

Claude Alzieu<sup>1</sup>  
Bruno Andral<sup>2</sup>  
Philippe Bassoullet<sup>3</sup>  
Michèle Gourmelon<sup>3</sup>  
Régis. Le Quillec<sup>4</sup>  
Jacky L'Yavanc<sup>3</sup>  
Françoise Quiniou<sup>3</sup>

décembre 1999 - R.INT.DEL /ST/RST/99.11/ Sète

<sup>1</sup> Ifremer - Sète  
<sup>2</sup> Ifremer - Toulon  
<sup>3</sup> Ifremer - Brest  
<sup>4</sup> CETMEF - Compiègne

## Biodragages

# Protocole de suivi de l'efficacité et de l'impact potentiel

IFREMER Bibliothèque de BREST



OEL08601



**Résumé :**

Les traitements *in situ* des sédiments, ou biodragages, consistent à disperser à la surface ou à injecter dans le sédiment des produits pulvérulents sur lesquels sont fixées des bactéries capables de dégrader les matières organiques. Peu de données expérimentales sont disponibles quant à l'efficacité et à l'impact de cette pratique qui, bien qu'utilisée dans certains milieux d'eau douce, n'a pas fait l'objet de réelles applications en milieu marin. L'offre de service de quelques opérateurs et la demande des gestionnaires des ports, ne peuvent être prises en considération, faute d'une connaissance approfondie des avantages et inconvénients de telles techniques. Il nous est donc apparu nécessaire de définir et de proposer, aux Services en charge des opérations de dragage et aux promoteurs de techniques *in situ*, des protocoles d'étude applicables tant au suivi de l'efficacité qu'à celui de l'impact écotoxicologique des biodragages *in situ*. Le document donne à cet effet des plans expérimentaux, des méthodes de mesure et d'analyse, des protocoles d'essais et des recommandations générales pour la mise en œuvre de tels suivis.

**Abstract :****Mots-clés :**

Biodragages, protocoles de suivi, efficacité, impact écotoxicologique,

**Keywords :**

Biodredging, monitoring protols, efficiency, ecotoxicological impact

**Commentaire :**

# Biodragages

## Protocole de suivi de l'efficacité et de l'impact potentiel

## sommaire

<b>1. Introduction .....</b>	<b>5</b>
<b>2. Caractérisation du sédiment en place .....</b>	<b>5</b>
2.1. Générale .....	5
2.2. Spécifique aux biodragages <i>in situ</i> .....	6
<b>3. Suivi de l'efficacité.....</b>	<b>7</b>
<b>3.1. Correction des profondeurs par rapport à un niveau de référence .....</b>	<b>7</b>
3.1.1. L'échelle de marée .....	8
3.1.2. L'ensemble marégraphe-échelle de marée .....	8
3.1.3. Moyens directs entre l'altitude de référence et le sédiment .....	8
<b>3.2. Détermination de la position des points de sonde .....</b>	<b>8</b>
<b>3.3. Mesure de la hauteur d'eau .....</b>	<b>10</b>
3.3.1. Les sondeurs .....	10
3.3.2. Les perches de sonde graduées .....	10
3.3.3. Présentation des résultats.....	11
<b>3.4. Suivi en continu des variations du niveau du sédiment .....</b>	<b>11</b>
<b>3.5. Suivi des concentrations en matières sèches.....</b>	<b>12</b>
<b>4. Suivi de l'impact .....</b>	<b>12</b>
4.1. Stratégie de suivi .....	12
4.2. Prélèvements et conditionnement des échantillons .....	14
4.3. Utilisation de bioindicateurs de contamination .....	15
4.4. Utilisation de bioindicateurs d'exposition .....	17
4.5. Evaluation de la toxicité .....	17
<b>5. Bibliographie .....</b>	<b>18</b>
<b>Annexes .....</b>	<b>19</b>

## 1. Introduction

Les traitements biologiques des sédiments à draguer consistent à utiliser la capacité de certains micro-organismes à dégrader la matière organique. De manière générale, l'efficacité des méthodes biologiques dépend des conditions de milieu (température, oxygène, teneurs en nutriments) et de l'adaptation des micro-organismes à utiliser le carbone organique des sédiments comme substrat pour leur propre développement. Ces biotechnologies peuvent être mises en œuvre, soit *in situ*, soit lors d'épandage sur des sols, soit dans des bioréacteurs.

Les traitements *in situ*, ou biodragages, consistent à disperser à la surface ou à injecter dans le sédiment des produits pulvérulents sur lesquels sont fixées des bactéries capables de dégrader les matières organiques. Les techniques se différencient par l'origine des bactéries, exogène ou provenant de cultures de souches prélevées dans le sédiment à traiter, l'addition ou non de nutriments et d'oxygène. L'avantage attendu est double, d'une part abaisser le niveau du sédiment afin de limiter la fréquence des dragages, d'autre part éliminer les contaminants organiques biodégradables (1).

D'après Fernandy van Vlerken (2) le concept du biodragage, qui propose des solutions économiques, donne des résultats médiocres et l'aération forcée du sédiment conduit à une dispersion des contaminants dans la colonne d'eau. En fait peu de données expérimentales sont disponibles quant à l'impact de cette pratique qui, bien qu'utilisée dans certains milieux d'eau douce, n'a pas fait l'objet de réelles applications en milieu marin. Toutefois, il existe à la fois une offre de service par quelques opérateurs et une demande des gestionnaires des ports pour de telles techniques. Il apparaît donc nécessaire de définir des protocoles d'étude applicables tant au suivi de l'efficacité que de l'impact écotoxicologique des biodragages *in situ*.

## 2. Caractérisation du sédiment en place

### 2.1. Générale

La circulaire interministérielle du 24/3/1988 (en cours de révision) relative à la "Méthodologie portant sur le prélèvement et l'analyse des déblais de dragage" fixe la stratégie d'échantillonnage et d'analyse des sédiments, en vue d'estimer les risques écotoxicologiques potentiels liés à leur dragage et / ou immersion. Ces données sont considérées acquises, quelles que soient les opérations ultérieures envisagées : traitement *in situ*, dragage, immersion, traitements à terre. Elles doivent en particulier permettre de :

- caractériser les sédiments par rapport aux valeurs guides, actuellement "niveaux Géode" en cours d'agrément par les ministères concernés (3),
- identifier des risques particuliers à caractère local, tels que la présence de formes enkystées d'espèces phytoplanctoniques toxiques (4) et/ou de microorganismes pathogènes (5).

*Note 1* : la circulaire précitée ne prévoit pas l'identification des congénères de PCB et la recherche des hydrocarbures polycycliques aromatiques (PAH) ainsi que du tributylétain (TBT) et de ses produits de dégradation. La prise en compte de ces substances est prévue dans la version révisée : il est donc recommandé de procéder à leur analyse.

*Note 2* : l'interprétation des niveaux Géode fait appel à la toxicité globale des sédiments lorsque ceux-ci présentent des contaminations supérieures au niveau 1 ; des tests de toxicité seront inclus dans la nouvelle circulaire.

**Recommandation 1** : à titre de précaution et dans l'attente de données expérimentales sur l'importance du relargage de contaminants par les biodragages *in situ*, il est recommandé de ne pas traiter par cette technique des sédiments comportant des éléments (mercure, plomb, cadmium) ou des substances (PCB) très toxiques en concentration supérieure au niveau 2 Géode. Cette recommandation s'applique également aux sédiments renfermant des kystes de dinoflagellés toxiques, dont la dissémination est à proscrire.

## 2.2. Spécifique aux biodragages *in situ*

De manière générale l'application des techniques de biodragages nécessite une connaissance spatiale des caractéristiques des sédiments, de manière à définir leur traitabilité liée de manière prépondérante à leur richesse en matière organique. Pour ce faire, les teneurs en carbone organique sont déterminées sur des carottes prélevées en différents endroits de la zone à traiter. Ces prélèvements peuvent également être mis à profit pour obtenir des informations sur la contamination des sédiments en fonction de leurs profondeurs et éventuellement mettre en évidence des niveaux inférieurs très contaminés.

**Recommandation 2** : sur quelques points où sont effectués des carottages, évaluer la contamination des sédiments à différentes profondeurs. Ces résultats seront par la suite utilisés comme valeurs de référence avant traitement ( $t_0$ ).

### 3. Suivi de l'efficacité

L'efficacité du traitement ne pourra être appréciée qu'à partir de mesures de l'évolution bathymétrique des fonds. Le but d'un levé bathymétrique classique est de représenter avec précision les détails du relief des fonds sous-marins. En ce qui concerne les travaux de biodragages, les mesures bathymétriques doivent permettre d'évaluer la réduction de hauteurs des sédiments pour cerner et valider l'efficacité de cette nouvelle méthode de dragage. Les sondages doivent être très précis et demandent des méthodes et des précautions particulières par rapport aux sondages classiques. Les moyens à utiliser dépendent de la surface à traiter, mais en général les dragages sont réalisés essentiellement dans des endroits restreints et bien abrités, comme les rivières, les bassins portuaires et les ports de plaisance. Les différentes précautions à prendre concernent :

- la correction des hauteurs mesurées pour les rapporter à un niveau de référence,
- la détermination de la position des points de sondes pour revenir sur ces mêmes points,
- la mesure, très précise de la hauteur d'eau au-dessus du sédiment,
- le suivi en continu et ponctuel des variations de la cote du sédiment.

