

Caractérisation des groupes bactériens fonctionnels dans le continuum “réseau d’assainissement/Step/milieu récepteur

Thierry Berthe, Josette Garnier, Xavier Philippon, Julien Nemery, Gaëlle Marinoni,
(UMR CNRS Sisyphé, Paris)

Jean-Jacques Pernelle, (CEMAGREF, Antony)

Au cours de la première phase du PIREN-Seine, l’étude du fonctionnement de la Seine s’est concentrée sur l’aval de l’agglomération parisienne où la pollution organique et ammoniacale, source de désoxygénation, représente une nuisance majeure.

Les observations microscopiques ont rapidement mis en évidence que les effluents urbains, source de matière organique, étaient également à l’origine de bactéries de plus grande taille que celles existant dans le milieu (Garnier et al., 1992a). Les expériences physiologiques réalisées sur cette base ont montré que ces bactéries allochtones ont, *dans la rivière*, des **taux de croissance** et de disparition **4 fois plus élevés** que les bactéries autochtones, avec une affinité identique pour les substrats (Garnier et al., 1992b). En matière de modélisation, ces résultats ont conduit à prendre explicitement en compte deux compartiments de bactéries hétérotrophes, avec les paramètres déterminés expérimentalement. Le module relatif au compartiment bactérien est donc intégré au modèle général de rivière (RIVERSTRAHLER, Billen et al., 1994, Garnier et al., 1995).

Si les simulations sont en accord avec les observations pour les situations de temps sec, de profonds désaccords semblent exister par temps de pluie. Il apparaît que des taux (ou rendement) de croissance bien plus élevés soient nécessaires pour simuler correctement les observations (Seidl, 1997).

Les recherches menées dans les programmes PIREN-Seine et Seine-Aval ont également permis de prendre en compte la physiologie des bactéries nitrifiantes dans le modèle des processus microbiologiques RIVE (Brion, 1997). Deux sources importantes de bactéries nitrifiantes ont été considérées: le lessivage naturel des sols et les sources ponctuelles via les rejets d’eaux usées domestiques. Il apparaît, comme pour les bactéries dégradant la matière organique, que les bactéries nitrifiantes sont essentiellement apportées par les effluents et que les apports diffus des sols sont quasi négligeables.

En raison des taux de croissance relativement faibles des bactéries nitrifiantes (temps de génération de 20 h environ) et du faible temps de résidence, la nitrification ne se produit que dans l’estuaire où elle est susceptible de contribuer fortement à la désoxygénation.

Dans le cadre du programme Seine Aval, nous avons développé une méthode moléculaire afin de quantifier des bactéries nitrifiantes du genre *Nitrobacter* qui représente le genre de nitrifiantes le plus répandu en milieux aquatiques continentaux (Berthe et al., sous presse). Cette méthode est basée sur l’utilisation de la technique d’amplification par PCR compétitive (Zachar et al., 1993) en utilisant des amorces spécifiques de l’ADNr 16S des bactéries du genre *Nitrobacter* (Degrange & Bardin, 1995).

1. Limites des approches utilisées et questions

Les problèmes auxquels se heurte le PIREN-Seine et les nouvelles connaissances acquises dans le domaine de la biologie moléculaire, conduisent à de nouvelles interrogations sur le modèle conceptuel de la dynamique des bactéries.

S'il paraît clair que des bactéries de grande taille sont contenues et apportées par les effluents, ces bactéries de grande taille sont-elles des petites bactéries qui ont grossi dans des conditions favorables de nourriture ou des bactéries de groupes fonctionnels différents avec des caractéristiques physiologiques à part ? Quelles sont finalement les origines ? Les méthodes classiques utilisées jusqu'alors en écologie ne permettent pas de différencier les bactéries autrement que sur des bases morphologiques.

Les études physiologiques basées sur le fractionnement à 1 µm ont été menées essentiellement sur la rivière, y compris à l'aval des rejets. On peut encore s'interroger des caractéristiques physiologiques de ces "grosses" et "petites" bactéries dans le réseau d'assainissement.

Enfin, le rôle des effluents comme source principale de bactéries nitrifiantes (par rapport aux sols) est surprenant. On peut se demander si elles apparaissent ces bactéries nitrifiantes dès les têtes du réseau d'assainissement et en quelle quantité.

Les outils écologiques disponibles jusqu'alors en écologie microbienne ne permettent pas de caractériser, de comprendre l'origine et le devenir des divers peuplements microbiens. Si ces connaissances sont importantes d'un point de vue fondamental, elles sont forcément indispensables dans des études appliquées à des systèmes dont le fonctionnement écologique est dominé par les processus bactériens. Il est donc désormais nécessaire d'associer aux outils classiques, les outils de la biologie moléculaires, qui nous nous donnent seuls accès à la diversité du monde microbien.

