attendre les résultats de la chimie avant de pouvoir intervenir à ce niveau.

Le même type d'observation peut être fait pour les canaux 2, 3, et 4 mais à la différence près que pour ces canaux, les biomasses chlorophylliennes sont beaucoup plus importantes que pour le canal 1 pour lequel il n'y a jamais eu d'ajout en phosphore. Lorsque l'on étudie les résultats du canal 1, on constate que sa production algale est toujours inférieure à ceux ayant reçu des ajouts.

3- Evolution de la numération bactérienne dans les 4 canaux.

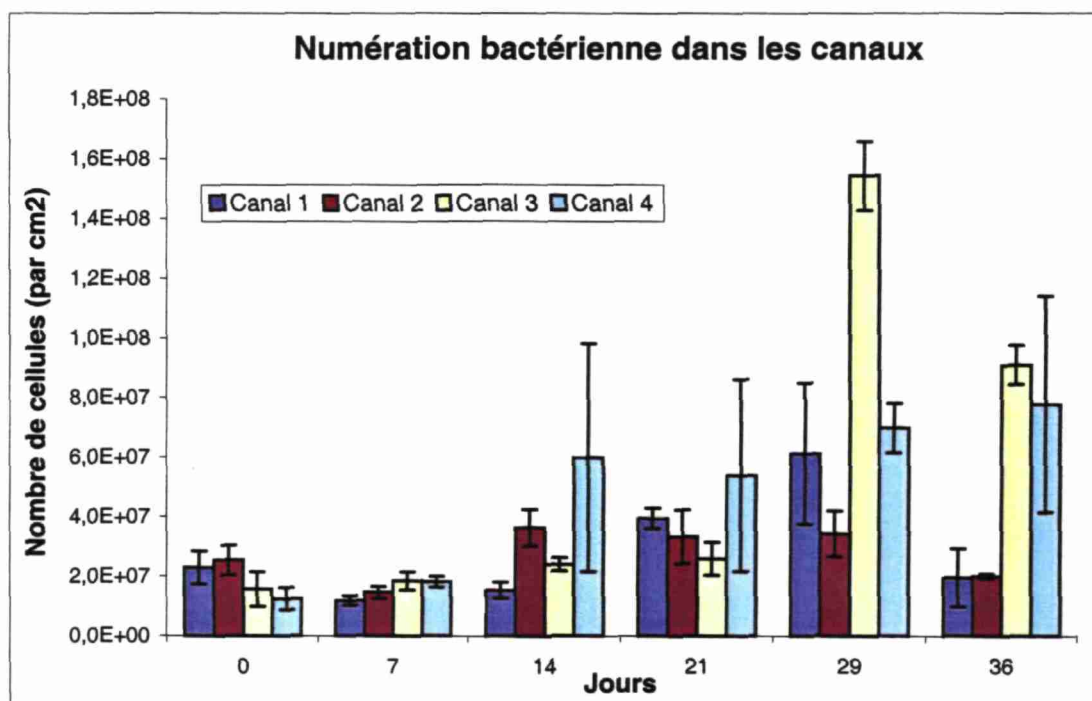


Figure 24

A T0, la colonisation du support est identique pour les quatre canaux du point de vue nombre de cellule par cm².

Les résultats de la numération ne montrent pas de réelle évolution pendant la première semaine. Au bout de 14 jours on observe une augmentation du nombre de cellule bactérienne dans le canal 4, cependant l'écart type moyen calculé sur les deux répétitions est relativement important. Ce n'est qu'à partir du 29^{ème} jour que l'on constate une différence significative entre les différents canaux, avec un nombre de cellule très important pour le canal 3.

L'augmentation du nombre de cellule est à mettre en relation avec l'ajout de nitrate réalisé après 21 jours d'expérimentation.

4- Etude de la croissance bactérienne et algale en fonction de la consommation en nutriments

Afin d'expliquer l'augmentation de la biomasse chlorophyllienne et bactérienne nous allons analyser l'évolution de la quantité de carbone (chlorophyllien et bactérien) en fonction de la consommation en nitrate et en orthophosphate.

Pour déterminer la quantité de carbone bactérien présent sur le film de polyéthylène, les résultats de tous les comptages sont repris un par un.

Pour chacun d'entre eux, on sépare les volumes cellulaires, exprimés en μm^3 , en trois classes (Rebillard, 1993) :

$< 0,065 \mu\text{m}^3$

$< 0,065-0,369 \mu\text{m}^3 >$

$> 0.369 \mu\text{m}^3$

A chaque classe de volume est attribué un facteur de conversion (respectivement : 0.4, 0.158, et $0.133 \text{ pgC}/\mu\text{m}^3$).