#### 3.1. Correction des profondeurs par rapport à un niveau de référence

L'observation de la marée ou d'un niveau d'eau dans un bassin fermé à l'occasion du levé bathymétrique doit conduire à rapporter le niveau des fonds à une altitude de référence qui, dans ce cas, n'est pas obligatoirement le zéro de réduction des cartes marines. Cette altitude de référence doit être mise en place spécialement pour ces travaux, située à proximité immédiate de la zone de sondage et rattachée à plusieurs repères durables. Son rattachement à un système de référence d'altitude (NGF) n'est pas obligatoire mais permet, quand il existe à proximité, de conserver ce niveau de référence local. Cette altitude de référence va permettre, pendant l'expérimentation, de rapporter les hauteurs mesurées à un même niveau et de comparer ces hauteurs entre elles.

L'observation des hauteurs d'eau au-dessus des sédiments peut être réalisée par la lecture d'une échelle de marée, ou d'un marégraphe couplé à une échelle de marée, ou plus directement par lecture entre l'altitude de référence et le fond.

### 3.1.1. L'échelle de marée

L'observation est généralement limitée aux périodes couvrant les séances de sondage et nécessite pour ce faire, la présence permanente d'une personne. Compte tenu de la précision recherchée, la cadence de lecture de l'échelle doit être rapide (5 mn).

### 3.1.2. L'ensemble marégraphe-échelle de marée

Le marégraphe enregistre en continu, les variations du niveau d'eau au-dessus du fond. Cet appareillage nécessite des dispositions particulières à savoir la pose d'une échelle de marée et l'observation, en continu, de la pression atmosphérique. En effet la détermination du zéro d'un marégraphe, par rapport à un repère de référence, n'est pas accessible au nivellement géométrique classique. Le calage de celui-ci, ainsi que son bon fonctionnement, sont obtenus à l'aide de quelques lectures simultanées au moyen de l'échelle de marée. Le zéro de l'échelle de marée doit être rattaché au repère de l'altitude de référence par un nivellement classique (niveau et mire).

### 3.1.3. Moyens directs entre l'altitude de référence et le sédiment

L'utilisation et le traitement des signaux des systèmes de positionnement par satellites (GPS) permettent de connaître à chaque instant la position d'un mobile ou d'une mire dans les trois axes avec une précision centimétrique. L'utilisation d'une mire, avec ce système, permet d'obtenir instantanément le niveau du fond en s'affranchissant des calculs de variations du niveau d'eau au-dessus du fond.

Des mesures électroniques des angles et des distances avec un système Infrarouge ou Laser permettent également de connaître à chaque instant la position d'un mobile ou d'une mire dans les trois axes avec une précision meilleure que le centimètre. Ces systèmes nécessitent une personne près de la station et une liaison radio avec l'équipe de sondage.

Ces moyens directs utilisent une mire qui repose sur le fond et ceci pour chaque mesure ; la hauteur d'eau au-dessus du fond limite évidemment l'utilisation de ces systèmes. Ils nécessitent une station de référence, connue en trois dimension (x, y et z).

## 3.2. Détermination de la position des points de sonde

Différents systèmes de positionnement peuvent être utilisés pour réaliser des levés bathymétriques classiques. Ils peuvent être classés en quatre catégories :

- les systèmes qui mesurent des angles et des distances,
- les systèmes qui mesurent des différences de distances ou des systèmes hyperboliques ; ce sont des systèmes radioélectriques,
- les systèmes de positionnement par satellites couplés à un système différentiel (DGPS),
- les systèmes de positionnement de grande précision par satellites (centimétrique).

Les systèmes des 2ème et 3ème catégories donnent des positions précises (mieux que 5m). Le positionnement par les données satellitaires est le plus utilisé actuellement.

Les systèmes des 1ère et 4ème catégories donnent des positions centimétriques.

Lorsque la zone à traiter est étroite (inférieure à 200 m environ), il existe un procédé simple qui permet de revenir exactement au même endroit avant, pendant et après le dragage. Il s'agit d'un système composé d'un filin ou câble d'acier que l'on tend entre les deux rives. Les points d'accroche, situés sur chaque rive, sont positionnés le plus précisément possible mais sont surtout matérialisés avec un soin particulier pour exister durablement. Le filin est gradué suivant la densité des sondes désirées, tous les 2 mètres par exemple. L'embarcation se déplace le long du filin et sonde au passage de chaque repère. A chaque fin de profil, ce filin est déplacé d'une distance déterminée et positionnée à l'avance. Cette distance dépend également de la densité de sondes désirées. La validation demandant une grande densité de points, une distance comprise entre 5 et 10 m entre deux profils semble raisonnable. Les profils sont généralement parallèles entre eux. La tension du filin entre les berges doit être importante pour éviter une courbure éventuelle surtout lorsqu'il y a du vent ou du courant. Il est donc conseillé d'utiliser un moyen de positionnement pour avoir une meilleure précision des points de sonde. Les systèmes de la 1ère et 4ème catégories, cités précédemment et utilisés déjà pour la détermination du niveau des fonds, répondent à cette demande.

L'orientation des profils doit être adaptée au terrain. Les sondages sont généralement réalisés selon un ensemble de profils perpendiculaires aux isobathes. La distance séparant ces profils dépend de la dimension de la zone étudiée et de la précision souhaitée. La densité des sondes sera adaptée en fonction de la topographie du fond (forte densité sur des fonds irréguliers). A l'issue d'un sondage et avant le repli de l'équipe de visualisation, des profils en plan et des sondes en coupe verticale sont une sage précaution pour, si nécessaire, revenir sur un profil incomplet ou incorrect.

Le périmètre de la zone sondée inclura des zones non directement soumises au biodragage afin de :

- évaluer les effets de ce traitement à la périphérie de la zone traitée,
- connaître les évolutions naturelles des fonds hors zone de traitement.

### 3.3. Mesure de la hauteur d'eau

Plusieurs moyens peuvent être également utilisés :

- le sondeur,
- les perches de sonde graduées.

#### 3.3.1. Les sondeurs

Il sera fait usage d'un sondeur hydrographique (200 kHz) permettant d'avoir une image du fond en continu. Les hauteurs mesurées, bien que précises pour la navigation, peuvent être entachées de quelques erreurs qui sont dues à :

- la vitesse de propagation du son dans l'eau,
- la réponse du sédiment en fonction de sa nature et de la fréquence d'émission utilisée par le sondeur.

Pour corriger en partie ces erreurs, des étalonnages sont réalisés avant et après chaque séance de sondage. Un mauvais calibrage du sondeur en fonction de la salinité et de la température de l'eau est souvent la cause d'imprécisions. La qualité des mesures reposera en grande partie sur le soin que l'opérateur apportera à tous ces contrôles. La hauteur d'eau, dans la plupart des cas, étant faible, les erreurs restent cependant faibles. Par contre la pénétration du son dans le sédiment soulève une incertitude sur la hauteur d'eau mesurée, surtout lorsque les caractéristiques des sédiments changent. Les sédiments avant dragage sont généralement de type cohésif avec un pourcentage de matière organique important. Après le traitement biologique les caractéristiques des sédiments s'orienteront sur un type de sédiments beaucoup plus minéral de sorte qu'une différence de 10 cm entre deux sondes au même point n'est pas forcément significative.

#### 3.3.2 Les perches de sonde graduées

Les perches sont munies à leur partie inférieure d'un disque d'appui d'un certain diamètre. Ce disque évite à la perche de s'enfoncer dans le sédiment et permet d'obtenir une grande précision sur les hauteurs mesurées. La perche peut être appareillée, à son autre extrémité, pour des mesures directes (paragraphes 3.1.3), soit avec des miroirs pour

un système de mesures d'angles et de distances, soit avec une antenne GPS pour des mesures satellitaires.

### 3.3.3 Présentation des résultats

Les mesures obtenues seront exploitées sur un logiciel de traitement de données de sondage adapté. Les résultats seront présentés sous forme :

- de cartes bathymétriques précisant les points de sonde ainsi que les lignes isobathes obtenues après traitement des données, pour chaque relevé de la zone sondée (zone de traitement et zone périphérique),
- de cartes d'évolution des fonds entre chaque relevé : un choix de couleur adapté permettra de distinguer les zones présentant une évolution positive ou négative des profondeurs.

Il sera par ailleurs effectué pour chaque relevé un calcul de cubature par rapport au gabarit type de la zone considérée.

## 3.4. Suivi en continu des variations du niveau du sédiment

L'altimètre ALTUS a été développé par Ifremer en collaboration avec la société MICREL. Cet appareil fonctionne sur le principe d'un écho-sondeur utilisant une fréquence d'émission de 2 MHz. Ce système est entièrement étanche. Il est autonome et peut être immergé dans une colonne d'eau ne dépassant pas 20 m de hauteur. Le transducteur disposé au fond sur une potence permet de mesurer une distance sédiment-transducteur comprise entre 20 et 200 cm. La précision est de + ou - 5 mm pour la pleine gamme (200 cm) et de + ou - 2 mm pour une gamme inférieure à 50 cm. La cadence d'acquisition est programmable et la capacité d'enregistrement des mesures est de l'ordre de 3 mois avec un enregistrement toutes les 15 minutes. La programmation du module et le transfert des données sur ordinateur sont réalisés par simple contact avec un "crayon" magnétique sur le module. Toutes ces opérations (mouillage, transfert et dialogue) nécessitent l'aide d'un plongeur, le système pouvant rester immergé pendant toute la durée des travaux.

Ce système permet donc une mesure précise de la réduction de hauteur de sédiment à tout instant. Le point de mesure est ponctuel et ne permet pas de donner une image spatiale sur l'ensemble de la zone à traiter ; toutefois l'utilisation simultanée de quelques appareils de ce type et de jalons en PVC enfoncés profondément dans le sédiment peuvent permettre de vérifier l'efficacité du traitement biologique des sédiments pendant la durée des travaux.