Nous chercherons à caractériser les groupes fonctionnels de bactéries hétérotrophes autochtones et allochtones qui se succèdent dans le continuum aquatique, des têtes de réseau d'assainissement au milieu récepteur. Il est peu probable qu'une même communauté bactérienne chemine le long de ce continuum. Il faudrait définir les zones éventuelles de transition où il sera nécessaire de revenir à des méthodes classiques pour appréhender la physiologie. Des variations de séquences des "populations allochtones et autochtones" seront examinées sur des profils de restriction.

Dans une perspective de modélisation, il est indispensable de réellement quantifier les bactéries qui réalisent le processus de nitrification. Comme les outils classiques de l'écologie microbienne ne permettaient pas d'accéder à cette communauté faiblement représentée en nombre par rapport aux hétérotrophes, nous utiliserons la technique d'amplification par PCR avec des amorces spécifiques de *Nitrobacter*, couplée à la méthode de PCR compétitive.

2. Méthodologies

Afin de répondre aux différentes problématiques évoquées, nous avons intégré dans notre démarche méthodologique ces techniques de biologie moléculaire car elles présentent:

- une très bonne **sensibilité** qui nous permettra de *détecter* l'origine des bactéries
- mais également une excellente **spécificité** conduisant à *caractériser, différencier* et *quantifier* les différents groupes fonctionnels impliqués.

Nous nous sommes dans un premier temps attaché à la mise au point de ces techniques moléculaires en laboratoire, sur des cultures, mais aussi sur les différents échantillons du continuum, et en particulier celle du réseau d'assainissement particulièrement difficile à appréhender.

Il s'agit :

a) de la purification des acides nucléiques à partir des échantillons car la grande majorité de ces techniques moléculaires nécessitent une extraction préalable des acides nucléiques.

b) de la quantification des bactéries nitrifiantes; deux méthodes principales ont été mises au point:

- la technique de PCR compétitive
- les techniques de Dot blot et de FISH

c) de la différenciation des groupes de petites et grosses bactéries réalisée à partir de la technique ARDRA.

2.1. Les activités bactériennes

L'activité hétérotrophe a été déterminée classiquement par incorporation de thymidine tritiée (Furhman & Azam, 1980; 1982), mais sur les fractions inférieures et supérieures à 1 µm, séparées par filtration après incubation (Servais & Garnier, 1993). Les activités ont été réalisées dans une gamme de concentration en thymidine de 50 à 500 nmolaire.

L'activité nitrifiante potentielle a été réalisée selon le protocole de Brion & Billen (1998) par incorporation de bicarbonate marqué au carbone 14 sur l'eau brute en conditions optimales d'ammonium, d'oxygène et de température

2.2. L'abondance et la biomasse bactérienne

L'abondance et la biomasse bactérienne de l'ensemble de la communauté bactérienne ont été déterminées en microscopie en épifluorescence après coloration au DAPI (Porter & Freig, 1980). Les organismes ont été dénombrés selon des critères de tailles et de formes, ce qui conduit à une estimation des biovolumes cellulaires dans les deux fractions inférieures ou supérieures à 1 µm (Garnier, 1989; Garnier et al., 1992a, b). La conversion en biomasse carbonée est effectuée selon Simon & Azam (1989).

2.3. Les outils moléculaires

Purification de l'ADN bactérien (UMR Sisyphe)

Une technique d'extraction de l'ADN génomique des bactéries présentes sur les filtres a été adaptée à partir du protocole de Tsai & Olson (1991). Les filtres sont tout d'abord découpés en petits fragments dans des conditions stériles puis incubés dans un tampon en présence de lysozyme. Les cellules bactériennes sont ensuite soumises à une série de trois chocs thermiques en présence de SDS (concentration finale de 10 %). Après avoir éliminé le SDS, les acides nucléiques sont purifiés par une extraction phénol/chloroforme. La qualité de l'ADN obtenu a ensuite été analysé sur un gel d'agarose à 0.8%. La présence dans les trois échantillons (figure 1) montre la présence d'ARN, éliminés par un

traitement par la RNase. Il apparaît également que l'ADN purifié n'est pas fragmenté comme l'indique la présence de la bande d'ADN à 20 kbp environ. Cet ADN constitue donc une bonne matrice pour réaliser les amplifications PCR.

La PCR quantitative (UMR Sisyphe)

Nous avons dans un premier temps utilisé la technique de PCR afin de détecter les bactéries du genre *Nitrobacter* dans un mélange d'ADN extrait des organismes présents dans un échantillon d'eau. Dans ce cas bien précis, la séquence d'ADN cible que nous désirons amplifier correspond au gène codant les ARNr 16S, gène également appelé ADNr 16S. Ces séquences ont été choisies car elles sont considérées comme de véritables chronomètres moléculaires puisqu'il est possible de trouver des motifs nucléotidiques spécifiques d'une espèce ou d'un genre bactérien. Il est donc intéressant de pouvoir amplifier ces séquences afin de mettre en évidence la présence de l'ADNr 16 S d'un micro-organisme recherché dans un échantillon de l'environnement.