On somme les volumes contenus dans chacun des intervalles ; le volume total déterminé est multiplié par le facteur de conversion correspondant. Les valeurs ainsi obtenues sont alors additionnées, on obtient la quantité totale de carbone C_t . La quantité C de carbone par cm^2 présente sur le film est donnée par l'équation suivante :

$$C = (X * C_t) / x$$

~ Avec :

X : nombre de cellules bactériennes par cm^2 ;

x : nombre de cellules sur les 10 champs observés.

Pour la chlorophylle, la conversion en carbone se fait en multipliant la concentration en chlorophylle a , exprimée en $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, par un facteur de 50 qui tient compte de la taille des cellules (algues et diatomées).

Les résultats commentés sont présentés dans les figures 25, 26, 27, 28.

La comparaison entre les quatre canaux sera effectuée par périodes identiques :

- pas de temps de 7 jours,
- pas de temps de 14 et 21 jours,
- pas de temps de 29 et 36 jours.

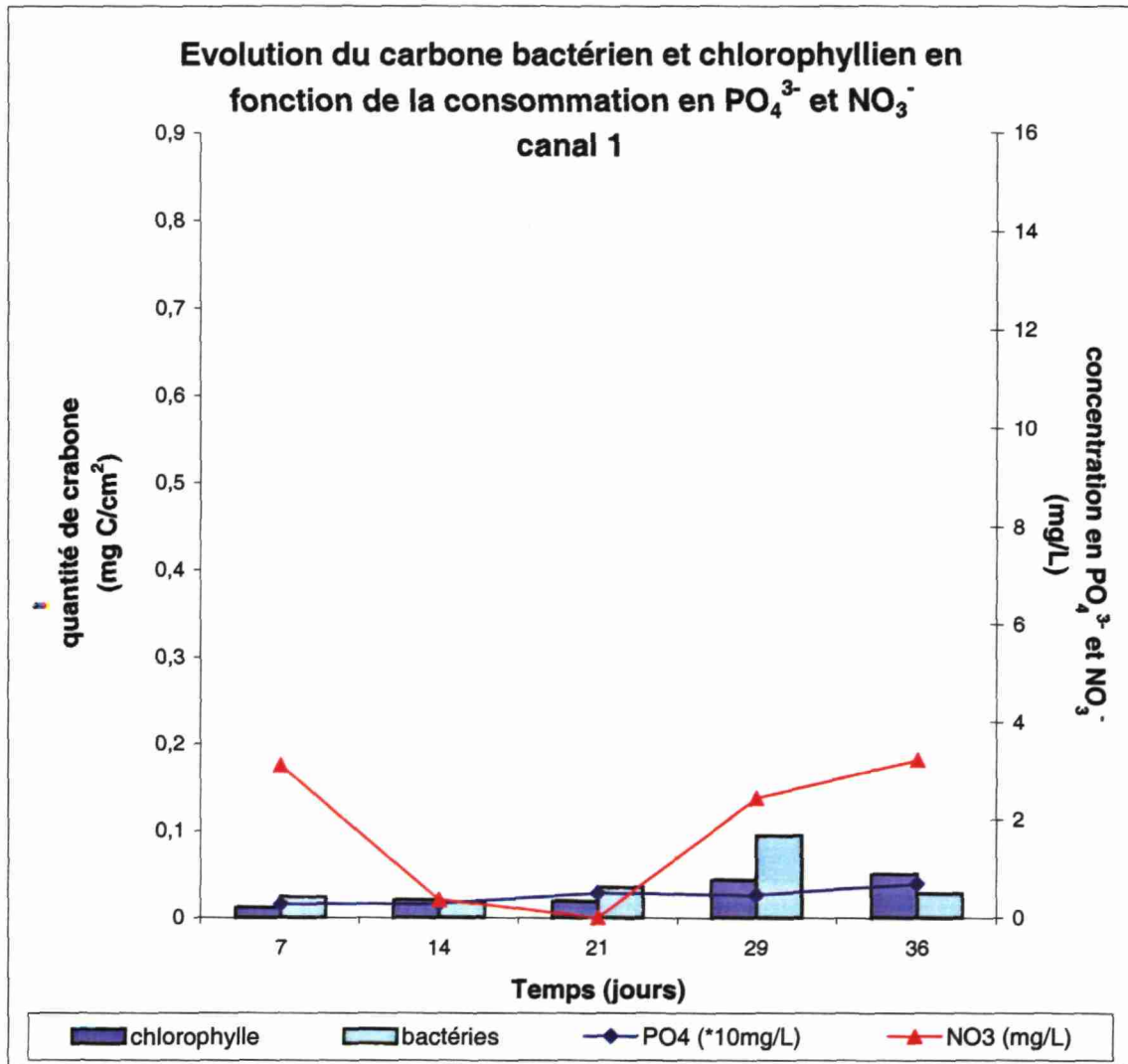


Figure n°25

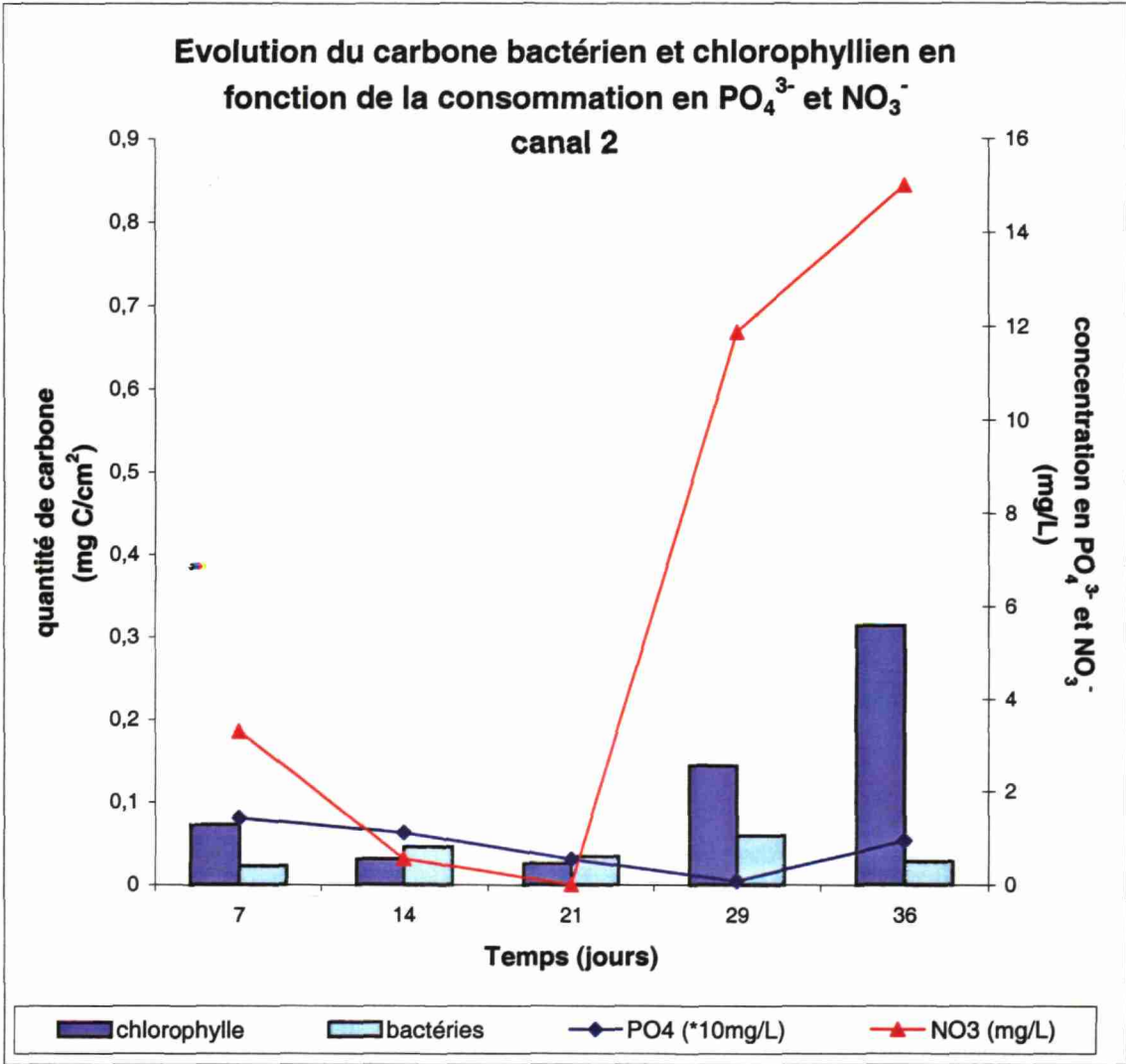


Figure n°26