### 3.5. Suivi des concentrations en matières sèches

La réduction de la matière organique par biotraitement doit s'accompagner d'une diminution de la rétention en eau et d'une augmentation de la concentration en matières sèches. La mesure ponctuelle des caractéristiques densimétriques des matériaux en place, après prélèvement direct, doit permettre de vérifier ces incidences.

**En résumé, les critères de suivi de l'efficacité du traitement retenus sont :**

- **la diminution des volumes à draguer,**
- **l'augmentation de la densité de matières sèches des sédiments traités.**

## 4. Suivi de l'impact

Le suivi a pour objectif d'évaluer l'impact potentiel du traitement sur la qualité physicochimique (turbidité), sanitaire et écotoxicologique du milieu portuaire et des zones contiguës. Il doit donc être adapté aux conditions locales et en particulier à la préservation des zones écologiquement sensibles et/ou exploitées pour leurs ressources biologiques ou touristiques (baignade).

### 4.1. Stratégie de suivi

La stratégie consistera à suivre l'évolution de la qualité du milieu avant, pendant et après le traitement, à partir de prélèvements d'eau, de sédiments et d'organismes indicateurs d'exposition ou de contamination. Des tests de toxicité seront utilisés pour vérifier l'évolution des propriétés toxicologiques du sédiment superficiel au cours du traitement.

**Les points de prélèvement** seront définis selon une maille n'excédant pas 50 mètres de côté (soit 9 à 10 points par hectare) et tenant compte des conditions locales, telles que leur représentativité par rapport à la variabilité de la zone, leur proximité avec des sites écologiquement ou économiquement sensibles et leur facilité d'accès.

**Un point de référence** hors de la zone susceptible d'être affectée, sera pris en considération.

**La fréquence des prélèvements** sera adaptée à la durée et au phasage du traitement, ainsi qu'aux compartiments considérés. Dans la mesure où la cinétique d'évolution de la hauteur du sédiment est présumée connue, la fréquence des prélèvements peut être plus importante pendant la phase de forte activité du traitement. Le tableau suivant donne des indications générales sur la stratégie d'ensemble et les adaptations possibles.

COMPARTIMENTS	PARAMETRES	FREQUENCES	ADAPTATIONS
<b>EAU</b> <u>Physicochimie</u>	température, salinité, O <sub>2</sub> dissous, turbidité	enregistrements continus	enregistrements continus sur 3 points et hebdomadaires sur les autres points
<u>Contaminants</u> - Particulaires	Hg, Pb, Cd, Cu, Zn, PCB, PAH	t <sub>0</sub> (pour mémoire) + tous les 15 jours jusqu'à l'arrêt du traitement	supprimer PCB et PAH si absence de contamination ou niveaux très faibles
- Dissous	Hg, Pb, Cd, Cu, Zn TBT, DBT, MBT, TPT	t <sub>0</sub> (pour mémoire) + tous les 15 jours jusqu'à l'arrêt du traitement	
<u>Bactériologie</u>	- <i>Escherichia coli</i> - entérocoques (si zone de baignade à proximité) - spores de micro- organismes anaérobies sulfito- réducteurs ou <i>Clostridium</i> <i>perfringens</i> (spores et cellules totales) - salmonelles (si présence dans le sédiment)	hebdomadaires	si sédiment en place contaminé
<b>SEDIMENTS</b> Carottes	granulométrie, NTK, COT, Hg, Pb, Cd, Cu, Zn, PCB, PAH, TBT, DBT, MBT, TPT	t <sub>0</sub> (pour mémoire) + tous les 15 jours jusqu'à l'arrêt du traitement	supprimer PCB et PAH si absence de contamination ou niveaux très faibles

<b>BIO INDICATEURS</b> Contamination	- <i>E. coli</i> - Entérocoques (si proximité baignades) - spores de microorganismes anaérobies sulfito-réducteurs ou <i>Clostridium perfringens</i> - salmonelles  Hg, Pb, Cd, Cu, Zn, PCB, PAH	t <sub>0</sub> (pour mémoire) t mi traitement t fin traitement  t <sub>0</sub> , t mi et fin de traitement t fin traitement + 1 mois	niveaux 0 - 50 cm
Exposition	EROD  AchE	t <sub>0</sub> , t mi et fin de traitement, t fin traitement + 1 mois	si présence PCB et PAH  si présence de neurotoxiques
<b>TOXICITE</b> Sédiment superficiel	tests sur embryons de bivalves (moules) ou oursins, ou microtox	t <sub>0</sub> et fin de traitement	sur 3 des points de prélèvements répartis dans la zone de traitement

#### 4.2. Prélèvements et conditionnement des échantillons

Eau :

Contaminants : effectués à la bouteille voir lignes directrices en annexe 1

Bactériologie : Les eaux sont prélevées avec des bouteilles stériles. Les échantillons sont conservés à 4 °C ou en glacière et analysés dans les 24 heures qui suivent le prélèvement.

#### Sédiments :

Prélèvement de surface à la benne Eckmann ou carottier boîte type "petit Reineck" en acier inoxydable. Carottages en profondeur par carottier ou équivalent en acier inoxydable.

Le matériel destiné :

- aux mesures granulométriques et de COT est prélevé dans la partie la plus périphérique des carottes ;
- à l'analyse des métaux est prélevé avec une spatule en polyéthylène dans la partie centrale et stocké dans des piluliers en polystyrène préalablement lavés à l'acide,
- à l'analyse des contaminants organiques est prélevé avec une spatule en acier inoxydable et stockée en barquettes en aluminium préalablement calcinées à 450°C pendant huit heures.

Les échantillons destinés aux analyses chimiques sont congelés après prélèvement puis lyophilisés au laboratoire (7).

Les sédiments pour les analyses bactériologiques peuvent être prélevés par les bennes ou carottiers utilisés pour les prélèvements de sédiments pour les analyses chimiques. Cependant, ces appareils doivent être lavés, passés à l'alcool à 70° et rincés à l'eau distillée stérile avant leur utilisation. Les échantillons de sédiment sont prélevés plutôt dans la partie centrale de la carotte. Des cuillères inox ou spatules stériles peuvent également être utilisées pour des prélèvements de sédiments superficiels. Les sédiments sont ensuite placés dans des flacons stériles (genre pot à coprologie), stockés à 4 °C et analysés dans les 24 heures qui suivent les prélèvements.

### 4.3. Utilisation de bioindicateurs de contamination

Les techniques dites des biointégrateurs quantitatifs utilisent la capacité des mollusques bivalves (moules) à accumuler dans leurs tissus les contaminants chimiques en quantités proportionnelles à leur concentration dans le milieu. Des protocoles ont été mis au point (8) pour l'utilisation de moules transplantées dans des zones où elles ne vivent pas naturellement. Ces protocoles peuvent être mis à profit pour évaluer un éventuel accroissement de contamination des eaux lié au traitement.

#### ***Nombre et positionnement des stations***

A définir en fonction du site ; les stations devront être suffisamment nombreuses pour rendre compte de l'influence directe du traitement et de ses effets de proximité (zones sous influence des apports portuaires). Une zone de référence choisie hors influence portuaire est souhaitable. Lorsqu'elles existent les données des stations RNO peuvent constituer une référence appropriée.

### **Caractéristiques des échantillons de moule**

Les lots de moules expérimentaux doivent provenir de secteurs réputés faiblement contaminés. Il est indispensable que les lots aient la même origine. Pour garantir l'homogénéité des lots, une taille de 45 à 55 mm correspondant à des jeunes adultes de 18 mois environ est recommandée. Ces critères correspondent à des individus mécaniquement calibrés sur la hauteur de la coquille avec une grille de 19 mm.

Les échantillons sont conditionnés dans des poches conchylicoles compartimentées pour faciliter leur développement et les prélèvements selon le plan d'échantillonnage retenu. Il est recommandé de remettre les poches en stabulation sur leur site d'origine quinze jours avant leur utilisation, de manière à permettre aux moules de se regrapper dans de bonnes conditions et éviter un stress supplémentaire lors des opérations de pose.

Pour chaque prélèvement la quantité de moules nécessaire est de 3 kg environ. Si nécessaire plusieurs poches peuvent être utilisées.

### **Période et durée d'immersion**

Il est préférable, pour des raisons de stabilité physiologique, de procéder aux immersions pendant le repos sexuel, lequel dépend de l'espèce utilisée (*Mytilus galloprovincialis*, *Mytilus edulis*) et des conditions climatiques des régions considérées. La durée maximale d'immersion peut atteindre 4 mois.

### **Mode de stabulation des échantillons**

En zone ouverte, plusieurs dispositifs techniques peuvent être retenus pour fixer les échantillon de moules :

- un mouillage de surface : constitué d'une bouée maintenue sur le fond par une chaîne reliée à une ancre plate. La poche conchylicole est reliée à la partie dormante de la chaîne de fond et maintenue en pleine eau à la profondeur désirée grâce à un flotteur de 5 à 11 litres selon la quantité de moule nécessaire au plan d'expérience .
- un mouillage de subsurface constitué d'une poche conchylicole reliée à un lest de 35 à 45 kg. La poche est maintenue en pleine eau à la profondeur désirée grâce à un flotteur de 5 à 11 litres selon la quantité de moules nécessaire au plan d'expérience .
- les lots expérimentaux peuvent être également fixés sur des lignes de mouillage existantes à condition que les matériaux des structures n'interagissent pas sur la contamination du milieu. La poche est maintenue en pleine eau à la profondeur désirée grâce à un flotteur de 5 à 11 litres selon la quantité de moules nécessaire au plan d'expérience .

La profondeur de stabulation ne doit pas excéder 15 mètres. Il est par ailleurs préférable de ne pas stabuler les échantillons trop près du fond (5 mètres) pour éviter un éventuel envasement des poches en relation avec les courants ou la marée.