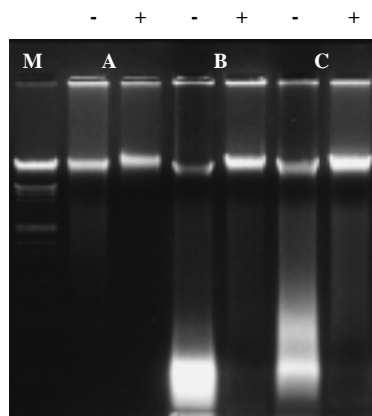


Figure 1. *Extraction de l'ADN génomique à partir de trois échantillons prélevés dans le continuum (A, Conflans ; B, Achères amont; C, Achères aval). M, marqueur de taille (phage λ digéré par Hind III), +, avec traitement RNase ; -, sans traitement RNase.*

Rappel: La technique de PCR ou de réaction de polymérisation en chaîne, consiste à augmenter le nombre de copies d'un fragment d'ADN. Cette amplification est effectuée en réalisant une succession de cycles; chaque cycle se décomposant en trois étapes principales: a) une première étape dite de **dénaturation** au cours de laquelle on favorise (en augmentant la température, généralement 94 °C), la dissociation des deux monobrans formant la molécule bicaténaire d'ADN. Cet ADN constitue la matrice que l'on désire amplifier. b) Puis succède une étape **d'hybridation** ou **d'annealing**, au cours de laquelle des amorces (qui sont de courts fragments d'ADN monobrin de synthèse de 15 à 25 bases) vont s'apparier avec une séquence qui leur est complémentaire au niveau du brin d'ADN matrice. Ces amorces encadrent la région que l'on désire amplifier; l'une étant complémentaire d'un brin et l'autre complémentaire de l'autre brin. c) Une troisième étape dite de **polymérisation** ou **d'extension** au cours de laquelle une enzyme (la Taq polymérase) va tout d'abord se positionner au niveau de l'extrémité trois prime des amorces et synthétiser un brin d'ADN - complémentaire au brin matrice. A l'issue du premier cycle nous obtenons donc deux brins d'ADN identiques au brin.

A titre d'exemple, la figure 2 montre l'analyse électrophoretique en gel d'agarose des produits d'amplification obtenus après amplification PCR en utilisant des amorces spécifiques de bactéries nitrifiantes du genre *Nitrobacter* (amorces FGPS 1269' et 872, définies par Degrange & Bardin, 1995) et de l'ADN extrait d'un échantillon d'eau de la Seine aval (Duclair). La présence du fragment de 388 bp indique bien la présence de l'ADNr 16S de *Nitrobacter* dans le mélange d'ADN et donc de cette bactérie dans l'échantillon d'eau initial.

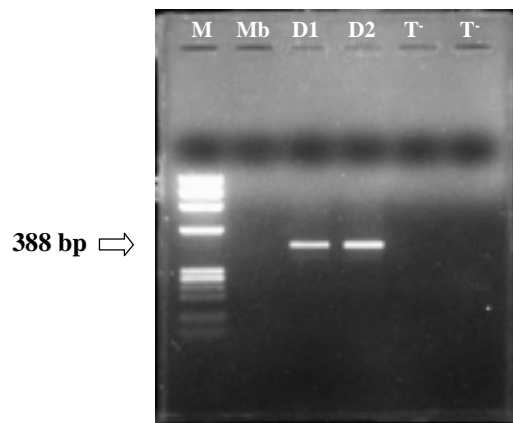


Figure 2. Amplification d'un fragment de l'ADNr 16S de *Nitrobacter*, à l'aide des amorces FGPS 1269' et 872, par la technique de PCR. Mb, matrice d'ADN non diluée ; D1, matrice diluée au dixième ; D2, matrice diluée au centième ; T, témoin négatif sans ADN.

L'approche quantitative repose sur une méthode développée par Zachar et al. (1993): il s'agit de la technique de PCR compétitive. Celle-ci permet de déterminer le nombre de copies d'un gène donné dans l'ADN extrait d'un échantillon de l'environnement. Connaissant le nombre de copies de ce gène dans le génome de la bactérie étudiée, il est possible de quantifier cette bactérie dans l'échantillon (figure 3). La PCR compétitive est également effectuée sur les séquences d'ADN codant les ARNr 16S.

Rappel: le principe de la cPCR (PCR compétitive) consiste à ajouter un standard interne ou compétiteur avec l'ADN cible que l'on désire amplifier. Ce fragment, généralement différent en taille, entre en compétition avec l'ADN cible lors de l'amplification PCR.

Dans la méthode développée par Zachar et al. (1993), une courbe de calibration est réalisée en effectuant une amplification PCR de plusieurs échantillons composés d'ADN compétiteur présent en masse constante (ou un nombre de copies constant) et d'ADN cible présent en quantité variable. La quantification se fait par détermination de la coloration au bromure d'éthidium, des fragments d'ADN obtenus après analyse électrophorétique sur gel d'agarose. La courbe de calibration est obtenue en exprimant le Log de la masse relative de compétiteur obtenu sur celle de l'ADN cible obtenue en fonction du Log de la masse initiale d'ADN cible (Figure 3). Avec l'ADN extrait de l'échantillon naturel, une même amplification est réalisée en présence de la même quantité de compétiteur. Le Log du rapport de la masse relative des produits obtenus permet de déterminer la masse d'ADN cible présente dans l'échantillon d'ADN étudié.