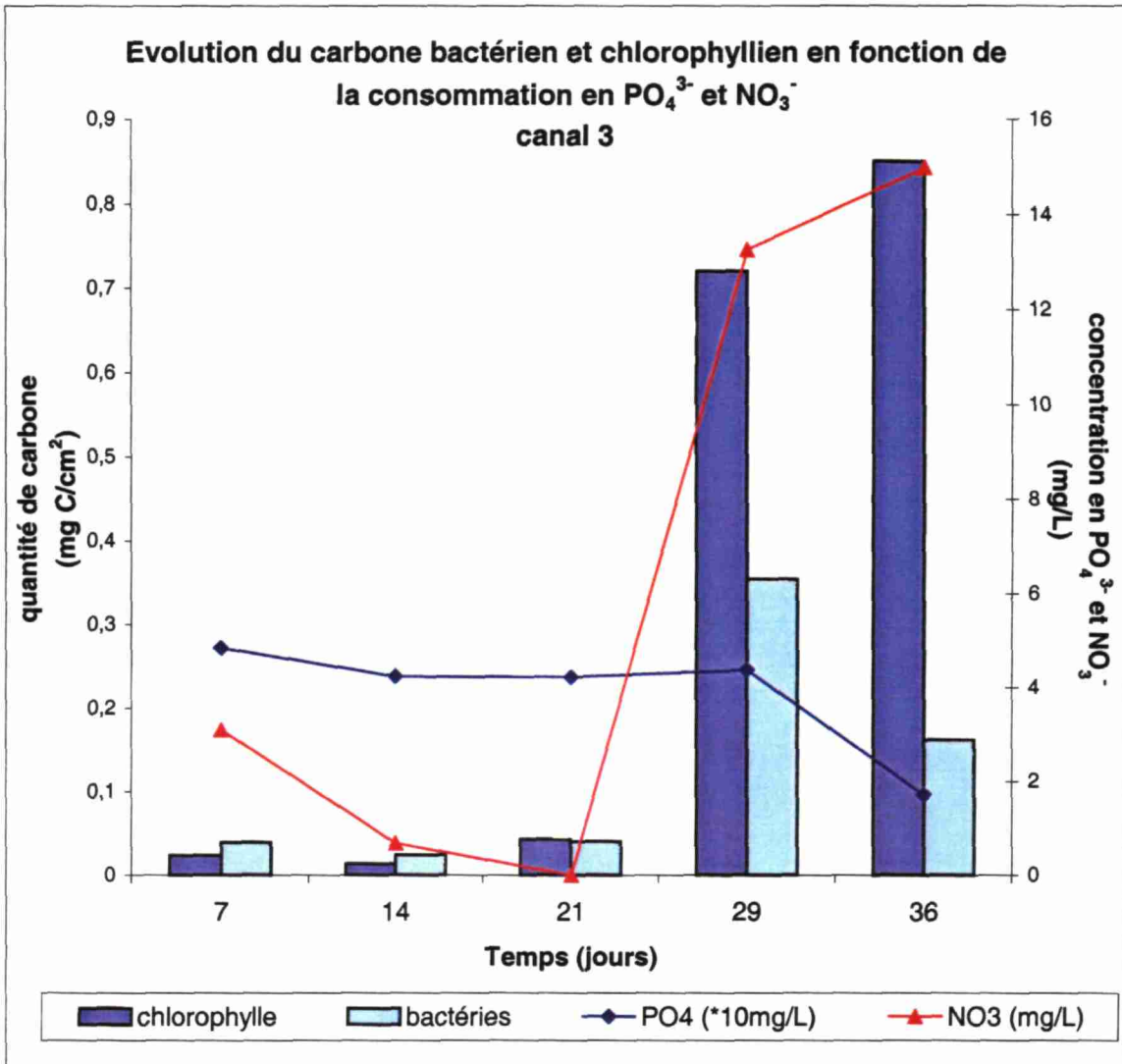


Figure n°27

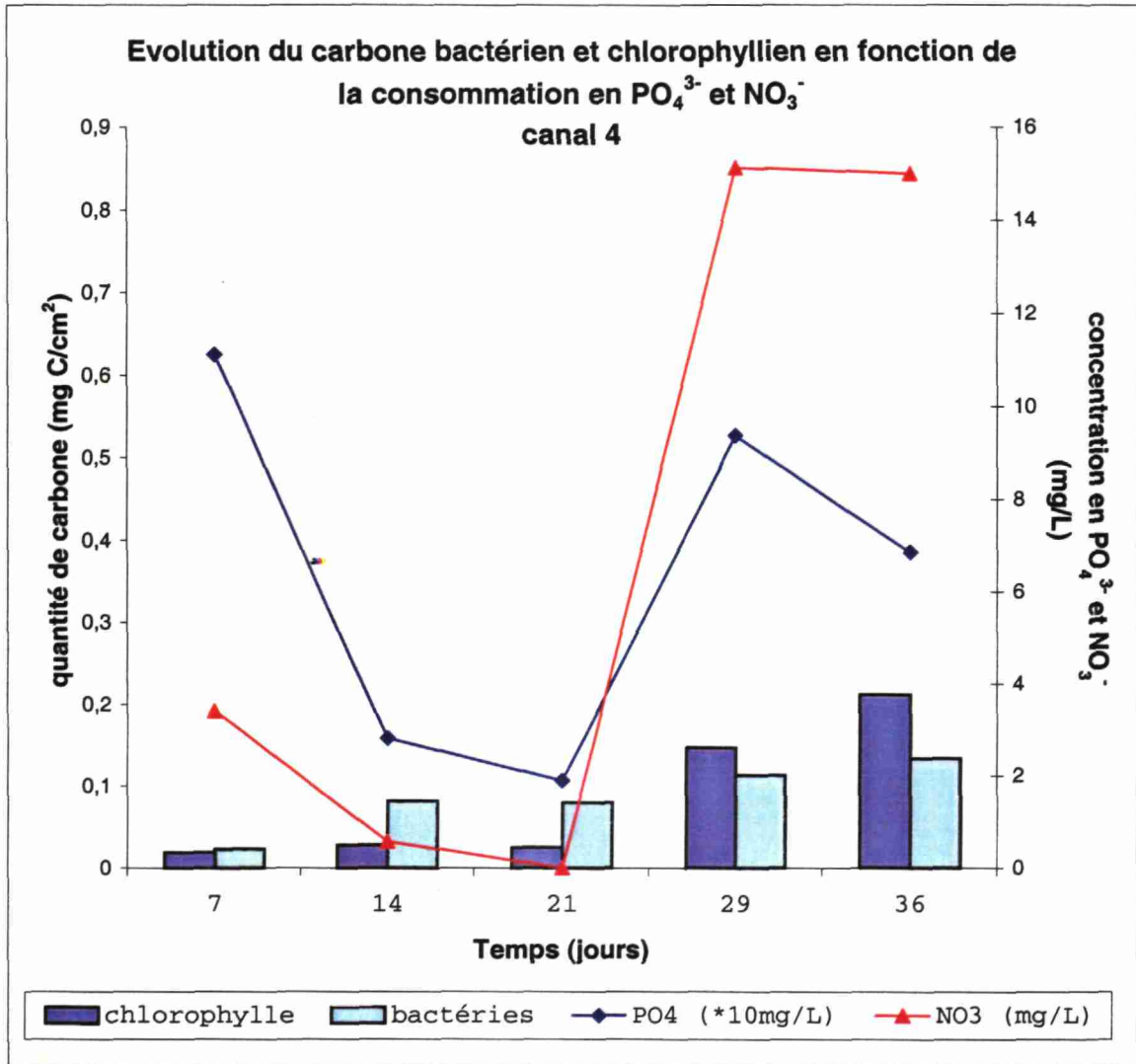


Figure n°28

✓ Période 7 jours

Pour des consommations quasiment identiques en nitrate et une production algale et bactérienne voisine, la consommation en orthophosphate est croissante en fonction de l'augmentation des ajouts en phosphore. Dès 7 jours les nitrates sont épuisés dans le canal 4 (cf. annexe).

✓ Période 14 à 21

Pour l'ensemble des quatre canaux, cette période se caractérise aussi par une consommation identique des nitrates apportés par le réajustement en eau de Garonne. A la fin de cette période les teneurs en nitrate sont totalement épuisées car il n'y a pas eu d'ajout compensatoire en cet élément. Les productions algales et bactériennes sont là aussi identiques à celle de la période 1, de même que les consommations en orthophosphates à l'exception du canal 4 où celle-ci est plus faible. Cela s'explique par la consommation quasi totale, au bout de 7 jours, des nitrates liée à l'ajout maximal en phosphore dans le canal 4.

✓ Période 29 et 36