Plusieurs paramètres biologiques, mortalité, poids sec de chair, poids sec de coquille, indice de condition, sont nécessaires pour l'interprétation des données de contamination et doivent être mesurés sur les lots soumis à l'analyse. Les protocoles de mesure sont indiqués en annexe 2.

#### **4.4. Utilisation de bioindicateurs d'exposition**

Dans la mesure où les sédiments à traiter sont réputés contaminés par des substances polyaromatiques (PCB, PAH), ou neurotoxiques (pesticides organochlorés), il peut être intéressant d'évaluer leur impact à partir d'indicateurs biochimiques d'exposition : EROD, Acétylcholinestérase (AchE). Les analyses correspondantes peuvent être réalisées sur des échantillons de moules autochtones, ou sur ceux implantés pour l'évaluation de la contamination (cf 4.3 supra).

#### **4.5. Evaluation de la toxicité**

Dans le cadre spécifique des boues de dragage, il existe peu de bio-essais normalisés et de méthodes d'évaluation de la toxicité. Trois types de tests peuvent cependant être retenus pour évaluer les effets des sédiments, selon que l'on s'intéresse à la toxicité du sédiment total, à celle de ses eaux interstitielles ou aux contaminants extractibles en milieu aqueux. Les tests portant sur le sédiment total donnent une détermination directe de la toxicité des substances chimiques présentes ; ceux sur l'eau interstitielle ou les extraits aqueux évaluent les effets toxiques de la fraction de contaminants solubilisée. Cette dernière non adsorbée sur les particules est la plus biodisponible et donc directement responsable des effets observés sur les organismes benthiques.

**Recommandation 3 : Afin de mettre en évidence un éventuel enrichissement du sédiment résiduel en contaminants, du fait de la dégradation de la matière organique à laquelle ils sont associés, il est recommandé d'évaluer les modifications des propriétés écotoxicologiques des sédiments avant et après traitement, en utilisant les protocoles décrits en annexe 3.**

**En résumé, les critères d'estimation des impacts du traitement retenus sont :**

- **la modifications des concentrations en contaminants dans les phases dissoutes et particulaires de la colonne d'eau et des sédiments après traitement,**
- **la modifications de la toxicité des sédiments et eaux interstitielles en relation avec le traitement,**
- **la modification de la contamination au point de référence en relation avec le traitement.**

## 5. Bibliographie

- (1) De Meyer C.P., Charlier R.H., De Vos K., Malherbe B., 1997. *In situ* bioremediation of contaminated sediments. *Sea Technology*, 57-59.
- (2) Ferdinandy van Vlerken M.M.A., 1997. Chances for biological techniques in sediment bioremediation. International Conference on Contaminated Sediments, Rotterdam september 7-11, 1997, vol. 1, 275- 283.
- (3) Alzieu Cl., 1999. Gestion des sédiments portuaires. *In : Dragages et environnement marin : état des connaissances*, Edit IFREMER Plouzané, p. 167- 186.
- (4) Erard-Le Denn E., 1999. Phytoplancton toxique et sédiments. *In : Dragages et environnement marin : état des connaissances*, Edit IFREMER Plouzané, p. 167- 186.
- (5) Crenn I. *et al.*, 1999. Microbiologie sanitaire des sédiments. *In : Dragages et environnement marin : état des connaissances*, Edit IFREMER Plouzané, p. 37 – 55.
- (6) Quiniou F. et Alzieu C., 1999. L'analyse des risques chimiques appliquée aux dragages. *In : Dragages et environnement marin : état des connaissances*, Edit IFREMER Plouzané, p.1276 147.
- (7) Le RNO : les contaminants chimiques dans les sédiments du littoral méditerranéen, édition 1998, p.9-52.
- (8) Andral B. et Stanisière J. Y. 1999. Réseau Intégrateurs Biologiques RINBIO. Evaluation de la qualité des eaux basée sur l'utilisation de stations artificielles de moule en Méditerranée : Résultats de la campagne 1998. Rapport IFREMER DEL/TL 99-038. Conventions n° 991452 et 992461 - Agence de l'Eau Rhône Méditerranée Corse.

## Annexes

### Annexe 1 : Méthodes de prélèvement et d'analyse des paramètres physicochimiques et des contaminants applicables aux sédiments

1. A. - *Extrait de : Méthodologie d'échantillonnage d'eaux naturelles en vue du dosage d'éléments trace par Daniel COSSA – novembre 1999*

#### 1. A. 1.- Lignes directrices dans le domaine des prélèvements d'eaux en vue du dosage des éléments traces

##### 1 - Matériaux

Deux types de matière plastique ont été sélectionnés : le polyéthylène basse densité (LDPE) et les téflons (PFA, FEP et PTFE). Le LDPE présente l'avantage d'un faible contenu en impureté (étant obtenu par simple compression de l'éthylène) et d'un faible coût. Le téflon présente l'avantage d'être relativement imperméable aux gaz et de supporter le nettoyage aux acides forts et aux solvants organiques ce qui le rend utilisable non seulement pour le prélèvement de l'eau en vue du dosage des contaminants élémentaires mais aussi pour celui des contaminants organiques. La quasi-totalité des outils et contenants en contact direct ou indirect avec l'échantillon d'eau est en l'un ou l'autre de ces deux matériaux. Il existe trois exceptions à ce principe : les porte-filtres en polypropylène, les membranes de filtration en polycarbonate et les boîtes de pétri en polystyrène utilisées pour la conservation des filtres. Qu'elle qu'en soit sa nature tout ce matériel est nettoyé selon le protocole décrit plus loin. Une fois propre il est emballé dans deux sacs en LDPE jusqu'à son utilisation. Les sacs sont rincés à l'eau déminéralisée avant usage.

##### 2 - Pompage

Comme le font remarquer Howard et Statham (1993), le résultat de la chaîne des opérations de prélèvement ne sera pas plus précis que ce que le permet son maillon le plus faible. Cette Lapalissade a pour corollaire la nécessité de réduire au minimum le nombre d'opération (transfert et contenants successifs). La méthode adoptée ici consiste en l'utilisation d'un système de pompage tout téflon (PFA), qui privilégie un rinçage abondant de l'échantillonneur comme moyen d'éviter les contaminations. Ce dispositif a été utilisé avec succès pour l'échantillonnage d'eaux parmi les moins contaminées de la planète, les rivières sibériennes et les eaux arctiques. Les concentrations mesurées dans ces eaux sous ces conditions de prélèvement sont aussi basses

que 0,6 ng/l et 0,3 ng/l respectivement de cadmium et de mercure (Dai et Martin, 1995 ; Coquery *et al.*, 1995).

### 3 - Transport

La partition de certains éléments réactifs entre les phases dissoute et particulaire peut évoluer tant que la filtration n'est pas effectuée. Si cette dernière ne peut être effectuée sur le terrain, l'échantillon d'eau non filtrée doit être rapporté au laboratoire dans les plus brefs délais et maintenu pendant le transport à basse température (+ 4° C). Pour limiter l'adsorption des espèces chimiques chargées sur les parois du flacon pendant le transport, il est préférable de choisir un flaconnage Téflon (PFA ou FEP) plutôt que polyéthylène.

### 4 - Filtration

Trois types de filtres sont disponibles sur le marché. Les filtres en fibres de cellulose ou de verre, les filtres en épaisseur (ex. : polysulfone) et les membranes fines en polycarbonates. Ils se différencient par des natures chimiques, des états de surface, pores, structures internes, des porosités et des tailles différentes. Les filtres en fibre de verre, trop chargés en métaux, ne sont pas utilisables pour les dosages élémentaires. Les membranes en polycarbonate offrent une meilleure définition du calibre des pores (Buffle *et al.*, 1992). Ce type de filtre présente aussi l'avantage de faibles changements de poids au lavage. Ils sont aussi aisément nettoyables aux acides et fournissent ainsi des niveaux de blancs réduits et reproductibles (Mart, 1979) ; c'est pourquoi leur usage est recommandé pour la filtration des échantillons destinés aux dosages des métaux en traces. En raison de l'absence de groupement ionisable, les membranes en polycarbonate sont celles qui adsorbent le moins les ions (Gardner, 1982). Ces membranes présentent, toutefois, l'inconvénient de colmater assez rapidement. Ce colmatage est relativement brusque comparativement aux autres types de filtres. Il n'est pas précédé par une importante formation de gel comme les filtres en fibres (Buffle *et al.*, 1992). Pour prévenir le colmatage une filtration lente est recommandée. De plus, une pression inférieure à 50 kPa est conseillée si l'on veut éviter la rupture des cellules phytoplanctoniques (Florence et Batley, 1980). Enfin, pour limiter les processus d'agrégation sur la membrane, la filtration doit aussi être relativement lente. Buffle *et al.* (1992) proposent une gamme de flux optimale de  $3 \cdot 10^{-4}$  à  $3 \cdot 10^{-3}$  cm s<sup>-1</sup>. De plus la filtration doit être effectuée aussi rapidement que possible après le prélèvement afin d'éviter des échanges de phase. Pour minimiser ce processus on maintient l'échantillon à basse température dans un contenant hydrophobe pendant le transport ; dans la pratique à + 4 °C dans des flacons en téflon (PFA). En résumé pour les échantillons destinés aux dosage des métaux, il est recommandé que la filtration soit effectuée sous pression d'azote Ultrapur (pression 50 kPa) sur des membranes en polycarbonate (Nuclepore, 0,4 µm) à la vitesse d'environ  $2 \cdot 10^{-3}$  cm s<sup>-1</sup>,

dans un environnement classe 100 (norme US), c'est-à-dire dans un environnement contenant moins de 100 particules de taille supérieure à 0,2 µm par pied cube d'air. Cette technique a été largement validée en milieu dulcicole comme en milieu marin (ex. : Chiffolleau *et al.*, 1993 ; Morley *et al.*, 1988).

