



**HAL**  
open science

# Les bactéries de station d'épuration : rôle et devenir en rivière

Christine Delsart

► **To cite this version:**

Christine Delsart. Les bactéries de station d'épuration : rôle et devenir en rivière. Sciences de l'environnement. 1995. hal-03797171

**HAL Id: hal-03797171**

**<https://hal.inrae.fr/hal-03797171>**

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.

## **MEMOIRE**

présenté devant  
l'université de BORDEAUX I  
en vue de l'obtention du  
**DIPLOME D'ETUDES SUPERIEURES SPECIALISEES**  
«Géosciences Appliquées aux équipements en milieu urbains, ruraux, littoraux et côtiers »  
par  
**Christine DELSART**

# **LES BACTERIES DE STATION D'EPURATION : ROLE ET DEVENIR EN RIVIERE.**

Septembre 1995.

Division « Qualité des eaux », CEMAGREF groupement de Bordeaux.

# **MEMOIRE**

présenté devant

l'Université de BORDEAUX I

en vue de l'obtention du

**DIPLOME D'ETUDES SUPERIEURES SPECIALISEES**

«Géosciences Appliquées aux équipements en milieux urbains, ruraux, littoraux et côtiers»

par

**Christine DELSART**

## **LES BACTERIES**

**DE STATION D'EPURATION :**

**ROLE ET DEVENIR EN RIVIERE.**

Septembre 1995.

Division « Qualité des Eaux », CEMAGREF Groupement de Bordeaux.

# PRESENTATION DU CEMAGREF

Le CEMAGREF Groupement de Bordeaux mène l'essentiel de ses recherches dans le domaine de l'eau et de l'espace rural.

Les activités de recherche sont réparties entre 5 divisions:

- AQUACULTURE ET PECHE,
- FROID,
- OUVRAGES ET RESEAUX HYDRAULIQUES,
- PRODUCTION ET ECONOMIES AGRICOLES,
- QUALITE DES EAUX.

## DIVISION « QUALITE DES EAUX »

Composée de 17 agents dont 10 ingénieurs, la division Qualité des Eaux du Groupement de Bordeaux exerce des activités d'appui technique et de recherche pour l'amélioration de la qualité des milieux aquatiques continentaux et la réduction des impacts dus aux usages qu'ils supportent.

Les approches développées dans la division sont axées sur la complémentarité entre les investigations au laboratoire et les mesures et les expérimentations pratiquées sur le terrain, en station d'épuration et systèmes aquatiques naturels (lacs, rivières et bassin versant...).

## DOMAINES DE COMPETENCE

### Fonctionnement des systèmes aquatiques continentaux

- Dynamique des nutriments et des polluants métalliques et organiques de synthèse dans les bassins versants.
- Gestion écologique des cours d'eau et plans d'eau, y compris les aspects piscicoles.
- Tests et indices biologiques d'appréciation globale de la qualité des eaux fondés sur les algues.
- Expertise des pollutions accidentelles.

### Traitement des eaux résiduaires

- Epuration des eaux usées en milieu rural, en particulier les procédés extensifs (lagunage naturel,...).
- Optimisation de l'épuration par lit bactérien.
- Epuration des effluents d'industries agro-alimentaires (caves vinicoles, distilleries, ...).

### Exploitation biologique des milieux aquatiques

Mise au point de techniques de repeuplement et de production d'écrevisses autochtones.

## REMERCIEMENTS

J'exprime toute ma reconnaissance à Mathieu Torre qui a su m'encadrer avec compétence et sympathie tout au long de mes recherches.

Je remercie Bernard Rousseau, directeur du Groupement de Bordeaux du Cemagref et Henri Beuffe, chef de la division «Qualité des Eaux» par intérim, de m'avoir accueillie au sein de leur établissement.

Je remercie vivement Paul Simon, en service civil au Cemagref, pour son aide précieuse au laboratoire et durant les campagnes de terrain.

Enfin, je tiens à manifester toute ma sympathie à l'ensemble du personnel de la division «Qualité des Eaux» pour son accueil chaleureux.

# RESUME

En milieu aquatique, les micro-organismes jouent un rôle primordial dans la dégradation des matières organiques.

Les bactéries de rejets de station d'épuration, si elles survivent dans le milieu récepteur, pourraient être dotées d'un pouvoir auto-épurateur.

Nous avons donc entrepris un repérage biologique et chimique d'un panache d'eaux usées dans le fleuve Charente. Pour ce faire, trois campagnes de prélèvements ont eu lieu et des mesures de numérations, de biovolumes et d'activité des bactéries ont été effectuées par la méthode de coloration couplée DAPI-INT et analyse d'image sur l'ensemble des échantillons. En parallèle, des dosages des formes d'azote (Norganique, NH<sub>4</sub>, NO<sub>2</sub>, NO<sub>3</sub>) et des analyses de carbone organique dissous et particulaire (COD et COP) ont été réalisés.

A l'aval du rejet, des cellules de grande taille (de l'ordre de 0,2 µm<sup>3</sup>) sont mises en évidence. Elles survivent et semblent se développer sur 500 mètres.

De plus, dans des conditions d'étiage, ce développement correspondrait à un temps de survie des bactéries d'eaux usées de 1 à 2 heures dans le milieu naturel.

Le développement de ces micro-organismes dans la rivière laisse supposer une consommation de matière organique.

Cependant, en milieu naturel, il reste difficile de distinguer le phénomène de consommation de celui de dilution de l'effluent. C'est pourquoi, des expériences en laboratoire ont été menées en parallèle afin de déterminer la part qui incombe à chacun.

# LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

- **Figure 1** : Paramètres bactériologiques en Avril 95.
  - **Figure 2** : Paramètres chimiques en Avril 95.
  - **Figure 3** : Paramètres bactériologiques en Juin 95.
  - **Figure 4** : Paramètres chimiques en Juin 95.
  - **Figure 5** : Paramètres bactériologiques et rapport C/N en Juillet 95.
  - **Figure 6** : Paramètres chimiques en Juillet 95.
  - **Figure 7** : Répartition des 3 classes de volumes en pourcentages en Avril 95.
  - **Figure 8** : Evolution de 6 classes de taille en effectifs en Juin 95.
  - **Figure 9** : Mélange rivière-effluent.
  - **Figure 10** : Evolution longitudinale du peuplement bactérien.
  - **Figure 11** : Evolution des effectifs de 3 nouvelles classes de taille.
- 
- **Tableau 1** : Contenu carboné moyen pour 3 classes de volumes cellulaires.
  - **Tableau 2** : Evolution de la microflore bactérienne sur la Charente.
  - **Tableau 3** : Protocole opératoire des méthodes de coloration utilisées.
  - **Tableau 4** : Récapitulatif des conditions des différentes campagnes.

# SOMMAIRE

Page

INTRODUCTION	1
--------------	---

## PARTIE 1: SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE.

I. LES BACTERIES DES MILIEUX AQUATIQUES.	4
I.1. Le rôle des bactéries dans l'eau.	4
I.2. Dégradation bactérienne des matières organiques dans les eaux.	6
I.3. Notion de bactéries autochtones et allochtones.	7
II. METHODES D'ETUDE DES BACTERIES DES MILIEUX AQUATIQUES.	8
II.1. Mesure de l'abondance, du biovolume et de la biomasse des bactéries.	8
II.2. Mesure de l'activité bactérienne.	11
II.3. Evolution des populations bactériennes en milieu naturel.	11
II.4. Mesure de la matière organique consommable.	14
III. LE CARBONE ET L'AZOTE DANS LES MILIEUX AQUATIQUES.	15
III.1. Le carbone organique en milieu aquatique	15
III.2. L'azote en milieu aquatique.	17
III.3. Influence du rapport C/N.	19

## PARTIE 2: MATERIEL ET METHODES.

I. LE TRAVAIL DE TERRAIN.	21
I.1. Le site d'étude: le fleuve Charente.	21
I.2. Les campagnes de terrain.	24
II. INVESTIGATIONS DE LABORATOIRE.	27
II.1. Dosage du carbone organique.	27
II.2. Dosage des formes d'azote.	28
II.3. Traitement des échantillons de bactériologie.	28
II.4. Traitement des lames au microscope et analyse d'image.	30

## **PARTIE 3: RESULTATS ET INTERPRETATIONS.**

<b>I. RESULTATS.</b>	<b>35</b>
<b>I.1. Campagne d'Avril.</b>	<b>36</b>
<b>I.2. Campagne de Mai: essai de traçage au sel.</b>	<b>41</b>
<b>I.3. Campagne de Juin.</b>	<b>43</b>
<b>I.4. Campagne de Juillet.</b>	<b>49</b>
<b>II. ESSAI DE DISCRIMINATION DES POPULATIONS BACTERIENNES.</b>	<b>54</b>
<b>III. INVESTIGATION COMPLEMENTAIRE EN LABORATOIRE.</b>	<b>61</b>
<b>CONCLUSION ET PERSPECTIVES.</b>	<b>62</b>

# INTRODUCTION

Les systèmes de traitement biologique des eaux usées ont classiquement pour but de réduire le taux de matières organiques et de matières en suspension. En absence d'un traitement plus poussé (désinfection), 90 à 99% de la charge microbienne est retenue dans les installations.  $10^6$  à  $10^8$  micro-organismes par millilitre d'effluent traité seront ainsi disséminés dans le milieu récepteur.

La présence de ces micro-organismes a des conséquences importantes sur l'état sanitaire des eaux mais aussi sur l'équilibre biologique du milieu récepteur.

De ce fait, l'étude du devenir et du rôle des bactéries de station d'épuration intervient dans le but de gérer et de protéger la qualité des eaux marines ou continentales.

Depuis 1992, le Ministère de l'Environnement et le Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche ont lancé pour quatre années le Grand Programme Qualité-Epuration des Eaux (GPQEE) en vue d'une caractérisation de l'impact des effluents liquides urbains sur les milieux aquatiques.

Quatre partenaires scientifiques participent à ce programme : Anjou Recherche et le CIRSEE, laboratoires respectifs de la CGE et de la Lyonnaise des Eaux, Ifremer et le Cemagref, le but ultime étant d'obtenir des données suffisantes afin de modéliser cet impact.

L'étude présentée dans ce rapport a été effectuée au Laboratoire de Microbiologie de la Division Qualité des Eaux du Cemagref Bordeaux et s'inscrit dans ce grand programme.

Les travaux du Cemagref concernent le bassin versant continental de la Charente depuis l'amont jusqu'à la baie de Marennes-Oléron, ceux intéressant le milieu marin étant confiés à Ifremer.

Des travaux effectués par le groupe PIREN-Seine (Garnier et al, 1991) ont mis en évidence la présence de bactéries de grande taille dans la Seine en aval de la station d'épuration d'Achères. Ces bactéries de grande taille participent activement à la biodégradation de la matière organique mais paradoxalement elles disparaissent rapidement.

Ces résultats sont-ils généralisables à tous les hydrosystèmes ? La caractérisation et le devenir des micro-organismes des stations d'épuration rejetés dans les milieux aquatiques sera abordée au travers des paramètres: abondance, morphologie et activité bactérienne.

La participation de ces micro-organismes au cycle du carbone et de l'azote sera également prise en compte afin de déterminer l'impact sur le milieu naturel.

En effet, les bactéries de station d'épuration, allochtones, peuvent avoir un intérêt si elles manifestent une activité dans la dégradation de la matière organique et de façon plus générale dans l'auto-épuration des cours d'eau. Dans ce cas, le critère de taille est-il suffisant pour

repérer et suivre ces communautés au sein du milieu récepteur ? Il s'agit de vérifier si une discrimination morphologique entre ces populations rejetées par les stations d'épuration et celles habituellement présentes en rivière est suffisante.

Les techniques récentes de mise en évidence des micro-organismes telles que fluorescence et analyse d'image s'avèrent être des outils adaptés à l'étude des milieux naturels et de leur perturbation sous l'effet de rejets anthropiques.

**PARTIE 1 :**  
**SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE**

# I. LES BACTERIES DES MILIEUX AQUATIQUES.

La communauté bactérienne des lacs et des cours d'eau apparaît très diversifiée et hétérogène. D'après Block et Colin (1985), elle peut être schématiquement classée en quatre groupes :

- population libre ou planctonique qui concerne les individus entraînés au fil de l'eau sous forme de cellules réellement individualisées;
- 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;
- population caractérisée par les bactéries fixées sur des supports immergés : pierres (population épilithique), plantes aquatiques (population épiphytique), supports artificiels (coque de bateau, pile de pont, lames de verre, ...);
- 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).

L'étude présentée dans ce rapport ne concerne que les deux premiers groupes décrits ci-dessus.

## I.1. Le rôle des bactéries dans l'eau.

Les milieux aquatiques, eaux douces ou marines, reçoivent en permanence une grande quantité de matières organiques (provenant de la photosynthèse des végétaux, de feuilles ou animaux morts, ou de rejets d'effluents urbains ou industriels ...).

Dans le milieu naturel, il y a un recyclage permanent de cette matière organique et l'énergie reçue est consommée par un ensemble d'êtres vivants unis entre eux par des liens alimentaires. Une telle succession d'organismes dans laquelle la nutrition des êtres vivants situés à un niveau déterminé dépend entièrement de ceux situés immédiatement en aval représente une « chaîne alimentaire » ou « chaîne trophique ».

Des méthodes récemment développées en écologie microbienne ont permis de montrer que le compartiment bactérien était quantitativement important dans la plupart des écosystèmes aquatiques. De nombreux travaux ont montré depuis que les bactéries utilisent la matière organique dissoute et qu'elles sont consommées par les micro flagellés eux mêmes consommés par le zooplancton. Ainsi, d'après Garnier et Barillier (1991), ces relations trophiques ont

permis d'introduire la notion de boucle microbienne. Une partie de l'énergie est ainsi restituée à la chaîne trophique linéaire classique.

La dynamique de la boucle microbienne est donc le résultat de nombreuses et complexes interactions.

De plus, l'équilibre est fragile, et une pollution excessive ou permanente va provoquer une perturbation de l'écosystème et entraîner la prolifération de micro-organismes qui consomment beaucoup d'oxygène.

D'après Finance (1985), deux types de réactions sont possibles selon les conditions de milieu:

- si l'eau est riche en oxygène dissous et si les matières organiques sont peu abondantes, les processus aérobies dominent et il se forme du gaz carbonique, de l'eau et des nitrates qui sont utilisés par les végétaux pour la fabrication de nouvelles substances organiques;
- si l'eau ne contient pas assez d'oxygène dissous, il y a fermentation anaérobie avec production de gaz carbonique mais aussi de produits comme le méthane, l'ammoniaque, des métabolites sulfurées (H<sub>2</sub>S,...), des acides gras, des acides aminés ainsi que des composés plus ou moins toxiques (phénols ...).

Ainsi, par exemple, le rejet d'un effluent riche en matières organiques va provoquer des modifications de l'écosystème avec apparition de zones qui vont se succéder dans le sens du courant. La succession de ces zones est décrite par Finance (1985). Tout d'abord s'observe une zone de dégradation, où les eaux du fleuve et celles de l'effluent se mélangent. Une zone de décomposition active lui fait suite, où micro-organismes aérobies puis anaérobies vont se multiplier et vont décomposer la matière introduite dans le cours d'eau. Plus en aval, s'observera une zone de restauration, où l'épuration va peu à peu restituer aux eaux leurs caractères initiaux et à laquelle succédera progressivement une zone d'eaux propres.

En définitive, on peut comparer un tel milieu à un système de fermentation continue doué d'un système auto-épuration, c'est-à-dire d'un pouvoir d'élimination de la matière organique particulaire ou dissoute. Ce pouvoir, qui est détenu en grande partie par les bactéries, organismes clés du cycle biologique des eaux, va se traduire par une véritable pullulation bactérienne.

Cependant, selon la littérature, l'évolution d'un rejet dans le milieu naturel n'est pas décrit de la même manière. Ainsi, Servais et Garnier (1993) décrivent simplement une disparition rapide de la population bactérienne apportée par le rejet de la station d'épuration d'Achères dans la Seine.

## **I.2. Dégradation bactérienne des matières organiques dans les eaux.**

Les bactéries, qui représentent une des formes de vie la plus simple que l'on connaisse, jouent un rôle prépondérant dans le recyclage des matières organiques et donc dans l'équilibre écologique. Ainsi, Finance (1985) énumère les raisons de cette efficacité épuratoire. Tout d'abord, la grande diversité des réactions métaboliques des bactéries leur permet de s'adapter à diverses sources de nourriture et d'hydrolyser une grande variété de composés organiques.

De plus, les bactéries ont des possibilités d'adaptation métaboliques très diversifiées selon les conditions environnantes (température, salinité, oxygénation), certaines d'entre elles pouvant même interrompre leur cycle de vie par une étape de quasi dormance si les éléments nutritifs viennent à manquer.

Du fait de leur petite taille et, par conséquent, de la valeur élevée du rapport surface/volume, les bactéries sont capables de transformer les matières organiques présentes à des taux très faibles. Le transport rapide des substances nutritives à l'intérieur de la cellule lui assure ainsi une activité métabolique intense.

Si les matières organiques présentes dans les eaux peuvent être d'origines très variées, elles peuvent être également de toutes tailles, allant de petites molécules telles que le glucose à de grosses particules macroscopiques. Pour permettre l'action bactérienne, les éléments macroscopiques sont auparavant fragmentés par de nombreux animaux saprophages et les composés moléculaires obtenus subissent une hydrolyse enzymatique permettant ainsi l'action minéralisatrice finale des micro-organismes.

Théoriquement, tous les micro-organismes capables de se développer aux dépens de la matière organique peuvent jouer un rôle dans l'auto-épuration. Parmi les espèces bactériennes actives, pourront proliférer celles qui sont capables de dégrader le maximum de matières organiques en un minimum de temps. La composition de la microflore est sous la dépendance de divers facteurs forts complexes et difficiles à explorer, car, s'il est relativement aisé d'estimer une densité bactérienne, la part à accorder aux interactions bactériennes, en particulier aux phénomènes de compétitions, dans la croissance des populations, ne peut être précisée. En général, les composés facilement dégradables (protéines, hydrates de carbone..) peuvent être utilisés par une très grande variété d'espèces bactériennes. Ces processus sont en réalité très complexes, car ils sont contrôlés par tout un ensemble de mécanismes régulateurs.

### I.3. Notion de bactéries autochtones et allochtones.

L'hydrosphère, c'est à dire à la fois les eaux douces et marines, constitue un habitat approprié pour la croissance bactérienne.

D'après Schwartzbrod (1985), la population bactérienne autochtone des eaux douces possède quelques caractères communs:

- capacité de croître en présence de faibles concentrations en nutriments (rencontrées 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...).

A côté des bactéries autochtones, la communauté microbienne aquatique comporte des micro-organismes allochtones, c'est à dire des membres « passagers », transitoires de l'écosystème, qui peuvent être transportés et croître dans un écosystème étranger. Leur temps de survie est très variable, certains disparaissent rapidement, d'autres sont capables d'y survivre pendant des périodes prolongées. Enfin, certains ont des possibilités de s'adapter en formant des spores qui vont accroître leur survie.

Quoique les définitions de micro-organismes autochtones et allochtones soient mutuellement exclusives, 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 autochtones peuvent être actifs, pendant une période donnée, puis « dormants » au cours d'une autre période. Ainsi, même quand un micro-organisme trouvé dans un écosystème paraît incapable de croissance, il faut envisager qu'il puisse se développer ultérieurement à la suite d'un changement d'environnement favorable à sa croissance.

D'autre part, quelques micro-organismes sont dans des écosystèmes situés à la frontière de leur habitat. De tels micro-organismes survivent souvent pendant de longues périodes avant d'être déplacés, par compétition avec les micro-organismes autochtones.

Enfin, plus rarement, les micro-organismes allochtones qui entrent dans des écosystèmes sont capables non seulement de survivre, mais de s'y développer. Dans ce cas, soit ils colonisent des niches inoccupées, soit ils remplacent par compétition des micro-organismes de la communauté indigène et deviennent alors des bactéries autochtones.

## II. METHODES D'ETUDE DES BACTERIES DES MILIEUX AQUATIQUES.

### II.1. Mesure de l'abondance, du biovolume et de la biomasse des bactéries.

#### - Dénombrements bactériens.

Parmi les méthodes de dénombrement des bactéries, une distinction existe entre les méthodes directes, dans lesquelles les dénombrements s'effectuent par l'observation individuelle des cellules, et l'ensemble des autres méthodes qualifiées d'indirectes (dénombrement des bactéries par culture).

Dans ce rapport ne sera abordée que la méthode directe de dénombrement des bactéries par microscopie en épifluorescence. Utilisé depuis 1970, ce mode d'observation en lumière incidente requiert l'emploi de fluorochromes spécifiques des acides nucléiques bactériens. Le complexe ainsi formé est excité en lumière de courte longueur d'onde et réémet une lumière visible dans une longueur d'onde supérieure intense. On peut ainsi mettre en évidence des formes cellulaires particulièrement ténues ( $< 0,5 \mu\text{m}$ ) parmi d'autres particules non biologiques, sans pouvoir toutefois en observer de manière très fine la morphologie.

Deux techniques sont couramment pratiquées selon le fluorochrome utilisé :

- la coloration au 3,6-tétraméthyl diamino acridine ou Acridine Orange (A.O), avec laquelle il est difficile de distinguer les bactéries des particules inertes (colloïdes, détritiques...).
- la coloration au 4'-6-diamidino-2-phenylindole dihydrochlorure (DAPI), qui permet une diminution des colorations parasites.

L'utilisation de filtres noirs de  $0,2 \mu\text{m}$  de porosité est nécessaire pour retenir les bactéries. La coloration a lieu avant ou après la fixation sur filtre selon les auteurs.

Troussellier et al (1985) étudient la répartition des bactéries sur les filtres et la précision des abondances moyennes. Ainsi, il existe une variabilité non négligeable dans le mode de distribution des bactéries dans les eaux. Le mode de répartition le plus fréquemment rencontré est la répartition contagieuse sous forme d'agrégats. La recherche d'une technique qui élimine le degré naturel de contagion et qui aboutirait à une distribution aléatoire des individus s'est avérée nécessaire. L'utilisation préalable des ultrasons sur les échantillons peut améliorer la qualité des dénombrements.

## - Observation microscopique et analyse d'image.

Avant l'usage courant de l'analyse d'image, différentes méthodes de comptage ont été employées par de nombreux auteurs:

- la lecture directe à l'oeil au microscope,
- la lecture de clichés photographiques ou diapositives,
- le système vidéo utilisé par Rebillard et Torre en 1992. L'image est reçue sur moniteur par une caméra noir et blanc et transmise à une vidéo-imprimante qui permet l'obtention instantanée de clichés.

En 1985, Sieracki et Johnson utilisent l'analyse d'image couplée à la microscopie en épifluorescence pour le dénombrement et la détermination de la taille des bactéries d'échantillons d'eau de mer. L'image de la fluorescence des cellules du champ microscopique est digitalisée. Il est alors possible de l'analyser afin de dénombrer et de mesurer la taille de cellules individualisées sur un champ microscopique.

Le volume  $V$  d'une cellule est obtenu en utilisant:

$$V=8,5*S^{2,5}*P^{-2} \quad \text{avec } S: \text{aire de la section,} \\ P: \text{périmètre cellulaire.}$$

Des critiques de la méthode sont observées:

- la qualité des résultats dépend de la qualité de la préparation.
- la lecture peut être erronée par la présence de détritiques qui fluorescent.
- la mesure de la taille des cellules est limitée par la résolution du système en pixels. Ainsi, l'estimation de la taille des petites cellules est moins précise que celle des plus grosses cellules.

Got, Baleux et Troussellier (1993) comparent des résultats de dénombrements de souches bactériennes de référence et de bactéries des milieux aquatiques, par la technique de microscopie en épifluorescence des cellules bactériennes marquées au DAPI, réalisés simultanément par observation microscopique visuelle et par analyse d'images automatisée. Le comptage par microscope en épifluorescence et l'analyse d'image assure une reproductibilité du comptage comparable à celle réalisée par deux manipulateurs expérimentés. Il contribue de ce fait à la standardisation des processus de comptage.

Psenner (1991) utilise une caméra noir et blanc Hamamatsu C2400 suffisamment sensible pour les échantillons colorés au DAPI et souligne l'utilité de l'analyse d'image qui est la seule méthode permettant de mesurer directement le nombre et les biovolumes des bactéries. Il note la présence d'un halo lorsque les cellules présentent une forte fluorescence ou pour les cellules de grande taille, ceci devra être pris en compte lors du traitement de l'image. Il souligne également les limites physiques du microscope pour les objets dont la taille est inférieure à 0,2  $\mu\text{m}$ .

L'utilisation de l'analyse d'image couplée à la microscopie en épifluorescence est donc une méthode de dénombrement et d'estimation des volumes bactériens très satisfaisante. Elle permet, de plus une automatisation et une impartialité très importantes pour l'exploitation des résultats.

- Calculs de biomasses.

La biomasse de population bactérienne a été reconnue comme un paramètre important en écologie microbienne. Le biovolume des cellules permet d'estimer la biomasse carbonée bactérienne à l'aide de facteurs de conversion.

La production de carbone bactérien est un paramètre important pour la compréhension des flux de carbone et d'énergie dans l'écosystème aquatique, mais ces paramètres sont difficiles à mesurer.

Bratbak (1985) mesure directement le contenu carboné et le volume des cellules bactériennes et suggère un facteur de conversion de  $2,2 \cdot 10^{-13}$  g de C/ $\mu\text{m}^3$  pour les bactéries de la masse d'eau ou de  $5,6 \cdot 10^{-13}$  g de C/ $\mu\text{m}^3$  pour les bactéries fixées.

Aucun des facteurs de conversion n'est universel car le contenu en carbone des organismes varie en fonction de la taille et des espèces. Cependant, pour les bactéries, les facteurs de Simon et Azam (1989) sont désormais largement utilisés.

Ainsi, Simon et Azam considèrent que le contenu en carbone par unité de volume cellulaire est variable selon la taille des bactéries. Ils notent une augmentation progressive de la concentration en carbone et de la richesse en ADN lorsque les bactéries deviennent plus petites.

Rebillard et Torre (1992) ont utilisé les facteurs établis par Simon et Azam (1989) et ont retenu 3 classes de volumes dans lesquelles sont rangées toutes leurs valeurs, avec, pour chacune, un facteur de conversion. Ces classes seront utilisées pour notre étude.

Classe	1	2	3
Volume $\mu\text{m}^3$	<0,065	0,065 - 0,4	> 0,4
pg C / $\mu\text{m}^3$ (facteur de conversion)	0,400	0,158	0,133

**Tableau 1: Contenu carboné moyen pour 3 classes de volumes cellulaires (d'après Rebillard et Torre (1992)).**

## II.2. Mesure de l'activité bactérienne.

L'utilisation d'un fluorochrome permet le dénombrement de l'ensemble des cellules intactes d'un échantillon. Cependant, la connaissance de l'état physiologique (cellules actives ou non) des bactéries dans le milieu naturel est un problème délicat en écologie microbienne.

En effet, dans de nombreux cas, il existe un faible pourcentage de cellules métaboliquement actives. L'état de dormance est l'état le plus fréquent des bactéries dans les habitats naturels (contrairement aux conditions de nutrition favorables dans les essais de laboratoire par exemple).

La mise en évidence de l'activité respiratoire bactérienne passe par l'utilisation d'un sel de tétrazolium. Le principe est basé sur la mesure de la fonctionnalité des systèmes de transport d'électrons (activité ETS: « Electron Transport System »). L'INT ou chlorure de 2-(p-iodophényl)-3-p(nitrophényl)-5 phényl tétrazolium traverse les parois cellulaires et est réduit sous l'action des ETS en INT-formazan qui se présente sous forme de cristaux rouges intracellulaires. Le nombre de cellules présentant ces cristaux rouges intracellulaires représente le nombre de cellules physiologiquement actives.

De nombreux auteurs ont utilisé cette méthode pour évaluer la fraction bactérienne active. Dutton, Bitton et Koopman (1986) dans des échantillons d'eaux de lacs, Rebillard et Torre (1992) en rivière, Johnson et Ward (1993) ...

Lors du montage de la préparation entre lame et lamelle, le formazan, insoluble dans l'eau, se solubilise progressivement dans l'huile à immersion. Ceci oblige à une lecture rapide. Johnson et Ward suggèrent un temps de conservation des lames de 24 heures.

A l'observation, si la réduction de l'INT est fonction de l'intensité des processus respiratoires, des cellules peu actives développeront des cristaux trop petits et difficilement détectables ce qui entraînera une sous-estimation de la biomasse active. De plus l'INT-formazan n'est pas décelable sur les très petites cellules < 0,3  $\mu\text{m}$ .

## II.3. Evolution des populations bactériennes en milieu naturel.

Servais et Garnier (1993) mettent en évidence l'existence d'une population allochtone apportée par le rejet de la station d'épuration d'Achères dans la Seine. Cette population est différente sur le plan morphologique (biovolume supérieur) et physiologique (vitesse élevée d'incorporation de leucine mesurant l'accroissement de la biomasse).