Caractérisée par un réajustement important en nitrate (15 mg/L) dans les quatre canaux, cette période s'identifie par une croissance de la biomasse bactérienne et algale :

- dans le canal 1 elle est modérée du fait de la limitation en phosphore ;
- dans le canal 2, à 29 jours, elle est plus importante et correspond à l'utilisation de phosphore de réserve traduisant une période transitoire d'adaptation aux nouvelles conditions du milieu (consommation très faible du phosphore dissous dans le système). A 36 jours, la biomasse algale est encore plus élevée du fait de l'utilisation, cette fois ci, du phosphore dissous du milieu.
- dans le canal 3 elle est très élevée mais les graphes ne montrent pas de période transitoire d'adaptation comme précédemment. Avec un enrichissement à 500 µg/L en phosphore dans le canal 3, la compétition que l'on peut supposer entre algues et bactéries dans le canal 2 n'existe pas pour le canal 3.
- dans le canal 4 elle est plus faible que dans les canaux 2 et 3, bien que les consommations en phosphore y soient nettement plus élevées.

5- Synthèse

Cette expérimentation nous a permis d'évaluer les parts respectives des activités algales et bactériennes dans le biofilm.

On observe, après l'apport nutritif, une augmentation des biomasses algales et bactériennes lorsque les éléments azotés et phosphorés ne sont pas limitants.

Le prélèvement de phosphore se fait essentiellement sous forme d'orthophosphate car il est directement assimilable, contrairement aux autres formes de phosphore qui nécessitent une hydrolyse exoenzymatique. Les algues peuvent ainsi stocker le phosphore sous forme de granules de polyphosphates, appelés « phosphore de luxe ».

On constate également que plus la concentration en phosphore est importante, plus le biofilm est capable d'utiliser ce phosphore. Lorsque le milieu est carencé en azote, on observe une baisse des biomasses algales et bactériennes puis, par suite, une augmentation du nombre de bactérie. La dégradation, algale semblerait ainsi assurer la nutrition bactérienne.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

BIBLIOGRAPHIE

ARGILLOS F., 1996 – Rôle du périphyton dans la dynamique des éléments nutritifs. DESU « Sciences Naturelles », Université de Bordeaux I, 67 pages, 4 annexes.

CAVEDA E., 1999 – Dénombrement des bactéries nitrifiantes : application à l'étude des biofilms épilithiques. DESU, Université Paul Sabatier, Toulouse III, 39 pages, 7 annexes.

DELSART C., 1995 – Les bactéries de station d'épuration : rôle et devenir en rivière. DESS « Géosciences appliquées aux équipements en milieux urbains, ruraux, littoraux et côtiers », Université de Bordeaux I, 62 pages, 22 annexes.

FAIRCHILD G.W., SHERMAN J.W., 1992 – Linkage between epilithic algal growth and water column nutrients in softwater lakes. *Can.J.Fish.Sci.*, 49 : 1641-1649.

GAUTHIER S., 1998 – Capacité d'assimilation d'un secteur particulier de cours d'eau en substrat sableux : étude du biofilm bactérien et algal. DESS « Eaux Continentales : pollutions et aménagements », Université de Franche Comté, 38 pages, 8 annexes.

HENNIAUX H., 1999 – Influence d'un rejet urbain épuré sur le développement du biofilm épilithique – étude in vitro. CESAC UMR C5576, 30 pages, 10 annexes.

HORNER R.R., WELCH E.B., VEENSTRA R.B., 1983 – Development of nuisance periphytic algae in laboratory streams in relation to enrichment and velocity. *In Periphyton of Freshwater Ecosystem* (Edited by Wetzel R.G.), pp. 121-134. Junk, The Hague, The Netherlands.

JONES S.E., LOCK M.A., 1989 – Hydrolytic extracellular enzyme activity in heterotrophic biofilms from two contrasting rivers. *Hydrobiol.*, 257 : 1-6.

LAHOUN V., 1994 – Etude du périphyton algal du fleuve Charente. DESS « Géosciences appliquées aux équipements en milieux urbains, ruraux, littoraux et côtiers », Université de Bordeaux I, 47 pages, 26 annexes.

LANCELOT C., 1984 – Extracellular release of small and large molecules by phytoplankton in the Southern Bight of the North Sea. *Estuar. Coast. Mar. Sci.*, 18 : 65-77.

LORENZEN C. J., 1967 - Determination of chlorophyll and phaeopigments : spectrophotometric equations. *Limnol.Oceanogr.*, 12 : 343-346.

MADIGOU E., 1999 – Caractérisation de l'état physiologique des bactéries au sein de biofilms épilithiques en réponse à divers enrichissement : rejets de stations d'épuration, nutriments. DEA « Ecologie des systèmes aquatiques continentaux », Université Paul Sabatier, Toulouse III.

MOSS B., 1968 – The chlorophyll a content of some benthic algal communities. *Arch. Hydrobiol.*, 65 : 51-62.

PARKER B.C., BOLD H.C., 1961 – Biotic relationships between soil algae and other microorganisms. *Am.J.Bot.*, 48 : 185-187.

PERCHERANCIER H., 1994 – Influence de supports de croissance sur la réponse de biofilms hétérotrophes benthiques à un apport polluant : étude en mésocosme. MST Chimie et Biologie Végétale, Université de Lyon 1, CEMAGREF, Division Qualité des Eaux.

REBILLARD J.P., 1999 – Contribution à la connaissance de l'écologie du fleuve Charente : étude la physico-chimie des eaux, des algues et de l'activité bactérienne en aval d'Angoulême. Thèse de Doctorat, Université de Metz, 143 pages, 19 annexes.

SOLLIER J., 1994 - Etude du périphyton bactérien du fleuve Charente. DESS « Géosciences appliquées aux équipement en milieux urbains, ruraux, littoraux et côtiers », Université de Bordeaux I, 46 pages, 3 annexes.

UKELES R., BISHOP J., 1975 – Enhancement of phytoplankton growth by marine bacteria. *J.Phycol.*, 11 : 142-149.

WALTON S.P., 1990 – *Discosmoectus gilvipes* (caddisfly) larvae and phosphorus enrichment on periphyton. *M. Sc. Thesis*, University of Whashington, Seattle, Washington.

ANNEXE 1

- DOSAGE DES PARAMETRES PHYSICOCHEMISTIQUES DE L'EAU -

Les ions ammonium

Le dosage est réalisé suivant la référence de Robyn Vere Pym et James Milham, Analyse Chemical vol 48 n°9 août 1976, ISO/TC/147/SC/2/WG/n 86. Il est effectué par spectrophotométrie d'absorption moléculaire avec analyseur à flux continu.

La méthode est applicable directement aux échantillons d'eau dont la concentration en sels ammoniacaux est inférieure ou égale à 0.5 mg/L en azote.

Les échantillons de concentrations supérieures à 0.5 mg/L doivent être dilués. La limite de quantification est de 0.01 mg/L N-NH₄.

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

L'azote Kjeldahl

Le dosage est réalisé à partir de la norme AFNOR T 90-110.

Le principe est celui du dosage par spectrophotométrie après minéralisation.

La prise d'essai (50 ml d'échantillon) est introduite dans des tubes de Bushi avec deux billes de verre (régulateur d'ébullition), 1g environ de catalyseur de minéralisation et 10 ml d'acide sulfurique 100 %. Les tubes sont alors placés dans le minéralisateur Bushi et reliés à une pompe à vide afin d'éliminer les vapeurs d'acide. La minéralisation se déroule pendant d'une heure trente environ ; elle est considérée incomplète si le liquide est trouble ou très coloré. Les minéralisats obtenus ainsi que les eaux de rinçage sont recueillis dans une série de béchers de 200 ml de façon à obtenir un volume final proche de 150 ml. L'ensemble est alors neutralisé avec de la soude 10 N puis de la soude diluée pour obtenir un pH (contrôlé au pH-mètre) entre 4,3 et 5. L'ensemble est introduit dans des fioles de 200 ml complétées à l'eau déminéralisée. La suite des analyses est alors identique à celle des formes de NH₄⁺.

La lecture au spectrophotomètre se fait à 633,5 nm. Les concentrations déduites des absorbances sont exprimées en mg N/l.

Les nitrites et les nitrates

Le dosage est réalisé suivant la norme AFNOR (1987) NF T90.012 (« Essai des eaux, dosage des nitrites et des nitrates, méthode automatique par spectrophotométrie d'absorption moléculaire »).

La procédure automatique pour la détermination des nitrites est une adaptation de la méthode de diazotation des « Standards Methods ».

En milieu acide (pH 2,5), l'ion nitrite réagit avec la sulfalimamide pour donner un composé diazoté qui, associé au dichlorure de N(1-naphtyl éthylène diamine) forme un complexe rose mesurable colorimétriquement entre 520 et 540 nm.

Les nitrates sont réduits en nitrites par passage de l'échantillon d'eau dans une colonne contenant des grains de cadmium cuivré. Les nitrites formés sont dosés par la méthode de diazotation des nitrites. La concentration en nitrate est obtenue par différence entre la concentration totale (nitrate + nitrite) et la concentration en nitrites.

L'orthophosphate

Le dosage est réalisé selon la norme AFNOR T 90-023.

20 ml d'échantillon à doser sont introduits dans un pilulier dans lequel on ajoute 1 ml d'acide ascorbique (à 20 g/l) et 4 ml de réactif combiné (acide sulfurique + tartrate double sodium antimoine + molybdate d'ammonium). Après les 30 minutes nécessaires au développement de la coloration bleue, la lecture spectrophotométrique des échantillons se fait à la longueur d'onde $\lambda = 890$ nm ; le blanc étant réalisé avec de l'eau déminéralisée.

Le phosphore total

Le dosage est effectué selon la norme AFNOR T 90-023.

100 ml d'échantillon à analyser sont introduits dans des ballons de Kjeldahl de 300 ml avec deux billes de verre (régulateur d'ébullition), 3 ml d'acide sulfurique concentré et 0,5 ml d'acide perchlorique 70 %. L'ensemble est ensuite porté à ébullition et évaporé jusqu'à l'apparition des fumées blanches ; dès lors, les colonnes réfrigérantes sont placées au-dessus des ballons et le chauffage est maintenu pendant 1 heure environ jusqu'à éclaircissement de la solution. A la fin du chauffage, les colonnes sont rincées avec 40 ml environ d'eau déminéralisée ; 11,5 ml de soude 10 N sont ajoutées aux ballons. Leur contenu est ensuite versé dans des fioles jaugées de 100 ml et le volume est ajusté à 100 ml avec de l'eau déminéralisée. La suite du dosage rejoint le protocole d'analyse des orthophosphates.

L'analyse au spectrophotomètre des échantillons se fait à la longueur d'onde $\lambda = 890$ nm ; le blanc étant réalisé avec de l'eau déminéralisée.

ANNEXE 3

**- Résultats des dénombrements
bactériens et des volumes cellulaires
moyens obtenus lors des différentes
campagnes de terrain -**

Dénombrements bactériens

Nombre de cellules par ml	13 juin	18 juillet	8 août	août 22
Pinsaguel	1,16E+08	6,08E+06	2,34E+06	3,40E+06
Gagnac	1,00E+08	1,30E+07	5,29E+06	6,39E+06
Sauveterre	1,68E+08	1,46E+07	3,45E+06	3,21E+06
Pont Layrac	7,45E+07	1,89E+07	1,56E+06	1,11E+07
Boé	1,47E+08	1,73E+07	2,81E+06	1,48E+07

Volumes cellulaires moyens

(μm^3)	13 juin	18 juillet	8 août	22 août
Pinsaguel	0,04824	0,07791	0,04023	0,0298
Gagnac	0,05505	0,13975	0,04715	0,0362
Sauveterre	0,0402	0,06812	0,05453	0,04304
Pont Layrac	0,04219	0,10217	0,03858	0,05601
Boé	0,06062	0,0452	0,05014	0,03824

ANNEXE 4

**- Résultats des analyses
physicochimiques ainsi que des
paramètres biologiques dans les quatre
canaux -**

CANAL 1

	16/08 1	16/08 2 (T0)	23/08 1 (T1)	23/08 2	30/08 1 (T2)	30/08 2	06/09 1 (T3)	06/09 2	14/09 1 (T4)	14/09 2	21-sept (T5)
Orthophosphate (mg/L)	0,018	0,044	0,017	0,053	0,024	0,07	0,019	0,052	0,035	0,1	0,033
Phosphore total (mg/L)	0,09	0,15	0,1	0,12	0,08	0,08	0,09	0,11	0,09	0,08	0,01
Nitrate (mg/L)	0,34	3,35	0,24	0,37	0	0	0	0,32	12,88	10,94	11,77
Nitrite (mg/L)	0,012	0,076	0,005	0,017	0,01	0	0,013	0,016	0,043	0,041	0,085
Ions ammonium (mg/L)	0,056	0,094	0,027	0,026	0,041	0,03	0,026	0,028	0,019	0,031	0,072
Chlorophylle a ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	0,74		0,23		0,41		0,38		0,87		1,01
Numération bactérienne (E^{+07})	2,29		1,19		1,53		3,95		6,12		1,96

CANAL 2

	16/08 1	16/08 2 (T0)	23/08 1 (T1)	23/08 2	30/08 1 (T2)	30/08 2	06/09 1 (T3)	06/09 2	14/09 1 (T4)	14/09 2	21-sept (T5)
Orthophosphate (mg/L)	0,018	0,161	0,017	0,135	0,023	0,092	0,037	0,075	0,097	0,12	0,025
Phosphore total (mg/L)	0,12	0,25	0,1	0,16	0,12	0,21	0,14	0,22	0,14	0,18	0,03
Nitrate (mg/L)	0,29	3,5	0,2	0,56	0	0	0	0,12	3,25	2,94	0
Nitrite (mg/L)	0,016	0,069	0	0,02	0,018,	0,007	0,018	0,041	0,315	0,267	0,051
Ions ammonium (mg/L)	0,053	0,062	0,024	0,028	0,027	0,029	0,02	0,022	0,035	0,036	0,046
Chlorophylle a ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	2,33		1,46		0,62		0,52		2,87		6,28
Numération bactérienne (E^{+07})	2,54		1,46		3,62		3,34		3,44		2,02

CANAL 3

	16/08 1	16/08 2 (T0)	23/08 1 (T1)	23/08 2	30/08 1 (T2)	30/08 2	06/09 1 (T3)	06/09 2	14/09 1 (T4)	14/09 2	21-sept (T5)
Orthophosphate (mg/L)	0,033	0,501	0,017	0,454	0,031	0,439	0,017	0,439	0,031	0,23	0,058
Phosphore total (mg/L)	0,12	0,62	0,09	0,53	0,18	0,62	0,16	0,62	0,11	0,42	0,05
Nitrate (mg/L)	0,13	3,39	0,3	0,68	0	0,11	0	0,34	2,09	2,01	0,031
Nitrite (mg/L)	0,018	0,066	0,003	0,015	0,02	0	0,007	0,016	0,109	0,082	0,003
Ions ammonium (mg/L)	0,042	0,139	0,025	0,024	0,03	0,06	0,033	0,038	0,028	0,032	0,06
Chlorophylle a ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	1,11		0,47		0,26		0,85		14,4		16,99
Numération bactérienne (E^{+07})	1,57		1,85		2,41		2,6		15,4		9,11

CANAL 4

	16/08 1	16/08 2 (T0)	23/08 1 (T1)	23/08 2	30/08 1 (T2)	30/08 2	06/09 1 (T3)	06/09 2	14/09 1 (T4)	14/09 2	21-sept (T5)
Orthophosphate (mg/L)	0,025	1,22	0,109	1,139	0,856	0,974	0,784	1,016	0,109	0,71	0,024
Phosphore total (mg/L)	0,14	1,18	0,2	1,18	1,1	1,21	1,08	1,28	0,37	1,1	0,09
Nitrate (mg/L)	0,11	3,47	0,06	0,58	0	0	0	0,14	0	0,374	0
Nitrite (mg/L)	0,022	0,064	0,003	0,01	0	0,013	0,025	0,056	0,064	0,041	0,062
Ions ammonium (mg/L)	0,111	0,139	0,027	0,028	0,024	0,046	0,019	0,023	0,024	0,03	0,022
Chlorophylle a ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	0,72		0,38		0,57		0,51		2,95		4,24
Numération bactérienne (E^{+07})	1,25		1,82		5,39		5,39		6,99		7,78