## 5 - Stockage

Les travaux du Conseil National des Recherches du Canada (Sturgeon et Berman, 1987) ont montré que le stockage d'eau filtrée acidifiée à pH 1-2 dans des flacons en LDPE était adéquate pour la conservation d'échantillons pendant plusieurs années. C'est de cette manière que sont conservées les eaux qui servent de Matériau de Référence Certifié produits dans le cadre du Programme PÉCAM du CNRC cogéré par l'Institut de l'environnement à Ottawa et celui des Biosciences marines à Halifax. Elle a été adoptée pour les échantillons naturels.

### 1. A. 2.- Protocoles de prélèvement, filtration et conservation des échantillons destinés aux dosages des éléments traces<sup>1</sup>

#### 1 - Préparation

##### **Lavage du matériel** (flacons, système de filtration et pompe)

Après un lavage au détergent et un rinçage à l'eau déionisée (ED, type Milli-Q-UV-Plus, 18,2 megaohms), l'ensemble du matériel en polyéthylène basse densité (LDPE) ou téflon neuf est mis à séjourner une semaine dans HNO<sub>3</sub> (Grade ACS) (50 %), est rincé à ED puis mis à séjourner une semaine supplémentaire dans HNO<sub>3</sub> (Grade ACS) (10 %), puis rincé abondamment à ED. Lors de nettoyages subséquents du flaconnage et de la pompe, seul le lavage à HNO<sub>3</sub> (10 %, 3 jours au moins) et le rinçage sont requis.

Après le nettoyage, les flacons sont gardés remplis d'eau ED acidifiée (HNO<sub>3</sub> ou HCl haute pureté, Seastar, 0,1 % v/v) et enveloppés dans deux sacs en PE. Le système de filtration est gardé dans un sac en PE. Suite au rinçage abondant de la pompe, les tubes en téflon sont déconnectés de celle-ci. Tous les orifices de la pompe et des tubes sont recouverts d'un sac en PE. Enfin, la pompe est recouverte d'un sac de PE supplémentaire. Les porte-filtres en polypropylène, quant à eux, sont mis à séjourner une semaine uniquement dans HNO<sub>3</sub> (10 %), puis rincés abondamment à ED. Lors de nettoyages subséquents les porte-filtres sont uniquement rincés à l'eau ED.

##### **Nettoyage des filtres**

Les filtres doivent toujours être manipulés avec des pinces en téflon prélavées. Dans des réacteurs en téflon (PFA, 120 ml) prélavés (voir précédemment) on enferme 10 membranes filtrantes (Nuclepore, 0.4 µm

<sup>1</sup> L'opérateur doit porter des gants en polyéthylène à toutes les étapes du protocole.

de pore, 47 mm de diamètre) avec de l'eau ED acidifiée à 10 % (v/v) par HCl concentré de haute pureté, Seastar). On laisse en contact une semaine, puis on les rince abondamment à l'eau ED. Le rinçage consiste en une succession de trempages à l'eau ED des filtres dans les mêmes réacteurs, cela pendant plusieurs jours jusqu'à l'obtention d'une eau de rinçage à pH au moins égal à 6.

Les filtres nettoyés encore humides, sont séparés et mis individuellement dans des boîtes de pétri hermétiques en polystyrène. Ils sont séchés dans les boîtes, couvercles ouverts, à l'étuve classe 100 à 65° C pendant 12 heures. Après la période de séchage, les filtres sont conservés dans un dessiccateur jusqu'au moment de la pesée, qui peut être effectuée une heure ou plus après la sortie de l'étuve. Le desséchant utilisé est le CaCl<sub>2</sub> ; l'usage de "Déirite" est déconseillé car ce produit peut contenir des sels de cobalt susceptibles de contaminer les filtres. Toutes ces opérations, de lavage comme de séchage et ensuite de pesée de filtre, se font avec des gants en PE en prenant soin de ne pas exposer les filtres en dehors d'une ambiance contrôlée (hotte à flux laminaire de classe 100). L'idéal consistant bien sûr à travailler en salle blanche. Avant la pesée les filtres sont déchargés par passage près d'un "pistolet antistatique" (Zerostat 3). Les filtres secs sont pesés sur une balance électromagnétique (Cahn, modèle 4700) et remis dans les boîtes de pétri. Les boîtes de pétri sont conservées dans le dessiccateur jusqu'à leur utilisation.

## 2 - Prélèvements des échantillons

### **Principe de la méthode**

Les tubes en téflon lavés (PFA, 0.25 pouces de diamètre) dont les extrémités ont été protégées dans des sacs en PE pendant le transport, sont connectés à la pompe pneumatique toute en téflon. Le système de pompage est alimenté par de l'azote à une pression de 20 à 40 psi.

### **Séquence des opérations de prélèvement**

Lors du prélèvement, toutes les étapes doivent être réalisées avec des gants en PE. L'opérateur doit s'assurer de les changer souvent afin de minimiser les risques de contamination. De plus, lorsque les prélèvements sont faits à bord d'une embarcation à moteur, ce dernier doit être arrêté pendant la durée du pompage. On doit également s'assurer de l'absence de traces d'huile ou d'essence à la surface de l'eau.

- Brancher les tubes d'échantillonnage en téflon (entrée et sortie) à la pompe et mettre la valve anti-retour à une profondeur d'environ 1 mètre sous la surface de l'eau.
- Fixer la pression d'azote permettant d'actionner la pompe à 30 psi.
- Rincer abondamment tuyau et pompe avec l'eau du milieu (un minimum de trois minutes).
- Vider le flacon récepteur (flacon en téflon-PFA de 5 litres prélavé) de son contenu (HCl 0,1% v/v haute pureté, Seastar). Le flacon est

gardé dans ses deux enveloppes de PE pendant toute la durée du prélèvement.

- Rincer 3 fois le flacon récepteur et son bouchon. Les contacts de l'échantillon avec l'air sont minimisés en utilisant un sac en PE enveloppant le flacon, ce pour éviter la contamination atmosphérique.
- Boucher rapidement le flacon après remplissage ainsi que les deux sacs en PE.
- Les échantillons recueillis doivent parvenir au laboratoire dans les plus brefs délais (en général moins de 4 heures). Le transport est effectué de façon à ce que les échantillons soient maintenus à basse température dans une glacière (+ 4 °C).
- L'échantillon est filtré dès son arrivée en laboratoire.

Une fois le prélèvement terminé, un soin particulier doit être porté pour démonter le système de pompage afin d'éviter la contamination de celui-ci. Toutes les extrémités de la pompe et des tubes en téflon doivent être recouvertes d'un sac en PE lors du transport.

### 3 - Filtration

#### **Principe de la méthode**

Toutes les filtrations sont effectuées sous hotte à flux laminaire classe 100 (norme US), l'opérateur portant des gants en polyéthylène (LDPE) pour toutes les opérations. Les échantillons sont filtrés sur des membranes de 47 mm de diamètre prélavées. Le système de filtration est alimenté par de l'azote ultra-pur à une pression <15 psi. Le filtrat est acidifié et les filtres sont conservés au congélateur jusqu'à l'étape de l'analyse.

#### **Séquence des opérations de filtration pour les métaux**

L'installation des filtres doit se faire avec des pinces en téflon.

- Humecter le support de filtre avec de l'ED fraîche.
- Installer la membrane en polycarbonate (Nuclepore, 0,4 µm) prépesée sur le support de filtre en polypropylène en évitant la formation de bulles d'air.
- Préparer le flacon (500 mL en LDPE) préalablement nettoyé servant à recueillir le filtrat en le rinçant abondamment à l'eau ED.
- Peser le flacon vide. (Afin d'éviter les risques de contamination, le flacon doit être gardé dans un sac en PE au moment de la pesée).
- Placer un bécher en téflon sous l'ampoule à filtration.
- Homogénéiser l'échantillon et transvider approximativement 500 mL dans l'ampoule à filtration.
- Mettre la pression de l'azote ultra-pur entre 5 et 10 psi.
- Les premiers mL (entre 10 et 20 mL) de filtrat servent à rincer le filtre et sont recueillis dans le bécher en téflon.
- Sans arrêter la filtration, remplacer le bécher par le flacon de LDPE.
- Noter le volume d'eau recueillie dans le bécher.
- Utiliser le filtrat pour rincer le flacon de LDPE (3 rinçages). Noter le volume de filtrat total utilisé lors des rinçages.

- Filtrer le restant du volume présent dans l'ampoule (environ 400 mL).
- Si le filtre n'est pas encore colmaté, ajouter un certain volume d'échantillon au besoin et noter le volume filtré.
- Une fois la filtration terminée, peser de nouveau le flacon dans son sac en PE.
- Noter le volume d'eau filtrée dans le flacon en LDPE calculé sur la base de la différence de poids du flacon avant et après filtration et en supposant une densité égale à un.
- Noter le volume total filtré. Ce volume, correspondant à la quantité de matières en suspension présentes sur la membrane filtrante, est la somme du volume de tous les rinçages et du volume de filtrat dans le flacon.
- Acidifier le filtrat dans le flacon pour amener le pH autour de 2 (100 µL de HNO<sub>3</sub> de haute pureté Seastar par 100 mL d'échantillon).
- Fermer hermétiquement le flacon et le garder enveloppé dans deux sacs en PE. Les filtrats acidifiés peuvent être conservés plusieurs mois à la température ambiante avant d'être analysés.
- Rincer les parois de l'ampoule à filtration avec environ 20 mL d'ED. Ce volume d'eau n'est pas inclus dans le calcul du volume total filtré.
- Continuer la filtration quelques minutes jusqu'à ce que toute l'eau sur le filtre soit bien drainée.
- Enlever le filtre à l'aide de pince en téflon, le replier en quatre et le mettre dans une boîte de pétri en polystyrène qui est mise au congélateur jusqu'au moment de l'analyse. Garder le filtre enveloppé dans deux sacs en PE.
- Rincer abondamment le système de filtration à l'ED et au besoin à l'éthanol.