Technique de Dot Blot (CEMAGREF)

Comme précédemment, cette technique nécessite une étape préalable d'extraction des acides nucléiques. L'ADN génomique purifié est ensuite dénaturé en présence de soude, puis **transféré sur un support solide**, généralement une membrane en Nylon chargée. Des fragments d'ADN monocaténaux sont donc alors fixés sur une membrane.

Rappel: Succède une étape d'**hybridation** au cours de laquelle, cet ADN va être hybridé avec une sonde permettant de rechercher une séquence d'intérêt. La sonde fixée sur la séquence identifiée doit pouvoir être détectée par la suite. Pour cela, elle peut donc être marquée de multiples façons; le système de marquage employé dans le cadre de ce travail est le système de la digoxigénine, molécule couplée à un nucléotide. Ce dernier sera intégré à la sonde selon diverses méthodes en fonction du type de sonde utilisée. S'il y a hybridation de la sonde marquée avec la séquence recherchée, celle-ci sera détectée grâce à un anticorps qui reconnaît la digoxigénine, et qui est couplé avec une molécule émettant une lumière à une certaine longueur d'onde.

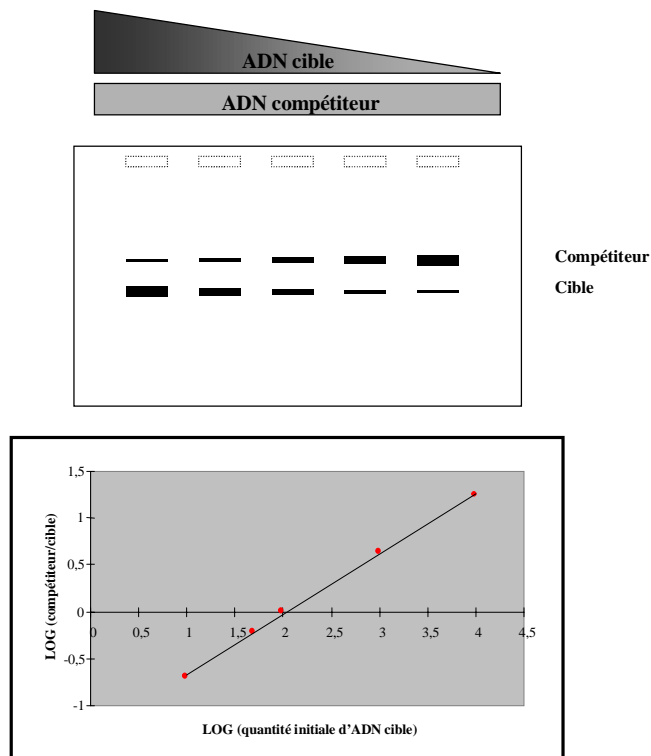


Figure 3. Principe de la PCR compétitive.

Le transfert sur membrane et la sensibilité des méthodes de détection ont été testées à l'aide de plasmides pBR 328 marqués à la digoxigénine (DIG) par « multipriming ». On observe une linéarité de transfert et de marquage entre 5.10^{-6} et 5.10^{-3} ng d'ADN par μl .

De l'ADN bactérien a été purifié à partir d'une gamme de concentration croissante de bactéries (*Pseudomonas mendocina* CIP 7519), transféré par Dot blot puis hybridé et révélé par luminescence. On observe alors une évolution proportionnelle des courbes de luminescence (Unité Relative Luminescence) et d'ADN (DO 260) jusqu'à $3,7.10^9$ cellules. Au-delà il semble y avoir saturation du système de révélation.

En utilisant la technique de Dot blot et une sonde spécifique par exemple dirigée contre l'ADNr 16S, il est alors possible d'estimer **la proportion** de bactéries nitrifiantes du genre *Nitrobacter* par rapport à la population bactérienne totale.

Technique FISH (CEMAGREF)

Rappel: La technique FISH a également été utilisée pour quantifier les bactéries nitrifiantes. Son principe analogue au précédent, mais présente l'avantage de ne pas devoir passer par une étape préalable d'extraction des acides nucléiques. En effet, les bactéries présentes dans l'échantillon sont tout d'abord fixées sur une lame. La lame est ensuite hybridée avec un oligonucléotide dirigé contre les ARNr 16S eux-mêmes, dont le nombre de copies est bien plus important au niveau d'une bactérie (et non contre l'ADNr 16 S comme auparavant). En

couplant cet oligonucléotide à un fluorochrome, il est donc ensuite possible de visualiser et dénombrer le nombre de bactéries en microscopie à épifluorescence.

Cette technique a été testée sur des cultures de *Nitrobacter winogradskyi* (figure 4). Nous pouvons ainsi déterminer toutes les bactéries présentes dans l'échantillon par dénombrement en microscopie à épifluorescence après coloration au DAPI. La même préparation hybridée avec un oligonucléotide spécifique de l'ARNr 16S de *Nitrobacter* conduit au dénombrement de la bactérie recherchée.

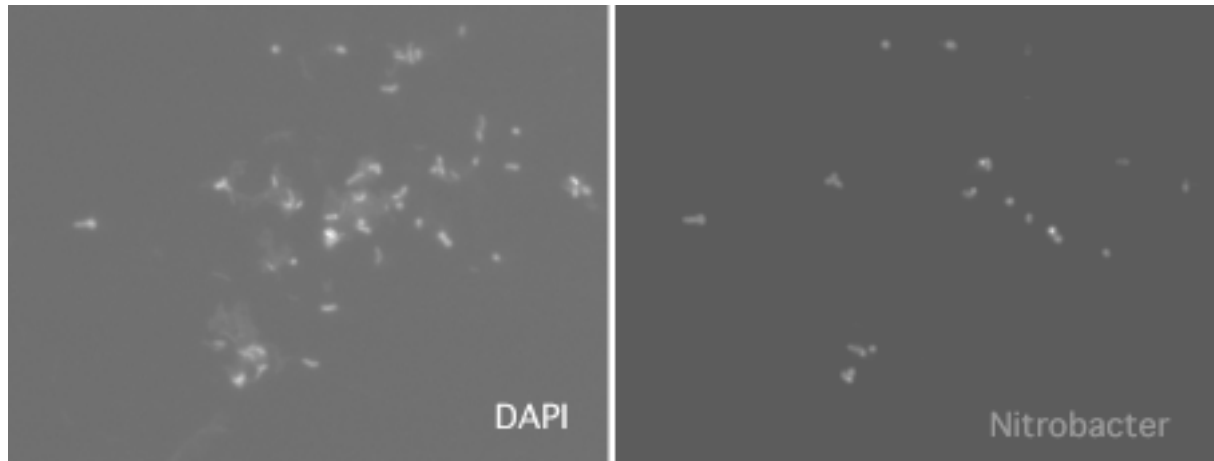


Figure 4. Détection de bactéries du genre *Nitrobacter* par la technique FISH. A droite, observation de la totalité des bactéries après coloration au DAPI. A gauche, observation des *Nitrobacter* après hybridation avec un oligonucléotide dirigé contre les ARNr16S de ces bactéries.

Technique ARDRA (UMR Sisyphe)

Une technique différente des précédentes a été utilisée afin de caractériser les “grosses” et les “petites” bactéries, ou plus particulièrement rechercher si ces deux groupes correspondent à des groupes fonctionnels différents. Comme pour les activités, les échantillons d'eau à analyser sont filtrés sur des membranes de 1 μm de porosité, pour retenir les “grosses” bactéries, puis le filtrat est passé sur une membrane de 0.22 μm pour retenir les “petites” bactéries. L'ADN génomique est ensuite extrait à partir des bactéries présentes sur le filtre puis l'ADN est soumis à une analyse ARDRA (figure 5) dont le principe est rappelé ci-dessous.

Rappel: Après extraction de l'ADN génomique, une amplification PCR est réalisée avec des **amorces universelles**, correspondant à des motifs nucléotidiques conservés de séquences d'ADNr 16S de bactéries. Ainsi **la diversité des séquences amplifiées reflétera la diversité initiale de la population bactérienne** dans l'échantillon. Cette diversité peut être évaluée en digérant ces fragments par **des enzymes de restriction** destinées à les couper au niveau de motifs nucléotidiques particuliers. Notons que la position de ces sites de coupure ne sera pas identique pour tous les fragments. Après analyse des produits de digestion sur gel de polyacrylamide, les profils de restrictions obtenus avec l'ADN extrait des « petites » et « grosses » bactéries seront comparés.

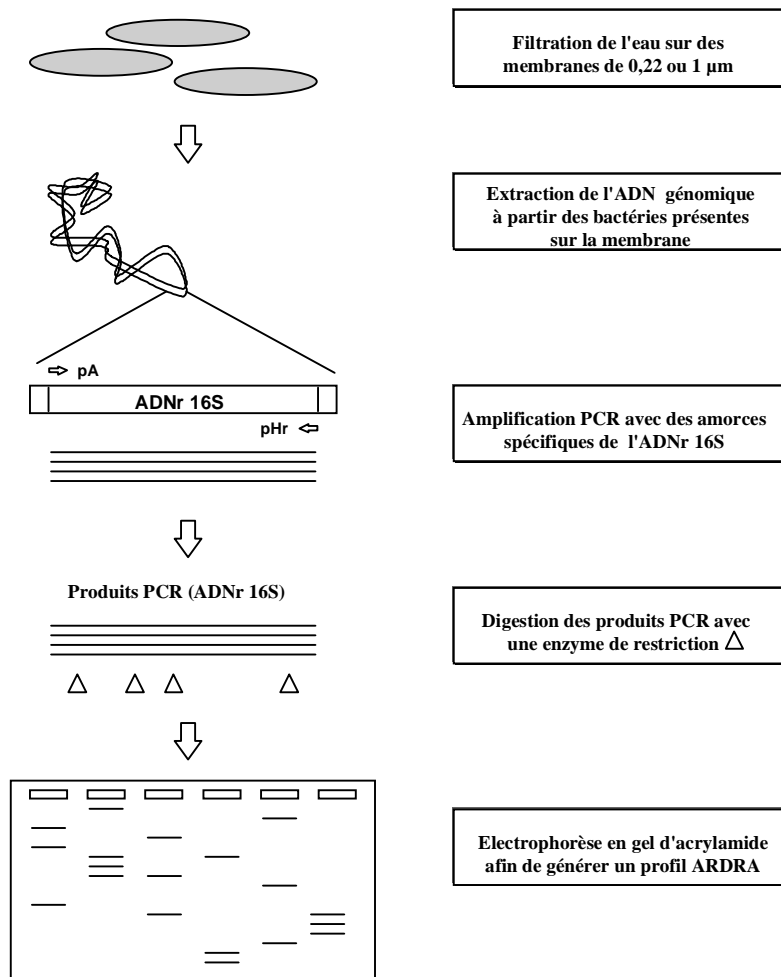


Figure 5. Principe de la technique ARDRA.

3. Présentation du site

Les échantillons ont été prélevés en tête du réseau d'assainissement (à l'exutoire du bassin du Marais à Paris, IV^{ème} arrondissement), sur le cours du réseau d'assainissement à Clichy (entrée et sortie), à la station d'épuration d'Achères (effluents bruts et traités), dans la rivière à l'amont de la station d'épuration d'Achères (Maison-Laffitte), et à l'aval immédiat des effluents (à Conflans), (Figure 6). Deux campagnes ont été réalisées, en mars et en mai 1998. Alors que les échantillons ont été prélevés ponctuellement dans la rivière et à Clichy, ils ont été moyennés sur 24 h au Marais et à Achères (prélèvements automatiques réfrigérés).

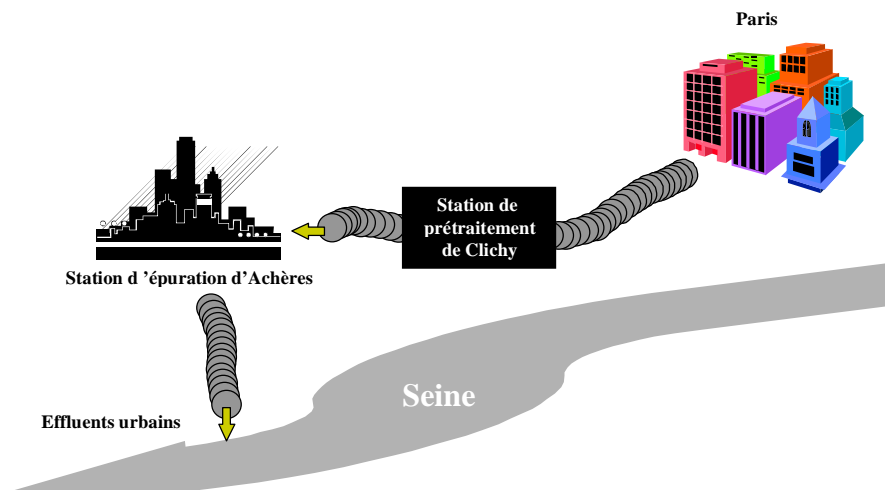


Figure 6. Continuum « réseau d'assainissement – stations d'épuration – milieu récepteur ».

4. Résultats (UMR Sisyphe)

4.1. Les bactéries nitrifiantes

Caractérisation et quantification

Les bactéries nitrifiantes du genre *Nitrobacter* (technique de PCR) dans le continuum montre bien que les bactéries nitrifiantes sont détectées dès l'exutoire du Marais et sont retrouvées le long du continuum, à l'entrée des stations de Clichy et d'Achères, ainsi que dans la rivière (figure 7).

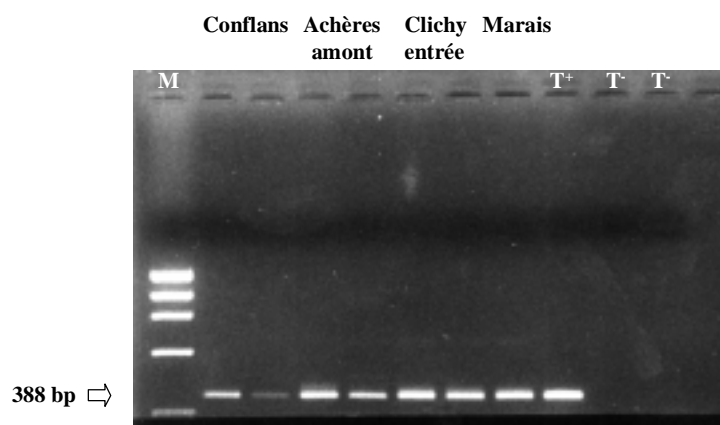


Figure 7. Détection des bactéries nitrifiantes du genre *Nitrobacter* dans le continuum par la technique de PCR. T^+ , témoin positif avec ADN de *Nitrobacter winogradskyi*; T^- , témoin négatif sans ADN.

Nous avons également quantifié le nombre de *Nitrobacter* par la technique de PCR compétitive en utilisant un échantillon d'ADN purifié à partir d'eau de Seine. En calculant la masse d'une copie de l'ADN cible et sachant que les bactéries du genre *Nitrobacter* ont **un seul opéron ribosomal avec une seule copie de la séquence d'ADNr 16S par cellule**, nous avons pu pouvons estimer le nombre de *Nitrobacter* à 10^6 cellules par litre d'eau de Seine. En se basant sur une estimation de la biomasse bactérienne totale par épifluorescence, la populations de bactéries du genre *Nitrobacter* correspond entre 0.1 et 1 pour 1000 de la population bactérienne totale. Cette faible proportion montre la pertinence de l'utilisation d'une technique sensible, telle que la biologie moléculaire.

Activité nitrifiante

Au cours des deux campagnes de mars et mai 1998, l'activité nitrifiante potentielle est importante dès la tête du réseau d'assainissement, à l'exutoire du bassin du Marais (figure 8). Les résultats montrent que le réseau collecteur tend à concentrer les bactéries, qu'il joue alors inévitablement un rôle d'ensemencement à l'aval des rejets, même s'il apparaît en général moins de bactéries nitrifiantes à la sortie qu'à l'entrée des stations.

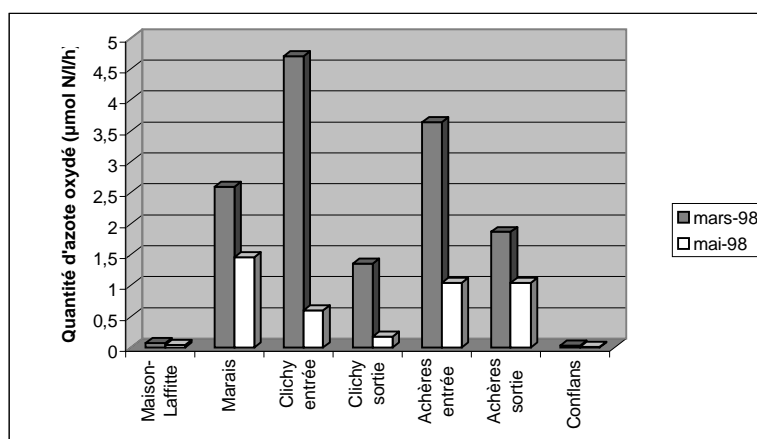


Figure 8. *Activité nitrifiante potentielle mesurée dans le continuum au cours des deux campagnes réalisées en 1998.*

L'activité nitrifiante mesurée en mai est moins importante que celle de mars; ce qui peut s'expliquer par la présence en mai de débits plus importants (de 0.03 à $4.75 \mu\text{mole N l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ contre 0.01 à $1.5 \mu\text{mole N l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ en mars et mai respectivement).

Si l'on compare ces mesures d'activités nitrifiantes potentielles avec celles obtenues en 1994 (Brion, 1997), on confirme bien les niveaux d'activités à l'amont et l'aval de la station d'Achères ainsi qu'à l'entrée (eau brute) et sortie (eau traitée), (Tableau 1). Notons toutefois qu'il existe une variabilité importante tant entre les 5 replicats effectués sur chaque échantillon qu'entre les stations lors des 2 campagnes. Ceci suggère la nécessité d'appréhender l'activité nitrifiante dans des conditions variées.

Tableau 1. Comparaison des mesures d'activités nitrifiantes potentielles mesurées au

	Activité nitrifiante potentielle ($\mu\text{mol N/l/h}$)		
	Mars-94 (Brion, 1997)	Mars-98	Mai-98
Rivière amont	0,016	0,075	0,042
Achères entrée	6	3,64	1,049
Achères sortie	0,385	1,86	1,049
Rivière aval	0,072	0,028	0,01

cours de trois campagnes.

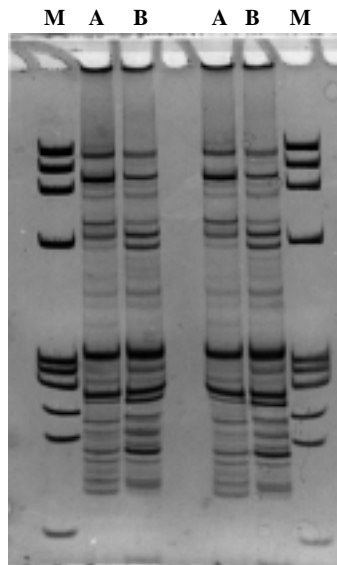
Nous avons ainsi confirmé les résultats de Brion (1997), i.e. les bactéries nitrifiantes sont essentiellement apportées par les effluents; les stocks, très faibles par rapport à celui de la communauté totale n'avaient en revanche pas été estimés. Nos deux campagnes menées en 1998 montrent que *l'activité et la biomasse des nitrifiantes sont importantes dès l'exutoire du Marais*. On peut penser que c'est dans **le biofilm**, dont le temps de séjour est plus long que dans l'eau égouttée, que ces bactéries se développent.

4.2. Les bactéries hétérotrophes

Caractérisation et quantification

La caractérisation des bactéries hétérotrophes réalisée par la technique ARDRA montre que les profils RFLP sont bien différents pour les deux communautés bactériennes (Figure 9). L'ADN amplifié a ici été soumis à une digestion par l'enzyme de restriction *Hae III* ce qui conduit à observer, deux types de modifications majeures : a) la présence de fragments d'ADN supplémentaires dans chacune des fractions (bas du gel, figure 9), b) l'intensification de bandes (haut du gel, figure 9) indiquant une proportion différente de ces bactéries dans chacune des fractions. Ces résultats suggèrent que des groupes bactériens sont communs aux deux fractions en proportion inégale alors que d'autres sont spécifiques d'une fraction.

**Bassin du Marais
(campagne du 19.03.98)**



A bactéries > 1µm
B bactéries < 1µm

Figure 9. Profil ARDRA généré à partir de l'ADN extrait d'un échantillon prélevé dans l'exutoire du Marais au cours de la campagne de Mars 1998.

Ce type d'analyse a été effectué sur quatre points du continuum au cours de la campagne de mai 1998 (Marais, entrée de Clichy, sortie d'Achères et Conflans ; figure 10). A ce stade préliminaire de l'étude, il apparaît deux points importants: a) l'analyse des profils obtenus montre une distribution de taille différente entre les fractions supérieure et inférieure à 1 µm (points 3,4 et 5,6) indiquant des différences dans la composition des communautés bactériennes; b) les profils générés semblent assez différents d'un point à l'autre du continuum, indiquant une modification ou adaptation des communautés bactériennes au cours de leur cheminement dans le continuum. Ceci apparaît tout particulièrement en comparant les pistes 6 et 8 pour la fraction < à 1 µm et les pistes 3 et 5 pour les fractions > à 1 µm.

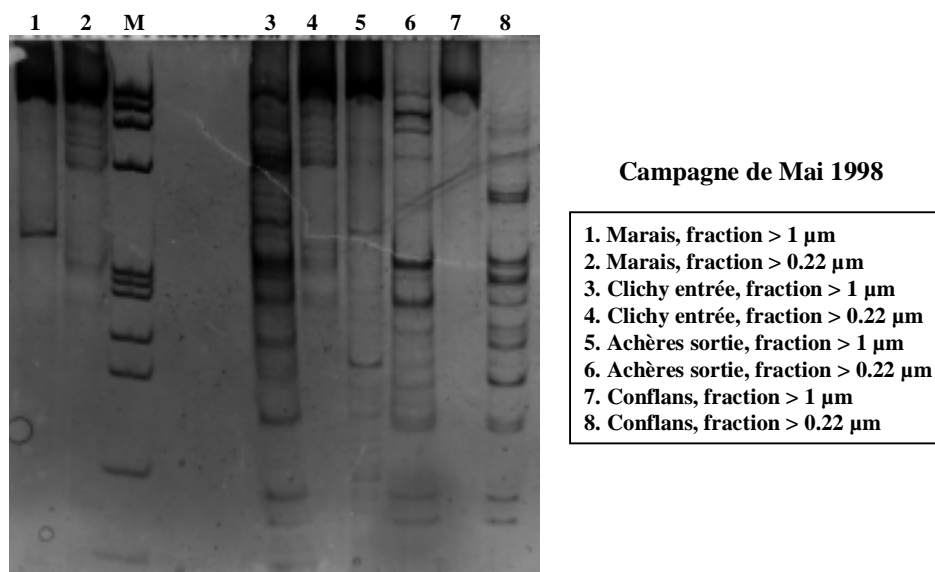


Figure 10. Comparaison des communautés bactériennes le long du continuum par la technique ARDRA.

La quantification effectuée classiquement par classes de taille en microscopie par épifluorescence, permet de distinguer sur les critères morphologiques habituels les 2 populations de “grosses” et de “petites” bactéries. Les “grosses” bactéries constituent une grande proportion de la biomasse dans les eaux d’égout et à l’aval des rejets (de l’ordre de 70 % contre 30 % respectivement). Dans la rivière amont (Maison Laffitte, la biomasse des “grosses” et des “petites” bactéries est sensiblement équivalente, de l’ordre de 50 % (Figure 11). Les biomasses totales varient de 90 $\mu\text{gC l}^{-1}$ à Maison Laffitte à 250 $\mu\text{gC l}^{-1}$ à Conflans. