

185229
193187

N040 - MIC-Q

micro
e
r

études et analyses bactériologiques en milieu naturel

**Quantification des microflores dénitrifiantes
associées aux eaux souterraines
d'un bassin versant agricole (Kerharo, Finistère)**

Première approche

septembre 1997

IFREMER Bibliothèque de BREST



0EL07262

contrat IFREMER n° 96 2 431409 DEL



N040

MIC-Q

Micromer SARL - Technopôle Brest Iroise - Site du Vernis - rue Charles Cadiou - 29200 BREST

SARL au capital de 50 000 F - SIRET 353989684 00017

Tél. 02 98 05 19 70 - Télécopie 02 98 05 47 67

FICHE DE PRESENTATION

à la commission de certification du service fait

Contrat n° : 96 2 43 14 09

Date de remise du rapport : 26 septembre 1997

Lieu de consultation du rapport : chez le chef de projet

Nom du Chef de projet : Michel MERCEYON

Mise en évidence de l'intérêt scientifique :

Dans le programme "Bassins Versants", la diminution des concentrations de nitrate dans les eaux profondes, situées dans l'exploitation atelier en baie de Douarnenez, a conduit à émettre l'hypothèse d'une dénitrification d'origine biologique. Il convenait de mettre en évidence les bactéries en jeu à ces niveaux et dans ceux superficiels.

Treize prélèvements ont été réalisés en mai 1997, sur différents ouvrages (drains, trous à tarière, piézomètres, forages). Dans le cas des forages, des fissures ont été isolées à l'aide d'obturateurs à différentes profondeurs afin d'obtenir des eaux de caractéristiques bien typées correspondant à chaque niveau. La mise en culture des échantillons a été effectuée dès la sortie du sol dans un laboratoire de terrain spécialement aménagé.

Ce travail a été réalisé en collaboration avec l'équipe d'hydrogéologie d'ISAMOR qui gère les ouvrages. La bactériologie des eaux profondes est un domaine très peu exploré jusqu'à présent.

Mise en évidence des résultats obtenus :

Les densités bactériennes observées ont été faibles (dénitrifiantes hétérotrophes et autotrophes, sulfatoréductrices). De plus, aucun gradient n'a pu être mis en évidence en fonction de la profondeur. Ces résultats sont surprenants et une réflexion méthodologique est entreprise.

Le temps de pompage avant chaque échantillonnage était-il suffisant pour avoir un échantillon représentatif du niveau observé ? Les faibles débits de pompage utilisés ont-ils été suffisants pour échantillonner (décrocher?) les bactéries recherchées, qui sont a priori adhérentes aux surfaces des schistes ? Le milieu de culture ordinaire qui a été employé convient-il à des bactéries d'un biotope aussi original ? Autant de questions que la nouveauté du sujet contraint de se poser avant de pouvoir répondre à la question initialement posée. Le travail, de très bonne qualité, doit être considéré comme une première approche. Il a permis de mieux appréhender la complexité du problème.

Visa du Chef de Projet

Sommaire

Introduction

Rappel sur les métabolismes bactériens

- 1- Notion d'autotrophie et d'hétérotrophie
- 2- La dénitrification
 - 2.1- La dénitrification hétérotrophe
 - 2.2- La dénitrification autotrophe
- 3- Les conditions de réalisation de la dénitrification
 - 3.1- Substrat carboné
 - 3.2- Oxygène dissous
 - 3.3- pH
- 4- Les types bactériens impliqués dans la dénitrification

Matériel et méthodes

- 1- Microflores bactériennes analysées
- 2- Origine des prélèvements
 - 2.1- Dénombrements sur milieux de culture
 - 2.2- Observation en microscopie

Résultats

- 1- Quantification des microflores hétérotrophes
- 2- Analyse qualitative

Discussion - Conclusion

Bibliographie

Introduction

Les eaux souterraines du bassin versant du Kerharo présentent une stratification. La première tranche d'eau, d'épaisseur variable mais ne dépassant pas 40 m, est caractérisée par de fortes teneurs en nitrates et en oxygène dissous. Elle est séparée de la couche sous-jacente par un front d'oxydo-réduction. Cette dernière contient très peu de nitrates mais présente des concentrations conséquentes en fer, manganèse, ammonium, sulfates, voire en l'hydrogène sulfuré (H₂S), indicateur de conditions fortement réductrices (Rapport d'avancement "Bassins versants et transmission des pollutions au littoral", 1996). La mise en évidence de bactéries dénitrifiantes lors d'un essai préliminaire suggère une dénitrification active dans ces eaux.

Cette étude fait suite à ces observations et a pour objet une évaluation des densités des microflores dénitrifiantes associées aux eaux souterraines du bassin versant du Kerharo.

Rappel sur les métabolismes bactériens

1- Notion d'hétérotrophie et d'autotrophie

Les organismes sont dits hétérotrophes lorsque leur source d'énergie primaire est organique. Ils effectuent donc leurs biosynthèses à partir de molécules organiques.

Les organismes sont dits autotrophes lorsqu'ils utilisent comme source d'énergie primaire, soit l'énergie lumineuse, soit des molécules minérales. Ils effectuent alors leurs biosynthèses à partir de molécules minérales.

Si l'on exclut les bactéries photosynthétiques, les principaux types physiologiques bactériens sont figurés dans le tableau 1.

Ces différents types physiologiques interviennent, au cours de processus aérobie ou anaérobie, dans la réalisation des quatre principaux cycles biologiques, qui sont :

- Le cycle du carbone (et de l'oxygène)
- Le cycle de l'azote
- Le cycle du soufre
- Le cycle du fer.

Dans le contexte de cette étude, nous nous intéresserons au cycle de l'azote, et plus précisément à la dénitrification.