### ***Séquence des opérations de filtration pour le mercure***

Les étapes de filtration décrites ci-dessous sont tirées de Quémerais et Cossa (1995).

La filtration des échantillons doit s'effectuer moins de 4 heures après le prélèvement, sous une hotte à flux laminaire de Classe 100 ou dans une salle blanche.

- Installer un filtre GF/F ou Fluoropore dans le porte-filtre situé sous l'ampoule à filtration.
- Mouiller le filtre à l'eau Milli-Q U.V. fraîche et bien l'étaler sur le porte-filtre.
- Verser une partie aliquote de l'échantillon préalablement homogénéisée dans l'ampoule à filtration.
- Bien fermer l'ampoule.
- Ouvrir la vanne 3 voies de façon à mettre la pression d'azote (0,5 bar) dans l'ampoule à filtration.
- Récolter le filtrat dans une bouteille en téflon préalablement lavée.
- Rincer la bouteille 3 fois avec les premiers mL du filtrat puis la laisser se remplir.

- Acidifier le filtrat à 1 % (v/v) avec HCl purifié de type Seastar.
- Bien fermer la bouteille à l'aide de la pince multiprise et la mettre dans deux sacs en PE.
- Enlever le porte-filtre fixé sous l'ampoule à filtration et l'ouvrir.
- Enlever le filtre et le déposer dans une boîte de pétri, noter le numéro d'échantillon sur la boîte et la mettre dans deux sacs en PE.
- Rincer le porte-filtre à l'eau Milli-Q UV Plus.
- Démontez l'ampoule et la rincer abondamment à l'eau Milli-Q UV Plus.
- Réinstaller le porte-filtre et envelopper tout le système de filtration dans un sac en PE.

Il faut récupérer les résidus de filtrat utilisés pour le rinçage de la bouteille et noter leur volume pour connaître exactement le volume filtré. Les filtrats (phase dissoute) peuvent être conservés plusieurs mois à l'abri de la lumière et les filtres (phase particulaire) doivent être mis tels quels au congélateur (- 20° C) où ils peuvent être conservés pendant environ deux mois. Avant utilisation, les filtres sont séchés dans une étuve de Classe 100 à 65° C pendant 12 à 24 heures. Ils sont ensuite pesés sur une balance de précision en notant le nouveau poids dans le cahier de filtration. Cette étape permet la détermination de la quantité exacte de matières en suspension présente sur le filtre. Les filtres sont ensuite conservés dans un dessiccateur jusqu'à la digestion.

#### 1. B. - Références

- Auger, D. 1989. Méthode de dosage du cadmium, du cuivre, du plomb et du zinc dans la chair de poissons. Rap Ifremer DERO-89-07-MR/Nantes.
- Sanjuan, J. et D. Cossa. 1993. Dosage automatique du mercure total dans les organismes marins par fluorescence atomique. Rap. Ifremer R.INT.DEL/93-12/Nantes.
- Chiffolleau, J.F. et D. Auger. 1990. Méthode de dosage de Cd, Pb, Cu, Zn, Ni, Co dissous dans l'eau. Rap. Ifremer DERO-90-09-MR/Nantes
- Cossa, D. 1999. Méthodologie d'échantillonnage d'eaux naturelles en vue du dosage d'éléments à l'état de trace. Rapport Ifremer non publié DEL/PC RA105.
- Quémerais, B. et D. Cossa. 1999. Dosage du mercure dissous et particulaire au niveau picomolaire dans les eaux naturelles. Rapport Ifremer non publié DEL/PC RA106.
- Chiffolleau, J.F. et I. Truquet. 1994. Nouvelle méthode de dosage de quelques métaux-traces dans les sédiments et les matières en suspension. Rap. Ifremer R.INT.DEL/94.08/Nantes.
- Cossa, D. et G. Touchard. 1997. Dosage du méthylmercure dans les mollusques. Rap. Ifremer non publié DEL/PC RA107. 19 pages.
- Cossa, D. 1987. Les éléments trace dans l'eau de mer : leurs niveaux de concentration et leurs mesures. Rap. Ifremer DERO-87-04-MR.

## **Annexe 2 : Protocoles de mesure des paramètres biologiques et d'analyse des contaminants dans les tissus de mollusques**

### **1 - Mortalité**

Pour chaque compartiment la mortalité des lots est estimée par comptage des individus vivants et des coquilles vides.

### **2 - Biométrie**

Détermination de l'*indice de condition (poids sec de chair / poids sec de coquille)*

30 individus environ sont prélevés dans le compartiment de la poche en aveugle, puis stockés au réfrigérateur avant mesure. Les échantillons peuvent être congelés si nécessaire.

Chaque individu est écoquillé. Lorsque les individus ont été congelés il est important de récupérer l'écoulement cytoplasmique résultant de l'ouverture. Les chairs sont mises en coupelle (écoulement cytoplasmique compris). Les chairs et les coquilles sont mises à sécher séparément à l'étuve à 60°C pendant 48 heures puis pesées au milligramme.

### **3 - Contamination chimique**

Sur site, environ 50 individus sont prélevés de façon aléatoire dans le compartiment central de la poche et après dégrappage et lavage, stockés au réfrigérateur. Dans les 24 heures chaque échantillon est écoquillé (pas de sélection par la taille) au laboratoire jusqu'à remplir 2 piluliers selon les procédures préconisées par le RNO. Les piluliers sont conservés au congélateur avant analyse.

#### **3.1. Contaminants métalliques**

Pb - Zn - Cd - Cu : La préparation est effectuée suivant le document IFREMER DERO 89-07-MR sur une prise d'essai de 0,5 gramme. Les dosages sont réalisés par spectrométrie d'absorption atomique four ou flamme suivant la concentration de l'élément à analyser.

Hg : sur la minéralisation effectuée pour les éléments Pb - Zn - Cd et Cu, une prise d'essai de 10 ml est effectuée. Après bromisation, le dosage est effectué par fluorescence atomique après formation des vapeurs froides en présence de chlorure stanneux.

### **3.2. Contaminants organiques.**

PCB : les extraits organiques sont purifiés par de l'acide sulfurique concentré et par du mercure et du cuivre. Après ajout de l'étalon interne (décachlorobiphényle) l'analyse est réalisée par chromatographie capillaire en phase gazeuse couplée à un détecteur à capture d'électrons.

Hydrocarbures Polycycliques Aromatiques (HAP) : les extraits organiques sont purifiés sur colonne de gel de silice (Seppak). Après reprise des extraits par de l'acétonitrile, l'analyse est réalisée par chromatographie haute performance couplée à un détecteur à fluorescence de longueur d'onde d'excitation et d'émission programmable.

### Annexe 3 : Protocoles des tests de toxicité applicables aux sédiments : extrait de (6)

#### Bivalves

##### *Développement embryonnaire*

Ce test de toxicité aiguë qui est préconisé par le Conseil International pour l'Exploration de la Mer a fait l'objet d'un essai d'intercalibration européen en 1991. Il est comparable à la norme ASTM (E 724-94) et, bien que non normalisé, largement employé en Europe avec les espèces *Mytilus edulis* et *Crassostrea gigas* et recommandé en France par Géode pour évaluer la toxicité potentielle des sédiments destinés au dragage. Le développement embryonnaire d'œufs fécondés (10 à 15 minutes après la fécondation) est réalisé dans les milieux à tester, afin de déterminer les concentrations qui induisent une anomalie du développement, voire un blocage de ce dernier. Les essais se déroulent sur 24 h avec les embryons d'huîtres et 48 h avec ceux de moules. Les géniteurs matures, âgés de un à trois ans, proviennent d'une éclosure ou du milieu naturel après vérification de la qualité de la zone de provenance. Les gamètes sont obtenus par stimulation thermique : immersion alternative, de 30 à 45 mn, en eau de mer de 18° C à 28° C. Dès l'émission des gamètes, les géniteurs sont isolés dans des béciers d'eau de mer stérile : eau de mer de référence ou eau de mer de synthèse filtrée à 0,2 µm. Après émission, les ovocytes des différents géniteurs sont filtrés sur soie de 100 µm pour éliminer les débris et transférés dans deux litres d'eau de mer filtrée propre. Le sperme est tamisé sur une soie de 32 µm et utilisé non dilué. La fécondation est effectuée dans les béciers contenant les ovocytes en utilisant un seul couple de géniteur pour chaque fécondation. Le taux de réussite de la fécondation est vérifié sous microscope, afin de déterminer le lot qui sera employé pour les tests. Quinze minutes après la fécondation, sous agitation douce, un volume correspondant à 24 000 œufs par litre est transféré par pipette automatique aux milieux à tester. Chaque milieu et / ou concentration est testé à raison de cinq réplicats dans des pots de 25 à 100 ml, plus dix témoins. En fin d'expérience, le taux de larves anormales est déterminé sur 100 larves par réplicat. L'expérience est recommencée si le taux d'anomalies dans les témoins dépasse 20 %. Les résultats sont exprimés en CE100, CE50 ou CE20 selon la toxicité induite. Les LOEC (concentration la plus faible ayant montré un effet) et NOEC (concentration n'entraînant pas d'effet) peuvent aussi être calculées. Les anomalies peuvent être classées selon différents critères : embryon n'ayant pas atteint le stade larve "D", larve avec une coquille irrégulière, larve dont le manteau est hypertrophié ou atrophié.

### **Spermiotoxicité**

Les ovocytes sont obtenus et sélectionnés comme précédemment. Le sperme devant être utilisé "sec" est prélevé directement sur le géniteur après ouverture des valves et introduit dans les milieux à tester pendant des périodes de 5, 10, 15 ou 30 mn (à raison de 20 µl pour 5 ml de milieu). Ensuite, les ovocytes préparés en eau de mer de référence ou de synthèse sont fécondés à l'aide du sperme pré-traité (à raison de 30 µl pour 3 ml). Le taux de réussite de la fécondation est observé pendant deux heures, lorsque les premières segmentations sont intervenues. Comme pour l'embryotoxicité, les essais sont effectués en 5 réplicats. Les résultats, comparés aux témoins, sont exprimés en pourcentage de fécondation et exprimés en CE20, CE50 ou CE10, ou LOEC et NOEC. Les tests de spermiotoxicité et embryotoxicité sont réalisés dans les conditions suivantes :

- pas d'alimentation pendant la durée du développement embryonnaire ;
- température et durée : 24 h à 24°C ± 1 pour l'huître creuse, 48 h à 20°C ± 1 pour la moule ;
- salinité : 25 à 35 ‰, pH 7,5 à 8,5, taux d'oxygène > 90 % de la saturation.

Tous les paramètres sont mesurés en début et fin d'essais. Ce test est proposé pour évaluer la toxicité potentielle du sédiment en contact direct, d'extraits aqueux ou organiques, ou de l'eau interstitielle. Le sulfate de cuivre (Cu SO<sub>4</sub>) est employé comme toxique de référence.

## **Oursins**

### **Développement embryonnaire**

Ce test de toxicité aiguë, ne fait pas encore l'objet d'une norme en Europe même s'il y est couramment employé ; il est très proche de ceux préconisés par la norme ASTM (E 1563-95). Deux espèces peuvent être utilisées : *Spærechinus granularis* et *Paracentrotus lividus*.

Comme pour les essais bivalves, ce bio-essai consiste à réaliser le développement embryonnaire d'œufs fécondés (10 à 15 minutes après la fécondation), dans les milieux à tester, afin de déterminer les concentrations qui induisent une anomalie du développement voire un blocage de ce dernier. Les essais se déroulent sur 48 h à 20-21°C pour *P. lividus* et 72 à 96 h à 16-18°C pour *S. granularis*. Les géniteurs matures proviennent d'un élevage ou du milieu naturel après vérification de la qualité de la zone de provenance. Les gamètes sont obtenus par stimulation chimique : injection d'une solution de KCl (*P. lividus*) ou d'acétylcholine (*S. granularis*) dans la cavité cœlomique des géniteurs soigneusement lavés à l'eau de mer stérile. Dès émission des gamètes, les femelles sont placées au-dessus d'un béccher contenant de l'eau de mer stérile (eau de mer de référence ou eau de mer de synthèse filtrée à 0,2 µm), alors que le sperme est récupéré "sec" et conservé à 0° C.

Après émission, les ovocytes des différents géniteurs sont filtrés sur soie de 200 µm pour éliminer les débris et transférés dans 500 ml eau de mer filtrée propre, puis décantés et rincés deux fois, afin d'éliminer les ovocytes de moins bonne qualité qui sont plus légers. Le sperme est dilué, à raison de 40 µl pour 2 ml d'eau de mer. La fécondation est effectuée dans les béchers contenant les ovocytes en utilisant un seul couple de géniteur pour chaque fécondation. Le taux de réussite de la fécondation, vérifié sous microscope, détermine le lot qui sera employé pour les tests. Quinze minutes après la fécondation, sous agitation douce, un volume correspondant à 24 000 œufs par litre est transféré par pipette automatique aux milieux à tester. Chaque milieu et / ou concentration est testé à raison de cinq réplicats dans des pots de 25 à 100 ml, plus dix témoins. En fin d'expérience, le taux de larves anormales est déterminé sur 100 larves par réplicat. L'expérience est recommencée si le taux d'anomalies dans les témoins dépasse 20 %. Les résultats peuvent être exprimés en CE100, CE50 ou CE20 selon la toxicité induite et les LOEC et NOEC calculées. Les anomalies sont exprimées selon différents critères : embryon n'ayant pas atteint le stade "prisme", larve n'ayant pas atteint le stade pluteus, larve "pluteus" dont les baguettes présentent des anomalies.

### **Spermiotoxicité**

Les gamètes sont obtenues et sélectionnées comme précédemment. Le sperme est introduit directement dans les milieux à tester pendant des périodes de 5, 10, 15 ou 30 mn, à raison de 20 µl pour 5 ml de milieu. Ensuite, les ovocytes préparés en eau de mer de référence ou de synthèse sont fécondés à l'aide du sperme pré-traité, à raison de 30 µl pour 3 ml.

Le taux de réussite de la fécondation est observé dès l'apparition de la membrane de fécondation : soit 15 à 30 mn après la fécondation. Comme pour l'embryotoxicité, les essais sont effectués en 5 réplicats et les résultats, exprimés en pourcentage de fécondation par rapport aux témoins, peuvent être traduits en CE20, CE50 ou CE10, LOEC et NOEC. Les tests de spermiotoxicité et d'embryotoxicité sont réalisés dans les conditions suivantes :

- pas d'alimentation pendant la durée du développement embryonnaire ;
- durée et température : 48h à 20°C ± 1 pour *P. lividus* ; 72 à 96 h à 16 - 18°C ± 1 pour *S. granularis* ;
- salinité : 30 à 35 ‰, pH 7,5 à 8,5, taux d'oxygène > 90 % de la saturation.

Tous les paramètres sont mesurés en début et fin d'essais. Ce test est proposé pour évaluer la toxicité potentielle du sédiment en contact direct, d'extraits aqueux ou organiques ou de l'eau interstitielle. Le sulfate de cuivre (CuSO<sub>4</sub>) et le sulfate de cadmium (CdSO<sub>4</sub>) peuvent être employés comme toxiques de référence.

## Inhibition de la bioluminescence d'une bactérie marine

Ce test de toxicité aiguë est normalisé pour la détermination de l'effet inhibiteur d'échantillons d'eau (Normes ISO/FDIS – 11348-1 ; 11348-2 et 11348-3 : 1998), peut être appliquée à l'évaluation de l'effet d' extrait aqueux de sédiments contaminés. Microbic Corporation (1992), propose aussi l'utilisation de la même bactérie pour tester la toxicité potentielle de sédiments en « contact direct ou « phase-solide » avec le système Microtox ®.

### Principe

Le test est une méthode sensible basée sur la bioluminescence de la bactérie marine *Vibrio fischeri* ou *Photobacterium phosphoreum* qui peut être activée ou inhibée en présence de substance toxique. L'intensité de la lumière émise est fonction du flux d'électrons de la chaîne respiratoire et reflète directement l'activité métabolique de la cellule, fournissant ainsi une mesure quantitative de la toxicité. La méthode d'abord développée en eau douce pour évaluer la toxicité de substances chimiques a été adaptée au milieu marin pour évaluer la toxicité potentielle du milieu ou d'extraits aqueux et organiques de sédiments. Plus récemment, une méthode d'exposition au sédiment entier a été présentée et paraît être plus sensible aux composés hydrophobes que l'essai sur les extraits. Bien que l'évaluation complète de la toxicité d'un composé ou d'une solution nécessite plus d'un bio-essai, le test inhibition de la bioluminescence d'une bactérie marine permet le "criblage" d'un grand nombre de toxiques et d'effluents en un temps court et à un coût peu élevé. La lumière émise par les bactéries est mesurée à l'aide d'un photomètre.

### Essais

Les extraits aqueux de sédiment peuvent être obtenus par agitation pendant 12 heures de 10 g/l (équivalent poids sec) de sédiment humide en eau de référence de salinité 30 ‰. Après trois heures de décantation, le surnageant est testé tel quel et dilué. Pour les essais en contact direct (sédiment entier), le sédiment humide est déposé en eau de mer de référence et testé après homogénéisation et décantation à des concentrations de 0 à 50g/l (équivalent poids sec). L'eau de mer de référence est utilisée fraîche, elle est pré filtrée sur membrane de vide maille de 0,2 µm et ajustée à la salinité de 30 ‰. Cette salinité et le pH des solutions étudiées (7 à 7,8) sont compatibles avec la réalisation des essais (Quiniou *et al.*, 1997). Les essais sur les extraits aqueux de sédiments sont réalisés selon la technique décrite dans les normes, sur les surnageants obtenus selon le protocole décrit ci dessus : des dilutions de 50 % sont effectuées en eau de mer de référence (deux à trois réplicats par concentration et deux à trois témoins). Les lectures de

bioluminescence sont faites après 15 mn d'incubation à 15° C. Les essais sur le sédiment entier ont été réalisés selon la technique " phase-solide " décrite par MICROBICS CORPORATION (1992) : 0.3 g de sédiment humide sont mis en solution dans 3 ml d'eau de mer de référence puis des dilutions successives de 50 % sont effectuées permettant ainsi de tester des concentrations de 0 à 50 g/l (deux à trois réplicats par concentration plus deux à trois témoins). Au temps  $t_0$  les bactéries sont introduites dans le milieu, après 20 mn d'incubation à 15°C la lecture se fait sur le filtrat.

### **Expression des résultats**

Les résultats sont exprimés en pourcentages d'inhibition ou d'activation de la luminescence par rapport au témoin pour les faibles effets ou en CE50 : Concentration Efficace entraînant une diminution de la bioluminescence de 50 % par rapport à la valeur des témoins. Ces valeurs sont calculées (au seuil de 95 %) selon les modalités indiquées dans les normes ou par le logiciel d'exploitation des fournisseurs de bactéries. Les résultats sont exprimés en gramme de sédiment sec par litre.

### **Références**

Quiniou F., Judas A., Le Squer-André E., Ann.Inst. Océanogr., Paris, 1997, 73(1) : 35-48.

Qualité de l'eau – Détermination de l'effet inhibiteur d'échantillons d'eau sur la luminescence de *Vibrio fischeri* (Essai de bactéries luminescentes) – Partie 1 : Méthode utilisant des bactéries fraîchement préparées (ISO/FDIS – 11348-1)

Qualité de l'eau – Détermination de l'effet inhibiteur d'échantillons d'eau sur la luminescence de *Vibrio fischeri* (Essai de bactéries luminescentes) – Partie 1 : Méthode utilisant des bactéries déhydratées (ISO/FDIS – 11348-2)

Qualité de l'eau – Détermination de l'effet inhibiteur d'échantillons d'eau sur la luminescence de *Vibrio fischeri* (Essai de bactéries luminescentes) – Partie 1 : Méthode utilisant des bactéries lyophilisées (ISO/FDIS – 11348-3)

Microbic Corporation, 1992 – Microtox manual. A toxicity Testing Handbook. Carsbad, A.A.

## Annexe 4 : Protocoles d'analyse de la contamination bactérienne des sédiments et des eaux

Au niveau de la bactériologie, il peut s'avérer intéressant de suivre deux types de flore : la flore d'intérêt sanitaire déjà présente sur le site d'étude et la flore apportée par le traitement biologique.

### Suivi de la flore d'intérêt sanitaire (sédiments et eaux)

#### *Les sédiments*

La contamination fécale des sédiments sera étudiée en recherchant des indicateurs tels que *les Escherichia coli*, les entérocoques et les micro-organismes anaérobies sulfito-réducteurs ou *les Clostridium perfringens* présumés et en recherchant des pathogènes tels que les salmonelles. Dans la littérature, il existe des protocoles très variables pour analyser la contamination fécale des sédiments. Les résultats seront différents d'un sédiment à l'autre. Il est conseillé de faire des réplicats d'analyse lors d'études sur le sédiment.

*Les Escherichia coli*, les entérocoques, et les salmonelles sont principalement observés dans les couches superficielles de sédiment. Par contre, *des Clostridium perfringens* et des micro-organismes anaérobies sulfito-réducteurs (signes d'une contamination ancienne) peuvent être retrouvés sur toute la hauteur de sédiment (des couches superficielles aux couches les plus profondes).

#### 1 - Suggestion de protocole de recherche de bactéries d'intérêt sanitaire dans les sédiments :

##### *Escherichia coli* et les entérocoques

Les sédiments peuvent être dilués dans le milieu approprié : tryptone-sel stérile (tryptone 1 g/l, NaCl 8,5 g/l) pour la technique NPP en tubes et diluant spécial pour microplaques stérile (DSM) pour la technique par microplaque.

Les sédiments dilués sont homogénéisés par vortex pendant 5 minutes à vitesse maximale.

L'analyse bactériologique peut se faire i) soit sur la suspension totale, ii) soit sur le surnageant obtenu après une centrifugation à 500 g pendant 1 min. L'étude sur le surnageant permet de limiter la charge particulaire et donc d'éviter des erreurs de lecture de la fluorescence dans les puits les plus concentrés de la microplaque.

L'analyse est réalisée :

- soit par la technique du nombre le plus probable (NPP) 3 x 5 tubes par ensemencement en milieu liquide bilié lactosé au vert brillant (BLBVB) (d'après la norme NF T90-413 pour les eaux) pour *E. coli* et par

ensemencement en milieu Rothe et Litsky (d'après la norme NF T90-411 pour les eaux) pour les streptocoques du groupe D (proche des entérocoques),

- soit par ensemencement en milieu liquide miniaturisé (MU/Ec) (d'après la norme NF T90-433; ISO 9308-3, mars 1999 pour les eaux) pour *E. coli* et pour les entérocoques (d'après la norme NF T90-432 (ISO 7899-1, mars 1999).

Recherche des spores de micro-organismes anaérobies sulfito-réducteurs (ASR) (d'après la norme NF EN 26 461-2, juillet 1993 : recherche et dénombrement des spores de micro-organismes anaérobies sulfito-réducteurs (*clostridia*) : essais des eaux).

- traitement de 15 min à 75°C des dilutions de sédiment pour éliminer les cellules végétatives
- filtration des échantillons
- utilisation de la gélose tryptose-sulfite, incubée 48 h à 37°C en anaérobiose

Recherche des *Clostridium perfringens* présumés (d'après l'ancienne norme NF T90-417, octobre 1985 : recherche et dénombrement des spores de bactéries anaérobies sulfito-réductrices et de *Clostridium* sulfito-réducteurs : essais des eaux).

- Cellules totales : sans pré-traitement
- Spores : pré-traitement thermique 15 min à 75 °C (élimination des cellules végétatives)
- filtration des échantillons,
- utilisation de la gélose TSC (gélose tryptose-sulfite à la D-cyclosérine) incubée 24 h en anaérobiose à 46°C (température plus spécifique pour la recherche de *Clostridium perfringens*)

Recherche semi-quantitative des salmonelles (analyse dans 10 g, 1 g et 0,1 g de sédiment)

- 1) pré-enrichissement en eau peptonnée tamponnée simple concentration incubation à 37 °C pendant 18 h
  - 2) enrichissement en milieu Rappaport Vassiliadis (RV) 0,1 ml du pré-enrichissement dans 10 ml RV incubation à 42 °C pendant 18 à 24 h
  - 3) isolement sur géloses Rambach et XLT4
- A partir de chaque enrichissement, isolement sur chaque gélose incubation des boîtes à 37 °C pendant 24 h
- 4) confirmation

Ensemencement des colonies caractéristiques sur les géloses en pente pour confirmation sur galerie API20E

colonies caractéristiques

Rambach : colonies rouges

XLT4 : colonies noires ou centre noir

## 2. Les eaux

Dans les eaux, les différents types de bactéries décrits précédemment seront recherchés. La mise en évidence de ces bactéries dans les eaux ne pose pas de problème particulier. Les protocoles sont bien définis dans les normes AFNOR ou ISO.

Recherche des *Escherichia coli* et des entérocoques : recherche par microplaque (norme NF T90-433; ISO 9308-3, mars 1999) pour *E. coli* et pour les entérocoques (norme NF T90-432 ISO 7899-1, mars 1999).

Recherche des spores de micro-organismes anaérobies sulfite-réducteurs : norme NF EN 26 461-2, juillet 1993.

Recherche des *Clostridium perfringens* présumés (spores et cellules végétatives) : voir ci-dessus : Les sédiments partie C.

Recherche semi-quantitative des salmonelles (analyse dans 1 l, 100 ml et 10 ml d'eau) : voir ci-dessus : Les sédiments partie D.

## 3 - Suivi de la flore apportée par le traitement biologique

Pour suivre l'implantation et le devenir des bactéries responsables du traitement *in situ*, une proposition pourrait être d'étudier les flores cultivables totale et halotolérante dans les sédiments superficiels pour évaluer une éventuelle prolifération bactérienne et dans les eaux pour suivre une éventuelle dispersion des bactéries : par un étalement sur gélose trypticase soja (TD) et sur gélose trypticase soja salée (TS), géloses incubées ensuite à 20°C pendant 4 jours. Au vu des caractéristiques des bactéries utilisées (différentes d'une étude à l'autre), le protocole pourrait être adapté avec une température plus élevée et un milieu plus spécifique. Il est important de savoir si les bactéries apportées lors des biodragages ne sont pas pathogènes c'est-à-dire qu'elles n'appartiennent pas à la liste AFNOR X 42-040 : "bactéries communément reconnues pathogènes pour l'homme" et qu'elles ne font pas partie des indicateurs de contamination fécale (*Escherichia coli*, entérocoques ou bactéries anaérobies sulfite-réductrices formant des spores).

## 4 - Références

Gourmelon M., Ménard D., Derrien A., Crenn I., Caprais M.P., Le Comte A., Pommepuy M., Le cann P., Bassoullet P., Cann P., 1999. Evaluation de la contamination microbienne des sédiments superficiels du bassin d'Arc (port autonome de Marseille) et du golfe de Fos prélevés le 29 juin 1999. Rap. Ifremer R.INT.DEL/MP/MIC.

Recherche et dénombrement des coliformes et des coliformes thermotolérants. Méthode générale par ensemencement en milieu liquide (NPP) : essai des eaux. Norme AFNOR NF T90-413 NF, octobre 1985.

Dénombrement des *Escherichia coli*. Méthode miniaturisée par ensemencement en milieu liquide (NPP) : eaux. Norme AFNOR T90-433 (ISO 9308-3, mars 1999).

Recherche et dénombrement des streptocoques du groupe D. Méthode générale par ensemencement en milieu liquide (NPP) : essais des eaux. Norme AFNOR NF T90-411, octobre 1989.

Dénombrement des entérocoques . Méthode miniaturisée par ensemencement en milieu liquide (NPP) : eaux. Norme AFNOR T90-432 (ISO 7899-1, mars 1999).

Recherche et dénombrement des spores de micro-organismes anaérobies sulfite-réducteurs (*clostridia*). Méthode par filtration sur membrane : qualité de l'eau. Norme AFNOR NF T90-434 NF EN 26461, juillet 1993.

Recherche et dénombrement des spores de bactéries anaérobies sulfite-réductrices de *Clostridium* sulfite-réducteurs. Méthode générale par filtration sur membrane : essais des eaux. Norme AFNOR NF T90-417, octobre 1985.