Garnier, Servais et Billen (1991) étudient les variations temporelles et spatiales des abondances et biomasses bactériennes dans la Seine. La zone d'influence de la station d'épuration d'Achères est à nouveau analysée.

Le signal de la station d'épuration d'Achères est observé d'autant plus loin que le débit de la rivière est élevé.

Les auteurs notent, en raison d'un apport massif de bactéries allochtones par les effluents, la production à l'aval de la station d'un accroissement important des abondances (de  $5.10^9$  à  $15.10^9$  cellules/l), des biovolumes (biovolume moyen de  $0,2\mu\text{m}^3$ , soit trois fois supérieur à celui trouvé en amont) et donc des biomasses (de 100 à  $750\ \mu\text{g C/l}$ ).

Les bactéries allochtones se composent d'une proportion importante de bactéries de grande taille qui disparaissent dans le milieu plus rapidement que les petites.

Cependant, les expériences en culture montrent que les bactéries de grande taille croissent à un taux deux fois plus élevé que les petites. Les bactéries allochtones de l'effluent ont donc la capacité de croître dans les conditions environnementales de la rivière. Considérant leur taux de croissance élevé, ces bactéries pourraient constituer un acteur de la communauté bactérienne, contribuant significativement à la dégradation de la matière organique.

Cependant, du fait de leur taux de disparition élevé, elles ne peuvent agir que dans une partie restreinte de la rivière après la décharge de l'effluent. En effet, ces auteurs admettent que les grosses bactéries doivent être soumises à des processus de pertes importantes (brouillage, sédimentation).

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 (différents stades de pollution). L'abondance est mesurée après coloration au DAPI et la production par mesure du taux d'incorporation de Thymidine dans l'ADN bactérien\*.

(\* Remarque: les mesures de production bactérienne ne seront pas effectuées lors de notre étude.)

Ces auteurs mettent 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.

Rebillard et Torre (1992) étudient les caractéristiques de la microflore bactérienne sur la Charente et plus particulièrement sur un secteur subissant les rejets de l'agglomération d'Angoulême. Les cellules observées ont été comptées et mesurées par la méthode couplée DAPI-INT.

Ils mettent en évidence une augmentation des VCM (volumes cellulaires moyens) et du nombre de micro-organismes à l'aval des rejets de l'agglomération d'Angoulême. Ces résultats peuvent correspondre au mélange de deux populations bactériennes, celles de la rivière (autochtones) et celles des rejets (cellules de grande taille allochtones).

Les populations bactériennes des rejets de stations de traitement d'eaux usées entrent vraisemblablement en concurrence avec les populations autochtones pour la dégradation de la matière organique apportée par la rivière.

Les résultats obtenus sont les suivants :

	Volume Cellulaire moyen en $\mu\text{m}^3$	% de cellules actives	Nombre de cellules * $10^6$ par ml	Volume biomasse $\mu\text{m}^3 * 10^6$ par ml	ng Carbone par ml
Angoulême	0,14	36	1,29	0,176	28
Rejets : 0 km					
3 km	0,30	60	9,53	2,844	405
16 km	0,17	30	1,56	0,265	41
30 km	0,14	25	1,70	0,232	37

**Tableau 2: Evolution de la microflore bactérienne sur la Charente (Septembre 1992. D'après Rebillard et Torre)**

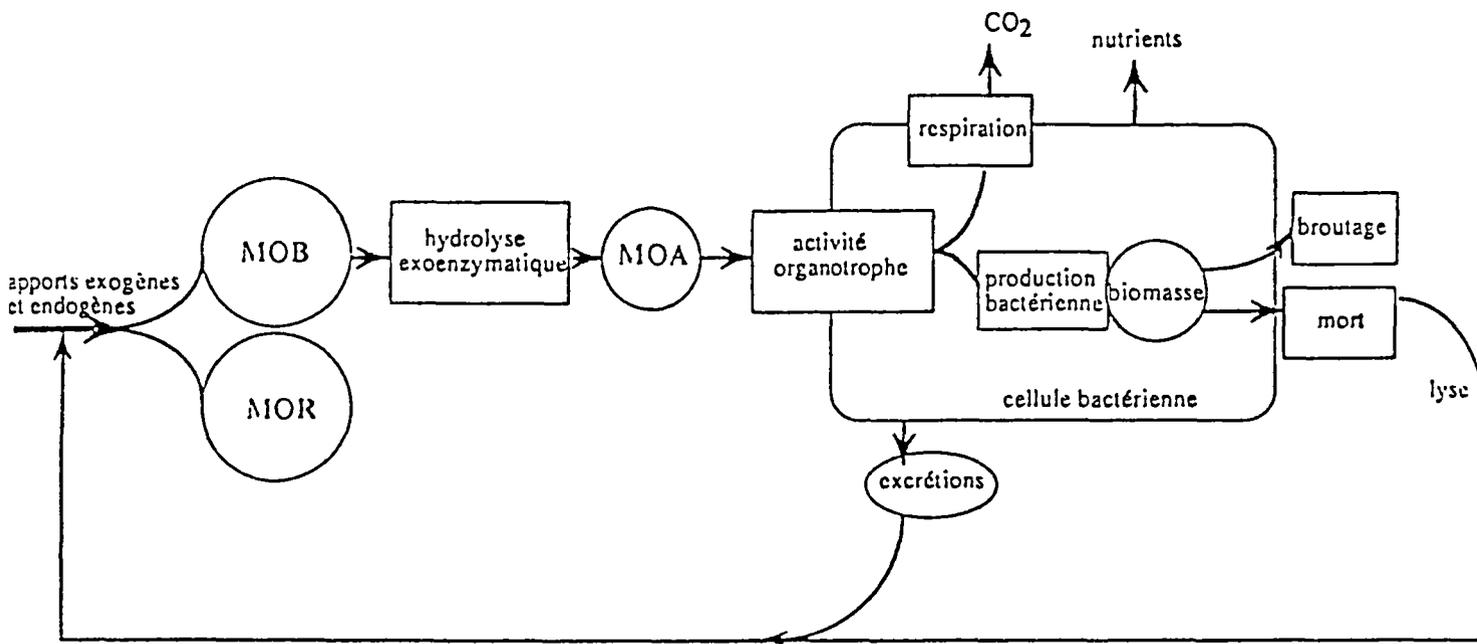
## II.4. Mesure de la consommation de la matière organique.

Dans la partie I.1, nous avons énoncé le rôle des bactéries au sein du milieu aquatique. En effet, les bactéries interviennent de façon importante pour le recyclage de la matière organique et représentent un maillon important de la chaîne trophique.

Ainsi, les activités exoenzymatiques des bactéries ont un rôle primordial dans la transformation des composés organiques dans les milieux aquatiques. En particulier, l'hydrolyse de composés à haut poids moléculaires qui sont réduits en monomères ou en petits oligomères permet l'assimilation par les bactéries.

Cette étape est un processus clé dans le fonctionnement de la boucle microbienne. Le schéma 1 illustre la succession de processus et montre la place des systèmes exoenzymatiques bactériens dans les biotransformations de la matière organique.

SCHEMA 1



D'après Montuelle et Volat (1993): **Intégration des processus exoenzymatiques dans la dégradation de la matière organique par les bactéries en milieu aquatique.**

MOB : matière organique biodégradable,

MOR : matière organique réfractaire,

MOA : matière organique assimilable.

Les composés à hauts poids moléculaires doivent subir des hydrolyses exoenzymatiques pour pouvoir devenir assimilables et participer à l'activité organotrophe: production de biomasse, respiration. La biomasse bactérienne sera recyclée dans le stock de matière organique à sa mort (= lyse cellulaire) ou consommée par les niveaux trophiques supérieurs.

Montuelle et Volat (1993) mesurent les activités exoenzymatiques microbiennes. L'objectif est d'évaluer dans quelle mesure ces tests d'activités enzymatiques peuvent rendre compte des capacités d'hydrolyse et de biodégradation de la matière organique dans les milieux aquatiques et comment ils peuvent s'insérer dans une problématique plus générale d'étude du fonctionnement des écosystèmes.

Différentes méthodes ont été élaborées pour mesurer le COD (carbone organique dissous) biodégradable qui représente le COD utilisable pour la croissance bactérienne. L'objectif de la mesure du COD biodégradable d'une eau est de prédire le potentiel de grossissement des bactéries.

Servais, Anzil et Ventresque (1989) ajoutent un inoculum de bactéries autochtones dans une eau stérile.

Frias, Ribas et Lucena (1992) utilisent un système de recirculation de l'échantillon dans une colonne de verre contenant un biofilm.

Dans les deux cas, ils mesurent la diminution de la concentration en COD qui représente la quantité de COD biodégradable.

### **III. LE CARBONE ET L'AZOTE DANS LES MILIEUX AQUATIQUES.**

#### **III.1. Le carbone organique en milieu aquatique.**

Dans l'eau, le carbone organique se trouve sous forme particulaire (carbone organique particulaire: COP) ou sous forme dissoute (carbone organique dissous: COD). La séparation entre ces deux classes varie selon les auteurs. Après filtration sur membrane de porosité 0,22, 0,45 ou 0,7  $\mu\text{m}$ , le filtrat renferme la fraction de matière organique dissoute et le rétentat sur membrane la fraction de matière organique particulaire.

Le COP et le COD des rivières sont soit d'origine autochtone soit d'origine allochtone.

Les principales sources autochtones de carbone organique sont issues du recyclage des biomasses animales et végétales (dégradation, lyse). L'hydrologie des rivières a une influence

significative sur l'origine du COD. Ainsi, les rivières qui drainent de grands lacs reçoivent les apports du phytoplancton.

Les principales sources allochtones de carbone organique viennent de l'érosion du sol, des débris de plantes, apports d'autant plus importants en période de crue. L'influence de l'hydrogéologie peut être importante. En effet, les apports de la nappe d'eau souterraine peuvent devenir non négligeables à la saison sèche (à l'étiage) ou en période de gel (la nappe d'eau souterraine est généralement source de COD).

Les effluents industriels et domestiques sont également une source allochtone importante de COP et de COD. L'eau d'égout domestique est largement biodégradable. Toutefois, la biodégradabilité des effluents domestiques dépend du type de matière organique et de la présence de composés toxiques ou inhibiteurs.

Il est à noter qu'il existe des échanges entre les formes particulaires et les formes dissoutes. En effet, par dissolution, lyse cellulaire ou produits d'excrétion, le COP devient COD. A l'inverse, le phénomène d'adsorption du COD sur des particules contribue à donner du COP. La matière organique biodégradable peut être d'origine particulaire ou dissoute.

D'après Spitzzy et Ittekkot (1991), 35% du COP est potentiellement décomposable et 15 % du COD est dégradable (avec une limite à 30%). Le flux de COP représente en rivière 0.5 à 12 % de la masse en suspension.

Spitzzy et Leenheer (1991) étudient plus particulièrement la chimie du COD. En effet, la composition chimique du COD n'est connue que partiellement.

Ils notent que le climat a un effet important sur la concentration en COD. Les teneurs en COD peuvent aller de valeurs inférieures à 1 mg/l en rivière alpine à des valeurs de plus de 20 mg/l en rivière tropicale.

### -Transformations et dégradations du COD (d'après Spitzzy et Leenheer (1991)).

Les molécules simples de faible poids moléculaire comme les hydrates de carbone, les acides aminés et les acides gras sont décomposés par des bactéries hétérotrophes en quelques heures.

Les substances organiques dissoutes à fort poids moléculaire qui sont biodégradables (mais qui ne passent pas les membranes cellulaires avant l'action d'enzymes extracellulaires ou de procédés abiotiques) se décomposent en un temps allant de quelques jours à des mois.

Le COD en rivière est souvent réparti en :

- Une quantité minoritaire venant de plantes biodégradables, phytoplancton, et de résidus bactériens qui seront rapidement recyclés;

- Une quantité majoritaire de résidus biologiques réfractaires comprenant des structures aromatiques et aliphatiques qui sont partiellement oxydés.

### - Rôle biogéochimique du COD.

Le carbone organique dissous en eau de rivière a un rôle de nutriment primaire mais aussi de micronutriment pour des organismes variés.

Les substances de faibles poids moléculaires sont des nutriments pour les bactéries, alors que les substances humiques dissoutes sont généralement considérées comme biologiquement réfractaires. Toutefois, cette portion de COD, considéré comme réfractaire dans certains environnements, peut devenir labile dans un milieu différent.

L'existence potentielle d'un COD réfractaire (ou non assimilable) devra être prise en compte lors de l'interprétation d'analyses de COD. En effet, il ne sera pas possible de dissocier le COD réfractaire du COD consommable.

De plus, d'après Spitzzy et Leenheer (1991), le COD, en faible concentration en eau de rivière, est physiquement moins disponible pour les micro-organismes que le COP auquel, s'attaquent plus généralement les micro-organismes.

D'après des expériences réalisées en laboratoire, Tranvik (1990) conclue que les molécules de COD à poids moléculaire élevé sont généralement plus disponibles (en quantité) pour les bactéries que les molécules à poids moléculaire faible. Dans les lacs, il trouve des concentrations en matière organique dissoute allant de 2,2 à 17,2 mg C/l.

D'après Garnier et Barillier (1991), la matière organique consommable est représentée par une forte proportion de molécules de bas poids moléculaire dans les milieux oligotrophes. Alors que dans les milieux eutrophes, les molécules de fort poids moléculaire sont prédominantes. Les concentrations en matière organique dissoute varient de 0,5 à 10 mg/l.

Vervier, Dobson et Pinay (1993) s'intéressent au rôle des écoulements souterrains et à l'influence des sédiments sur le carbone organique et les bactéries. L'importance des échanges à l'interface eau-sédiments devrait être prise en compte dans une étude concernant la matière organique et les bactéries.

## **III.2. L'azote en milieu aquatique.**

### - Le cycle de l'azote.

De par ses degrés d'oxydation très variables (de -3 à +5), l'azote est l'un des éléments les plus présents dans notre environnement sous des formes très diverses: on le rencontre sous

forme gazeuse comme élément majeur de l'air, sous forme ionique comme l'ammoniaque ou les nitrates, sous forme combinée dans les composés de type amine. C'est également un élément indispensable à la vie, puisqu'il est l'un des éléments constitutifs des acides aminés et donc des protéines.

La transformation de l'azote dans l'environnement est un mécanisme très complexe qui fait surtout intervenir des réactions biologiques. Les relations entre les différents composés azotés et les transformations qu'ils subissent composent le cycle de l'azote.

Les principales transformations que l'on y trouve sont : fixation de l'azote, assimilation de l'azote, ammonification, nitrification, dénitrification.

A l'origine de toutes ces transformations, on trouve des bactériens capables de réduire ou d'oxyder les différents composés de l'azote.

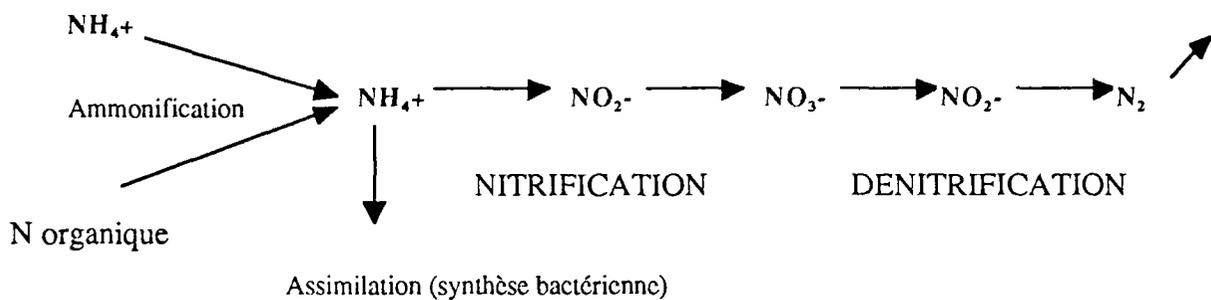
Certains micro-organismes sont capables de fixer l'azote gazeux  $N_2$  pour le transformer, par exemple, en nitrates ou en ammoniaque. Par la suite, l'assimilation de ces formes d'azote permet de synthétiser les protéines végétales sous forme d'azote organique.

Le processus d'ammonification fait passer l'azote de la forme organique à la forme ammoniacale  $NH_3$  ou  $NH_4^+$ . C'est le stade de décomposition biologique.

D'un autre côté, il existe des processus de transformation permettant, d'une part, l'oxydation biologique de l'ammoniaque en nitrates: c'est la nitrification, et, d'autre part, la réduction biologique des nitrates en azote gazeux : c'est la dénitrification.

-procédés biologiques d'élimination des composés azotés.

La dégradation de la pollution azotée s'effectue schématiquement de la façon ci-après:



### III.3. Influence du rapport C/N.

D'après différents auteurs, le rapport C/N (poids de carbone / poids d'azote) joue un rôle important dans l'écosystème aquatique.

Ainsi, le rapport C/N influence l'activité bactérienne et donc la dégradation de la matière organique. Un rapport élevé contribue à une activité importante.

D'après Menon (1993), dans un milieu où le rapport COT/NT (carbone organique total / azote total) est élevé (de 9 à 34), les organismes sont limités en azote, de ce fait l'addition de  $\text{NH}_4^+$  stimulera leur croissance. Le rendement de croissance est augmenté par l'apport de N sous forme  $\text{NH}_4^+$ . En revanche, l'apport d'azote sous forme organique n'influe pas sur le rendement de croissance.

Maurice (1993) suppose d'après ses résultats, une dégradation préférentielle de NOP (azote organique particulaire) par rapport au COP, information qu'il est possible de rapprocher d'une augmentation de C/N.

Le rapport C/N influence également le processus de la nitrification. D'après Bonnet (1994), le taux de nitrification est corrélé au rapport C/N pour les bactéries autotrophes nitrifiantes (pour une faible valeur de C/N le taux de nitrification diminue).

A l'inverse, un rapport C/N faible favorise l'activité nitrifiante par les bactéries hétérotrophes.

Enfin, une relation existe peut-être entre ce rapport et la morphologie des bactéries. D'après Menon (1993) un C/N faible induirait chez les bactéries un processus de réserve et ainsi une augmentation de volume. Au contraire, pour Staley J. et al (1989), les taux de réserves carbonées cellulaires (PHB) sont stimulés par un C/N élevé, les facteurs favorisant étant un déficit en azote et en oxygène.

Les valeurs de C/N (COP/NOP) établies par Kroer, Jorgensen et Coffin (1994) sont les suivantes :

C/N	Milieu
5,3 à 6,2	estuaire.
8 à 8,8	océan.
5,2 à 7,5	rivière eutrophe.

**PARTIE 2 :**  
**MATERIEL ET METHODES**

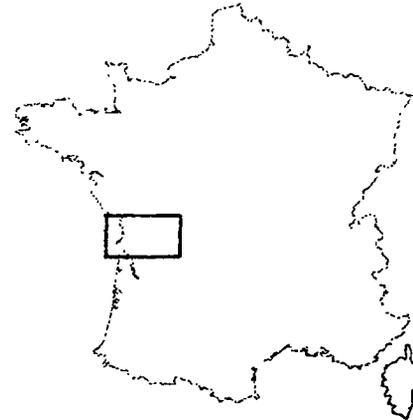
# I. LE TRAVAIL DE TERRAIN.

## I.1. Le site d'étude : le fleuve Charente.

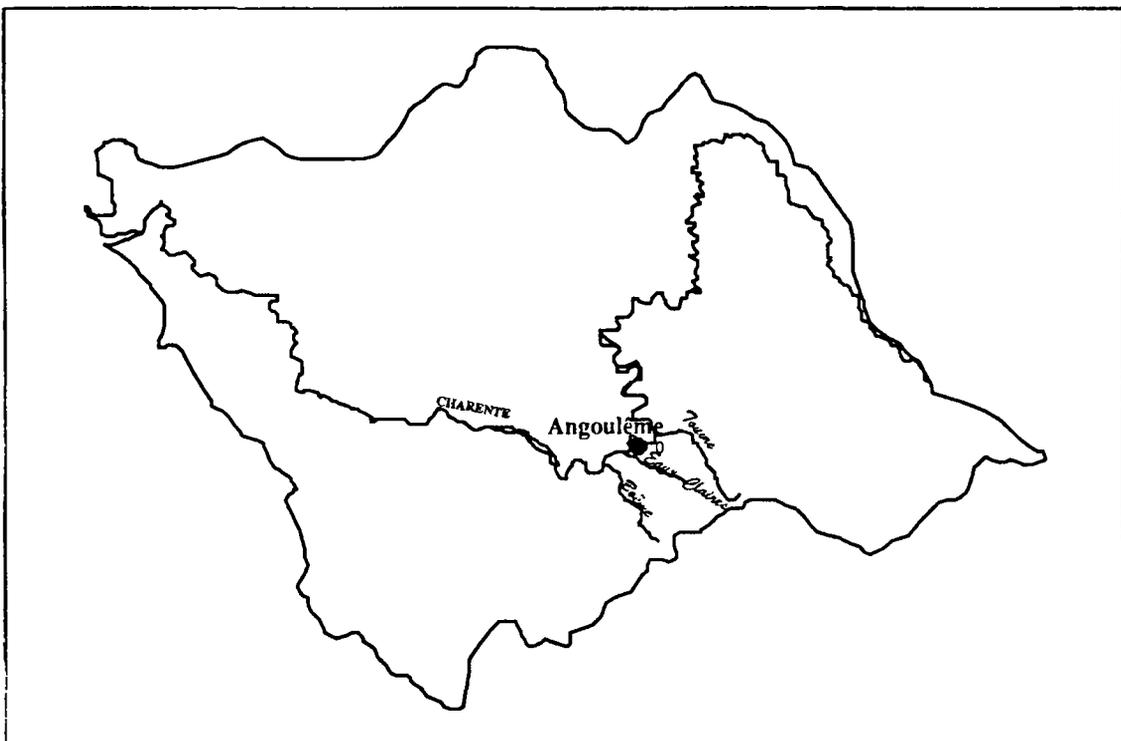
La Charente est un fleuve côtier de 360 km de longueur drainant un bassin versant d'une superficie voisine de 10000 km<sup>2</sup> et débouchant dans la baie de Marennes-Oléron. Sa pente générale est faible et son régime fortement variable selon les saisons. Les écoulements sont conditionnés par un climat océanique.

Une succession de biefs depuis Chalonne jusqu'à Saint Savinien permet la navigation et assure une régulation des débits à l'étiage.

Le bassin versant est à forte dominante rurale et cinq villes seulement ont plus de 10000 habitants. La plus importante est l'agglomération d'Angoulême, qui avec 87000 habitants regroupe une bonne part des industries du bassin.



Le bassin versant de la Charente



## - Le site de prélèvements.

Il se situe dans la zone de rejet des effluents de la station d'épuration d'Angoulême, Frégeneuil.

Actuellement, cette station d'épuration est en cours de réhabilitation et s'inscrit dans un vaste programme d'amélioration de l'assainissement sur le territoire du District du Grand Angoulême entrepris depuis quelques années.

La station d'épuration de Frégeneuil qui reste le principal centre de traitement des effluents de l'agglomération d'Angoulême, devra répondre aux nouvelles exigences en terme de rejet d'eau traitée (contraintes sévères imposées par la législation européenne à l'horizon 1996).

Les installations existantes de la station d'épuration de Frégeneuil sont décrites ci-après.

La station a été réalisée en trois tranches. Les deux tranches les plus anciennes (1963 et 1966), identiques sont construites sur le principe d'une filière « Décanteur/digesteur + lit bactérien à remplissage traditionnel (sans recirculation) » et comptent globalement pour un tiers de la capacité totale (soit 20000 équivalents habitants).

Ces deux tranches sont notées T1 + T2 et constituent un seul et même rejet nommé step 2 dans ce rapport. La troisième tranche, datant de 1982, profite d'une technique plus récente « Décanteur primaire + lit bactérien avec recirculation ». Elle est conçue pour une capacité de 40000 équivalents habitants. Cette tranche est notée T3 et constitue un deuxième rejet nommé step 1 dans ce rapport.

Les boues primaires produites sont épaissies puis digérées (dans un digesteur chauffé et brassé) avant de subir une déshydratation mécanique finale sur une presse à bande. Les lits de séchage mécanisés en place à proximité du traitement des boues, ne sont plus utilisés, l'ensemble des boues et résidus d'épuration étant à l'heure actuelle évacué en décharge.

Les temps de séjour sont d'environ 41 heures dans les tranches T1 + T2 (ou StEp 2) et de 22 heures dans la tranche T3 (ou StEp 1).

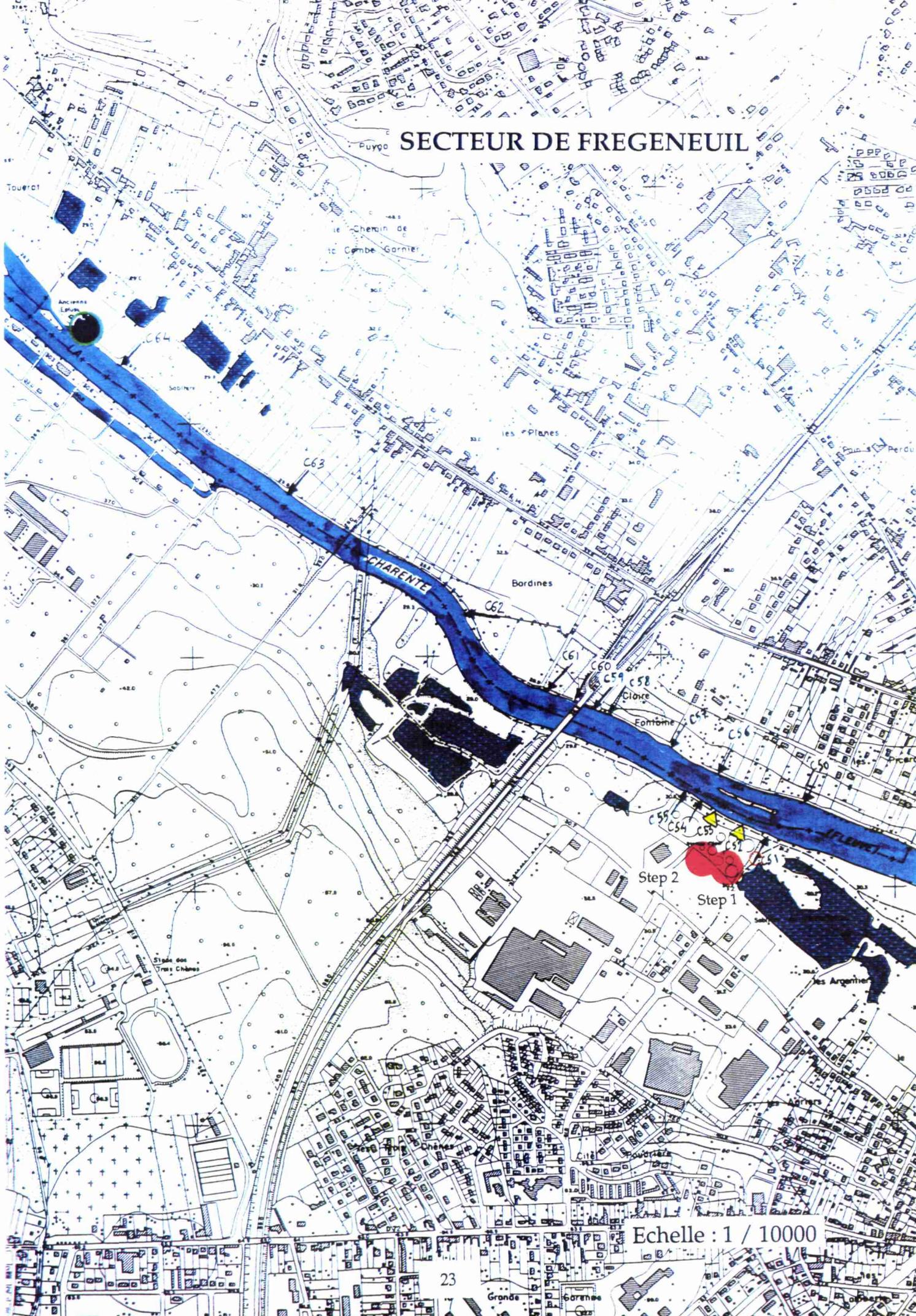
## - Le suivi de l'effluent.

Le suivi de l'effluent s'est effectué depuis les deux buses de rejet de la station d'épuration de Frégeneuil jusqu'à l'ancienne écluse (cf. carte « Secteur de Frégeneuil » page 23), soit sur environ 1600 mètres de cours d'eau.

On note la présence d'un méandre environ 500 mètres après les rejets. En effet, celui-ci pourrait influencer l'évolution dans l'espace du panache du rejet.

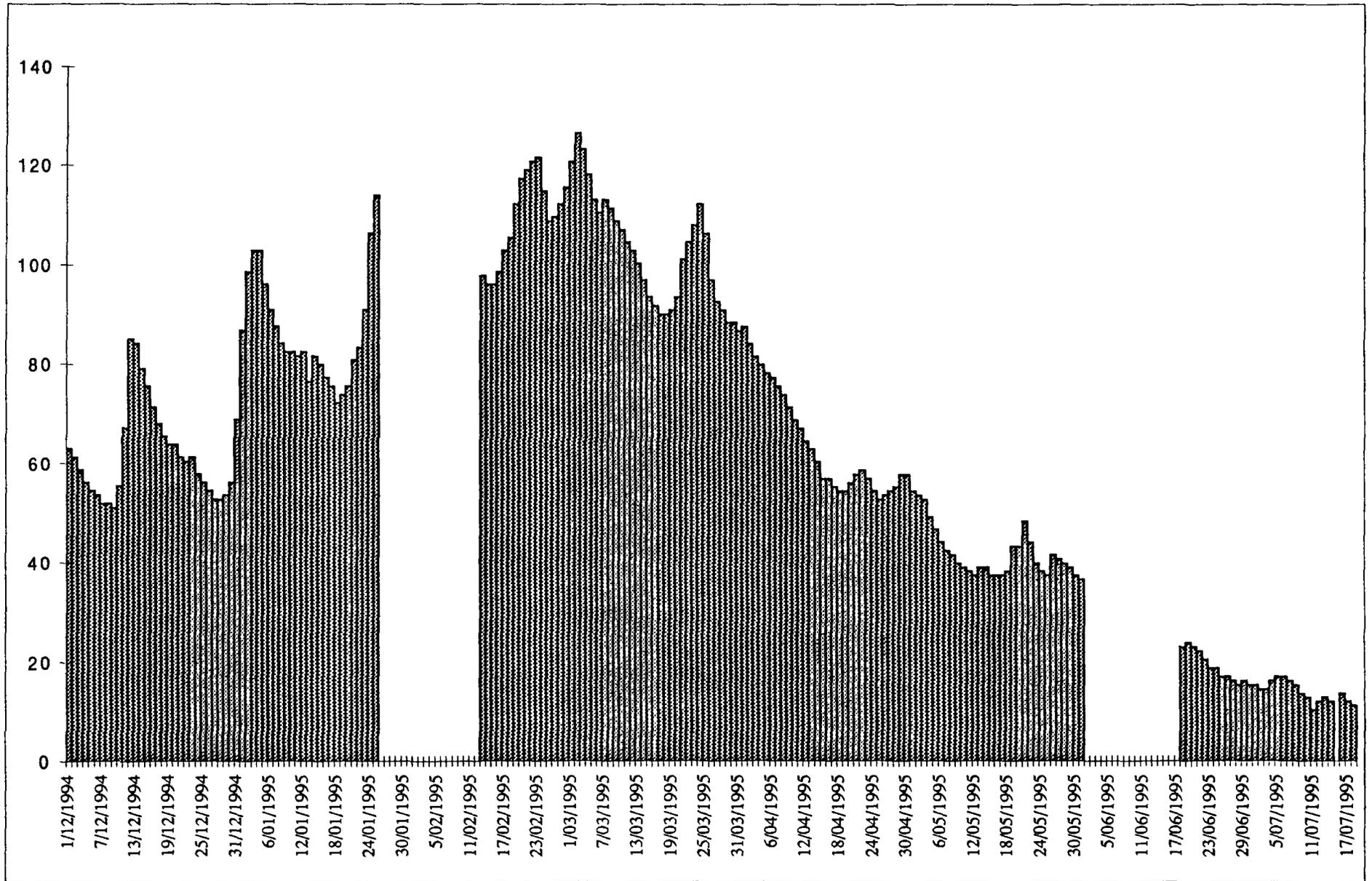
De plus, l'ensemble des rejets directs dans la Charente a été recensé (données Cemagref 1994). Sur le secteur d'étude, notés de C50 à C64 sur la carte, ces apports sont constitués principalement de rejets d'eaux pluviales ou de drainage (voir détail des rejets en annexe).

# SECTEUR DE FREGENEUIL



Echelle : 1 / 10000

# Débits de la Charente à Angoulême (en m<sup>3</sup>/s)



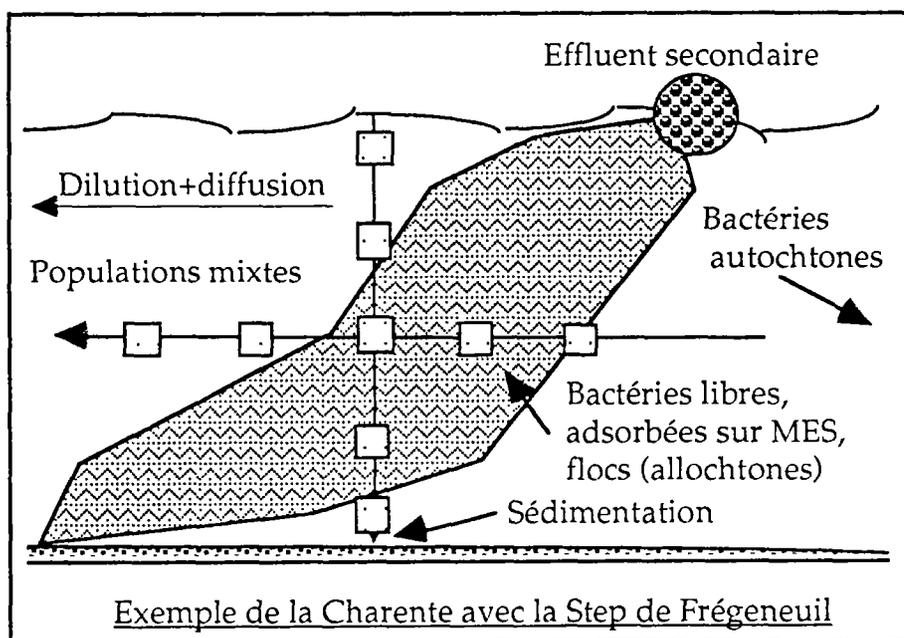
Toutefois, si des variations de qualité inattendues étaient observées lors de notre étude, ce référentiel pourrait fournir des éléments d'explications.

## I.2. Les campagnes de terrain.

Des campagnes de terrain ont été menées en Avril, Mai, Juin et Juillet dans des conditions climatiques et à des débits différents. Le graphique précédent donne les débits de la Charente à Angoulême entre Décembre 94 et Juillet 95 et permet de resituer les campagnes de terrain dans le temps. De plus, pour chaque sortie sur la Charente les débits de rejets des deux tranches de la station d'épuration sont connus (moyenne sur 24 heures).

Pour chaque série de prélèvements, nous avons choisi de suivre la masse d'eau, c'est à dire de suivre en temps réel une portion de l'effluent rejeté dans le milieu naturel. En effet, dans la mesure où les stations d'épuration rejettent des micro-organismes, il convient de s'intéresser à leur temps de séjour dans le milieu récepteur.

Pour cela, l'utilisation d'un courantomètre (flowmeter) s'est avérée nécessaire avant chaque série de prélèvements. Les mesures ont été faites, depuis un zodiac, en rive droite, milieu et rive gauche et pour chaque point à 30 cm de la surface, à mi-profondeur et à 30 cm du fond. En mesurant une profondeur moyenne du fleuve et la largeur du lit, on obtient le débit et le courant dans la Charente sur la zone d'étude. Ainsi, on peut calculer le temps nécessaire à l'effluent pour atteindre chaque point de prélèvement.



Les échantillons d'eau destinés à l'analyse sont, selon les campagnes de terrain, soit ponctuels (rive droite, rive gauche et milieu du fleuve, en surface et à mi-profondeur) pour la campagne d'Avril, soit moyens, réalisés par mélange de 6 prélèvements d'un litre effectués sur un profil en travers du fleuve ( 3 points et 2 profondeurs).

De plus, pour chaque campagne, ont été notées la température de l'eau ainsi que les variations de conductivité. En effet, l'évolution du paramètre conductivité permet de guider les prélèvements. Il est à noter que ce paramètre a permis de suivre le panache du rejet durant les campagnes de Juin et Juillet. Un essai de traçage au sel de l'effluent a été effectué en Mai mais n'a permis de suivre le panache que sur une distance de quelques dizaines de mètres. Les détails des résultats de ce traçage au sel seront explicités en troisième partie de ce rapport.

### - Prélèvements et traitements des échantillons sur place:

Après agitation, on prélève 10 ml d'échantillon dans un récipient stérile que l'on incube sur place en présence d'un ml d'INT à température ambiante et à l'obscurité. La durée d'incubation est d'une heure sitôt l'INT ajouté.

La solution mère d'INT est dosée à 0,2 g/100 ml. La concentration finale est de 0,02 % soit 0,2 mg/ml d'échantillon.

Cette solution se conserve à 4°C et à l'obscurité, en flaconnage sombre.

L'INT est réduit en formazan qui se présente sous forme de cristaux rouges intracellulaires. On peut ensuite observer plusieurs cristaux par cellule.

L'ajout d'un sel de cyanure à la concentration utilisée n'est pas toxique pour les cellules, mais inhibe le dernier transporteur d'électrons de la chaîne respiratoire (la cytochrome-oxydase) et améliore le marquage. La solution de cyanure de potassium (dosée à 1,4 mg CN/l) est utilisée à raison de 1 ml par 10 ml d'échantillon.

Le prélèvement est ensuite fixé au formol à 37% (0,5 ml dans les 10 ml prélevés + INT + KCN). Cet échantillon est ensuite conservé à 4°C et à l'obscurité jusqu'à l'acheminement au laboratoire où il est ensuite traité par coloration dans un délai inférieur à un mois.

En plus de ces prélèvements destinés aux analyses bactériologiques (numération, biovolume, biomasse et activité), nous avons prélevé des échantillons d'eau en flaconnage propre pour les mesures des formes d'azote et du carbone organique. Les flacons destinés à l'analyse de NH<sub>4</sub>, NO<sub>2</sub>, NO<sub>3</sub> et N organique sont ramenés tels quels au laboratoire de chimie du Cemagref.

Pour les analyses de COD (carbone organique dissous), il est nécessaire de filtrer (filtres whatman GF/F de diamètre 2,5 cm à porosité de 0,7µm) sur place environ 40 à 50 ml d'eau

placés dans des flacons en pyrex préalablement nettoyés pour éliminer toute forme de carbone. On prend soin de travailler avec des gants et de nettoyer la seringue et le porte filtre à l'eau déminéralisée entre chaque échantillon. On ajoute ensuite à l'eau filtrée du chlorure de mercure (à raison de 100 µl d'une solution à 1g de HgCl<sub>2</sub>/l pour 10 ml d'échantillon) qui permet d'inhiber l'activité de toute forme organique.

Les échantillons sont conservés à 4°C jusqu'à l'acheminement au laboratoire.

Pour les analyses de COP (carbone organique particulaire), des filtres Whatman GF/F de diamètre 4,5 cm à porosité de 0,7µm ont été préalablement passés à l'étuve à 100°C, au dessiccateur (pour éliminer l'eau qui pourrait se trouver sur les filtres) et prépesés. Ainsi, de retour au laboratoire on filtre directement une quantité minimum de 500 ml de chaque échantillon. Les filtres sont ensuite laissés une nuit à l'étuve à 37°C pour que l'eau contenue sur les filtres s'évapore. Ils sont enfin pesés à nouveau, la différence avec la prépesée donnant le poids de matières en suspension dans l'échantillon.

## II. INVESTIGATIONS DE LABORATOIRE.

### II.1. Dosage du carbone organique.

Après les manipulations décrites ci-dessus les flacons pour l'analyse du COD et les filtres pour le COP sont amenés au laboratoire d'océanographie de l'Université de Bordeaux I qui effectue ces dosages.

Une description des techniques utilisées est donnée ci-après :

#### - Dosage du carbone organique dissous (COD) :

La première étape de cette analyse est la mise en ampoule des échantillons. Lorsque celle-ci est effectuée, l'ajout d'un acide (ici l'acide phosphorique  $H_3PO_4$ ) a pour rôle de décarbonater l'échantillon. L'oxydation du carbone peut alors avoir lieu pendant 12 heures et à  $100^\circ C$  pour activer la réaction. Le  $CO_2$  sous forme gazeuse résultant doit être dosé dans l'ampoule devant une cellule infrarouge. On obtient au comptage un pic de carbone dont la hauteur est proportionnelle à la quantité de carbone présente dans l'échantillon. En effet, une gamme étalon a été établie au préalable et d'après la droite de régression correspondante, la concentration en COD est lue directement.

Les résultats sont donnés en mg de COD par litre d'échantillon, la précision étant de l'ordre de 0,2 mg/l.

#### - Dosage du carbone organique particulaire (COP) :

Comme pour le dosage du COD, il est nécessaire de décarbonater les échantillons. Pour ce faire, de l'acide chlorhydrique (HCl à 2N) est répandu sur les filtres qui sont ensuite placés sur une plaque chauffante 12 à 24 heures pour évaporation de HCl et de l'eau. En effet, HCl et  $H_2O$  ne doivent plus être présents dans l'appareil de mesure. Pour cela, des pièges à HCl et  $H_2O$  existent tout au long de l'appareil. Après évaporation, les filtres sont disposés dans un creuset propre (sans carbone) avec un catalyseur et de la limaille de fer qui a pour but d'augmenter le champ magnétique de l'appareil. L'ensemble est brûlé à  $1200^\circ C$  : le carbone brûlé donne du monoxyde de carbone (CO) qui donne du dioxyde de carbone ( $CO_2$ ). Comme pour le dosage du COD, le  $CO_2$  résultant est dosé devant la cellule infrarouge et on obtient le pourcentage de carbone organique dans le poids de matière en suspension déposée sur le filtre au départ.

Les résultats sont donnés en mg/l de MES (matière en suspension), en pourcentage de carbone et donc en mg/l de COP. La précision de la mesure est de l'ordre de +/- 0,3 mg/l.

## II.2. Dosage des formes d'azote.

Les dosages des formes d'azote  $\text{NH}_4$ ,  $\text{NO}_2$ ,  $\text{NO}_3$  et N Kjeldahl (=  $\text{NH}_4$  + Norganique) ont été effectués par le laboratoire de chimie du Cemagref.

-Dosage de l'ammoniac ( $\text{NH}_4$ ) d'après la norme T90-015 (Août 1975).

En premier lieu est appliquée la méthode spectrophotométrique au réactif de Nessler, technique pouvant être mise en œuvre dans le but d'obtenir une première approximation du résultat.

En deuxième lieu, est appliquée la méthode spectrophotométrique au bleu d'indophénol.

- Dosage des nitrites ( $\text{NO}_2$ ) effectué d'après la norme T90-013 (Août 1975).

- Dosage des nitrates ( $\text{NO}_3$ ), d'après la norme T90-045 (Juin 1989).

- Dosage de l'azote Kjeldahl ( $\text{NH}_4$  + Norganique), d'après la norme T90-110, (Décembre 1981).

## II.3. Traitement des échantillons de bactériologie.

De retour au laboratoire, les échantillons, ayant subis sur le terrain la coloration à l'INT avec KCN et ayant été formolés, sont conservés à l'obscurité et à 4°C. Le tableau 3 schématise le protocole opératoire des méthodes de coloration utilisées.

A ce stade, le but est de connaître pour chaque échantillon le nombre de cellules bactériennes présentes par ml, leur volume cellulaire moyen (VCM) et le pourcentage de cellules actives (présentant des cristaux de formazan).

La première étape consiste à passer chaque échantillon aux ultra sons. En effet, comme il a été indiqué dans la première partie de ce rapport, ceci permet d'améliorer la qualité des dénombrements en dissociant les agrégats bactériens. Le traitement aux ultras sons est de deux minutes à 125 Watts.

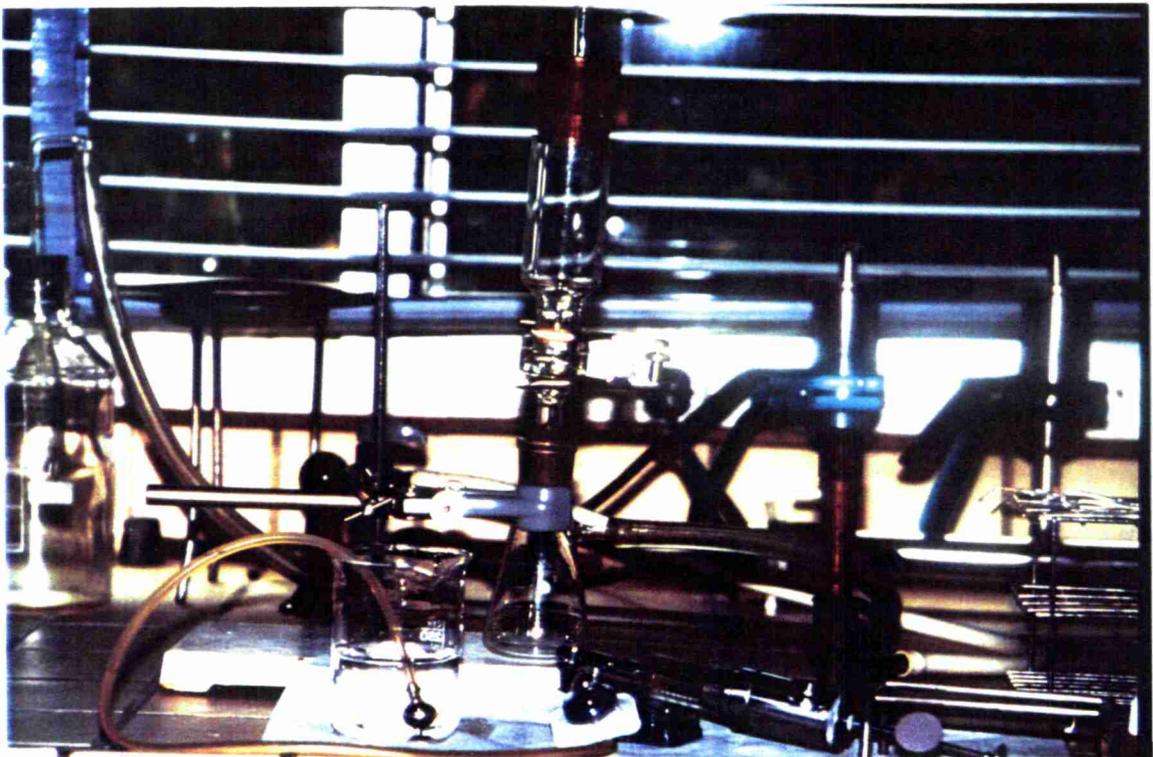
Le comptage direct des micro-organismes requiert l'emploi de fluorochromes spécifiques des acides nucléiques bactériens. Le complexe colorant-cellule ainsi formé, excité en lumière de courte longueur d'onde réémet une lumière visible dans une longueur d'onde supérieure intense. Les formes bactériennes sont ainsi mises en évidence et peuvent être dénombrées.

Le 4-6- diamino-2-phénylindole dihydrochlorure (DAPI), colorant utilisé lors de cette étude, a la propriété de se lier aux acides nucléiques bactériens. La solution de DAPI utilisée est dosée à 10 µg/ml. La liaison DAPI-ADN ainsi établie, excitée en lumière UV (340 nm) fluoresce en bleu brillant.

La pénétration passive du fluorochrome dans la cellule autorise l'utilisation d'échantillons fixés au formol. La coloration peut ainsi être différée.

La filtration de 1 ml d'échantillon (éventuellement dilué) est faite sur membrane en polycarbonate noire de porosité 0,2 µm (Millipore de diamètre 25 mm). La membrane est ensuite déposée sur une lame et recouverte de 0,8 ml de DAPI (contact direct colorant-membrane après filtration). Une durée d'incubation de 5 minutes à l'obscurité est suffisante pour avoir une bonne pénétration cellulaire. La membrane est rincée à l'eau distillée stérile (environ 5ml) pour éliminer l'excès de DAPI.

#### Le matériel de filtration.



Après séchage à l'air, la membrane est montée entre deux gouttes d'huile à immersion non fluorescente et entre lame et lamelle. L'ensemble est fermement comprimé à l'aide d'une pince. D'après Johnson et Ward (1993), l'huile à immersion ne dissout pas les cristaux d'INT des cellules bactériennes pendant une période de 24 heures ce qui laisse un délai pour l'utilisation des lames.

## **II.4. Traitement des lames au microscope et analyse d'image.**

Les observations sont réalisées sur un microscope Leitz Laborlux S à épifluorescence avec brûleur HBO vapeurs de mercure de 50 W. Un porte filtre à trois positions permet l'observation en fluorescence (DAPI) ou en lumière transmise (100 W-12 V). L'optique comprend un objectif PL Fluotar 100/1,32 immersion à diaphragme et deux oculaires périplan 10X18. Un variateur de grossissement Leitz permet d'augmenter le grossissement total d'un facteur 1.25, 1.6 ou 2 sans modifier la profondeur de champ.

Un système vidéo est adapté sur la monture C de la tête trinoculaire qui reçoit une caméra noir et blanc CCD 0,5 Lux reliée à une unité de contrôle Hamamatsu C2400. Cette unité permet des corrections de l'image. L'acquisition d'images sur l'unité centrale d'un micro-ordinateur Macintosh Quadra 700 permet l'exploitation de celles-ci par le logiciel d'analyse d'image Optilab qui effectue, après seuillage, comptage et mesures automatiques des particules.

### **Microscope et système vidéo relié à l'ordinateur.**



Sur une même lame et pour chacun des champs, nous effectuons une observation en fluorescence (DAPI) et une observation en lumière transmise (INT) en faisant varier la source lumineuse. Ces deux images superposables permettent d'associer les cristaux de formazan à la cellule correspondante observée en fluorescence.

A ce stade, il est possible de noter certaines difficultés rencontrées lors de la lecture des lames au microscope et à l'analyse d'image. En effet, lorsqu'on observe une eau de rivière ou d'étang une observation fine est nécessaire. La présence de débris d'algues, de matières en suspension ou d'autres particules peut entraîner une source d'erreur non négligeable pour les numérations. De plus, certaines bactéries sont parfois peu lumineuses ou de très petite taille, la précision de l'oeil peut alors devenir insuffisante. A l'inverse, certaines bactéries sont très lumineuses et il se forme un halo de fluorescence autour de la cellule, ce qui, sans correction, entraîne une surestimation du biovolume. Enfin, au bout de quelques minutes en lumière fluorescente, le champ observé devient de plus en plus pâle et la lecture difficile.

Le traitement de l'image sur ordinateur permet de palier convenablement ces différents problèmes. Les éléments autres que bactériens peuvent être effacés, les halos de fluorescence rectifiés et la rapidité de la méthode s'acquiert peu à peu par l'utilisateur. Le seuillage automatique en niveaux de gris permet une meilleure élimination du bruit de fond de la préparation et détermine mathématiquement les classes d'objets à prendre en compte. Il permet donc d'affiner la méthode.

Nous avons observé 10 champs par membrane soit de 100 à 500 cellules par échantillon. L'échantillonnage des champs que l'on observe est strictement aléatoire: nous choisissons au hasard 10 champs sur la membrane répartis aussi bien vers le centre qu'en périphérie.

Le nombre de cellules présentes sur chaque champ ainsi que leurs paramètres morphométriques sont enregistrés directement par l'ordinateur, alors que le nombre de cellules actives présentant des cristaux rouges de formazan en lumière transmise est décompté manuellement.

Il convient à ce niveau d'effectuer un calcul permettant d'obtenir un nombre de cellules bactériennes par ml d'échantillon filtré :

soit  $x$  le nombre de cellules obtenu sur les 10 champs observés et 70500 le nombre de champs existant sur une membrane noire sur laquelle a été filtré 1ml d'échantillon

on a alors  $N = (x / 10) * 70500 =$  Nombre de cellules par ml d'échantillon.

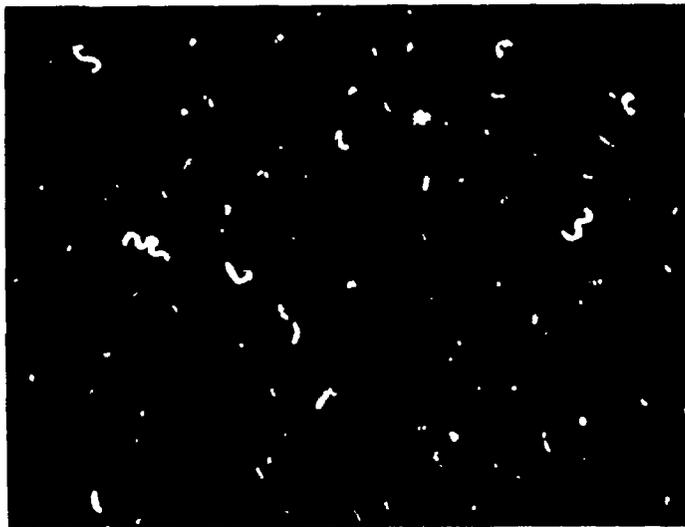
Le calcul des biovolumes est fait par le logiciel qui mesure le périmètre (P) et la surface (S) de chaque cellule bactérienne. Les biovolumes (V) sont déterminés en appliquant la formule:

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

La détermination de la biomasse bactérienne est obtenue par les facteurs établis par Simon et Azam (1989), le contenu carboné par unité de volume varie en fonction de la taille de la cellule et, en proportion, une petite cellule contient plus de carbone qu'une cellule de grande taille. Nous avons retenu les 3 classes de volumes utilisées par Rebillard et Torre (1992) dans lesquelles sont rangées toutes nos valeurs. On obtient un contenu carboné moyen par ml d'échantillon considéré.

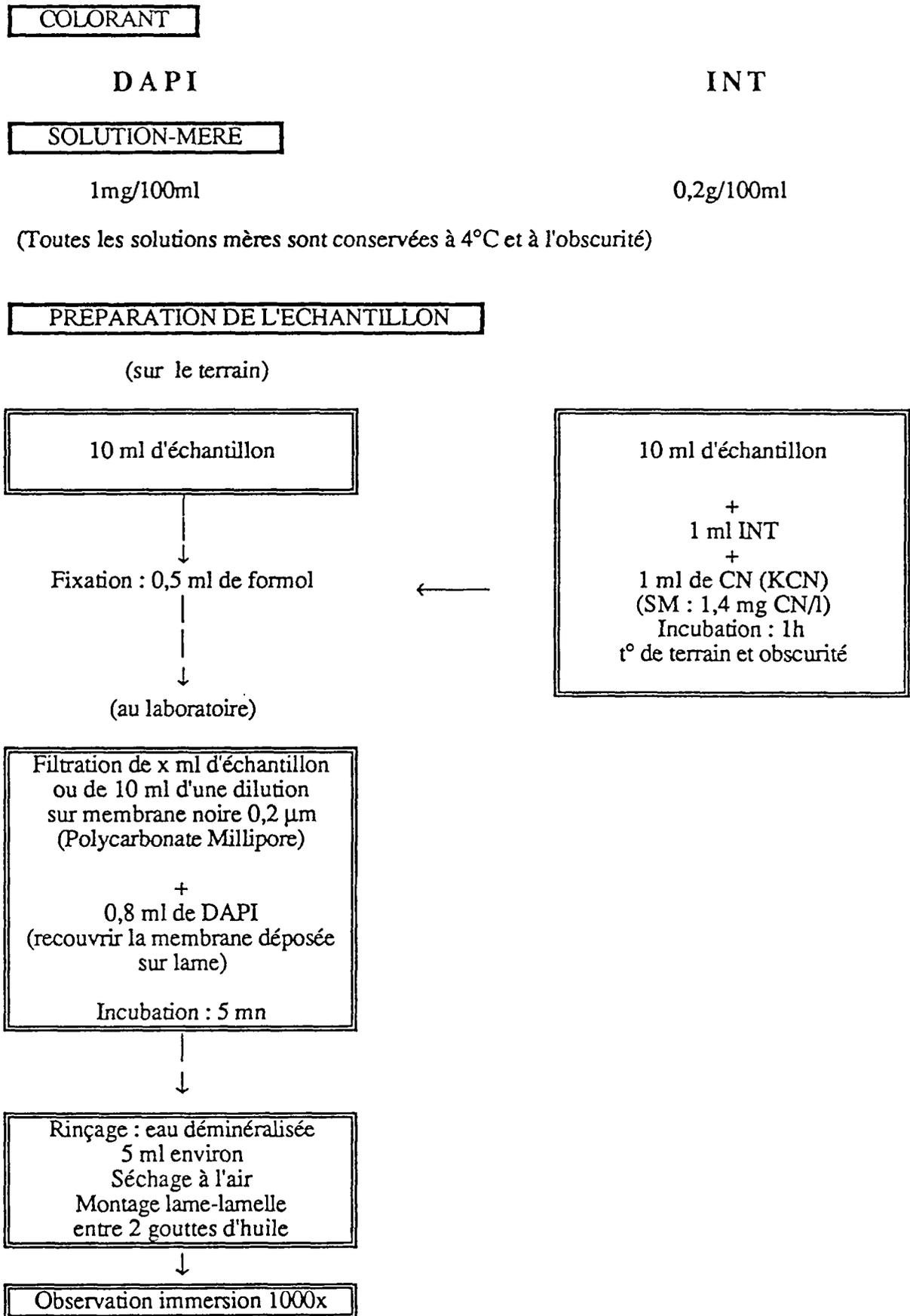
Il est important de remarquer que la méthode utilisée, malgré une observation fine des cellules, ne permet en aucun cas l'identification bactérienne. En effet, il est impossible de se baser uniquement sur un critère morphologique. Toutefois, lors des campagnes successives, une espèce particulière a été mise en évidence. Celle-ci, de grande taille, présente une forme circulaire ou en spirale. Elle est observée en quantité importante au niveau du rejet StEp 2 puis de façon de plus en plus aléatoire vers l'aval.

D'après Pfennig (1978), il pourrait s'agir de *Rhodocyclus purpureus*, bactérie phototrophe appartenant à la famille des Rhodospirillaceae.



Observation en fluorescence (coloration au DAPI) d'un échantillon du rejet StEp 2.

Protocole opératoire des méthodes de coloration utilisées.



**PARTIE 3 :**  
**RESULTATS ET INTERPRETATIONS.**

Le déroulement et les résultats des quatre campagnes de terrain sont exposés dans cette partie. Il est à noter que nous avons essayé au fur et à mesure de ces campagnes de faire évoluer la méthode au niveau de l'échantillonnage, le but étant d'avoir le plus d'information possible sur le rôle des bactéries de station d'épuration rejetées dans le milieu naturel. De plus, chaque campagne bénéficie de conditions environnementales différentes (débit de la Charente, température de l'eau...).

Nous présenterons d'abord les résultats de chacune des quatre campagnes de terrain.

Dans un deuxième temps, la synthèse et l'interprétation de l'ensemble des résultats seront exposés.

## I. RESULTATS.

TABLEAU RECAPITULATIF DES CONDITIONS DES DIFFERENTES CAMPAGNES

	Avril	Juin	Juillet	Septembre
Débit Charente (m <sup>3</sup> /s)	40	34	11	10,6
Débit StEp (m <sup>3</sup> /s)	0,098	0,105	0,084	0,090
Température de la Charente (°C)	12	15	19	16,5
Rapport de débits StEp/Charente	1/410	1/320	1/130	1/117
Rapport de flux bactériens StEp/Charente	1/33	1/50	1/6	1/8

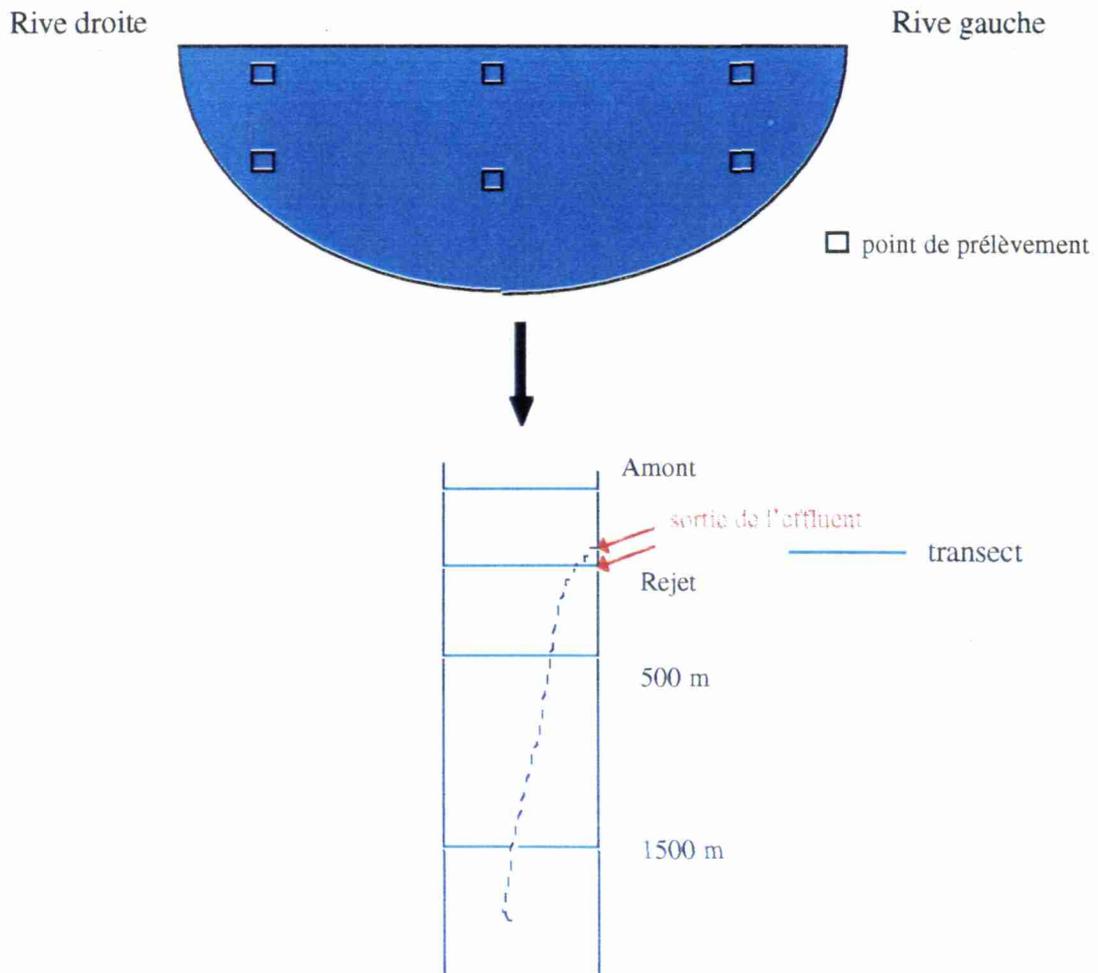
Ces données illustrent les différences de conditions entraînées par une variation des débits. En Juillet, à l'étiage, la population bactérienne apportée par le rejet représente 1/6ème de la population totale de la rivière. Dans ces conditions, l'effluent de station d'épuration doit être largement pris en compte dans le milieu naturel.

## I.1. Campagne d'Avril.

Pour cette campagne, nous avons prélevé des échantillons d'eau par transects. Quatre transects ont été effectués: à l'amont, à 30 mètres, 500 mètres puis 1500 mètres du rejet de la station.

Pour chaque transect, des prélèvements ont été effectués en rive gauche, au milieu et en rive droite, en surface et à mi-profondeur ( voir schéma ci-dessous ).

### Schéma d'un transect en Avril :



Les mesures de numérations bactériennes, de cellules actives, de volumes cellulaires moyens et des concentrations en NH<sub>4</sub>, NO<sub>2</sub>, NO<sub>3</sub> ont été effectuées pour chaque point de prélèvement. Les analyses de COD et COP ont été réalisées uniquement pour les prélèvements de surface. Tous les paramètres précédents sont aussi recherchés pour les deux rejets de la station.

Lors de cette campagne, les conditions étaient les suivantes :

- débit de la Charente 40 m<sup>3</sup>/s soit 30 cm/s
- température de la Charente : 12 °C,
- débit de la StEp : 98 l/s soit 0,098 m<sup>3</sup>/s,

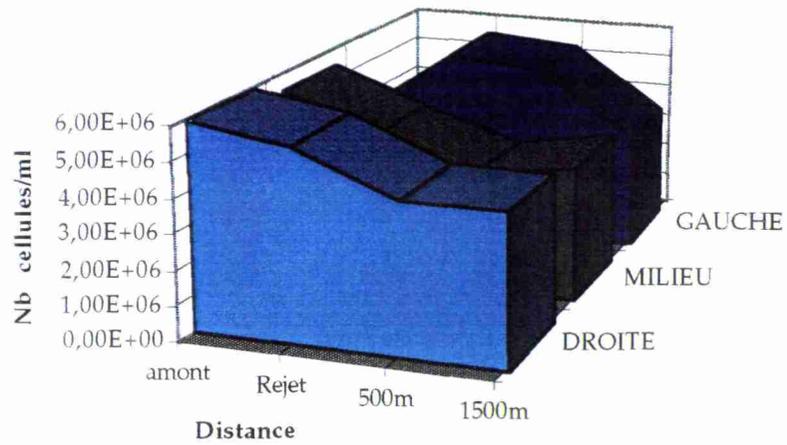
(voir tableau récapitulatif page 35)

Le débit de la StEp est obtenu d'après la quantité d'effluent rejetée par les deux tranches en 24 heures le jour de la campagne de terrain (données de la station de Frégeneuil). On obtient un débit moyen pour l'ensemble du rejet sur la journée. Il est évident qu'on ne peut tenir compte de la variation de débit journalière. Toutefois, nos prélèvements ont toujours débuté en fin de matinée ce qui permet d'admettre une certaine homogénéité dans les conditions des différentes campagnes de prélèvements.

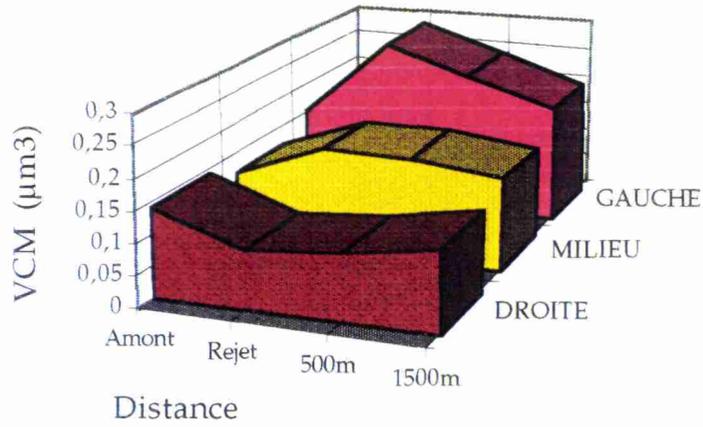
Après calcul des temps nécessaires à la masse d'eau pour parcourir les distances entre les transects, les prélèvements sont effectués.

L'ensemble des analyses est exécuté comme explicité dans la partie 2 « matériel et méthodes » et les résultats de numérations, pourcentages de cellules actives, volumes cellulaires moyens, COP, COD et N-NH<sub>4</sub> en surface sont présentés dans les pages ci-après (la totalité des résultats est présentée en annexe). En effet, les résultats obtenus en profondeur sont moins significatifs au niveau de l'influence du rejet dans le milieu.

### Numération bactérienne (en surface)



### Volumes cellulaires moyens en surface ( $\mu\text{m}^3$ )



### Cellules actives (% INT)

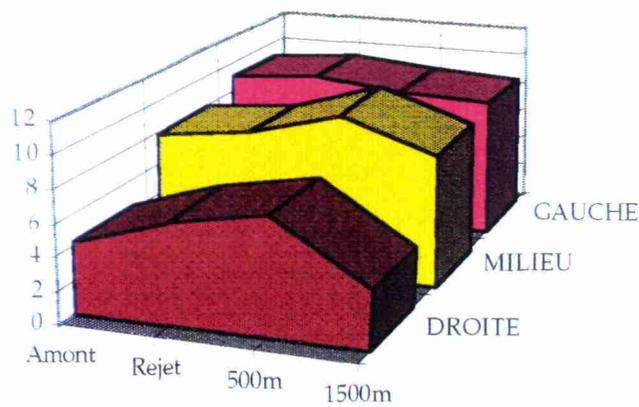
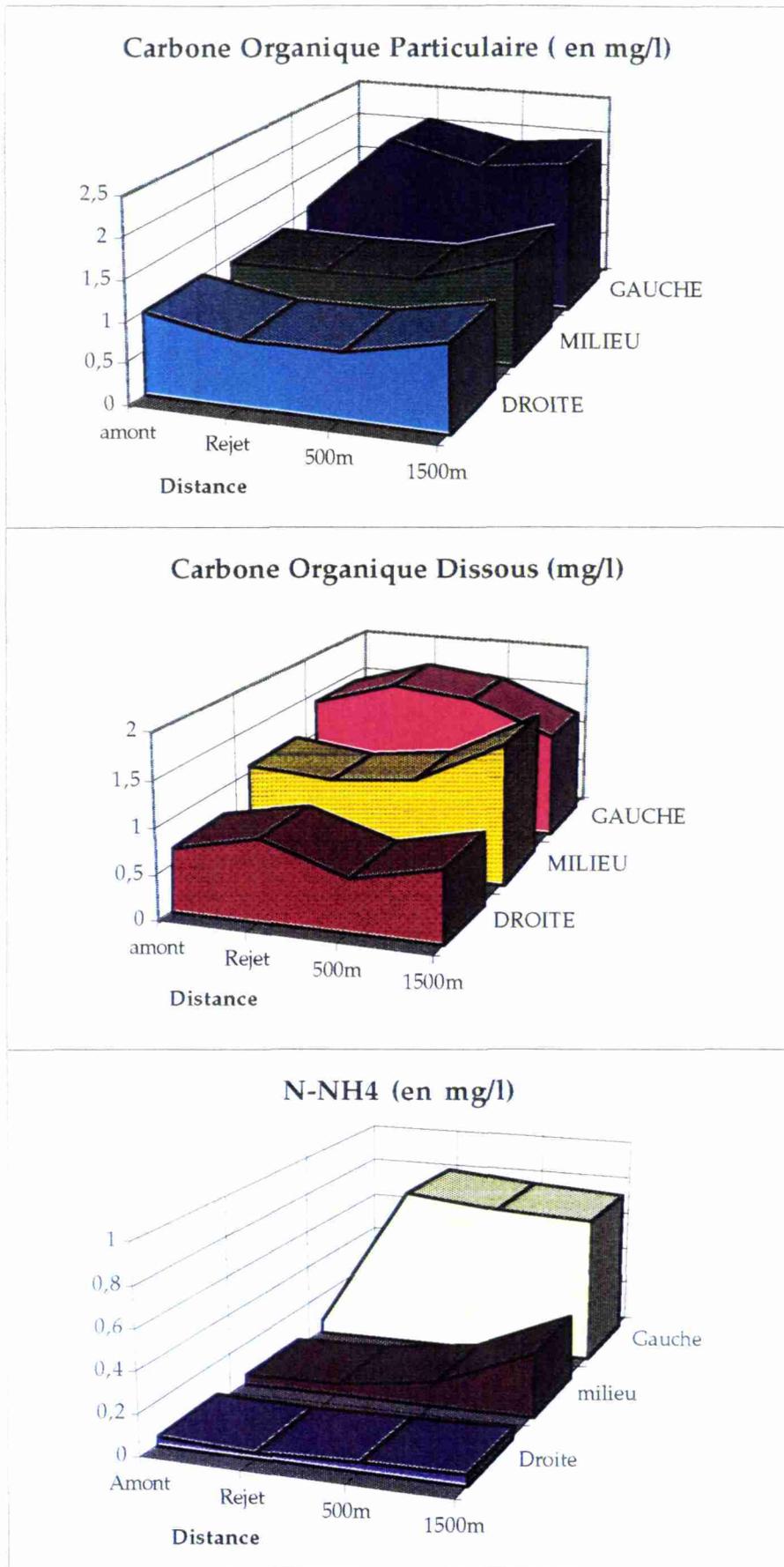


Figure 1 : Paramètres bactériologiques en Avril 95



**Figure 2 : Paramètres chimiques en Avril 95**

Ce travail mené sur le repérage chimique et biologique du panache d'eaux usées en rivière et son devenir sur 1600 mètres (transects fixes et suivi des masses d'eau) permet de dégager les éléments suivants :

Pour les conditions de débits d'Avril 95, le rejet fait augmenter l'ensemble des paramètres chimiques et biologiques et les conditions amont ne se retrouvent pas 1,5 km plus loin.

Le panache semble se confiner sur la rive gauche du rejet.

Les valeurs des paramètres chimiques sont nettement plus élevées en rive gauche, après le rejet.

Les teneurs en N-NH<sub>4</sub>, particulièrement importantes à l'aval du rejet, tendent à augmenter vers le milieu du fleuve, montrant ainsi l'élargissement du panache.

Les teneurs en carbone sont globalement plus élevées à gauche.

La diminution du COD vers l'aval peut traduire une consommation bactérienne ou encore une simple dilution d'un COD réfractaire ou très lentement assimilable. Cependant, l'évolution des teneurs en carbone est délicate à interpréter. En effet, il est impossible de contrôler les phénomènes d'adsorption du COD sur les particules (qui devient alors du COP) ou de dissolution du COP en COD.

Les paramètres bactériologiques indiquent, à l'aval du rejet, en rive gauche, des effectifs bactériens plus importants, une activité métabolique constante, et des volumes cellulaires moyens (VCM) plus élevés. A ce stade, nous mettons en évidence la présence de bactéries de grande taille à l'aval d'une station d'épuration.

La décroissance des VCM vers l'aval peut indiquer une dispersion des bactéries allochtones du rejet dans les eaux du fleuve, à la condition que celles-ci, de grande taille, survivent. Parallèlement, l'augmentation relative des VCM au milieu et en rive droite pourrait s'expliquer par l'élargissement du panache entraînant des bactéries de grande taille ou encore par un accroissement du biovolume des cellules autochtones provoqué par un déséquilibre nutritionnel (apports du rejet).

L'ensemble de ces résultats met en évidence un impact du rejet de la station d'épuration de Frégeneuil sur la Charente. Des variations des paramètres chimiques et bactériologiques en rive gauche et en surface sont observées. Les résultats des prélèvements à mi-profondeur sont moins nets pour la distinction du panache du rejet. Ceci peut être dû à l'influence du périphyton et surtout à la remise en suspension des sédiments, importante au fond des rivières.

A ce stade de l'étude, il nous est apparu important de pouvoir dimensionner le panache afin de suivre le rejet dans la rivière dans un profil longitudinal. Ainsi, pour les prélèvements suivants il serait possible de cibler plus précisément le mélange rivière-effluent afin de mieux comprendre le rôle et l'évolution des apports de la station d'épuration dans le milieu naturel.

## I.2. Campagne de Mai : essai de traçage au sel.

En Mai, un essai de traçage au sel a donc été entrepris dans le but de connaître l'évolution du panache du rejet dans la rivière.

L'essai consiste à ajouter du sel avant la sortie de l'effluent afin d'augmenter la conductivité de celui-ci. Le sel utilisé est le chlorure de sodium (NaCl), qu'il est facile de se procurer. En mesurant constamment la conductivité dans la rivière, il est théoriquement possible de suivre le trajet de l'effluent.

La méthode est avantageuse de part son faible coût, sa facilité de mise en oeuvre. En effet, cette technique engendre moins de contraintes qu'un traçage colorimétrique (rhodamine, fluorescéine) qui nécessite une autorisation.

Au préalable, un calcul de la quantité minimum nécessaire de NaCl pour faire varier la conductivité de l'eau de  $50 \mu\text{S/cm}$  a été effectué.

D'après la norme de détermination de la conductivité :

Une solution à  $584,43 \text{ mg/l}$  de NaCl (soit  $0,01 \text{ mole/l}$ ) a une conductivité de  $1277 \mu\text{S/cm}$ .

Pour un débit de Charente de  $30 \text{ m}^3/\text{s}$  et débit du rejet de  $70 \text{ l/s}$  soit  $0,07 \text{ m}^3/\text{s}$ , nous avons un rapport de débits de  $30/0,07=430$

Pour une augmentation de  $50 \mu\text{S/cm}$  (par rapport à la conductivité normale de la rivière), il faut  $50 * 430 = 21500 \mu\text{S/cm}$  dans l'effluent.

Sachant que  $1277 \mu\text{S/cm}$  correspondent à une concentration de  $584 \text{ mg/l}$ ,

pour avoir  $21500 \mu\text{S/cm}$ , il faut une concentration de NaCl de:

$$(21500 * 584) / 1277 = \underline{9832 \text{ mg/l}} \text{ soit } \underline{10 \text{ kg/m}^3}$$

Si on déverse le sel pendant 40 secondes à un débit de  $70 \text{ l/s}$ , soit  $2,8 \text{ m}^3$ , pour avoir une concentration de  $10 \text{ kg/m}^3$ , il faut environ  $28 \text{ kg de NaCl}$  avant la sortie de l'effluent pour faire varier la conductivité dans la rivière de  $50 \mu\text{S/cm}$ .

### - Exécution des traçages:

Nous avons donc entrepris de verser  $30 \text{ kg}$  de NaCl juste avant la sortie du rejet StEp 1 qui possède un débit plus élevé que StEp 2.

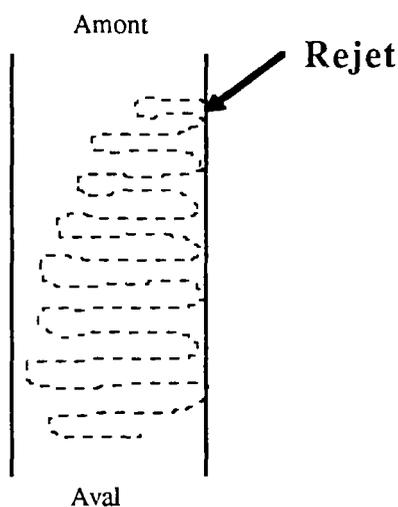
Avant le largage du sel, il a également été nécessaire de faire une mesure de courant sur un transect pour apprécier de façon la plus précise possible l'avancée de l'effluent dans la rivière. Nous avons obtenu une vitesse moyenne de courant de 0,24 m/s et un débit de 30 m<sup>3</sup>/s.

Avant le déversement, la conductivité près du rejet atteint déjà une valeur de 430-440  $\mu$ S/cm pour 415  $\mu$ S/cm en rive droite. A ce stade, on observe une variation de la conductivité liée au rejet.

Après calcul des temps nécessaires à la masse d'eau pour parcourir des distances fixées, le largage de 30 kg de sel pendant 40 secondes a pu avoir lieu.

Lors de ce premier traçage, l'augmentation forte et rapide de la conductivité est nettement observée en sortie du rejet juste après le déversement. Cependant, il n'a pas été possible de suivre cette variation de conductivité plus en aval, puisque très rapidement elle s'est avérée trop faible pour pouvoir en tenir compte de manière significative.

Les difficultés à suivre l'évolution du panache dans la rivière nous ont conduit à effectuer un second traçage en modifiant les paramètres: la quantité de sel déversé est de 60 kg et la technique de suivi du rejet se fait en temps réel au fur et à mesure de son avancement comme l'indique le schéma ci-après.



----- Parcours en zodiac afin de repérer le rejet.

Trente minutes après le largage du sel, l'effluent est repéré à 325 mètres. Il s'étend sur 20 mètres depuis la rive gauche.

150 mètres plus loin, la conductivité n'atteint plus que 460-470  $\mu$ S/cm à 60 cm de la surface. La variation de conductivité n'est alors plus très significative. On estime la largeur du panache à 20 mètres à partir de la rive gauche.

Au bout de 45 minutes, le panache arrive à environ 500 mètres du rejet. Il est alors très difficile de le suivre objectivement.

### - Conclusion :

Malgré les calculs de la quantité de sel déversée, cette méthode ne permet pas d'obtenir des résultats satisfaisants.

En effet, par différence de densité, le mélange salé est entraîné rapidement en profondeur.

De plus, l'élargissement du panache au cours du temps augmente peu à peu la dilution.

Par la suite, nous nous sommes contentés de suivre les variations de conductivité dues au rejet de station d'épuration dans la Charente.

Pour les campagnes de terrain de Juin et de Juillet, ce simple suivi de la conductivité de l'eau a guidé l'échantillonnage.

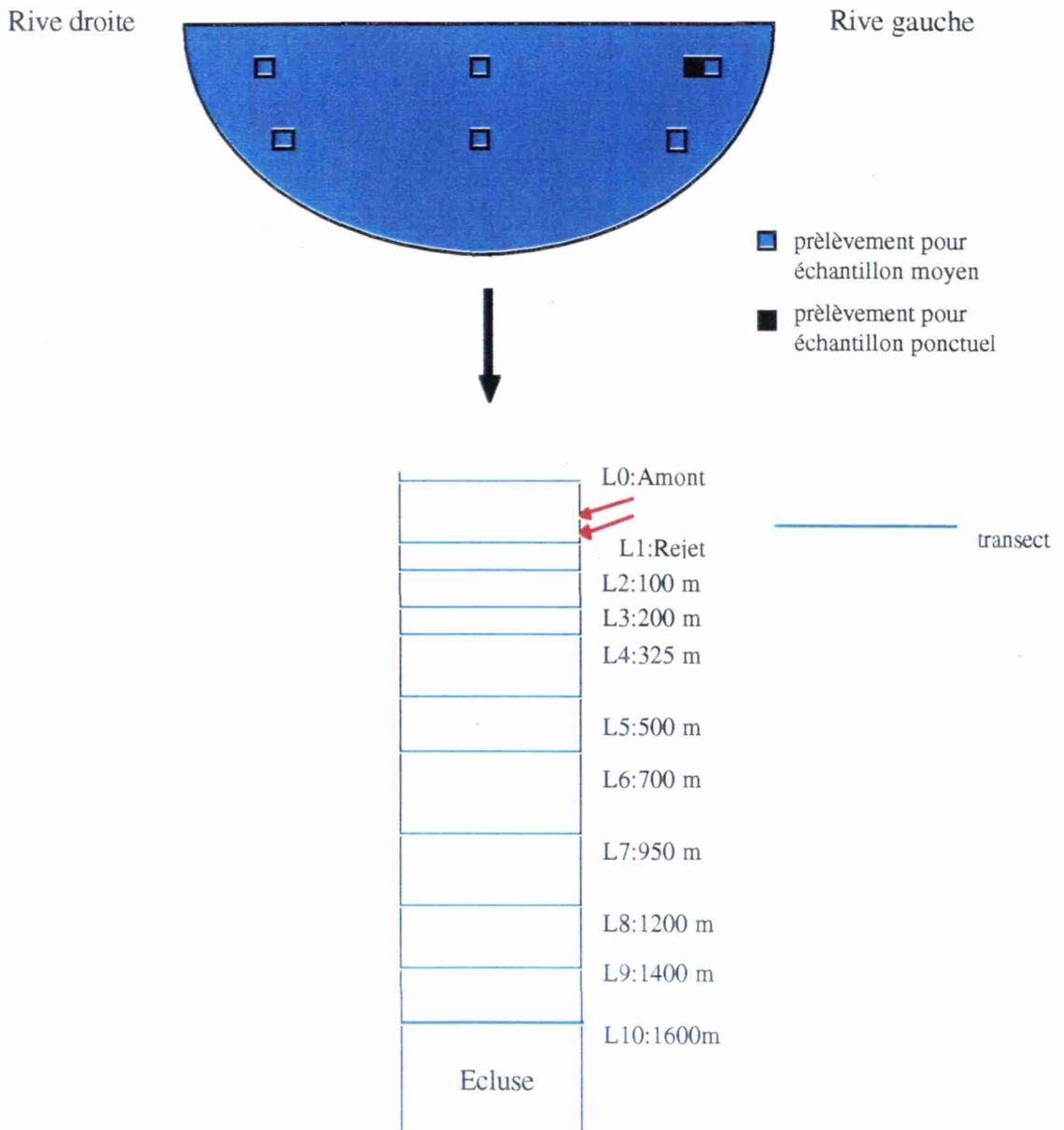
### **I.3. Campagne de Juin.**

Lors de cette campagne, le mode de prélèvement de l'eau destinée à l'analyse est un échantillon moyen, c'est à dire réalisé par mélange de 6 prélèvements d'un litre effectués sur un profil en travers de rivière (3 points et 2 profondeurs), et un échantillon ponctuel (rive gauche en surface). La méthode de prélèvement demeure la même, seul le traitement de l'information diffère. Le but de cette démarche est de révéler l'existence d'un phénomène en rive gauche par rapport à un échantillon moyen.

Onze transects sont effectués comprenant chacun deux échantillons à analyser (+ les deux rejets StEp 1 et StEp 2 en sortie de station).

Le schéma ci-après indique leur position.

## Schéma d'un transect en Juin :



Les mesures de numérations bactériennes, de cellules actives, de volumes cellulaires moyens et des concentrations en  $\text{NH}_4$ ,  $\text{NO}_2$ ,  $\text{NO}_3$  ont été effectuées pour chaque point de prélèvement. Les analyses de COD et COP ont été réalisées uniquement pour les prélèvements amont, L1, L3, L5, L7, L10. Tous les paramètres précédents sont aussi recherchés pour les deux rejets de la station.

Lors de cette campagne, les conditions étaient les suivantes:

- débit de la Charente: 34 m<sup>3</sup>/s soit 28 cm/s,
- température de la Charente: 15-16°C,
- débit StEp 105 l/s soit 0,105 m<sup>3</sup>/s.

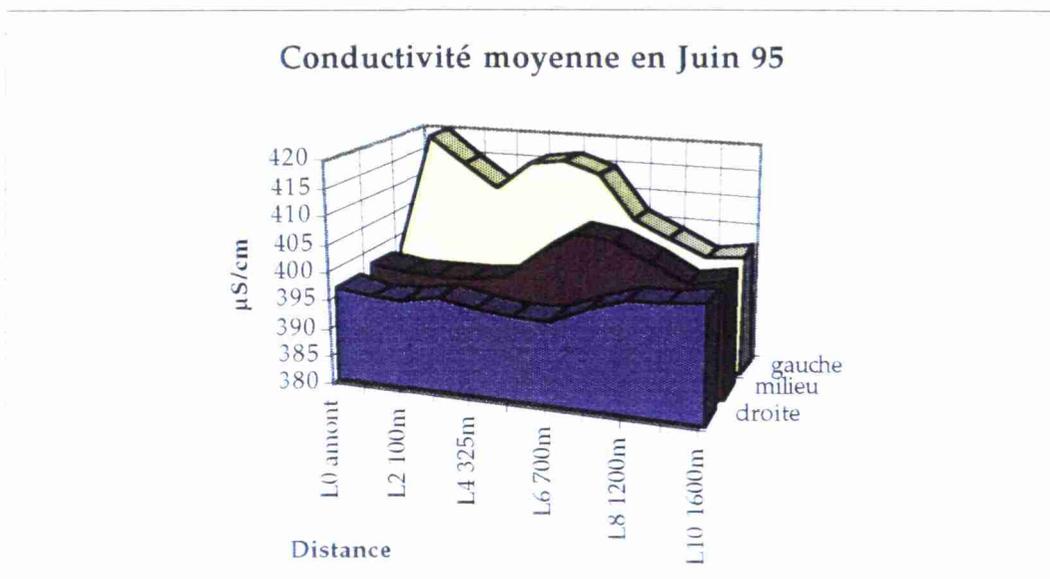
(voir tableau récapitulatif page 35).

Les mesures de courant ont été effectuées dans les mêmes conditions que pour les campagnes précédentes, c'est à dire sur un transect et à l'aide d'un courantomètre.

Les résultats ont permis de calculer le temps nécessaire à la masse d'eau pour parcourir les distances fixées.

### - Suivi de conductivité :

Le graphique suivant donne les valeurs moyennes de conductivités (en  $\mu\text{S}/\text{cm}$ ) sur toute la zone de prélèvements. Les prélèvements en rive gauche, dans le panache, ont été faits lorsque les plus hautes valeurs de conductivité ont été relevées.



En L4 à 325 mètres, le rejet atteint à peine le tiers de la largeur de la rivière.

En L6, après un méandre, la rivière est moins large et la panache semble atteindre le milieu.

En L8 à 1200 mètres, la variation de conductivité est moins significative et il est difficile de situer l'étendue du panache.

Depuis L9 à 1400 mètres jusqu'à l'écluse, la conductivité est uniforme sur toute la largeur.

### - conclusion sur le suivi de conductivité:

Durant cette campagne, nous avons tenté de suivre la conductivité de l'eau pour situer le rejet dans l'espace. Nous avons pu suivre une conductivité relativement différente, de 10  $\mu\text{S}/\text{cm}$  jusqu'à 950 mètres du rejet. Au delà, la conductivité est homogène sur toute la largeur: ou bien la diffusion du panache est totale, ou bien, par dilution, la conductivité du rejet n'est plus significativement différente.

### - Résultats :

L'ensemble des analyses a eu lieu comme explicité dans la partie 2 « matériel et méthodes » et les résultats des numérations, pourcentages de cellules actives, volumes cellulaires moyens, COP, COD et N-NH<sub>4</sub> sont présentés ci-après (figures 3 et 4).

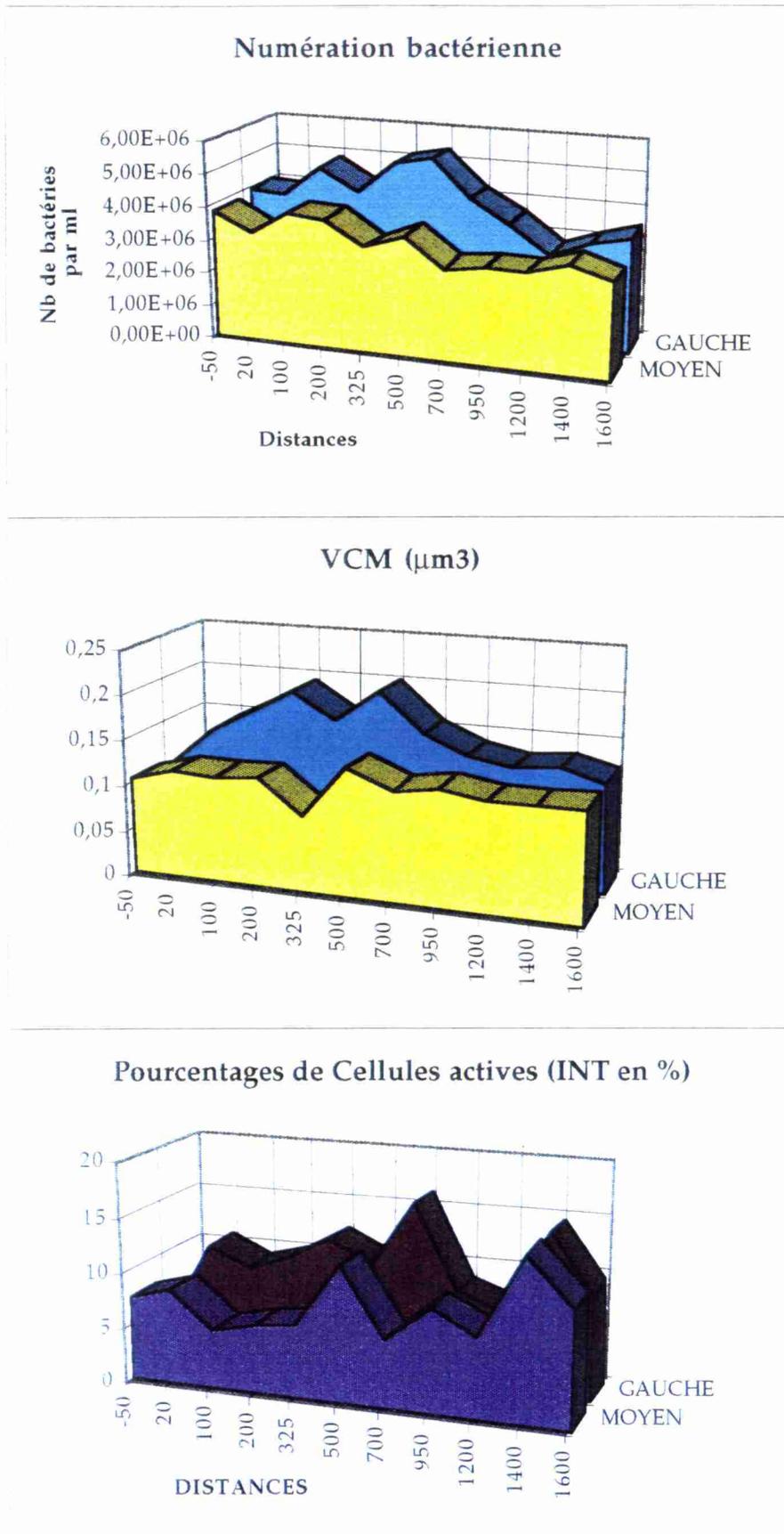


Figure 3: Paramètres bactériologiques en Juin 95.

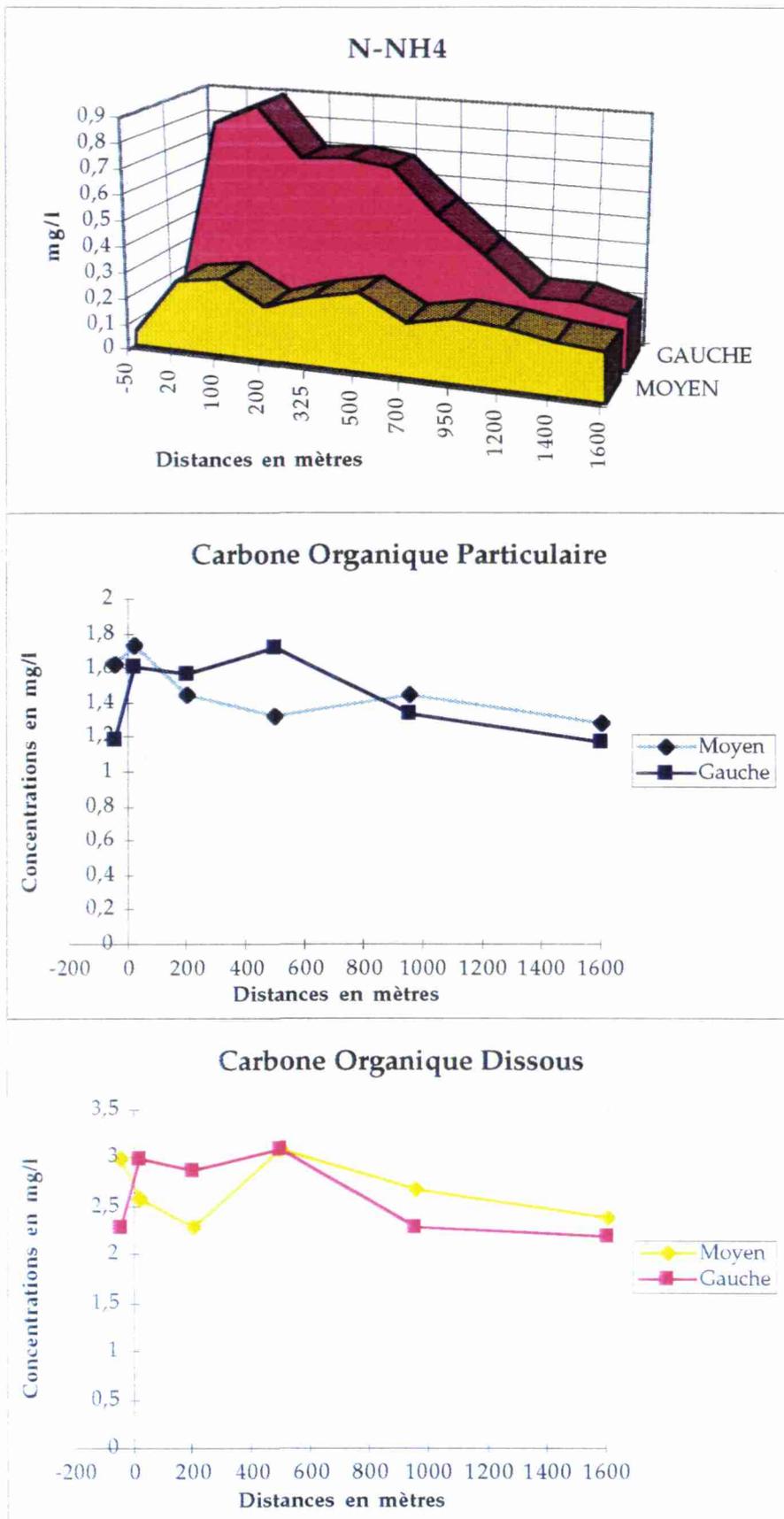


Figure 4: Paramètres chimiques en Juin 95.

Dans les conditions de débit de Juin 95, les résultats obtenus montrent pour l'ensemble des paramètres recherchés des valeurs plus élevées en rive gauche.

Cependant, les résultats du prélèvement gauche en L1, juste après le rejet, semblent faibles. En effet, il paraît presque aberrant d'obtenir des résultats peu différents entre l'amont et L1 pour l'ensemble des paramètres (l'inverse ayant été vérifié en Avril). Ceci peut être dû à une erreur au moment du prélèvement. Après le rejet, le mélange rivière-effluent étant confiné sur la gauche de la rivière, il est possible, lors de l'échantillonnage, de prélever légèrement en dehors du panache.

Toutefois, sur l'ensemble des autres points, la différence entre les prélèvements gauches et moyens est très prononcée pour l'azote ammoniacal mais beaucoup moins pour le carbone organique.

Les paramètres bactériologiques indiquent en rive gauche des effectifs bactériens plus importants, une activité métabolique et des volumes cellulaires moyens (VCM) plus élevés. Nous notons, toujours en rive gauche, mais à 500 mètres du rejet, l'existence d'un deuxième pic au niveau des VCM et des numérations bactériennes. Une légère augmentation se distingue également pour les deux formes de carbone organique.

Ce pic pourrait signifier, qu'après un temps d'adaptation aux nouvelles conditions du milieu naturel, les populations bactériennes se multiplient et se développent. Nous mettrions donc en évidence l'existence d'un phénomène autre qu'une simple dilution du rejet dans la Charente.

C'est pourquoi il a été entrepris pour la campagne de Juillet de prélever à nouveau en rive gauche dans le panache et sur 11 transects.

#### **I.4. Campagne de juillet.**

Lors de cette campagne, les échantillons d'eau destinés à l'analyse sont ponctuels (rive gauche à 20-30 cm de la surface + les deux rejets StEp 1 et StEp 2). La méthode de prélèvement demeure toujours la même. Le but de cette démarche est de mettre en évidence un phénomène autre qu'une simple dilution du mélange rivière-effluent et de comprendre comment évolue le compartiment bactérien à ce niveau.

Pour l'échantillonnage, il nous a semblé intéressant de reprendre la position des onze transects de la campagne de Juin ( de L0 à L10, voir schéma page 44 ).

Les mesures de numérations bactériennes, de cellules actives, de volumes cellulaires moyens et des concentrations en NH<sub>4</sub>, NO<sub>2</sub>, NO<sub>3</sub>, COD et COP ont été effectuées pour tous

les prélèvements. De plus, des analyses d'azote Kjeldhal (= NH<sub>4</sub> + N organique) ont été réalisées pour L0, L1, L2, L4, L6, L8 et L10.

Lors de cette campagne, les conditions étaient les suivantes :

- débit de la Charente : 11 m<sup>3</sup>/s soit 10 cm/s,
- température de la Charente : 19°C,
- débit StEp : 84 l/s soit 0,084 m<sup>3</sup>/s.

Comme pour les autres campagnes, le travail a lieu en suivi de masse d'eau.

### - Suivi de conductivité :

Durant cette campagne, nous avons suivi la conductivité de l'eau afin de situer le rejet dans l'espace et de guider les prélèvements.

A 500 mètres du rejet, avant le méandre, le panache atteint plus de la moitié de la largeur de la rivière.

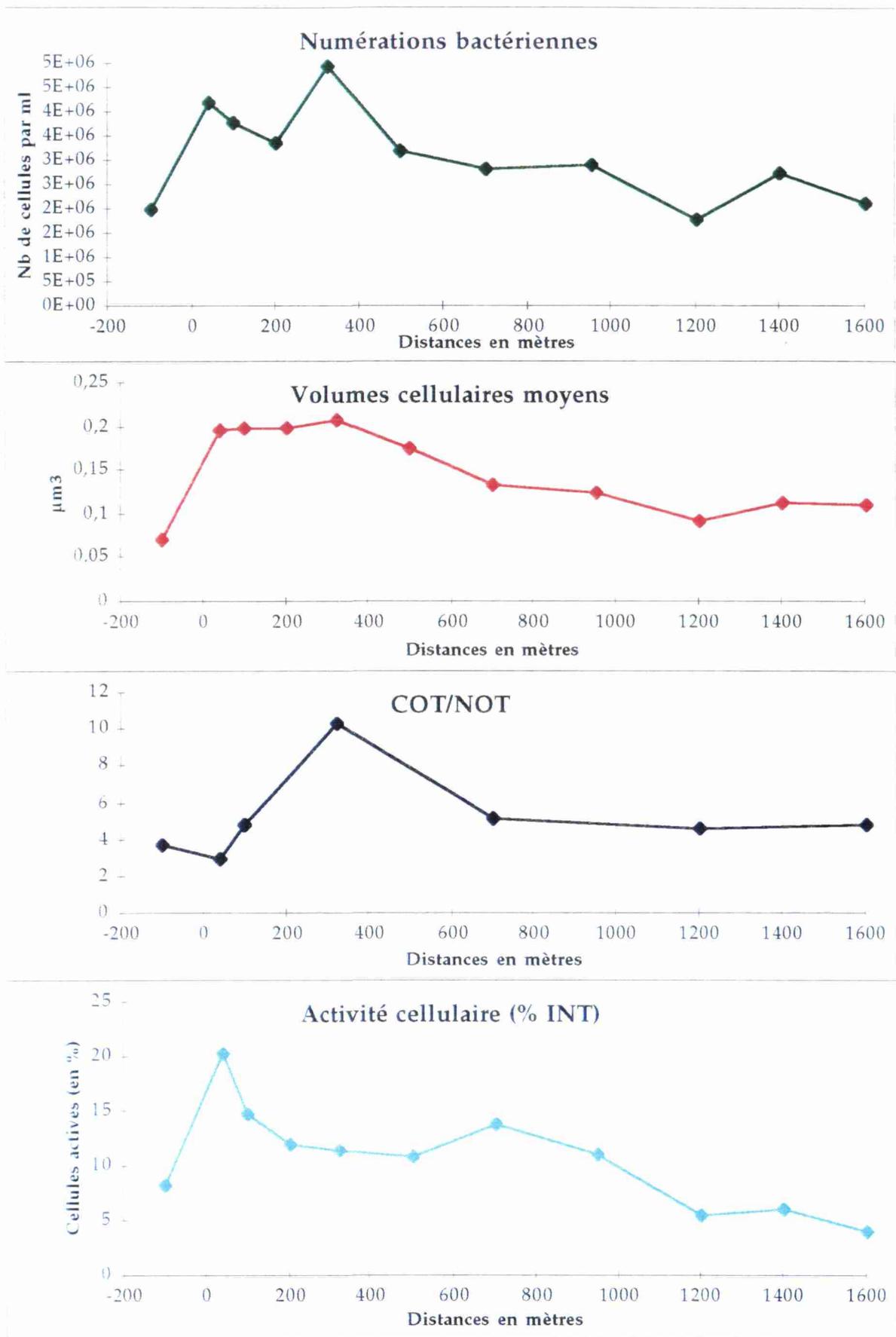
A 700 mètres, après le méandre, il s'étend sur les 4/5ème de la largeur de la Charente.

A partir de 1200 mètres, la conductivité est homogène.

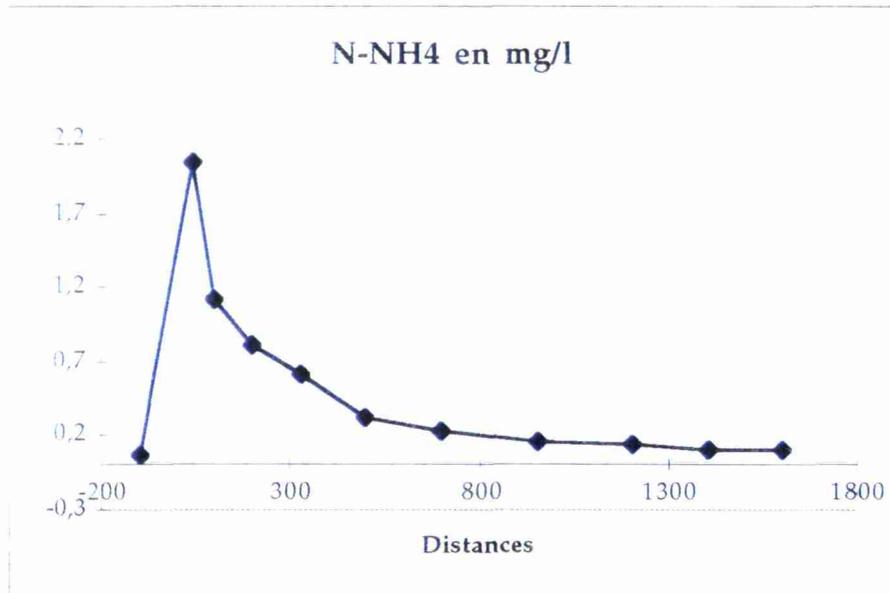
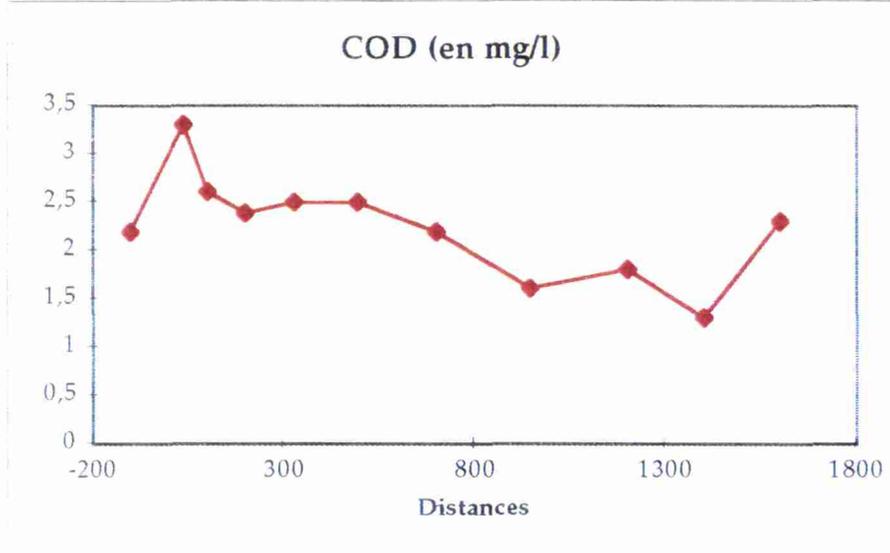
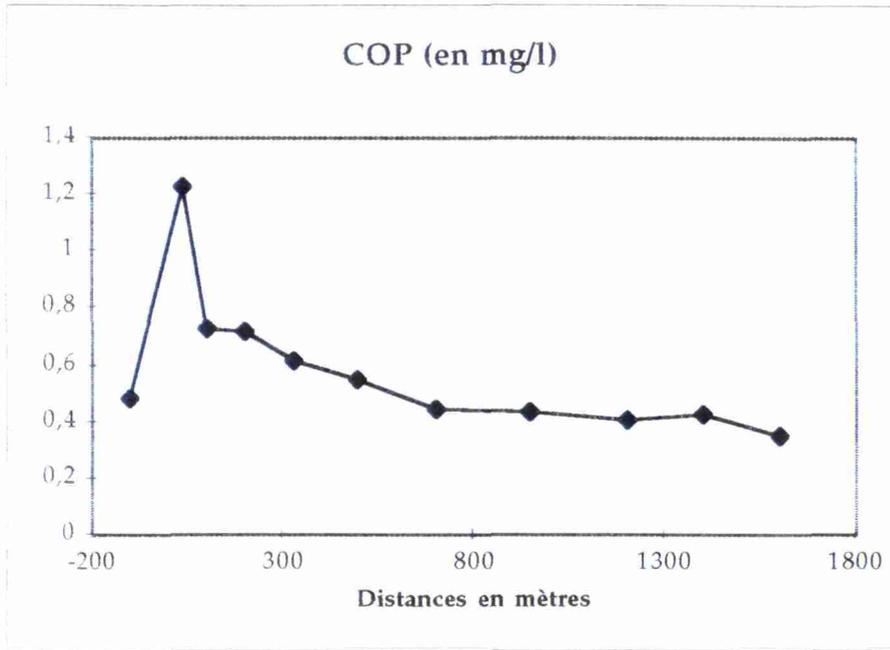
Les résultats de ce suivi de conductivité montrent un élargissement plus rapide du panache. Dans les conditions d'étiage de cette campagne, les temps de transport de la masse d'eau étant beaucoup plus longs, ces résultats sont cohérents.

### - Résultats :

L'ensemble des analyses a eu lieu comme explicité dans la partie 2 « matériel et méthodes ». Les résultats de numérations, pourcentages de cellules actives, volumes cellulaires moyens, COT/NOT (carbone organique total/azote organique total), N-NH<sub>4</sub>, COP et COD sont présentés dans les pages qui suivent (figures 5 et 6).



**Figure 5 : Paramètres bactériologiques et rapport C/N en Juillet 95**



**Figure 6 : Paramètres chimiques en Juillet 95.**

L'apport d'azote ammoniacal par le rejet de la station d'épuration est, comme pour les autres campagnes, toujours très élevé. Cependant, dans le cas présent, la rivière semble récupérer des teneurs plus basses assez rapidement.

Les paramètres bactériologiques indiquent des augmentations des effectifs, des VCM et de l'INT après le rejet. Puis, à environ 350 mètres, un deuxième pic confirme l'hypothèse émise d'après les résultats de Juin, c'est à dire un développement et une multiplication des populations bactériennes après un temps d'adaptation dans la rivière.

A ce stade, il est important de noter en parallèle à ce deuxième pic une valeur élevée du rapport COT/NOT.

- Entre 40 et 350 mètres, le rapport COT/NOT croît, ce qui correspond à une baisse importante de l'azote organique et plus faible du carbone. Ceci traduirait une assimilation ou une minéralisation par les micro-organismes d'où une augmentation de la population bactérienne et des biovolumes (un phénomène de mise en réserve semble possible).

- Après 350 mètres, la chute du rapport COT/NOT correspond surtout à une augmentation de l'azote organique. Ceci pourrait être lié à la chute des numérations due à la lyse bactérienne ou à un phénomène lié à un autre compartiment biologique (algues, protozoaires).

Les résultats de cette campagne confirment l'hypothèse émise en Juin. Un phénomène autre qu'une simple dilution du rejet dans la Charente est mis en évidence. En effet, l'évolution des populations bactériennes au sein du mélange rivière-effluent corrélé avec une baisse de la matière organique dans le milieu démontre le rôle auto-épurateur des micro-organismes.

## **I.5. Campagne de Septembre.**

Afin de confirmer les résultats obtenus en Juillet, une deuxième campagne de terrain en conditions d'étiage a été réalisée.

Lors de cette campagne, les échantillons d'eau destinés à l'analyse sont ponctuels (rive gauche dans le panache à 20-30 cm de la surface + les deux rejets StEp 1 et StEp 2). La méthode de prélèvements demeurent toujours la même.

Pour l'échantillonnage, nous avons repris la position des onze transects des campagnes de Juin et de Juillet (de L0 à L10, voir schéma page 44).

Les mesures de numérations bactériennes, de cellules actives, de volumes cellulaires moyens et des concentrations en NH<sub>4</sub>, NO<sub>2</sub>, NO<sub>3</sub> ont été effectuées pour tous les prélèvements.

Lors de cette campagne, les conditions étaient les suivantes:

- débit de la Charente : 10,6 m<sup>3</sup>/s soit 7,5 cm/s,
- température de la Charente : 16,5 °C,
- débit StEp : 90 l/s soit 0,09 m<sup>3</sup>/s.

- Suivi de conductivité :

La conductivité de l'eau a été suivie lors de cette campagne afin de guider les prélèvements dans le mélange rivière-effluent.

A 100 mètres du rejet, le panache atteint la moitié de la largeur de la rivière.

A 500 mètres, avant le méandre, il s'étend sur les 3/4 de la largeur de la Charente.

Après 1000 mètres, la conductivité est homogène de gauche à droite.

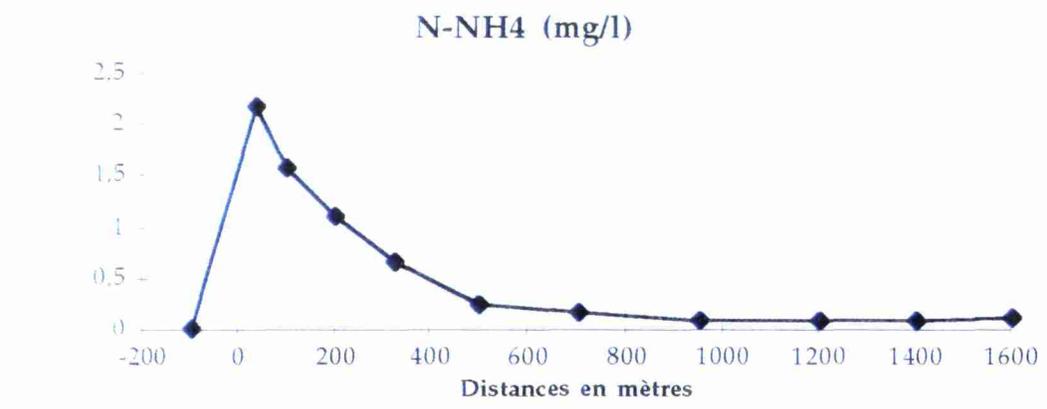
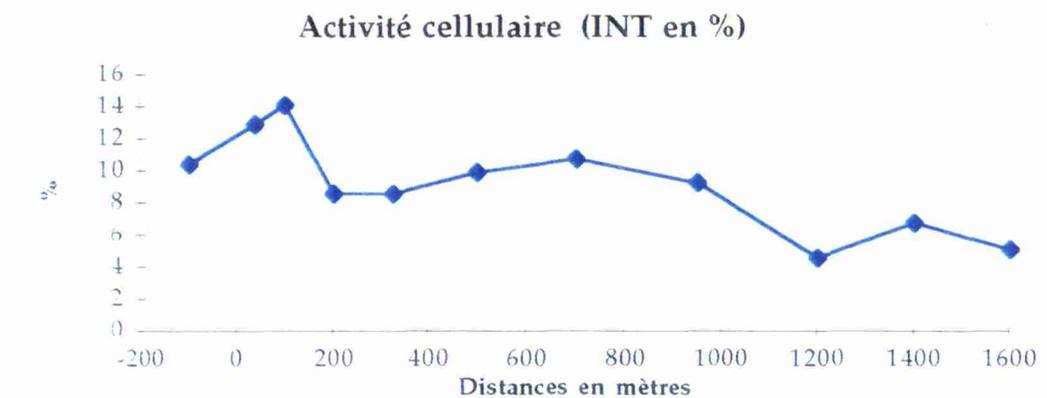
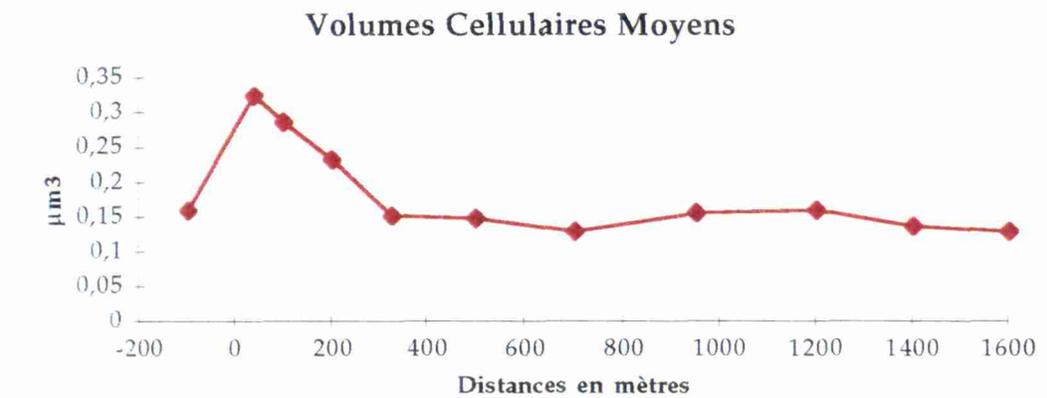
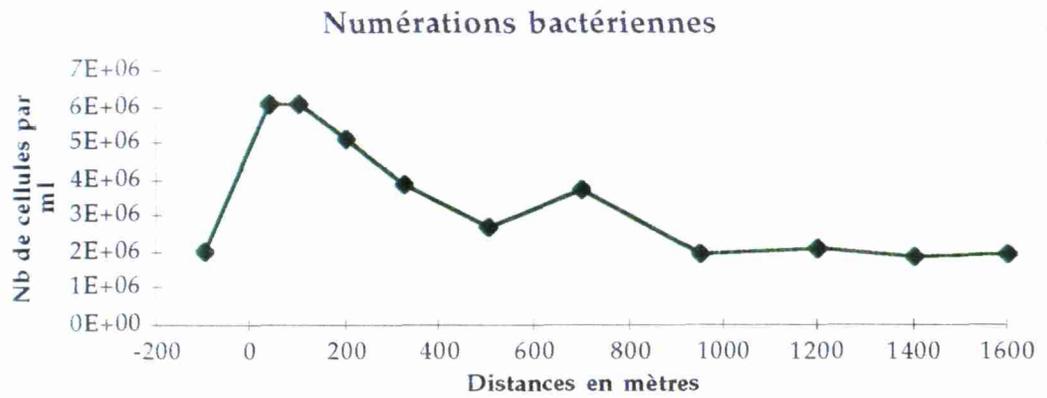
Les résultats de ce suivi de conductivité montrent un élargissement très rapide du panache en Septembre.

En effet, début Septembre, le débit de la Charente est très faible et les temps de transport de la masse d'eau sont très longs.

- Résultats :

Les méthodes d'analyse sont les mêmes qu'en Avril, Juin et Juillet.

Les résultats de numérations bactériennes, pourcentages de cellules actives, volumes cellulaires moyens et concentration en N-NH<sub>4</sub> sont présentés à la page suivante.



**Paramètres bactériologiques et chimiques en Septembre 95**

L'apport d'azote ammoniacal par le rejet de la station d'épuration est toujours très important. Les teneurs baissent assez rapidement mais les conditions amont ne sont pas retrouvées après 1600 mètres.

Les paramètres bactériologiques indiquent des augmentations des effectifs, des VCM et de l'INT après le rejet. La survie des populations bactériennes confirme les résultats de Juillet.

Cependant, à ce stade, il est impossible de connaître quelles populations entrent réellement en jeu et dans quelle mesure elles contribuent à l'auto-épuration de la rivière. C'est pourquoi, nous avons entrepris la recherche d'un critère de distinction entre les bactéries autochtones et les bactéries allochtones.

## II. ESSAI DE DISCRIMINATION DES POPULATIONS BACTERIENNES.

Les résultats des campagnes de terrain nous ont permis de mettre en évidence une évolution des micro-organismes à l'aval de la station d'épuration de Frégeneuil. Des cellules de grande taille (de l'ordre de  $0,2 \mu\text{m}^3$ ) caractéristiques de l'effluent, semblent survivre et se développer sur presque 500 mètres.

Cependant, il existe plusieurs possibilités quant au devenir du compartiment bactérien :

- Les allochtones peuvent s'adapter au changement de milieu, survivre et profiter de la matière organique ou minérale suivant qu'elles sont hétérotrophes ou autotrophes;
- Les autochtones pourraient également profiter de l'apport nutritif constitué par le rejet et se développer dans leur propre milieu;
- Les deux populations peuvent également entrer en concurrence, chacune cherchant à profiter et à se développer.

C'est pourquoi, nous avons tenté de distinguer les populations allochtones des populations autochtones en utilisant un critère morphologique : la taille des cellules.

La recherche de l'évolution des bactéries de station d'épuration s'est traduite par le suivi des bactéries de grande taille dans le milieu naturel.

En premier lieu, nous avons utilisé les trois classes de tailles utilisées par Rebillard et Torre (1992) pour déterminer le contenu carboné moyen des cellules.

Ces trois classes sont les suivantes :

- cellules  $< 0,065 \mu\text{m}^3$ ;
- cellules comprises entre  $0,065$  et  $0,4 \mu\text{m}^3$ ;
- cellules  $> 0,4 \mu\text{m}^3$ .

La répartition de ces 3 classes de volumes en pourcentage et pour les quatre transects de la campagne d'Avril est représentée sous forme de graphique à la page suivante.

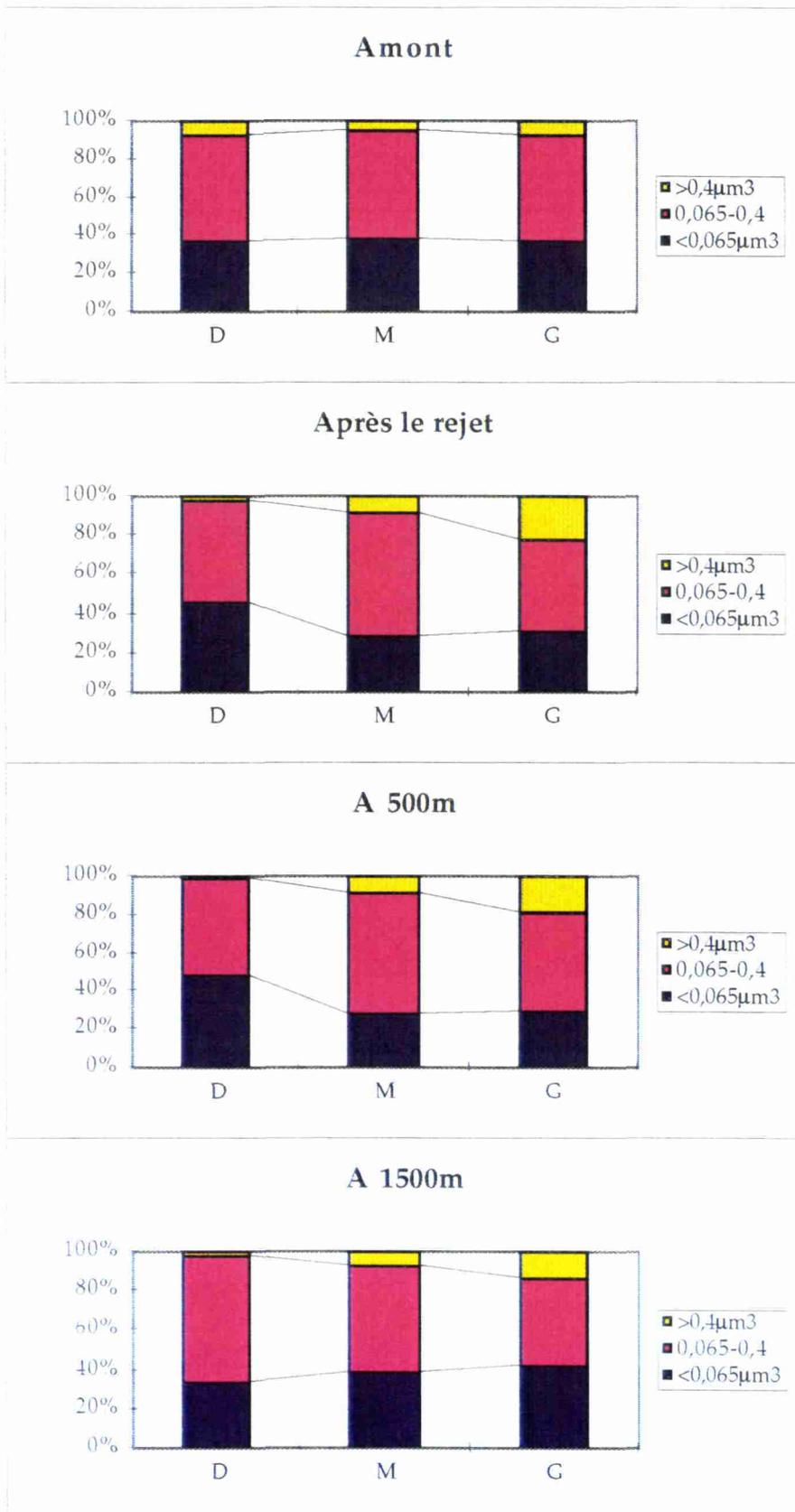
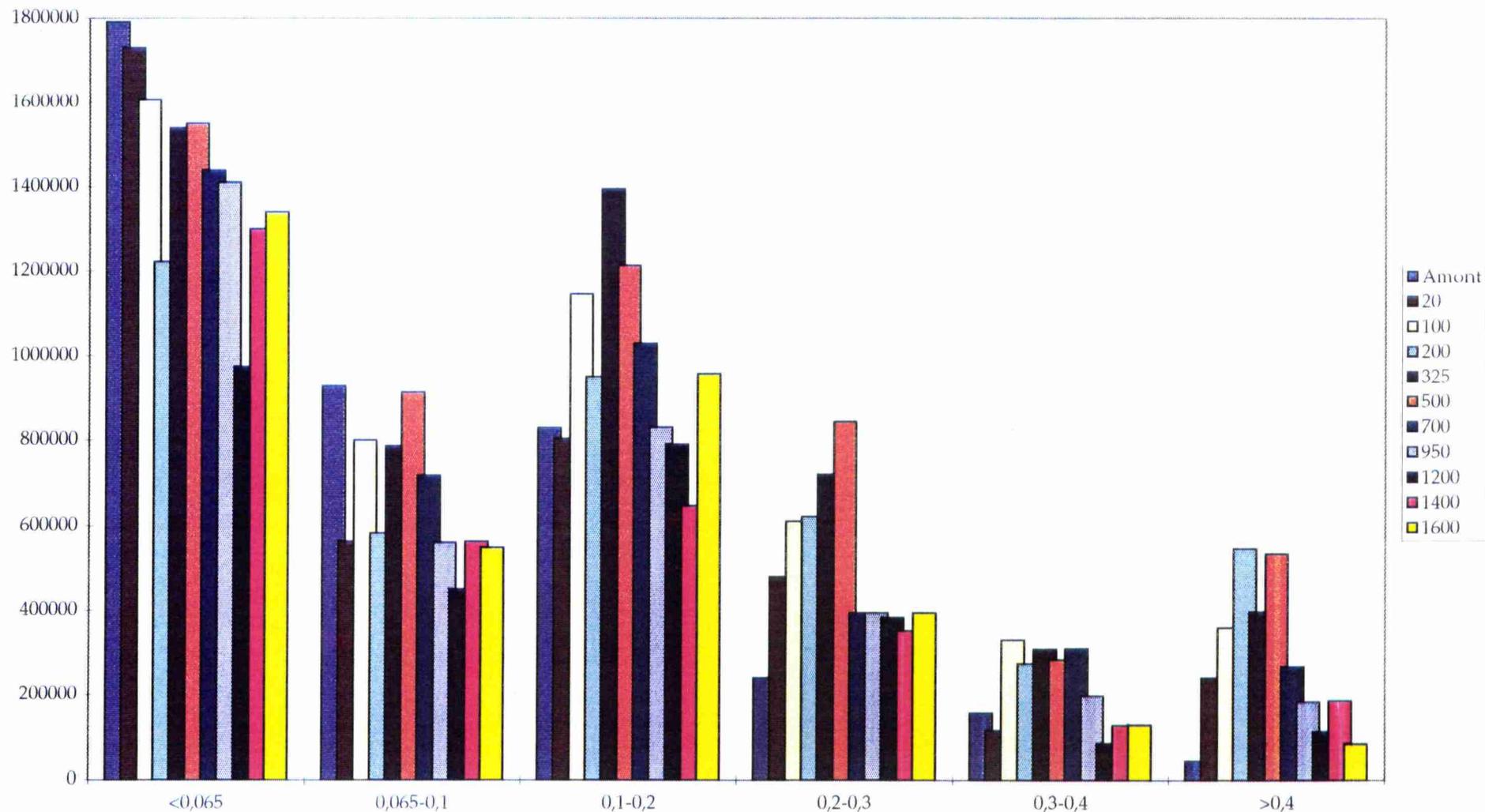


Figure 7 : Répartition de 3 classes de volumes en pourcentages en Avril 95

Figure 8 : Evolution des échantillons de Juin par classes de tailles (en effectifs)



D'après la figure 7, la répartition des 3 classes est homogène à l'amont.

Après le rejet, on distingue à gauche une nette évolution de la part des bactéries dont la taille est supérieure à  $0,4 \mu\text{m}^3$ . A 1500 mètres, elle diminue légèrement mais le pourcentage de petites cellules augmente.

Après examen de l'évolution de ces trois classes pour la campagne de Juin, nous avons conclu que les renseignements fournis par cette classification ne donnaient pas assez de précision pour pouvoir interpréter l'évolution de nos différentes populations.

De ce fait, nous avons tenté de répartir nos populations non plus en 3 classes mais en 6 classes afin d'obtenir plus de précision dans les résultats. La figure 8 illustre l'évolution des échantillons de Juin pour 6 classes de taille en effectifs.

Les quatre dernières classes présentent des allures en cloche avec un accroissement d'effectifs autour des 500 mètres.

Un découpage plus fin des classes de volume nous permettrait de caractériser, par l'allure générale de la courbe, une population pour un échantillon donné.

En rangeant selon une progression géométrique de type  $\exp(N)$ , avec  $N = (n+0,25)$  et  $-4,5 < n < 1,5$ , les volumes cellulaires obtenus pour les campagnes de Juin de Juillet et de Septembre, nous obtenons une distribution de la population en 24 classes de taille.

La figure 9 donne, d'après des résultats de la campagne de Juillet, les distributions :

- à l'amont (L0) de la station d'épuration caractérisant la population autochtone;
- de l'effluent (StEp) caractérisant la population allochtone;
- du mélange rivière-effluent 30 mètres après le rejet (L1) caractérisant une population allochtone + autochtone.

Nous notons, malgré une échelle différente, des allures de courbes similaires entre l'effluent et le mélange. Au niveau du mélange rivière-effluent, les bactéries allochtones représentent donc une part importante de la population microbienne totale.

La figure 10 montre l'évolution longitudinale du peuplement bactérien entre l'amont et 1600 mètres après le rejet.

Le glissement de la distribution vers la droite par rapport à la taille de  $0,1 \mu\text{m}^3$ , taille moyenne des bactéries de rivière, correspond à une augmentation des populations de grande taille.

La courbe reprend ensuite peu à peu la position qu'elle avait à l'amont.

Au vu de la figure 9, il semblait possible de distinguer une population allochtone d'une population autochtone. Nous avons alors regroupé nos valeurs en 3 nouvelles classes de taille :

- $< 0,08 \mu\text{m}^3$  caractérisant la population autochtone;
- $> 0,2 \mu\text{m}^3$  caractérisant la population allochtone;

- 0,08-0,2  $\mu\text{m}^3$  représentant les plus grosses cellules autochtones et les plus petites cellules allochtones.

**Figure 9 : Mélange Rivière-Effluent.**

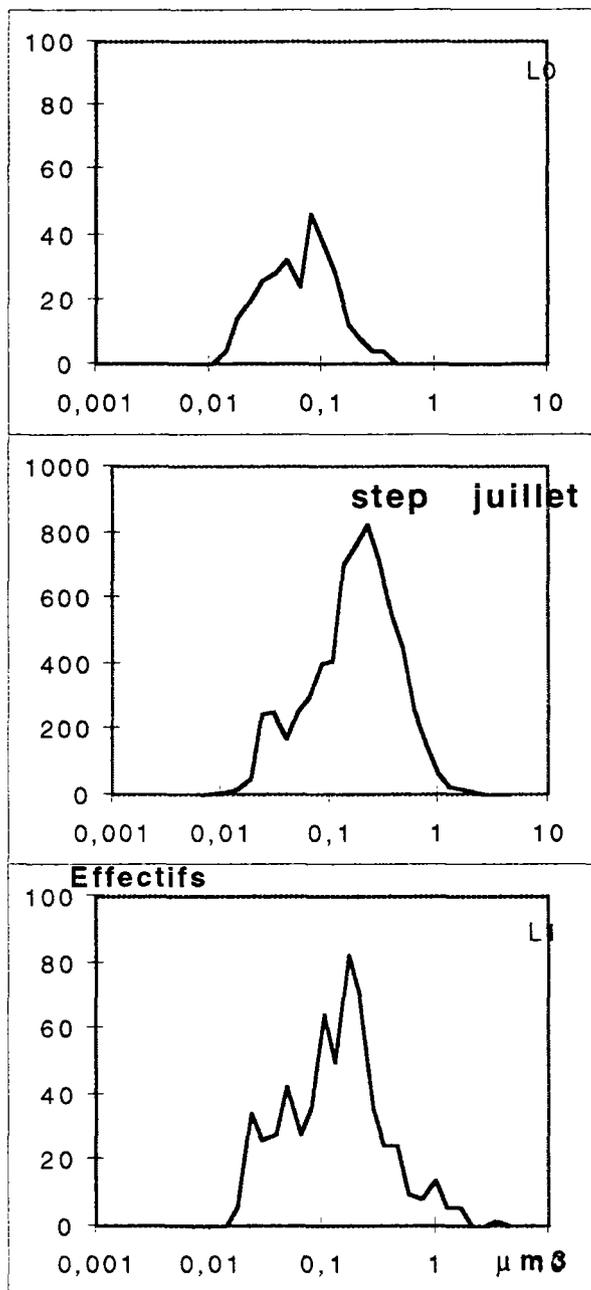
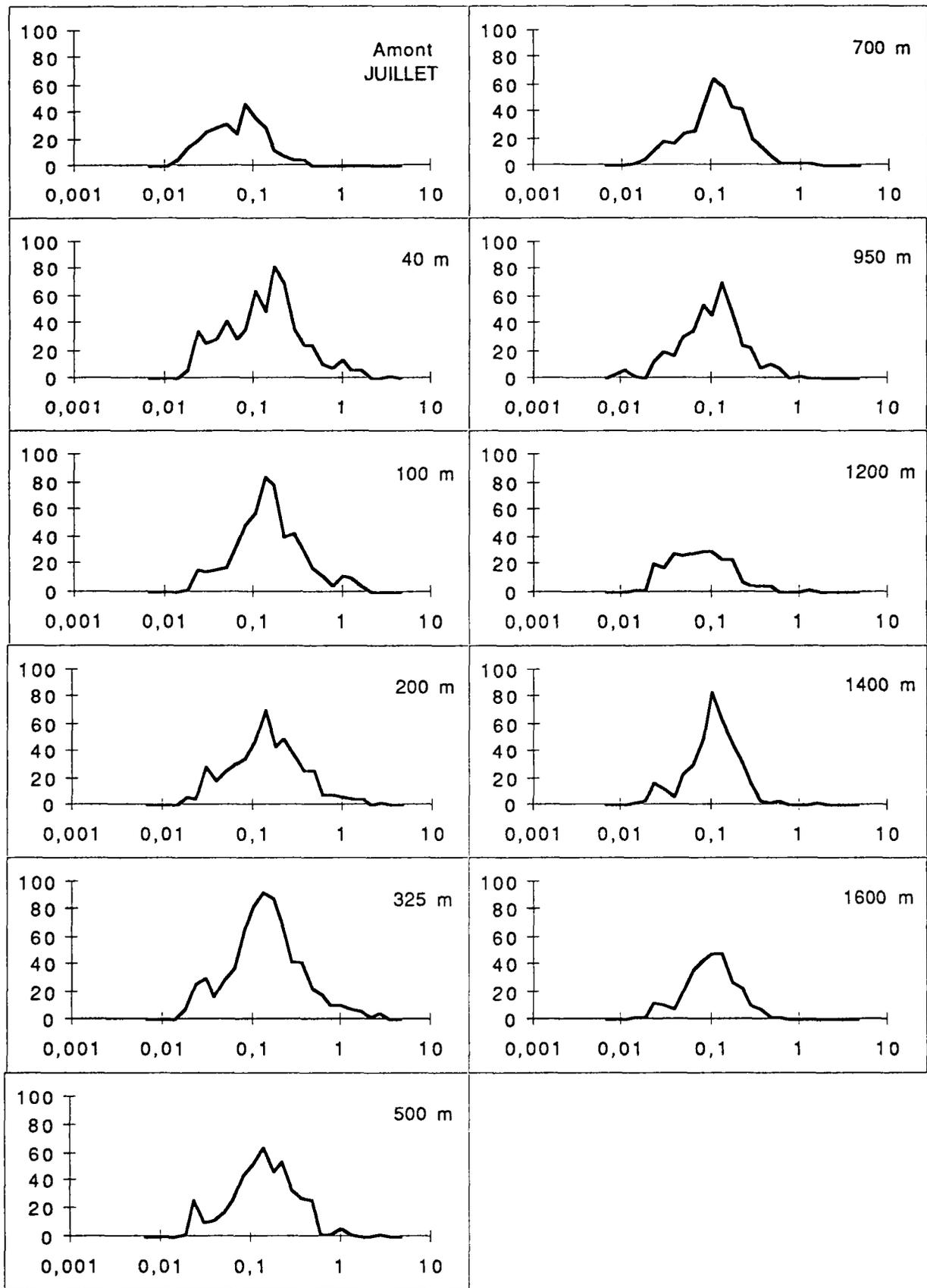


Figure 10 : Evolution longitudinale du peuplement bactérien en Juillet 95



La figure 11 montre l'évolution des effectifs de chacune de ces 3 nouvelles classes en fonction de la distance d'une part et en fonction du temps d'autre part. Nous avons pu estimer l'évolution en fonction du temps en utilisant les débits et courants de la Charente relevés pour chaque campagne.

Il nous permet de conclure que :

- les grosses cellules subsistent 500 mètres après le rejet (il s'agit ici de la fraction  $> 0,2 \mu\text{m}^3$ ); cela ne signifie pas qu'ensuite les bactéries allochtones disparaissent totalement;
- en condition d'étiage, leur temps de survie atteint 1 à 2 heures.

Nous remarquons que la baisse des effectifs d'une classe de taille traduit une mortalité au sein de cette classe et non un glissement des individus d'une classe à l'autre. Ce dernier choix de classes de volumes semble être approprié à la distinction des populations bactériennes.

Figure 11 : Evolution des effectifs de 3 nouvelles classes.

3 classes <math><0,08\mu\text{m}^3</math> <math>0,08-0,2\mu\text{m}^3</math> <math>>0,2\mu\text{m}^3</math>



Evolution des effectifs en fonction de la distance en mètres.

Evolution des effectifs en fonction du temps en minutes.

### III. INVESTIGATION COMPLEMENTAIRE EN LABORATOIRE.

Malgré la mise en évidence d'un temps de survie des bactéries de station d'épuration dans le milieu naturel, la distinction entre consommation bactérienne et dilution du rejet n'est pas évidente. Bien que les bactéries survivent après un temps d'adaptation, leur efficacité n'est pas encore établie. Des essais de laboratoire ont donc été entrepris en parallèle dans le but de préciser leur rôle.

Les expérimentations de terrain ne sont donc pas en mesure de distinguer la part d'activité qui incombe aux bactéries de rivière et aux bactéries de station d'épuration. Elles ne permettent pas non plus de dissocier les phénomènes de dégradation bactérienne de la charge polluante des phénomènes de dilution. C'est pourquoi nous avons mené en parallèle des expériences en conditions de laboratoire par la comparaison de 3 types de réacteurs:

réacteur n°1: bactéries de rivière (prélevées en amont de la station de Frégeneuil).

réacteur n°2: bactéries de station d'épuration (prélevées en sortie de la station).

réacteur n°3: bactéries mixtes (mélange des deux populations précédentes).

En conditions de laboratoire, le suivi des 3 classes de tailles de cellules établies par les expérimentations de terrain ( $<0.08$ ;  $0.08$  à  $0.2$ ;  $>0.2\mu\text{m}^3$ ) permet de préciser que:

- l'apport de COD en provenance de la station d'épuration contribuerait à une augmentation simultanée des effectifs pour les 3 classes dans les premières 24 heures, en ce qui concerne la population autochtone. En revanche, nous n'observons pas de grossissement des cellules de rivière.

- les plus grosses cellules bactériennes caractérisent effectivement la population allochtone.

De plus, une période d'adaptation se confirme pour les bactéries de station d'épuration. Par la suite, cette population allochtone semble plus active que les autres populations.

Les diminutions des teneurs en  $\text{NH}_4$  et en COD observées dans les réacteurs traduisent une assimilation microbienne. Ainsi, les baisses de  $\text{NH}_4$  et de COD mesurées sur le terrain doivent, en partie, rendre compte de cette faculté d'assimilation. De surcroît, les expériences menées en laboratoire semblent montrer que, dans un premier temps, les bactéries de rivière amorcent ces processus de dégradation qui seront repris ensuite par les bactéries de station d'épuration.

## CONCLUSION ET PERSPECTIVES

La minéralisation de la matière organique par les bactéries hétérotrophes est un processus majeur conditionnant le fonctionnement des écosystèmes aquatiques.

Ces micro-organismes participent ainsi à l'auto-épuration du milieu.

L'observation du devenir des bactéries de station d'épuration dans le milieu récepteur a été effectuée par mesures de l'abondance, de l'activité et de la morphologie des cellules.

En effet, le critère de taille est intéressant pour suivre les communautés au sein du milieu récepteur, mais n'est cependant pas suffisant pour conclure sur le rôle exact joué par les bactéries allochtones.

Certes, leur rôle auto-épurateur est largement supposé mais n'est pas clairement défini.

En milieu naturel, le principal inconvénient est de distinguer la part de la consommation bactérienne, de celle de la dilution du rejet. De plus, la participation des autres populations (algues, protozoaires...), les apports secondaires, les phénomènes de remise en suspension de la matière organique depuis les sédiments ne peuvent être quantifiés.

C'est pour cette raison qu'ont été menés en parallèle, des essais en laboratoire afin de suivre uniquement l'évolution du compartiment bactérien.

L'assimilation microbienne allochtone est mise en évidence avec une période initiale d'adaptation.

S'il semble démontré par l'évolution des biovolumes que les bactéries allochtones de grande taille survivent quelques heures dans le milieu récepteur, nous pouvons supposer que celles de taille moyenne ou petite continuent à jouer leur rôle un peu plus loin dans le temps. Ce séjour prolongé (survie ou adaptation) devrait contribuer aux processus de dégradation des composés organiques et donc à l'auto-épuration du cours d'eau.

Il semble indispensable d'essayer de définir l'impact de ces populations allochtones. Il est donc nécessaire, à l'avenir, de mener à nouveau de front des travaux en laboratoire et en milieu naturel.

Des essais devront être envisagés pour préciser les phénomènes observés dans les premières heures de transfert de la masse d'eau en milieu naturel. La complémentarité des informations obtenues en parallèle, in situ, et en conditions de laboratoire, permettrait une interprétation plus fine.

# BIBLIOGRAPHIE

**Billen G. et Servais P.**, 1989. Modélisation des processus de dégradation bactérienne de la matière organique en milieu aquatique. Micro-organismes dans les écosystèmes océaniques, Bianchi M et coll., Masson, 219-245.

**Bonnet C.**, 1994. Caractérisation d'une population de *Nitrobacter* de station d'épuration: étude de son devenir lors d'un rejet en cours d'eau. Mémoire de DEA, spécialité Ecologie Microbienne, de l'Université de Lyon 1.

**Bonvallet Garay S.**, 1995. Mesure expérimentale de la transformation du carbone organique dissous en carbone bactérien dans un écosystème lotique: la Garonne. Mémoire de DEA d'Ecologie des Systèmes Aquatiques Continentaux de l'Université de Toulouse III.

**Block et Colin** , 1985. Fixation des bactéries. Le point sur l'épuration et le traitement des effluents. Tome 1. G. Martin coordonnateur. Lavoisier Tec et Doc.

**Bratbak G.**, 1985. Bacterial biovolume and biomass estimations. Appl. Env. Microbiol.49:1488-1493.

**Dutton R. J., Bitton G. and Koopman B.**, 1986. Application of a direct microscopic method of the determination of active bacteria in lakes. Wat. Res. 20(1):1461-1464.

**Finance** (1985). Facteurs biologiques d'épuration des eaux. Le point sur l'épuration et le traitement des effluents. Tome 1. G. Martin coordonnateur. Lavoisier Tec et Doc.

**Frias J., Ribas F. and Lucena F.**, 1992. A method for the measurement of biodegradable organic carbon in waters. Wat. Res 26(2):255-258.

**Garnier J. et Barillier A.**, 1991. Synthèse et dégradation de la matière organique dans les écosystèmes aquatiques : boucle microbienne et statut trophique. Océanis 17:561-580.

**Garnier J., Servais P. and Billen G.**, 1991. Bacterioplankton in the Seine River (France): impact of the Parisian urban effluent. Can J. Microbiol. 38 : 56-64.

**Got P., Baleux B. and Trousselier M.**, 1993. Dénombrements directs des bactéries des milieux aquatiques par microscopie en épifluorescence: comparaison entre un système d'analyse d'images automatisé (Mudican<sup>®</sup>) et l'observation visuelle. Revue des sciences de l'eau 6:269-284.

**Johnson M. D. and Ward A. K.**, 1993. A comparison of INT-formazan methods for determining bacterial activity in stream ecosystems. J. N. Benthol. Soc. 12(2):168-173.

Jorgensen N. O. G., Kroer N. and Coffin R. B., 1994. Utilization of dissolved Nitrogen by Heterotrophic Bacterioplankton: effect of substrate C/N ratio. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:4124-4133.

Kroer N., Jorgensen N. O. G. and Coffin R. B., 1994. Utilization of dissolved Nitrogen by Heterotrophic Bacterioplankton: a comparison of three ecosystems. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:4116-4123.

Geller A., 1983. Growth of Bacteria in Inorganic Medium at Different Levels of Airborne Organic Substances. *Appl. Environ. Microbiol.* 46:1258-1262.

Letarte Y., Hansen H. J., Sondergaard M. and Pinel-Alloul B., 1992. Production and abundance of different bacterial size-classes: relationships with primary production and chlorophyll concentration. *Arch. Hydrobiol.* 126:15-26.

Maurice L., 1993. Modélisation du cycle de dégradation bactérienne de la matière organique, application à la zone de turbidité maximale de l'estuaire de la Loire. Mémoire de thèse, spécialité Physique et Chimie de l'Environnement, de l'Institut National Polytechnique de Toulouse.

Menon P., 1993. Le fonctionnement des compartiments biologiques-Synthèse bibliographique. CEMAGREF Bordeaux.

Mulder EG., 1989. « Sheated Bacteria » in *Bergey's manual of Systematic Bacteriology*. Williams et Wilkins. Vol 3 (22):1994-1998.

Montuelle B. et Volat B., 1993. Utilisation des activités exoenzymatiques microbiennes dans l'étude d'écosystèmes aquatiques. *Revue des sciences de l'eau* 6:251-268.

Nagata T. and Watanabe Y., 1990. Carbon-and-nitrogen-to-volume ratios of bacterioplankton grown under different nutritional conditions. *Appl. Env. Microbiol.* 56:1303-1309.

Pfennig N., 1978. *Rhodocyclus purpureus* gen. nov. and sp. nov., a Ring-Shapes, Vitamin B12-Requiring Member of the Family *Rhodospirillaceae*. *International Journal of Systematic Bacteriology* 28:283-288.

Psenner R., 1991. Determination of bacterial cell volumes by image analysis. *Verh. Internat. Verein. Limnol.* 24:2605-2608.

Rebillard J. P. et Torre M., 1992. Numération bactérienne en épifluorescence par la méthode couplée DAPI-INT: application à un cas concret. *Revue des sciences de l'eau* 6(2):153-174.

Schwartzbrod (1985). Les micro-organismes agents biogéochimiques. Le point sur l'épuration et le traitement des effluents . Tome 2. G. Martin coordonnateur. Lavoisier Tec et Doc.

**Servais P., Anzil A. and Ventresque C., 1989.** Simple method for determination of biodegradable dissolved organic carbon in water. *Appl. Env. Microbiol.* 55:2732-2734.

**Servais P. et Garnier J., 1990.** Activité bactérienne hétérotrophe dans la Seine : profil d'incorporation de thymidine et de leucine tritiée. *Ecologie générale.* 353-360.

**Servais P. et Garnier J., 1993.** Contribution of heterotrophic bacterial production to the carbon budget of the river Seine (France). *Microb. Ecol.* 25:19-33.

**Sieracki M. E., Johnson P. W. and Sieburth J. McN., 1985** Detection, enumeration and sizing of planktonic bacteria by image-analysed epifluorescence microscopy. *Appl. Env. Microbiol.* 49:799-810.

**Simon M. and Azam F., 1989.** Protein content and protein synthesis rates of planktonic marine bacteria. *Mar Ecol Prog Ser.* 51:201-213.

**Spitzky A. and Ittekkot V., 1991.** Dissolved and particulate organic matter in rivers. *Ocean Margin Processes in Global Change.* 6-15.

**Spitzky A. and Leenheer J. 1991.** Dissolved organic carbon in rivers. *Biogeochemistry of Major World Rivers.* 214-231.

**Tranvik L. J., 1990.** Bacterioplankton growth on fractions of dissolved organic carbon of different molecular weights from humic and clear waters. *Appl. Env. Microbiol.* 56:1672-1677.

**Trousselier M., Albat M., Andre P. et Baleux B., 1985.** Dénombrements directs des bactéries dans les milieux aquatiques par microscopie en épifluorescence: distribution et précision des mesures. *Revue des sciences de l'eau* 4:35-49.

**Turley C. M. and Hughes D.J., 1994.** The effect of storage temperature on the enumeration of epifluorescence-detectable bacterial cells in preserved sea-water samples. *J. mar. biol. Ass. U.K.* 74:259-262.

**Turley C. M. and Hughes D.J., 1992.** Effects of storage on direct estimates of bacterial numbers of preserved seawater samples. *Deep-Sea Research.* 39: 375-394.

**Turley C M., 1993.** Direct Estimates of Bacterial Numbers in Seawater Samples Without Incurring Cell Loss Due to Sample Storage. Chapter 18, 143-147.

**Vervier P, Dobson M. and Pinay G., 1993.** Role of interaction between surface and ground waters in DOC transport and processing: considerations for river restoration. *Freshwater biology* 29:275-284.

**Whei-Chou Jen and Bell R. G., 1982.** Influence of temperature and time of incubation on the estimation of bacterial numbers in tropical surface waters. *Wat. Res.* 16:601-604.

# **ANNEXES**

AVRIL 1995

Numération bactérienne  
(Nombre de cellules/ml)

Distance	GAUCHE	MILIEU	DROITE
<b>Amont</b>			
Surface	3525000	5428500	5964300
Fond	3750000	3933900	4568400
<b>Rejet</b>			
Surface	5583600	4413300	5470800
Fond	3567300	4596600	4399200
<b>500m</b>			
Surface	5315700	3454500	4272300
Fond	3454500	3919800	3440400
<b>1500m</b>			
Surface	3398100	3948000	4272300
Fond	3525000	3017400	2143200
		step1	39973500
		step2	50619000

Concentrations en Nitrates (mg/l)

GAUCHE	MILIEU	DROITE
22,86	24,77	28,42
22,73	25,09	27,46
21,71	24,26	26,88
21,77	23,75	26,69
22,41	24,33	26,75
22,28	25,35	26,69
23,05	24,2	25,99
22,99	23,82	26,12
	step1	21
	step2	15

Volumes Cellulaires Moyens (µm3)

Distance	GAUCHE	MILIEU	DROITE
<b>Amont</b>			
Surface	0,154	0,119	0,145
Fond	0,172	0,162	0,132
<b>Rejet</b>			
Surface	0,284	0,171	0,094
Fond	0,207	0,155	0,129
<b>500m</b>			
Surface	0,24	0,171	0,106
Fond	0,213	0,149	0,134
<b>1500m</b>			
Surface	0,193	0,151	0,128
Fond	0,224	0,196	0,115
		step1	0,273
		step2	0,237

Concentrations en Nitrites (mg/l)

GAUCHE	MILIEU	DROITE
0,05	0,05	0,05
0,06	0,05	0,05
0,09	0,05	0,05
0,08	0,06	0,05
0,09	0,06	0,05
0,09	0,05	0,05
0,1	0,07	0,05
0,1	0,07	0,05
	step1	5,45
	step2	6,75

AVRIL 1995

Cellules actives (% INT)

Distance	GAUCHE	MILIEU	DROITE
Amont			
Surface	9,2	8	4,5
Fond	8,6	7,2	6,2
Rejet			
Surface	9,6	8,6	6,2
Fond	9,5	8,3	9,3
500m			
Surface	9	10,2	7,3
Fond	10,6	5,4	3,7
1500m			
Surface	8,7	8,2	3,6
Fond	9,2	7,9	4
		step1	18
		step2	12

Concentrations en Ammonium (mg/l)

Distance	GAUCHE	MILIEU	DROITE
Amont			
Surface	0,08	0,06	0,06
Fond	0,08	0,06	0,04
Rejet			
Surface	1,05	0,07	0,04
Fond	0,62	0,07	0,05
500m			
Surface	0,99	0,16	0,06
Fond	0,87	0,1	0,05
1500m			
Surface	0,96	0,41	0,07
Fond	0,94	0,35	0,07
		step1	53,4
		step2	72,5

Classes de taille des cellules  
(Nombre de cellules/classe)

Distance	<0,08 $\mu\text{m}^3$	0,08-0,2	>0,2 $\mu\text{m}^3$
Amont	218	174	108
Rejet	278	206	308
500m	264	202	288
1500m	228	110	144

COP (mg/l)

Distance	GAUCHE	MILIEU	DROITE
amont	1,055	0,955	1,02
Rejet	2,115	0,945	0,795
500m	1,84	0,985	0,815
1500m	1,965	1,33	1,05
		step1	31,355
		step2	55,95

COD (mg/l)

Distance	GAUCHE	MILIEU	DROITE
amont	1,4	1,1	0,7
Rejet	1,7	1	0,9
500m	1,6	1,1	0,6
1500m	1,2	1,6	0,8
		step1	39,6
		step2	42

## JUIN 1995

### Numération bactérienne

(Nombre de cellules/ml)

Distance	MOYEN	GAUCHE
-50	3863400	3990300
20	3271200	3933900
100	3948000	4850400
200	3877500	4201800
325	3172500	5146500
500	3581400	5343900
700	2749500	4230000
950	2890500	3581400
1200	2862300	2735400
1400	3186600	3172500
1600	2834100	3454500
	step1	25591500
	step2	27142500

### Concentrations en Nitrates (mg/l)

Distance	MOYEN	GAUCHE
L0	21	23
L1	22	24
L2	22	24
L3	21	24
L4	24	23
L5	22	24
L6	22	25
L7	22	22
L8	23	22
L9	22	22
L10	18	21
	step1	22
	step2	28

### Volumes Cellulaires Moyens (µm3)

Distance	MOYEN	GAUCHE
-50	0,107	0,101
20	0,119	0,142
100	0,117	0,167
200	0,121	0,194
325	0,085	0,164
500	0,14	0,201
700	0,121	0,157
950	0,129	0,137
1200	0,12	0,129
1400	0,12	0,133
1600	0,121	0,121
	step1	0,253
	step2	0,257

### Concentrations en Nitrites (mg/l)

Distance	MOYEN	GAUCHE
L0	0,08	0,07
L1	0,1	0,16
L2	0,11	0,21
L3	0,1	0,18
L4	0,11	0,18
L5	0,12	0,18
L6	0,1	0,15
L7	0,11	0,13
L8	0,11	0,11
L9	0,1	0,11
L10	0,1	0,11
	step1	2,65
	step2	7,65

### Cellules actives (% INT)

Distance	MOYEN	GAUCHE
-50	7,7	4,2
20	8,6	10,75
100	5,36	9,07
200	6,2	10,18
325	6,7	12,3
500	12,2	10,3
700	6,15	16,33
950	9,27	8,66
1200	7,39	7,21
1400	14,6	14,67
1600	10,45	9,4
	step1	28,4
	step2	24,9

### Concentrations en Ammonium (mg/l)

Distance	MOYEN	GAUCHE
L0	0,08	0,06
L1	0,36	1,05
L2	0,39	1,15
L3	0,27	0,9
L4	0,34	0,92
L5	0,39	0,89
L6	0,27	0,68
L7	0,32	0,5
L8	0,3	0,31
L9	0,26	0,31
L10	0,24	0,26
	step1	42,8
	step2	28,7

## JUIN 1995

### Classes de taille des cellules (Nombre de cellules/classe)

Distance	<0,08 $\mu\text{m}^3$	0,08-0,2	>0,2 $\mu\text{m}^3$
Amont	159	93	31
40	140	80	59
100	138	114	92
200	106	88	102
325	139	125	101
500	144	117	118
700	125	102	73
950	121	78	55
1200	84	73	37
1400	118	60	47
1600	114	88	43

### COP (mg/l)

Distance	MOYEN	GAUCHE
Amont	1,635	1,19
20	1,745	1,615
200	1,455	1,58
500	1,335	1,73
950	1,45	1,34
1600	1,285	1,175

STEP 1	1,467
STEP2	8,41

### COD (mg/l)

Distance	MOYEN	GAUCHE
Amont	3	2,3
20	2,6	3
200	2,3	2,9
500	3,1	3,1
950	2,7	2,3
1600	2,4	2,2

STEP 1	24,9
STEP2	20,7

JUILLET 1995

Numération bactérienne  
(Nombre de cellules/ml)

Distance		GAUCHE
AMONT	-100	2016300
L1	40	4201800
L2	100	3807000
L3	200	3384000
L4	325	4963200
L5	500	3214800
L6	700	2848200
L7	950	2904600
L8	1200	1790700
L9	1400	2763600
L10	1600	2107950

step1	50901000
step2	36801000

Concentrations en Nitrates (mg/l)

Distance		GAUCHE
AMONT		18
L1		22
L2		20
L3		20
L4		19
L5		18
L6		19
L7		18
L8		18
L9		19
L10		18

step1	80
step2	55

Volumes Cellulaires Moyens ( $\mu\text{m}^3$ )

Distance		GAUCHE
AMONT	-100	0,0725
L1	40	0,197
L2	100	0,199
L3	200	0,1985
L4	325	0,208
L5	500	0,177
L6	700	0,135
L7	950	0,126
L8	1200	0,093
L9	1400	0,114
L10	1600	0,11

step1	0,193
step2	0,255

Concentrations en Nitrites (mg/l)

Distance		GAUCHE
AMONT		0,16
L1		0,88
L2		0,48
L3		0,36
L4		0,39
L5		0,28
L6		0,24
L7		0,21
L8		0,2
L9		0,19
L10		0,19

step1	5,45
step2	4

Cellules actives (% INT)

Distance		GAUCHE
AMONT	-100	8,4
L1	40	20,4
L2	100	14,8
L3	200	12,1
L4	325	11,5
L5	500	11
L6	700	13,9
L7	950	11,2
L8	1200	5,5
L9	1400	6,1
L10	1600	4,1

step1	21
step2	24,5

Concentrations en Ammonium (mg/l)

Distance		GAUCHE
AMONT		0,1
L1		2,65
L2		1,45
L3		1,05
L4		0,81
L5		0,43
L6		0,32
L7		0,21
L8		0,19
L9		0,14
L10		0,16

step1	26,4
step2	31

## JUILLET 1995

### Classes de taille des cellules (Nombre de cellules/classe)

Distance	<0,08 µm <sup>3</sup>	0,08-0,2	>0,2 µm <sup>3</sup>
Amont	186	90	10
40	200	232	164
100	140	246	154
200	142	180	158
325	204	300	200
500	134	200	122
700	138	200	66
950	162	194	56
1200	148	88	18
1400	136	220	36
1600	125	143	31

### COP (mg/l)

Distance	GAUCHE
AMONT	0,485
40	1,225
100	0,725
200	0,72
325	0,615
500	0,55
700	0,445
950	0,435
1200	0,41
1400	0,43
1600	0,35

step1	14,11
step2	7,94

### N organique (mg/l)

Distance	GAUCHE
AMONT	0,71
40	1,55
100	0,69
325	0,3
700	0,51
1200	0,48
1600	0,55

### COD (mg/l)

Distance	GAUCHE
AMONT	2,2
40	3,3
100	2,6
200	2,4
325	2,5
500	2,5
700	2,2
950	1,6
1200	1,8
1400	1,3
1600	2,3

step1	24
step2	21,6

## Septembre 1995

### Numération bactérienne (Nombre de cellules/ml)

Distance	GAUCHE	
AMONT	-100	2093850
L1	40	6091200
L2	100	6091200
L3	200	5160600
L4	325	3933900
L5	500	2693100
L6	700	3764700
L7	950	1974000
L8	1200	2115000
L9	1400	1945800
L10	1600	2023350

step1	31302000
step2	21784500

### Classes de taille des cellules (Nombre de cellules/classe)

Distance	<0,08 $\mu\text{m}^3$	0,08-0,2	>0,2 $\mu\text{m}^3$
Amont	91,5	120,5	85
40	209	169	485
100	204	192	468
200	220	190	322
325	194	198	166
500	156	144	82
700	206	224	104
950	82	120	78
1200	70	133	97
1400	91	131	54
1600	98	139	50

### Volumes Cellulaires Moyens ( $\mu\text{m}^3$ )

Distance	GAUCHE	
AMONT	-100	0,161
L1	40	0,326
L2	100	0,29
L3	200	0,235
L4	325	0,152
L5	500	0,15
L6	700	0,132
L7	950	0,157
L8	1200	0,162
L9	1400	0,137
L10	1600	0,131

step1	0,289
step2	0,343

### Cellules actives (% INT)

Distance	GAUCHE	
AMONT	-100	10,5
L1	40	13
L2	100	14,1
L3	200	8,7
L4	325	8,6
L5	500	10
L6	700	10,9
L7	950	9,3
L8	1200	4,7
L9	1400	6,9
L10	1600	5,2

step1	17
step2	14,9

Concentrations en Nitrates (mg/l)

Distance GAUCHE	
AMONT	13
L1	18
L2	18
L3	17
L4	15
L5	15
L6	14
L7	13
L8	14
L9	13
L10	14

step1	54
step2	55

Concentrations en Ammonium (mg/l)

Distance GAUCHE	
AMONT	0,05
L1	2,8
L2	2,05
L3	1,45
L4	0,88
L5	0,32
L6	0,24
L7	0,14
L8	0,12
L9	0,13
L10	0,18

step1	26,2
step2	23,2

Concentrations en Nitrites (mg/l)

Distance GAUCHE	
AMONT	0,17
L1	0,65
L2	0,54
L3	0,58
L4	0,45
L5	0,38
L6	0,34
L7	0,26
L8	0,26
L9	0,27
L10	0,3

step1	3,1
step2	3,6

## Rejets sur le secteur d'étude de la Charente

Numéro	Section (en mm)	Ecoulement	Débit	Localisation	Origine	Remarques/ Pollution
En RD, Nombreux rejets de divers diamètres (50-100 mm) amenant des eaux en provenance des champs						
C50	300	non	0	RD, les Picards	EP	-
C51	1200	non	0	RG, amont STEP Frégeneuil	EP	tuyau au 4/5 sous l'eau, légères traces d'hydrocarbures
C52	500	oui	intermittent fort à très fort	RG, au droit STEP	rejet principal STEP	Panache visible jusqu'au milieu de la Charente et sur 200 m en aval. Présence de mousse, odeur MO, MES
C53	400	oui	fort	id	Rejet principal STEP	id. (mais moins important)-
C54	400	oui	filet	id	Pluvial STEP	-
C55	300	non	0	id	by-pass STEP	possible
C56	300	non	0	RD, les Picards	?	?
C57	fossé	colmaté	0	RD, Claire Fontaine	ruissellement Pt N10	plus utilisé ?
C58	fossé	non	0	RD, amont Pt RN10	id	id
C59	fossé	non	très faible	RD, amont Pt RN10	surverse fossé principal (aval N10)	-
C60	600	non	0	RD, aval Pt N10	EP	-
C61	fossé	oui	courant faible	RD, aval Pt N10	collecte divers pluviaux (un 300 et un 1000) cf. plan	passé en ovoïde de 4000 sous la N10 poissons dans le fossé
C62	fossé	oui	faible	RD, base Jet-ski	collecte divers pluviaux	-
C63	500	oui	filet	RD, au niveau serres	EP	eaux chargées en MES
Entrée du canal SNPE						
C64	600	non	0	RD, rue de l'écluse	EP	dépôts sur le tuyau

---

# normalisation française

---

T 90-045

Juin 1989

ISO 7890-3

Essais des eaux

## Dosage des nitrates

Méthode spectrométrique avec l'acide sulfosalicylique

E: Testing water — Determination of nitrate — Spectrometric method using sulfosalicylic acid

D: Wasserbeschaffenheit — Bestimmung von Nitrat — Spectrometrisches Verfahren mit Sulfosalizylsäure

---

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

---

### correspondance

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

---

### analyse

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

### descripteurs

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

---

### modifications

### corrections

---

# Qualité de l'eau — Dosage des nitrates —

## Partie 3 :

### Méthode spectrométrique avec l'acide sulfosalicylique

#### 1 Domaine d'application

##### 1.1 Substance dosée

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

##### 1.2 Type d'échantillon

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

##### 1.3 Étendue du dosage

Jusqu'à une concentration maximale en azote due aux nitrates,  $\rho_N = 0,2$  mg/l, en utilisant une prise d'essai maximale de 25 ml. La gamme peut être étendue vers le haut par des prises d'essai inférieures.

##### 1.4 Limite de détection<sup>1)</sup>

Avec des cuves de 40 mm d'épaisseur et une prise d'essai de 25 ml, la limite de détection est comprise dans la gamme  $\rho_N = 0,003$  à  $0,013$  mg/l.

##### 1.5 Sensibilité<sup>1)</sup>

Une concentration en azote due aux nitrates,  $\rho_N = 0,2$  mg/l, fournit une absorbance d'environ 0,68 unité, en utilisant une prise d'essai de 25 ml dans des cuves de 40 mm d'épaisseur.

#### 1.6 Interférences

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

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

#### 2 Principe

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

En même temps que l'alcali, on ajoute du sel disodique de l'acide éthylènediamine-tétraacétique ( $\text{Na}_2\text{EDTA}$ ) pour empêcher la précipitation des sels de calcium et de magnésium. L'adjonction d'azoture de sodium vise enfin à neutraliser l'interférence des nitrites.

#### 3 Réactifs

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

1) Résultats d'un essai interlaboratoire effectué au Royaume-Uni et qui rassemblait quatre participants. La limite de détection a été prise égale à 4,65 fois l'écart-type du blanc au sein d'un lot.

1 Acide sulfurique,  $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 18 \text{ mol/l}$ ,  $\rho = 1,84 \text{ g/ml}$ .

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

2 Acide acétique cristallisable,  
( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ) =  $17 \text{ mol/l}$ ,  $\rho = 1,05 \text{ g/ml}$ .

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

3 Alcali, solution,  $\rho_{\text{NaOH}} = 200 \text{ g/l}$ ,  
( $[\text{CH}_2\text{-N}(\text{CH}_2\text{COOH})\text{CH}_2\text{-COONa}]_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) =  $50 \text{ g/l}$ .

Dissoudre avec précaution  $200 \pm 2 \text{ g}$  de pastilles d'hydroxyde de sodium dans environ  $800 \text{ ml}$  d'eau. Ajouter  $30 \text{ g} \pm 0,5 \text{ g}$  de sel disodique de l'acide éthylènediamine-tétraacétique ( $\text{Na}_2\text{EDTA}$ ) dihydraté ( $[\text{CH}_2\text{-N}(\text{CH}_2\text{COOH})\text{CH}_2\text{-COONa}]_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) et dissoudre. Laisser refroidir à la température ambiante et compléter à 1 litre avec de l'eau dans une éprouvette graduée. Conserver dans une bouteille en polyéthylène. Ce réactif est stable indéfiniment.

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

4 Azoture de sodium, solution,  $\rho_{\text{NaN}_3} = 0,5 \text{ g/l}$ .

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

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

NOTE — Une solution d'acide sulfamique,  $\rho_{\text{NH}_2\text{-SO}_3\text{H}} = 0,75 \text{ g/l}$ , peut être également utilisée à la place de la solution d'azoture de sodium.

5 Salicylate de sodium, solution,  
 $\rho_{\text{HO-C}_6\text{H}_4\text{-COONa}} = 10 \text{ g/l}$ .

Dissoudre  $1 \text{ g} \pm 0,1 \text{ g}$  de salicylate de sodium ( $\text{HO-C}_6\text{H}_4\text{-COONa}$ ) dans  $100 \text{ ml} \pm 1 \text{ ml}$  d'eau. Conserver dans une bouteille en verre ou en polyéthylène. Préparer cette solution chaque jour au moment de l'emploi.

6 Nitrate, solution mère étalon,  $\rho_{\text{N}} = 1\,000 \text{ mg/l}$ .

Dissoudre  $7,215 \text{ g} \pm 0,001 \text{ g}$  de nitrate de potassium ( $\text{KNO}_3$ ), (préalablement séché à  $105 \text{ }^\circ\text{C}$  pendant au moins  $2 \text{ h}$ ) dans environ  $750 \text{ ml}$  d'eau. Transférer quantitativement dans une fiole jaugée de 1 litre et compléter au volume avec de l'eau.

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

3.7 Nitrate, solution étalon,  $\rho_{\text{N}} = 100 \text{ mg/l}$ .

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

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

3.8 Nitrate, solution étalon d'essai,  $\rho_{\text{N}} = 1 \text{ mg/l}$ .

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

## 4 Appareillage

Matériel courant de laboratoire, et

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

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

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

4.4 Bain d'eau, thermoréglable, pouvant maintenir une température de  $25 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$ .

## 5 Échantillonnage et échantillons

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

## 6 Mode opératoire

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

### 6.1 Prise d'essai

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

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

**6.2 Essai à blanc**

Effectuer un essai à blanc, parallèlement au dosage, en utilisant 5,00 ml ± 0,05 ml d'eau à la place de la prise d'essai. Soit  $A_b$  unités l'absorbance mesurée.

**6.3 Étalonnage**

**6.3.1 Préparation de la série de solutions étalons**

Dans une série de capsules d'évaporation propres (4.2), introduire à la burette, respectivement, 1; 2; 3; 4 et 5 ml de la solution étalon d'essai de nitrate (3.8) correspondant respectivement à des quantités de nitrate de  $m(N) = 1; 2; 3; 4$  et  $5 \mu\text{g}$  dans les capsules respectives.

**6.3.2 Développement de la coloration**

Ajouter 0,5 ml ± 0,005 ml de solution d'azoture de sodium (3.4) et 0,2 ml ± 0,002 ml d'acide acétique (3.2). Attendre au moins 5 min, puis faire évaporer le mélange à sec dans le bain d'eau bouillante (4.3). Ajouter ensuite 1 ml ± 0,01 ml de solution de salicylate de sodium (3.5), homogénéiser et faire à nouveau évaporer à sec. Retirer la capsule du bain d'eau et laisser refroidir à la température ambiante.

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

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

**6.3.3 Mesurages spectrométriques**

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

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

**6.3.4 Établissement de la courbe d'étalonnage**

Soustraire l'absorbance de l'essai à blanc des absorbances de chaque solution étalon et tracer la courbe d'étalonnage faisant apparaître l'absorbance en fonction de la masse de nitrate,  $m(N)$ , en microgrammes. Contrôler si la courbe est linéaire et passe par l'origine. Dans le cas contraire, répéter l'étalonnage.

**6.4 Dosage**

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

Poursuivre comme indiqué en 6.3.2 et 6.3.3.

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

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

**7 Expression des résultats**

**7.1 Calcul**

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

$$A_r = A_s - A_b$$

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

$$A_r = A_s - A_b - A_t$$

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

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

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

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

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

Tableau 1 — Tableau de conversion

Nitrate	$c(\text{NO}_3)$	$\rho_{\text{NO}_3}$	$\rho_N$
	mmol/l	mg/l	mg/l
$c(\text{NO}_3) = 1 \text{ mmol/l}$	1	62	14,01
$\rho_{\text{NO}_3} = 1 \text{ mg/l}$	0,016 1	1	0,226
$\rho_N = 1 \text{ mg/l}$	0,071 4	4,427	1

Exemple :

$\rho_{\text{NO}_3} = 1 \text{ mg/l}$  correspond à  $\rho_N = 0,226 \text{ mg/l}$ .

## 7.2 Répétabilité et reproductibilité<sup>1)</sup>

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

## 3 Procès-verbal d'essai

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

- a) la référence à la présente partie de l'ISO 7890;
- b) l'identification précise de l'échantillon;

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

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

e) le résultat obtenu, exprimé sous forme  $\rho_{\text{N}}$ , en milligrammes par litre, ou sous forme  $\rho_{\text{NO}_3}$ , en milligrammes par litre ou  $c(\text{NO}_3)$ , en millimoles par litre;

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

Tableau 2 — Écarts-types de répétabilité et reproductibilité

Échantillon	Teneur en nitrates $\rho_{\text{N}}$	Volume de la prise d'essai	Écart-type <sup>*)</sup> Répétabilité	$\rho_{\text{N}}$ Reproductibilité
	mg/l		ml	mg/l
Solution étalon (solution à blanc)	0,00	25	0,001 à 0,005	—
Solution étalon	0,20	25	0,003 à 0,011	0,005 à 0,011
Eau de rivière	4,40	1,0	0,07 à 0,22	0,07 à 0,48
Eau de rivière	9,18	0,5	0,13 à 0,54	0,16 à 0,98
Eau de rivière	10,0	0,5	0,06 à 0,09	0,06 à 0,12

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

## Annexe A (normative)

### Effets des autres substances sur la méthode<sup>1)</sup>

Autres substance (exprimée en terme de la substance entre parenthèses)	Quantité de l'autre substance dans une prise d'essai de 25 ml	Effet en µgN de l'autre substance dans une prise d'essai de 25 ml	
	µg	$m(N) = 0,00 \mu\text{g}$	$m(N) = 5,00 \mu\text{g}$
Chlorure de sodium (Cl <sup>-</sup> )	10 000	+ 0,03	- 0,73
Chlorure de sodium (Cl <sup>-</sup> )	2 000	+ 0,01	- 0,16
Hydrogène-carbonate de sodium (HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )	10 000	- 0,02	- 0,52
Hydrogène-carbonate de sodium (HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )	2 000	- 0,03	- 0,18
Sulfate de sodium (SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> )	10 000	+ 0,04	+ 0,16
Orthophosphate de sodium (PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> )	1 000	+ 0,30	- 0,73
Orthophosphate de sodium (PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> )	100	+ 0,11	+ 0,17
Silicate de sodium (SiO <sub>2</sub> )	250	+ 0,15	+ 0,30
Chlorure de calcium (Ca)	5 000	+ 0,23	+ 0,38
Chlorure de calcium (Ca)	2 500	+ 0,02	+ 0,14
Acétate de magnésium (Mg)	5 000	+ 0,14	+ 0,29
Acétate de magnésium (Mg)	2 500	- 0,05	+ 0,12
Sulfate de fer(III) (Fe)	20	+ 0,08	+ 0,02
Sulfate de manganèse(III) (Mn)	20	+ 0,92	+ 0,99
Sulfate de manganèse(III) (Mn)	5	+ 0,05	+ 0,13
Sulfate de zinc (Zn)	20	- 0,02	+ 0,07
Sulfate de cuivre (Cu)	20	+ 0,03	+ 0,19
Acétate de plomb	20	+ 0,02	+ 0,07
Sulfate d'aluminium (Al)	20	0,00	- 0,02
Fluorure de potassium (F <sup>-</sup> )	20	- 0,07	- 0,06
Chlorure d'ammonium (NH <sub>3</sub> exprimé en N)	500	- 0,12	- 0,17
Cyanure de potassium	20	+ 0,15	+ 0,01
Urée [CO (NH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> ]	50	+ 0,04	+ 0,13

Si l'autre substance n'interférait pas, les effets escomptés seraient (95 %) :

± 0,16 à  $m(N) = 0,00 \mu\text{g}$

± 0,20 à  $m(N) = 5,00 \mu\text{g}$

1) Indications fournies par le Royaume-Uni.

Édité par l'ASSOCIATION FRANÇAISE DE NORMALISATION (AFNOR) - Tour EUROPE CEDEX 7 92080 PARIS LA DÉFENSE - Tél. : (1) 788-11-11

NORME FRANÇAISE  
HOMOLOGUÉE

ESSAIS DES EAUX  
DOSAGE DES NITRITES

NF  
**T 90-013**

Août 1975

### 1. OBJET ET DOMAINE D'APPLICATION

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

Elle est applicable aux eaux dont la teneur en nitrites, exprimée en  $\text{NO}_2$ , est supérieure à  $1 \mu\text{g/l}$ .

### 2. PRINCIPE

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

Mesure spectrophotométrique à une longueur d'onde voisine de  $537 \text{ nm}$  de la coloration du complexe rose formé.

### 3. RÉACTIFS

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

#### 3.1 Réactif de diazotation :

A  $800 \text{ ml}$  d'eau, ajouter  $100 \text{ ml}$  d'acide orthophosphorique concentré, puis  $40 \text{ g}$  de sulfanilamide ( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_2\text{N}_2\text{S}$ ). Laisser dissoudre, puis ajouter  $2 \text{ g}$  de dichlorure de N-(1-naphtyl)éthylène-diamine ( $\text{C}_{10}\text{H}_7\text{NHCH}_2\text{CH}_2 \cdot 2 \text{ HCl}$ ).

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

#### 3.2 Solution étalon de nitrite à $1 \text{ mg}$ de $\text{NO}_2$ par litre :

Peser, à  $0,1 \text{ mg}$  près,  $150 \text{ mg}$  de nitrite de sodium, les dissoudre dans de l'eau et ajuster à  $1\ 000 \text{ ml}$  en fiole jaugée. La solution mère ainsi obtenue est une solution à  $100 \text{ mg}$  de  $\text{NO}_2$  par litre.

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

### 4. APPAREILLAGE

Matériel courant de laboratoire,

Spectrophotomètre (longueur d'onde  $537 \text{ nm}$ ).

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

### 5. ÉCHANTILLON

Les échantillons destinés au laboratoire d'analyse doivent aussitôt que possible après leur prélèvement être refroidis à une température voisine de  $5 \text{ }^\circ\text{C}$ . L'analyse doit être effectuée aussitôt que possible après le prélèvement.

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

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

## 6. MODE OPÉRATOIRE

### 6.1 PRISE D'ESSAI

Si l'échantillon contient moins de 1 mg de  $\text{NO}_2$  par litre, introduire 50 ml de l'échantillon de laboratoire dans une fiole jaugée de 50 ml. Si l'échantillon contient plus de 1 mg de  $\text{NO}_2$  par litre, diminuer la prise d'essai et ajuster à 50 ml avec de l'eau distillée.

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

Introduire dans des fioles jaugées de 50 ml, respectivement :

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

correspondant à :

0 - 1 - 2 - 5 - 10 - 20 - 30 - 40 - 50  $\mu\text{g}$  de  $\text{NO}_2$

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

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

### 6.3 DOSAGE

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

## 7. EXPRESSION DES RÉSULTATS

Déduire de la courbe d'étalonnage la teneur en nitrites de l'échantillon et l'exprimer en milligrammes de  $\text{NO}_2$  par litre.

## 8. PROCÈS-VERBAL D'ESSAI

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

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

Édité par l'ASSOCIATION FRANÇAISE DE NORMALISATION (AFNOR) - Tour EUROPE - CEDEX 7 - 92080 PARIS LA DÉFENSE - Tél. : (1) 788-11-11

NORME FRANÇAISE  
HOMOLOGUÉE

ESSAIS DES EAUX  
DOSAGE DE L'AZOTE AMMONIACAL

NF  
T 90-015

Avût 1975

### AVANT-PROPOS

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

### 2<sup>ème</sup> PARTIE :

## MÉTHODE SPECTROPHOTOMÉTRIQUE AU BLEU D'INDOPHÉNOL

### 1. OBJET ET DOMAINE D'APPLICATION

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

Elle est applicable aux teneurs en azote ammoniacal, exprimées en  $\text{NH}_4$ , supérieures à 2  $\mu\text{g/l}$ .

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

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

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

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

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

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

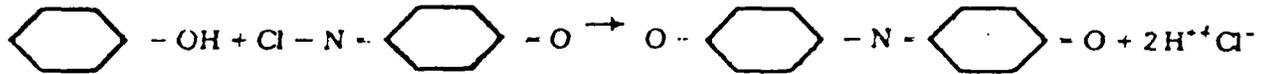
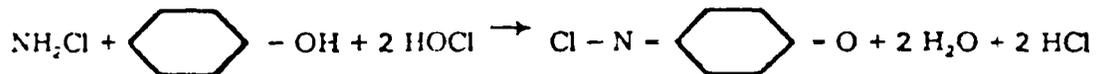
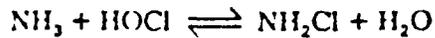
J. BRARD - 60110 Méru

NF T 90-015 1<sup>er</sup> TIRAGE 75-08

Testing water - Determination of nitrogen (ammonia)  
Wasseruntersuchung - Bestimmung des Ammoniakstickstoffes

## 2. PRINCIPE

Formation, en milieu alcalin ( $10,4 < \text{pH} < 11,5$ ) d'un composé type indophénol par réaction des ions ammonium avec du phénol et de l'hypochlorite, en présence de nitroprussiate comme catalyseur.



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

## 3. RÉACTIFS

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

### 3.1 Solution alcaline, complexante et chlorée

Dissoudre dans environ 800 ml d'eau, 20 g d'hydroxyde de sodium en pastilles et 380 g de citrate trisodique ( $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ ). Porter à ébullition et maintenir une ébullition douce pendant 20 min.

Refroidir, ajouter 4 g d'acide dichlorocyanurique ( $\text{C}_3\text{HCl}_2\text{N}_3\text{O}_3$ ) et amener le volume à 1 000 ml. Conserver cette solution à une température de 4 °C environ.

### 3.2 Solution de phénol et de nitroprussiate

Dissoudre dans de l'eau 35 g de phénol et 0,4 g de nitroprussiate de sodium  $\text{Na}_2 [\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}] \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ , et amener le volume à 1 000 ml.

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

### 3.3 Azote ammoniacal, solutions étalons

#### 3.3.1 Solution mère à 100 mg de $\text{NH}_4$ par litre.

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

#### 3.3.2 Solution étalon à 1 mg de $\text{NH}_4$ par litre. Diluer au moment de l'emploi au dixième la solution 3.3.1

#### 3.3.3 Solution étalon à 0,2 mg de $\text{NH}_4$ par litre. Diluer au moment de l'emploi au dixième la solution 3.3.

## 4. APPAREILLAGE

**Matériel courant de laboratoire.**

**Spectrophotomètre** (longueur d'onde : 630 nm).

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

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

## 5. ÉCHANTILLON

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

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

## 6. MODE OPÉRATOIRE

### 6.1 PRISE D'ESSAI

Si la teneur de l'échantillon en  $\text{NH}_4$  est inférieure à 1 mg/L, prélever une prise d'essai de 20 ml.

Si la teneur de l'échantillon en  $\text{NH}_4$  est supérieure à 1 mg/L, prélever un volume plus petit et ajuster à 20 ml avec de l'eau.

## 5.2 COURBE D'ÉTALONNAGES

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

GAMME I POUR MESURES EN CUVES DE 50 mm		GAMME II POUR MESURES EN CUVES DE 10 mm	
Volume de solution 3.3.3 ml 0,2 <sup>3</sup> / <sub>10</sub>	correspondant à une teneur de : mg NH <sub>4</sub> N	Volume de solution 3.3.3 ml 2 <sup>2</sup> / <sub>10</sub>	correspondant à une teneur de : mg NH <sub>4</sub> N
1	0,01	1	0,1
2	0,02	2	0,2
5	0,05	4	0,4
10	0,10	6	0,6
15	0,15	8	0,8
20	0,20	10	1,0

Compléter au volume avec de l'eau et homogénéiser.

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

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

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

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

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

## 3. DOSAGE

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

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

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

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

## 4. ESSAI TÉMOIN

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

## 7. EXPRESSION DES RÉSULTATS

Déduire de la courbe d'étalonnage la teneur en azote ammoniacal de l'échantillon et l'exprimer en milligrammes de NH<sub>4</sub> par litre.

# Qualité de l'eau — Dosage de l'azote Kjeldahl — Méthode après minéralisation au sélénium

## 1 Objet et domaine d'application

### 1.1 Substance dosée

La présente Norme internationale spécifie une méthode de dosage de l'azote par une méthode de type Kjeldahl. Seul l'azote à l'état trivalent négatif est dosé. L'azote organique du type azide, azine, azoïque, hydrazone, nitrite, nitré, nitrosé, oxime ou semicarbazone n'est pas dosé quantitativement. L'azote des composés hétérocycles peut être incomplètement récupéré.

### 1.2 Type d'échantillon

La présente méthode est applicable aux eaux brutes, aux eaux potables et aux eaux résiduaires.

### 1.3 Étendue du dosage

Une teneur en azote Kjeldahl,  $\rho_N$  jusqu'à 10 mg dans la prise d'essai peut être déterminée. Avec une prise d'essai de 10 ml, cela correspond à une concentration d'azote dans l'échantillon de  $\rho_N = 1\ 000$  mg/l.

### 1.4 Limite de détection

La limite de détection, déterminée expérimentalement (4 degrés de liberté), avec une prise d'essai de 100 ml est  $\rho_N = 1$  mg/l.

### 1.5 Sensibilité

Avec une prise d'essai de 100 ml, 1,0 ml d'acide chlorhydrique à 0,02 mol/l correspond à  $\rho_N = 2,8$  mg/l.

## 2 Référence

ISO 7150/1, *Qualité de l'eau — Dosage de l'ammonium — Partie 1: Méthode spectrométrique manuelle.*

## 3 Définition

Dans le cadre de la présente Norme internationale, la définition suivante est applicable.

**azote Kjeldahl:** Azote organique et ammoniacal contenu dans l'échantillon et déterminé après minéralisation.

Il n'inclut pas les nitrates et les nitrites, ni nécessairement tout l'azote organique.

## 4 Principe

Minéralisation de l'échantillon pour former du sulfate d'ammonium, libération et distillation de l'ammoniac puis dosage par titrimétrie.

Transformation des composés de l'azote dosables par la méthode en sulfate d'ammonium par minéralisation de l'échantillon avec de l'acide sulfurique contenant une concentration élevée de sulfate de potassium destiné à élever le point d'ébullition du mélange, et en présence de sélénium comme catalyseur.<sup>1)</sup>

Libération de l'ammoniac du sulfate d'ammonium par ajout d'une base, puis distillation dans une solution d'acide borique indicateur.

Dosage de l'ion ammonium du distillat par titrimétrie avec de l'acide titré.

Selon une variante, dosage direct de l'ion ammonium dans le minéralisat, par spectrométrie à 655 nm. (Voir chapitre 11.)

## 5 Réactifs

Au cours de l'analyse, utiliser uniquement des réactifs de qualité analytique reconnue, et de l'eau préparée comme indiqué en 5.1.

1) Le sélénium a été choisi comme catalyseur de préférence au mercure en raison des inquiétudes de nombreux pays vis-à-vis de la toxicité du mercure. Cependant, la toxicité du sélénium ne doit pas être négligée. Voir 11.2 pour le mode opératoire proposé pour éliminer le sélénium des résidus de minéralisation.

5.1 Eau, exempte d'ammonium, préparée par l'une des méthodes suivantes.

#### 5.1.1 Méthode par échange d'ions

Faire passer de l'eau distillée à travers une colonne de résine fortement échangeuse de cation (forme hydrogène) et recueillir l'éluat dans une bouteille en verre munie d'un bouchon à fermeture hermétique. Pour la conservation, ajouter environ 10 g de la même résine à chaque litre d'éluat recueilli.

#### 5.1.2 Méthode par distillation

Ajouter  $0,10 \pm 0,01$  ml d'acide sulfurique concentré (5.3) à  $1\ 000 \pm 10$  ml d'eau distillée et redistiller dans un appareil en verre. Après avoir éliminé les premiers 50 ml, recueillir le distillat dans une bouteille en verre munie d'un bouchon à fermeture hermétique. Ajouter environ 10 g de résine fortement échangeuse de cation (forme hydrogène) à chaque litre de distillat recueilli.

5.2 Acide chlorhydrique,  $\rho = 1,18$  g/ml.

5.3 Acide sulfurique,  $\rho = 1,84$  g/ml.

**AVERTISSEMENT** — Ce réactif provoque de graves brûlures.

De l'acide sulfurique de la plus grande pureté doit toujours être utilisé. Attacher une attention particulière aux spécifications du fabricant en ce qui concerne la teneur en azote.

5.4 Hydroxyde de sodium, solution à environ 500 g/l.

**AVERTISSEMENT** — Ce réactif provoque de graves brûlures.

Dissoudre  $500 \pm 20$  g d'hydroxyde de sodium dans environ 300 ml d'eau. Refroidir à température ambiante et diluer à 1 litre avec de l'eau dans une éprouvette graduée.

5.5 Acide chlorhydrique, solution titrée,  $(\text{HCl}) \approx 0,10$  mol/l.

Cette solution doit être préparée par dilution de l'acide chlorhydrique (5.2), puis titrée par les méthodes habituelles. Des solutions du commerce, dont la concentration est garantie, peuvent être également utilisées.

5.6 Acide chlorhydrique, solution titrée,  $(\text{HCl}) \approx 0,02$  mol/l.

Cette solution doit être préparée par dilution de l'acide chlorhydrique (5.2 ou 5.5) puis titrée par les méthodes habituelles. Des solutions du commerce, dont la concentration est garantie peuvent être également utilisées.

5.7 Acide borique indicateur, solution.

5.7.1 Dissoudre  $0,5 \pm 0,1$  g de rouge de méthyle dans environ 800 ml d'eau et diluer à 1 litre avec de l'eau dans une éprouvette graduée.

5.7.2 Bleu de méthylène, solution à 1,5 g/l.

Dissoudre  $1,5 \pm 0,1$  g de bleu de méthylène dans environ 800 ml d'eau et diluer à 1 litre avec de l'eau dans une éprouvette graduée.

5.7.3 Solution d'indicateur à l'acide borique.

Dissoudre  $20 \pm 1$  g d'acide borique ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ ) dans de l'eau chaude. Amener à température ambiante. Ajouter  $10,0 \pm 0,5$  ml de la solution d'indicateur au rouge de méthyle (5.7.1) et  $2,0 \pm 0,1$  ml de la solution de bleu de méthylène (5.7.2) et diluer à 1 litre avec de l'eau dans une éprouvette graduée.

5.8 Mélange catalyseur.

**AVERTISSEMENT** — Ce mélange est toxique. Il contient du sélénium. L'inhalation de poussières résultant de sa préparation ou de son emploi doit être évitée. Tous les résidus contenant du sélénium doivent être recueillis en vue de la récupération du sélénium (11.2) ou de dispositions de contrôle.

Mélanger soigneusement  $1\ 000 \pm 20$  g de sulfate de potassium et  $10,0 \pm 0,2$  g de sélénium en pastilles.

5.9 Régulateurs d'ébullition.

## 6 Appareillage

Matériel courant de laboratoire, et

6.1 Fioles de minéralisation Kjeldahl, spécialement adaptées, de capacité suffisante pour recevoir les prises d'essai utilisées au cours de l'analyse, et de toute façon, n'excédant pas 500 ml.

Elles devront être de préférence conçues pour pouvoir être directement rattachées à l'appareil de distillation (6.2).

6.2 Appareil de distillation, composé d'une tête de distillation anti-projections et d'un réfrigérant vertical, dont une extrémité peut être immergée dans la solution absorbante.

Si les fioles Kjeldahl (6.1) ne sont pas conçues pour être rattachées directement à l'appareil de distillation, des ballons de distillation séparés sont nécessaires.

**NOTE SUR LE NETTOYAGE PRÉLIMINAIRE DE L'APPAREIL DE DISTILLATION**

Effectuer l'opération suivante chaque fois que l'appareillage a été inutilisé plusieurs jours.

Introduire environ 350 ml d'eau (5.1) dans le ballon à distiller. Ajouter quelques régulateurs d'ébullition (5.11), assembler l'appareillage et distiller au moins 100 ml. Éliminer le distillat et le résidu du ballon à distiller.

## 7 Échantillonnage et échantillons

Les échantillons pour laboratoire doivent être prélevés dans des bouteilles en polyéthylène ou en verre. Ils doivent être analysés dès que possible, ou conservés entre 2 et 5 °C jusqu'à l'analyse. Une acidification avec de l'acide sulfurique (5.3) à  $\text{pH} < 2$  peut également être effectuée pour faciliter la conservation, sous réserve d'éviter toute contamination de l'échantillon acidifié par absorption de l'ammoniac de l'atmosphère.

## 8 Mode opératoire

### 8.1 Prise d'essai

Lorsque la concentration approximative en azote de l'échantillon est connue, le volume de la prise d'essai peut être choisi d'après le tableau 1.

Tableau 1 — Choix du volume de prise d'essai

Concentration en azote Kjeldahl, $\rho_N$	Volume de prise d'essai*, $V$
mg/l	ml
Jusqu'à 10	250
10 à 20	100
20 à 50	50
50 à 100	25

\* Lorsqu'une solution titrée d'acide chlorhydrique à 0,02 mol/l (5.6) est utilisée pour le titrage.

### 8.2 Essai à blanc

Procéder comme décrit en 8.3, mais en utilisant environ 250 ml d'eau (5.1) au lieu de la prise d'essai. Noter le volume d'acide chlorhydrique (5.6) utilisé.

### 8.3 Dosage

**ATTENTION** — La minéralisation peut libérer du dioxyde de soufre gazeux toxique. Du sulfure d'hydrogène et/ou du cyanure d'hydrogène peut également être libéré par des échantillons pollués. La minéralisation devrait donc être effectuée sous une hotte aspirante efficace.

Introduire la prise d'essai (8.1) dans la fiole Kjeldahl (6.1) et ajouter avec une éprouvette graduée 10 ml d'acide sulfurique (5.3) et  $5,0 \pm 0,5$  g du mélange catalyseur (5.8). Ajouter quelques régulateurs d'ébullition (5.9) et faire bouillir rapidement le contenu du ballon, sous une hotte aspirante. Le volume du contenu décroît au cours de l'ébullition jusqu'à apparition de fumées blanches.

Après disparition des fumées, observer régulièrement le minéralisat et lorsqu'il s'éclaircit pour devenir incolore ou légèrement brun, poursuivre le chauffage pendant 60 min. (Voir note 1.)

Après la minéralisation, laisser la fiole refroidir à température ambiante. Pendant ce temps, prélever  $50 \pm 5$  ml d'indicateur (5.7) et les introduire dans le flacon récepteur de l'appareil de distillation (6.2). S'assurer que l'extrémité du réfrigérant est sous la surface de la solution d'acide borique.

Ajouter avec précaution  $250 \pm 50$  ml d'eau (5.1) dans la fiole de minéralisation en même temps que quelques régulateurs d'ébullition (5.9). Avec une éprouvette graduée, ajouter 50 ml de la solution d'hydroxyde de sodium (5.4) et connecter aussitôt la fiole à l'appareil de distillation. (Voir note 2.)

Chauffer le ballon à distiller de façon à collecter le distillat à un débit d'environ 10 ml/min. Arrêter la distillation lorsque 200 ml ont été recueillis. Titrer le distillat avec de la solution d'acide chlorhydrique (5.6), jusqu'au virage au rouge et noter le volume utilisé. (Voir note 3.)

### NOTES

1 Après évaporation totale de l'eau, la puissance de chauffe doit être suffisante pour refluer le mélange acide jusqu'à la moitié du col de la fiole. Cela indique que la température est suffisamment haute.

2 Lorsque la fiole est incompatible avec l'appareil de distillation, son contenu doit être transféré en totalité dans un ballon à distiller adéquat. Ceci peut être fait aisément au moment de l'ajout de l'eau.

3 La solution d'acide chlorhydrique (5.5) peut être également utilisée pour le titrage des distillats d'échantillons contenant de fortes concentrations d'azote.

## 9 Expression des résultats

### 9.1 Méthode de calcul

La concentration en azote Kjeldahl,  $\rho_N$ , exprimée en milligrammes par litre, est donnée par la formule

$$\frac{V_1 - V_2}{V_0} \times c \times 14,01 \times 1\,000$$

où

$V_0$  est le volume, en millilitres, de la prise d'essai (voir 8.1);

$V_1$  est le volume, en millilitres, de la solution titrée d'acide chlorhydrique (5.6) utilisé pour le titrage (voir 8.3);

$V_2$  est le volume, en millilitres, de la solution titrée d'acide chlorhydrique (5.6) utilisée pour le titrage du blanc (voir 8.2);

$c$  est la concentration exacte, en moles par litre, de la solution titrée d'acide chlorhydrique utilisée pour le titrage;

14,01 est la masse atomique relative de l'azote.

Le résultat peut être exprimé en concentration en masse d'azote,  $\rho_N$ , en milligrammes par litre, ou en concentration de substance azotée,  $c_N$ , en micromoles par litre.

Pour convertir  $\rho_N$  en  $c_N$ , multiplier  $\rho_N$  par 71,4.

### 9.2 Répétabilité

Des écarts-types de répétabilité ont été déterminés comme indiqué dans le tableau 2.

## 10 Interférences

La présence de nitrates et/ou de nitrites peut être la cause d'erreurs par défaut ou par excès. Les nitrates et/ou nitrites peuvent être réduits, dans les conditions de l'essai en ammonium, conduisant à des résultats faux par excès. Les nitrates et/ou nitrites peuvent également former des sels d'ammonium avec l'ammonium présent dans l'échantillon. Ces sels peuvent se décomposer à la température de minéralisation, ce qui con-

duit à la perte d'azote gazeux et par conséquent à des résultats faux par défaut. Si la concentration des nitrates et/ou des nitrites dans l'échantillon est la cause possible d'un biais ou d'une perte de précision, une réduction en ammonium doit précéder la minéralisation.

Des résultats faux par défaut peuvent également être obtenus si le processus de minéralisation est trop prolongé. Le mode opératoire donné au chapitre 8 doit être soigneusement observé.

## 1 Notes sur le mode opératoire

1.1 L'ion ammonium peut être dosé directement sur le minéralisat par spectrophotométrie. Le mode opératoire suivant doit être utilisé.

Après minéralisation et refroidissement de la fiole, ajouter  $50 \pm 0,5$  ml d'eau (5.1) puis 2 gouttes d'une solution aqueuse de trophénol-4 à 1 g/l. Ajouter alors, lentement, la solution hydroxyde de sodium (5.4) tout en agitant vigoureusement et en refroidissant la solution jusqu'à apparition d'une couleur rose pâle persistante. Ajouter quelques gouttes d'acide sulfurique (5.3) jusqu'à disparition de la coloration. Transférer quantitativement dans une fiole jaugée de 200 ml et compléter au volume avec de l'eau (5.1). Doser l'ammonium de cette solution en utilisant la méthode spectrométrique (voir ISO 7150). Les solutions d'étalonnage et l'essai à blanc doivent être préparés en suivant le mode opératoire décrit ci-dessus, car la forte concentration en sulfate de sodium de la solution minéralisée neutralisée affecte l'étalonnage de la méthode spectrométrique.

La concentration en ammonium,  $\rho_N$ , exprimée en milligrammes par litre, déterminée par spectrométrie doit être multipliée par le facteur  $200/V_0$ , où  $V_0$  est le volume de la prise d'essai en millilitres (8.1), pour obtenir la concentration d'azote Kjeldahl,  $\rho_N$ , en milligrammes par litre, de l'échantillon.

## 11.2 Proposition de procédé d'élimination du sélénium des résidus de minéralisation

Les résidus doivent être recueillis dans un récipient en verre muni d'une inscription «Toxique». Pour l'élimination du sélénium, le contenu du récipient doit être acidifié (pH 2). Une réduction de cette solution acide avec du chlorure d'étain(II) (ajouté sous forme solide) provoque la formation d'un précipité rouge de sélénium qui peut être filtré et récupéré de façon contrôlée.

## 12 Procès-verbal d'essai

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

- la référence de la présente Norme internationale;
- l'identification précise de l'échantillon;
- les détails sur la conservation de l'échantillon pour laboratoire avant l'analyse;
- la répétabilité obtenue par le laboratoire par application de la méthode;
- les résultats et le mode d'expression utilisé;
- toute modification du mode opératoire normalisé, ou tout autre incident susceptible d'avoir agi sur le résultat.

Tableau 2 — Écarts-types de répétabilité\*

Échantillon	Concentration en azote, $\rho_N$ mg/l	Volume de prise d'essai ml	Écart-type** mg/l	Degrés de liberté
Solution d'urée	2	500	0,027	19
Solution d'urée	50	100	0,31	19
Solution d'urée	150	100	2,69	19
Eau d'égout	79***	50	0,68	19
Effluent chimique	16***	200	0,19	15
Effluent chimique	62***	100	0,48	15

\* Données provenant de France.

\*\* De l'acide chlorhydrique à 0,1 mol/l a été utilisé pour tous les dosages, sauf pour la solution étalon  $\rho_N = 2$  mg/l pour laquelle l'acide chlorhydrique à 0,02 mol/l a été utilisé.

\*\*\* Valeurs moyennes des dosages.