Types physiologiques	Autres noms, Définitions	Source d'énergie (donneur d'électron)		Source de carbone	
		composé inorganique	composé organique	CO ₂	composé organique
Chimiolithoautotrophe obligatoire	Chimiolithotrophe oblig. Autotrophe oblig. Chimiautotrophe oblig. Litotrophe oblig.	+	-	+	-
Chimiolithoautotrophe facultatif	Chimiolithotrophe facul. Autotrophe facul. Chimiautotrophe facul. Litotrophe facul. Mixotrophe	+	+	+	+
"Symbiontes"	---	+	?	+	?
Chimiolithohétérotrophe	Hétérotrophe capable d'obtenir de l'énergie de l'oxydation d'un composé inorganique	+	+	-	+
Chimioorganohétérot.	Hétérotrophe capable d'oxyder des composés inorganiques mais incapables d'en tirer de l'énergie	-	+	-	+

Tableau 1 : Les différents types physiologiques bactériens (d'après Durand, 1992).

Chimio : énergie métabolique obtenue par oxydation chimique et non par photosynthèse.

Litho : source d'énergie inorganique / Organo : source d'énergie organique

Auto : dioxyde de carbone utilisé comme source de carbone (à l'instar de l'utilisation hétérotrophe des sources de carbone organique).

2- La dénitrification

L'azote est un élément omniprésent. Il intervient dans le métabolisme de tous les organismes, qu'ils soient microbiens, végétaux ou animaux. Il décrit un cycle biogéochimique qui relie ses différentes formes N₂, NO₂⁻, NO₃⁻, NH₄⁺ et N-organique.

La dénitrification au sens large est la transformation des nitrates en composés dans lesquels l'azote a un nombre d'oxydation plus faible (Martin, 1979). Sont distingués en général trois modes de réduction des nitrates :

1- Une réduction assimilatrice des nitrates (ou assimilation), qui correspond au processus par lequel NO₃⁻ est converti en NH₄⁺ ; ce dernier est utilisé comme source d'azote pour les synthèses protéiques.

2- Une réduction dissimilatrice incidente, qui correspond à la réduction des nitrates en nitrites par des bactéries fermentant des sucres. Cette réaction se déroule en anaérobiose et en l'absence de tout accepteur d'hydrogène exogène.

3- Une respiration des nitrates (ou dénitrification dissimilatrice), qui correspond au processus par lequel le NO_3^- est réduit en N_2O ou en N_2 ; cette dernière a lieu en conditions anaérobies, lorsque le nitrate remplace l'oxygène comme accepteur terminal d'électrons.

2.1- La dénitrification hétérotrophe

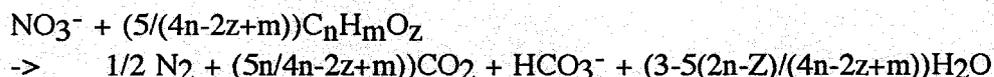
Lors de la dénitrification hétérotrophe, c'est donc la dégradation d'un substrat organique fournit donc à la fois les électrons nécessaires à la réduction des nitrates et le carbone pour la synthèse cellulaire.

Les bactéries hétérotrophes utilisent dans un ordre préférentiel les accepteurs d'électrons suivants : oxygène dissous, nitrates et sulfates (Bonin *et al.*, 1989 ; Hochstein *et al.*, 1984). Qu'il s'agisse de l'oxygène ou des nitrates, le système de transport des électrons est le même (Itagaki *et al.*, 1961), excepté pour les enzymes terminales, la nitrate réductase et la cytochrome oxydase. "Les électrons fournis par l'oxydation de la matière organique sont transférés le long d'une chaîne de transfert vers l'oxygène des nitrates. Cette chaîne est constituée de flavines, quinones et cytochromes ; elle est couplée à une réaction de phosphorylation qui par le jeu des liaisons phosphore stocke cette énergie et la restitue lors de synthèses cellulaires" (Philipot *et al.*, 1983).

La dénitrification est un processus très complexe et quarante gènes au moins sont impliqués dans sa réalisation (Stouhamer, 1990). La transformation des nitrates en azote gazeux s'effectue selon une chaîne de réactions enzymatiques, chaque étape de la transformation étant catalysée par une enzyme distincte (Zehnder et Stumm, 1988) :

composé	NO_3^-	\rightarrow	NO_2^-	\rightarrow	NO	\rightarrow	N_2O	\rightarrow	N_2
nombre d'oxydation	+5		+3		+2		+1		0
enzyme			nitrate réductase		nitrite réductase		oxyde nitrique réductase		oxyde nitreux réductase

L'équation de la dénitrification hétérotrophe, en ne tenant compte que de la seule voie énergétique, peut s'écrire (Hollo et Czako, 1987) :



par exemple, si le substrat carboné est l'éthanol, cette équation s'écrit :



A cette équation se rajoute celle liée à la synthèse cellulaire, qui se réalise grâce à cette libération d'énergie. L'équation généralement proposée pour l'éthanol (Ballay *et al.*, 1985), dans laquelle la biomasse est représentée par $\text{C}_5\text{H}_7\text{NO}_2$, s'écrit :



2.2- La dénitrification autotrophe

Dans le cas de la dénitrification autotrophe, le processus peut se réaliser soit avec de l'hydrogène, soit avec du soufre. Les bactéries autotrophes utilisent l'énergie libérée par les réactions suivantes :

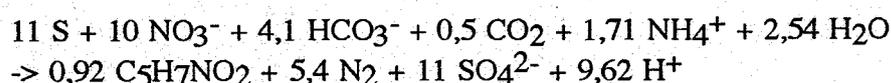
- Pour l'hydrogène :



- Pour le soufre :



Le bilan massique intégrant la synthèse cellulaire établi par Gaid (1980) s'écrit :



La dénitrification autotrophe sur le soufre génère des sulfates (SO_4^{2-}).

Outre cette dénitrification en relation avec le soufre, une dénitrification avec le sulfure de fer est également possible.

Dans le cadre d'essais sur des pilotes de dénitrification à partir de sulfure de fer, Montiel et Welte (1994) utilisent du fer métallique qui, en présence d'eau, s'oxyde en fer ferreux et conduit à une réduction de l'oxygène dissous. Dans ces conditions, des bactéries sulfatoréductrices vont alors produire des sulfures à partir des sulfates présents dans l'eau, conduisant à la production de sulfures de fer.

Des bactéries dénitrifiantes appartenant à deux types peuvent être mobilisées pour l'élimination des nitrates. Il s'agit des bactéries oxydant le fer ferreux et des bactéries utilisant le soufre.

En milieu naturel, au niveau d'aquifères réducteurs, différents auteurs ont mis en évidence un processus de dénitrification naturelle (Kolle *et al.*, 1985 ; Edmunds *et al.*, 1982 ; Abdi-Haider, 1986 ; Pauwels *et al.*, 1996). Selon ces auteurs, cette dénitrification couplée à l'oxydation de la pyrite (FeS_2) serait la conséquence de l'activité métabolique de *Thiobacillus denitrificans*. L'équation régissant cette réaction s'écrit :



Les cinétiques des réactions de dénitrification impliquant des bactéries autotrophes sont plus faibles que celles des bactéries hétérotrophes (Haidler *et al.*, 1988).

3- Les conditions de réalisation de la dénitrification

La dénitrification nécessite :

- La présence de bactéries possédant la capacité de métaboliser les nitrates.
- La présence de donneurs d'électrons appropriés comme les composés organiques ou les composés soufrés.
- La présence de phosphates.
- L'établissement de conditions anaérobies strictes ou des concentrations faibles en oxygène.
- La présence de substrats azotés, NO_3^- , NO_2^- , NO et N_2O comme accepteurs terminaux d'électrons.

3.1- Substrat carboné

Dans la mise en œuvre de la dénitrification hétérotrophe, le substrat carboné sert à la fois de source d'énergie, de source de carbone pour la synthèse cellulaire et de composé facilement oxydable pour l'établissement de conditions anaérobies.

Un grand nombre de substrats carbonés peut convenir (Akunna *et al.*, 1993 ; Blaszyk, 1993). Toutefois, pour un même nombre d'atomes de carbones, plus le substrat est réduit et plus grand est le nombre d'électrons libérés. En outre, la dégradation du substrat est plus rapide avec une chaîne carbonée courte.

3.2- Oxygène dissous

Les enzymes impliquées dans le processus de dénitrification sont essentiellement des enzymes inductives, dont la synthèse est le plus souvent réprimée en présence d'oxygène (Edeline, 1979). Cependant, la présence d'oxygène dissous à de faibles concentrations dans le milieu aqueux ne compromet pas systématiquement l'activité dénitrifiante si l'hypothèse de l'existence de microniches anaérobies au niveau du biofilm ou de flocs bactériens est formulée (Philipot *et al.*, 1983). En outre, localement l'oxygène peut être consommé plus rapidement qu'il ne se dissout (Skerman *et al.*, 1957). La dénitrification ne démarre réellement que lorsque la teneur en oxygène dissous dans l'eau, et non dans les biofilms, est inférieure à 2 à 3 mg/l (Philipot, 1982).

3.3- pH

La dénitrification peut se réaliser dans une gamme de pH comprise entre 4 et 11. Pourtant dans la plupart des cas, les bactéries dénitrifiantes sont légèrement basophiles et la fourchette de pH optimale se situe entre 7,5 et 8,5 (Degremont, 1989).

4- Les types bactériens impliqués dans la dénitrification

Si la plupart des bactéries hétérotrophes possède les réductases nécessaires au passage des nitrates vers l'azote gazeux (Knöles, 1982), d'autres ne possèdent que certains maillons de la chaîne. Ainsi, parmi les souches isolées du sol et responsables de la dénitrification, il semble, selon Germon (1982), que seules 40 à 65% d'entre elles soient capables de réaliser l'étape de dénitrification ($\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^-$) tandis qu'un nombre encore plus restreint poursuit la réaction jusqu'à l'obtention de composés gazeux.

Parmi les micro-organismes capables d'effectuer une dénitrification complète, se positionnent :

- Des bactéries hétérotrophes appartenant aux genres *Pseudomonas*, *Micrococcus*, *Denitrobacillus* ...
- Des bactéries autotrophes appartenant aux espèces *Thiobacillus denitrificans*, *Thiomicrospira denitrificans*, *Thiobacillus thioparus*.

Les *Thiobacillus* réalisent l'oxydation en sulfates des diverses formes du soufre inorganique S_2^- , S^0 , $S_2O_3^{2-}$, $S_4O_6^{2-}$, SO_3^{2-} . Certaines espèces telle que *T. denitrificans* peuvent coupler l'oxydation des composés soufrés à la réduction des nitrates. L'assimilation du carbone organique est limitée mais peut exister en présence d'une source d'énergie inorganique. Certaines souches de *T. denitrificans* ne peuvent assimiler les nitrates en tant que source d'azote ; la présence d'ammoniaque est alors nécessaire.

Matériel et méthodes

1- Microflores bactériennes analysées

Compte tenu des mesures *in situ* de différents paramètres chimiques et des données bibliographiques, les analyses bactériologiques ont porté sur la recherche de trois types de microflores :

Deux d'entre elles concernent directement l'activité de dénitrification ; il s'agit de :

- la microflore dénitrifiante hétérotrophe
- la microflore dénitrifiante autotrophe, et plus précisément au sein de cette dernière, de *Thiobacillus denitrificans*.

La dernière a trait à la microflore sulfatoréductrice. Ces germes hétérotrophes, en réduisant les sulfates peuvent être responsables de la production d'hydrogène sulfuré (H_2S), dont la présence a été décelée dans les eaux souterraines. En outre, la production de sulfates, associée au processus de dénitrification en présence de pyrite de fer par des bactéries du cycle du soufre peut favoriser le développement de ces germes.

S'ajouteront au dénombrement de ces trois microflores, des observations en microscopie photonique et en microscopie électronique afin de déceler certains germes difficilement cultivables et présentant une morphologie particulière telles que les gallionelles. Ces bactéries interviennent dans le cycle du fer en oxydant ce composé. Ce cycle étant souvent couplé à celui du soufre, il convenait de s'y intéresser dans le cadre de cette étude.

2- Origine des prélèvements

2.1- Dénombrements sur milieux de culture

Treize prélèvements ont été réalisés. Leur origine est précisée dans le tableau 2.

Les prélèvements ont été réalisés en flacons plasma par débordement à partir du fond et analysés immédiatement. Pour ce faire un laboratoire a été installé sur site.

Ouvrage	Réf.	Prélèvement	Remarques	n°
drain	D	niveau buse dans le ruisseau		1
trou à tarière	TT2	-	bulles* ++	7
piezomètre	PZ3	-	bulles ++	12
	PZ4	-	odeur H ₂ S + turbidité moyenne (blanchâtre)	4
	PZ9	-	forte odeur d'H ₂ S + forte turbidité	5
forage	F31	entre 0 et 11 m (fissure)	bulles +	2
		entre 26 et 29 m (fissure)	bulles +	3
		entre 29 et 32 m (fissure)		6
		mélange	bulles ++ (prélèvement après 1/2h de pompage)	13
	F34	entre 0 et 13 m (fissure)	bulles ++	8
		entre 13 et 16 m (fissure)		9
		entre 17,5 et 20,5 m (fissure)	bulles +	10
		mélange	(prélèvement après 1/4h de pompage)	11

Tableau 2 : Origine des prélèvements analysés sur milieux de culture.

*Les bulles correspondent à des dégagements gazeux dont la présence a été notée de façon plus ou moins importante dans les eaux prélevées.

2.2- Observation en microscopie

Les gallionelles étant des germes pédonculés associés aux surfaces (lames de verre) ont été immergées dans trois ouvrages pendant trois semaines afin de permettre une fixation des organismes éventuellement présents. Le tableau 3 donne les références des ouvrages et les profondeurs auxquelles ces lames ont été immergées.

Ouvrage	Référence	Profondeur	n°
Piezomètre	PZ9	- 5 m	10
Forage	F34	- 40 m	5
		- 30 m	6
		- 23 m	7
		- 12 m	8
	F30	- 44 m	1
		- 34 m	2
		- 25 m	3
		- 15 m	4

Tableau 3 : Origine des prélèvements observés en microscopie.

Les lames, une fois prélevées, sont fixées dans une solution de glutaraldéhyde (2,5% en concentration finale) préparée en eau physiologique stérile filtrée sur 0,2 μ m.

Résultats

1- Analyse quantitative

Les densités des trois microflores recherchées dans les eaux prélevées sur différents ouvrages sont présentées dans le tableau 4.

Ouvrage	Réf.	Profondeur	Microflore dénitrifiante		Microflore sulfatoréductrice
			hétérotrophe	autotrophe <i>Thiobacillus denitrificans</i>	
drain	D		2,3	< 0,3	< 0,3
trou à tarière	TT2		16	< 0,3	0,92
piézomètre	PZ3		290	< 0,3	< 0,3
	PZ4		2,1	2,3	< 0,3
	PZ9		1 500	< 0,3	0,36
forage	F31	0-11m	930	< 0,3	< 0,3
		26-29m	74	0,36	< 0,3
		29-32m	150	< 0,3	< 0,3
		mélange	110	< 0,3	< 0,3
	F34	0-13m	150	< 0,3	0,36
		13-16m	150	0,36	< 0,3
		17,5-20,5m	280	< 0,3	< 0,3
		mélange	240	0,36	0,36

Tableau 4 : Densités des microflores dénitrifiantes et sulfatoréductrices (/ml) dénombrées dans les eaux prélevées sur différents ouvrages.

La microflore dénitrifiante hétérotrophe est décelée sur la totalité des échantillons analysés. Présente à de faibles densités dans les eaux du drain (D) et du piézomètre PZ4 (2 germes/ml), elle atteint des densités de l'ordre 10^2 /ml sur les autres prélèvements. Une valeur maximale de $1,5 \cdot 10^3$ germes/ml est notée sur le piézomètre PZ9, dont les eaux étaient caractérisées par une turbidité importante.

La recherche de cette microflore sur des fissures isolées à l'aide d'obturateurs ne laisse apparaître aucun gradient net de densité en fonction de la profondeur.

Les densités observées sont relativement proches sur les deux forages suivis.

La microflore dénitrifiante autotrophe, et plus précisément au sein cette microflore, l'espèce *Thiobacillus denitrificans*, est très faiblement représentée avec des densités inférieures à 2 germes/ml. Elle n'a été décelée, compte tenu de la sensibilité des techniques utilisées, que sur 4 des 13 prélèvements analysés. Elle est notée au moins une fois sur chacun des deux forages suivis et sur le piézomètre PZ4 ; les eaux de ce dernier étaient caractérisées par une turbidité blanchâtre.

Là encore, aucun gradient n'est perceptible en fonction de la profondeur.

La microflore sulfatoréductrice est, elle aussi, très faiblement représentée, avec des densités inférieures à 1 germe/ml. Décelée sur 4 des 13 prélèvements analysés, cette microflore apparaît sur le trou à tarière, sur l'un des 3 piézomètres (PZ9) ainsi que dans les eaux de surface et de mélange du forage F34. Sur le piézomètre PZ9 la présence de ces bactéries coïncide avec la mise en évidence d'une forte odeur d'H₂S lors du prélèvement. Par contre, cette odeur également perceptible, bien que de façon moins marquée sur le piézomètre PZ4, n'a pu être corrélée à la présence de bactéries sulfatoréductrices.

2- Analyse qualitative

L'observation des surfaces, immergées durant 3 semaines à différentes profondeurs au niveau d'un piézomètre et de deux forages, a été effectuée dans un premier temps en microscopie photonique.

La présence de fourreaux bactériens a été mise en évidence sur les forages aux profondeurs de 25 m (forage F30) et de 40 m (forage F34), mais les densités de microorganismes étaient très faibles.

Seules quelques formes non filamenteuses ont été notées sur les autres échantillons.

En microscopie électronique à balayage, les quelques rares formes filamenteuses rencontrées précédemment présentaient une structure torsadée, caractéristique des gallionelles.

A titre d'information complémentaire, l'observation en microscopie photonique d'échantillons prélevés dans le piézomètre PZ4 en septembre 1996 avait permis la mise en évidence de nombreuses formes filamenteuses dans les d'eaux. Ces microorganismes étaient apparus sous forme de flocs 24 à 48h après stockage des échantillons eaux. Il est alors possible de penser que ces bactéries étaient initialement présentes à de faible densité dans l'échantillon. Les conditions de stockage (oxygénation partielle des eaux par exemple, ces germes étant aérobies ou microaérophiles) ont pu favoriser leur prolifération. Ces formes filamenteuses pourraient appartenir présomptivement aux genres *Gallionella*, *Leptothrix* ou *Sphaerotilus* (cf planche photo) ; ses trois genres sont des bactéries associées au cycle du fer, le premier étant autotrophe et les deux autres hétérotrophes.

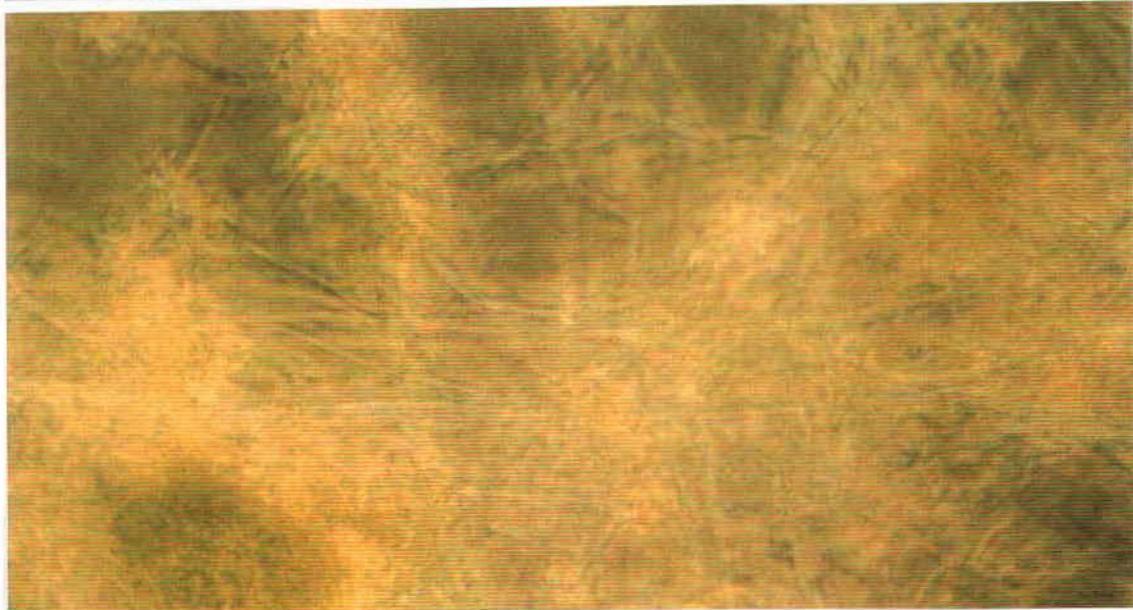
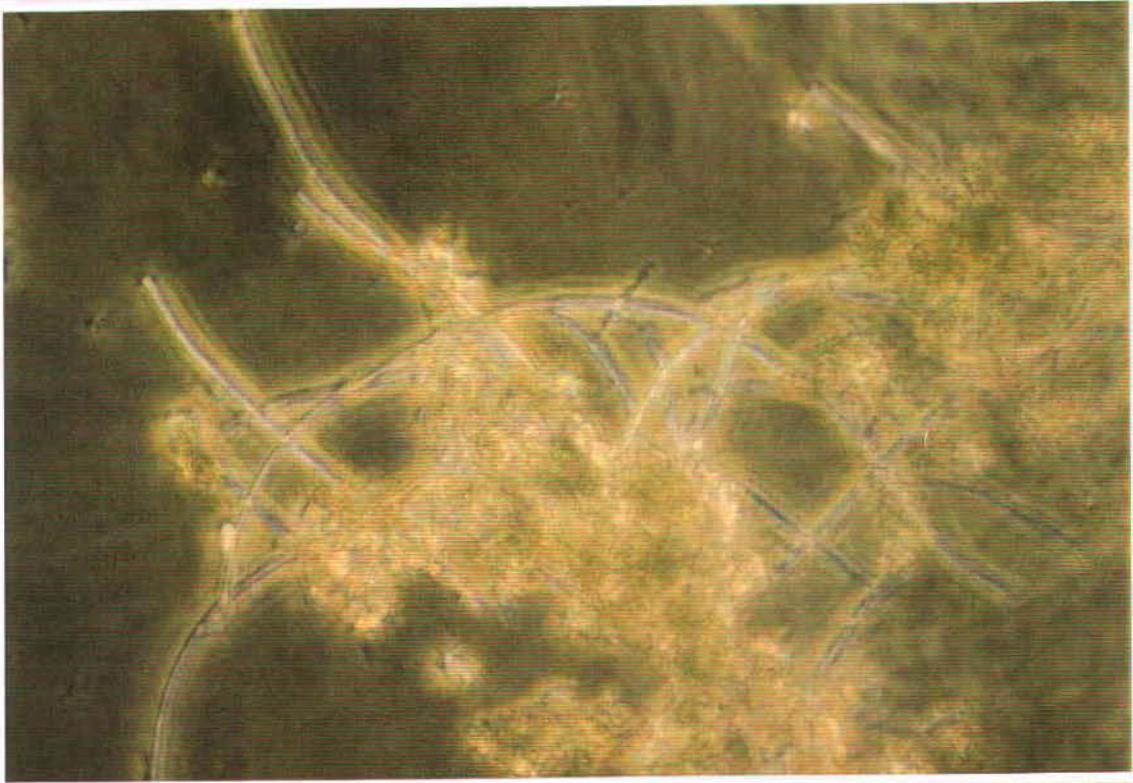
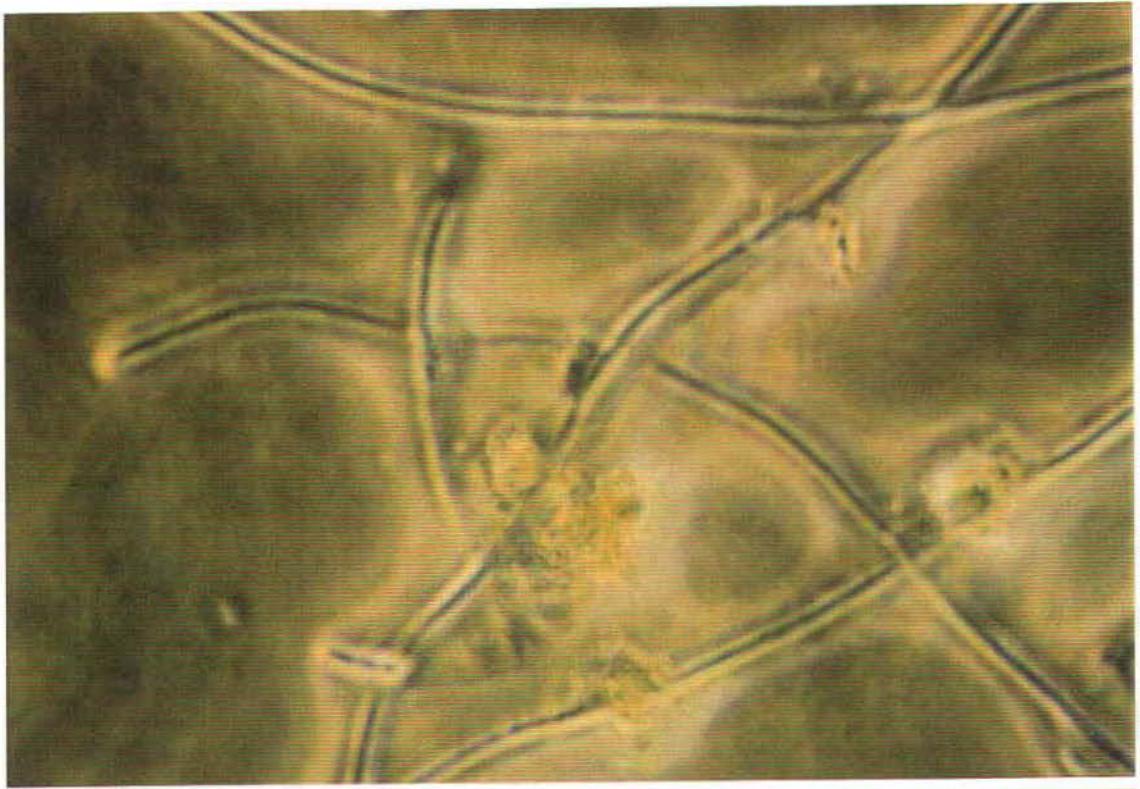
Planche photo

1

2

3

Formes filamenteuses mises en évidence dans des eaux de forages 48 heures après leur prélèvement (bassin versant du Kerharo - septembre 1996).



Discussion - Conclusion

Sur la base des résultats obtenus, l'hypothèse d'une dénitrification des eaux associée aux métabolismes des bactéries ne peut être pleinement confirmée. En effet, les densités bactériennes sont faibles : les densités de bactéries hétérotrophes sont inférieures à 10^2 germes/ml ; celles des bactéries autotrophes inférieures à 10 germes/ml.

Les densités de bactéries dénitrifiantes associées à l'eau d'un aquifère schisteux avec présence de pyrite (bassin versant du Coët Dan) ont été suivies par Pauwells *et al.* (1996). Au cours de l'année 1995 ces densités étaient comprises, selon les ouvrages, entre 2,5 et $1,3 \cdot 10^5$ *Thiobacillus denitrificans*/ml et allaient jusqu'à $1,3 \cdot 10^4$ bactéries capables de réduire les nitrates en azote gazeux/ml.

Mariotti *et al.* (1988) ont montré sur un aquifère crayeux du nord de la France, que les microflores dénitrifiantes associées à la phase aqueuse étaient faibles (de l'ordre de quelques unités en général avec juste un maximum à $2,3 \cdot 10^3$ bactéries/ml dans un forage). Par contre, elles atteignaient des densités de 10^5 à 10^6 bactéries/g sur les surfaces rocheuses de l'aquifère. Ces valeurs étaient notées pour les germes dénitrifiants tant autotrophes qu'hétérotrophes.

L'hypothèse d'une dénitrification biologique n'est cependant pas exclue mais nécessitera des investigations complémentaires afin de mieux cibler la recherche de ces germes.

Ces investigations porteront sur :

1- La stratégie d'échantillonnage

Les prélèvements effectués dans le cadre de cette étude correspondaient à des eaux issues de fissures isolées au sein des forages à l'aide d'obturateurs. Les échantillons analysés étaient prélevés après 1h-1h30 de pompage et après stabilisation des caractéristiques physico-chimiques des eaux (Faillat, Somlette, com. pers.).

Même si, dans quelques cas, des mélanges ont pu se produire entre l'eau de la fissure et les eaux sus-jacentes piégées par l'obturateur, les modalités de prélèvement se sont avérées tout à fait correctes.

Il semble toutefois que dans certains ouvrages des temps plus longs de pompage auraient permis d'obtenir des eaux aux caractéristiques encore plus réductrices et par là-même encore plus représentatives des fissures isolées.

-> quelques prélèvements supplémentaires seront donc effectués après des temps de pompage d'au moins 6 heures.

De plus, les germes pris en compte sont ceux qui sont présents dans la phase aqueuse. Or selon plusieurs auteurs ayant travaillé, soit *in situ*, soit sur pilote, les germes impliqués dans ces processus de dénitrification semblent majoritairement associées aux surfaces minérales. Leur présence en fortes concentrations dans les eaux pourrait en outre s'expliquer par le décrochage des bactéries fixées par effet mécanique du pompage. Dans le cas présent la pompe utilisée ne permettait l'obtention que de faibles débits (0,2 à 1 m³/h) et limitait par là-même les phénomènes de décrochage des germes.

-> quelques essais supplémentaires seront menés avec des débits de pompage plus forts (2 m³/h).

En dernier lieu, les bactéries pouvant être localisées préférentiellement sur les parois, la recherche de ces germes pourrait être envisagée au niveau de surfaces.

-> soit par récupération de débris rocheux en fond de forage,
-> soit par immersion de fragments rocheux (schisteux avec inclusions pyritiques) de fine granulométrie dans le forage durant environ deux mois et recherche des germes ayant, sur ce laps de temps, colonisés les surfaces. L'immersion des surfaces est effective depuis la mi septembre.

2- La stratégie analytique

L'installation d'un laboratoire sur site a permis la réalisation des analyses dans les quelques minutes qui ont suivi les prélèvements. Il ne semble donc pas, sur ce point, que la qualité des analyses puisse être remise en cause.

Les milieux de culture utilisés pour dénombrer les germes hétérotrophes et les *Thiobacillus denitrificans*, sont des milieux référencés dans la littérature (Prokaryotes). Le milieu pour les hétérotrophes a déjà été testé par notre laboratoire sur des eaux de surfaces et des eaux potables (Patris *et al.*, 1994) et a donné des résultats très concluants. Le milieu pour les autotrophes n'a par contre pas été précédemment testé par notre laboratoire.

-> afin de garantir l'adaptation des milieux de culture utilisés aux métabolismes recherchés, des tests seront réalisés à l'aide de souches pures achetées auprès d'une collection de microorganismes (Institut Pasteur).

Le pH optimal permettant la croissance des bactéries réalisant ce métabolisme se situant aux alentours de 7, les milieux de culture ont été ajustés à ce pH. Cependant, le pH des eaux analysées était systématiquement compris entre 5 et 6, ce qui pourrait sélectionner des microflores adaptées aux conditions acides. Cette remarque n'exclut pas que des microniches à des pH différents (par exemple de l'ordre de 7) puissent exister au niveau de l'interface roche/eau.

-> afin de prendre en compte ce paramètre, les milieux de culture seront préparés à pH 5 et à pH 7.

Enfin, les meilleurs résultats en terme de dénombrements et d'approche de la diversité des peuplements sont, dans le cas de certains métabolismes complexes, obtenus en travaillant à partir des substrats sur lesquels se développent les bactéries *in situ*.

Ces milieux présentent alors l'inconvénient de ne plus être standardisés et donc de ne plus permettre une comparaison directe des résultats avec ceux d'autres auteurs. Mais compte tenu de l'objectif de cette étude et de la diversité des protocoles utilisés pour quantifier les germes dénitrifiants dans les aquifères (tant en terme de modalités de prélèvements, qu'en terme de milieux utilisés pour la croissance des bactéries recherchées), cette approche semble tout à fait adaptée au cas présent.

-> des milieux de culture à base d'eau de l'aquifère seront testés.

De la même façon, des essais complémentaires de dénombrements de germes sulfatoréducteurs seront menés sur des milieux préparés à base d'eau prélevée sur site. Dans ce dernier cas, les densités trouvées sont également très faibles (< 1 germes/ml), ce qui est particulièrement surprenant dans le cas des piézomètres PZ4 et PZ9 présentant une odeur d'H₂S marquée, produit résultant de la réduction des sulfates par ces bactéries. Il convient de rappeler que les bactéries sulfatoréductrices sont des germes hétérotrophes et que dans les biotopes oligotrophes que représentent les aquifères, il est fort probable que ces germes, si tant est qu'ils soient présents, se développent principalement sur les surfaces, qui sont lieu d'accumulation de la matière organique dissoute.

En dernier lieu, la quantification de métabolismes spécifiques, tels que la dénitrification ou la sulfatoréduction, ne prend toute sa signification en terme de potentialité d'un biotope donné, que lorsque les densités trouvées correspondent à une fraction représentative du peuplement bactérien présent.

-> dans ce sens, une évaluation des densités de microflore totale sera effectuée sur les différents échantillons analysés.

Bibliographie

Abdi-Haider, 1986 - Etude du rôle des sulfures et pyrite de fer dans la dénitrification en sous-sol. Thèse de docteur ingénieur de l'Université de Rennes I, U.E.R. Ecole Nationale Supérieure de Chimie. 184p.

Akunna J.C., Bizeau C., Moletta R., 1993 - Nitrate and nitrite reductions with anaerobic sludge using various carbon sources. *J. Water Poll. Control Fed.*, 58 : 398-404.

Ballay D., Martin G., Sebillotte and Tricard, 1985 - Rapport français "Les nitrates dans les eaux". Congrès nitrates dans les eaux, paris, 22-24 octobre.

Blaszcyk M., 1993 - Effect of medium composition on the denitrification of nitrate by *Paracoccus denitrificans*. *Applied and environmental microbiology*, 59 : 203-210.

Bonin P., Gilewick M., Bertrand J.C. 1989 - Effect of reach step of denitrification on *Pseudomonas nautica*. *Can. J. Microbiol.*, 35 : 1061-1064.

Degremont, 1989 - Memento technique de l'eau. Lavoisier-technique.

Durand P., 1992 - Taxonomie des bactéries oxydant les composés soufrés réduits en milieu hydrothermal profond : cas du sud-ouest Pacifique. Thèse de l'Université de Bretagne Occidentale, Station Biologique, UPR 4601 CNRS Roscoff. 183p.

Edeline F., 1979 - L'épuration biologique des eaux résiduaires. Théorie et technologie. Cebedoc/Liège rue A. Stavart B 4000 liège.

Edmunds W.M., Bath A.H., Miles D.L., 1982 - Hydrochemical evolution of the East midlands Triassic sandstone aquifer England. *Geoch. Cosmoch. Acta* 46, 2069-2081.

Gaid K., 1980 - Mode d'élimination de polluants sur filtre. Thèse de doctorat es Sciences. Université de Rennes I.

Germon J.C., 1982 - Rapport groupe Azote. 20 p.

Haidler N., Morvan N., Le Cloirec P., Martin G., 1988 - Dénitrification en réacteur garni en pyrite de fer : études de laboratoire. *Environmental Technology Letters*, 9 : 411-420.

Hochstein L.I., Bellach M., Kriticos G., 1984 - The effect of oxygen on denitrification during study-state growth of *Paracoccus halodenitrificans*. *Arch. Microbiol.*, 137 : 74-78.

Hollo J. et Czako L., 1987 - Nitrate removal from drinking water in a fluidized-bed biological denitrification bioreactor. *Acta biotechnol.*, 7 (5) : 417-423.

Itagaki E., Fujita T., Sator R., 1961 - *Biochem. et Biophys. acta*, 51, 390.

Knowles R., 1982 - Denitrification. *Microbiol. Rev.*, 46 : 43-70.

Kolle W., Strebel O., Bottcher J., 1985 - Formation of sulfate by microbiological denitrification in a reducing aquifer. IWSA in "Wasser Berlin, avril 1985, 22-28.

Martin G., 1979 - Le problème de l'azote dans les eaux. Editions techniques et documentation. 279p.

Mariotti A., Landreau A., Simon B., 1988 - 15N isotope biogeochemistry and natural denitrification process in groundwater : application to the chalk aquifer of northern France. *Geochimica et Cosmochimica Acta* Vol. 52 : 1869-1878.

Montiel A., Welte B., 1994 - Nouveau procédé de dénitrification des eaux par le fer métallique. 11èmes journées Information Eau, 1, C13, Poitiers, 28-30 septembre.

Patris T., Laplanche A., Sammut F., Bourbigot M.M., Friant M., Jacq E., Prigent J.P., 1994 - Dénitrification à basse température sur l'usine de production d'eau potable de Pont-ar-Bled. TSM, 9 : 513-518.

Pauwels H., Martelat A., Foucher J.C., Lassagne P., 1996 - Dénitrification des les eaux souterraines du bassin versant du Coët Dan : suivi géochimique et hydrologique du processus. Rapport BRGM R39055, 66p.

Philipot J.M., 1982 - Une voie biologique pour la dénitrification des eaux potables. trib. Cebedeau, 458 (35) : 11-20.

Philipot J.M., Sibony J., Martin G., Blecon G. 1983 - Réduction des teneurs en nitrates dans les eaux de consommation : le point sur les traitements disponibles, Paris, 22-24 octobre.

Skerman V.B.D., Mac Rae I.C., 1957 - The influence of oxygene on the reduction of nitrate by adapted cells of pseudomonas denitrificans. Cand. J. Microbiol., 3 : 215-230.

Stouhamer A.H., 1990 - Metabolic regulation including anaerobic metabolism in Paracoccus denitrificans. J. Bioenerg. Biomemb., 23 : 163-185.

Zehnder A.J.B., Stumm W., 1988 - Geochemistry and biogeochemistry of anaerobic habitats. In : Biology of anaerobic microorganisms. Wiley - Interscience (eds.), new York.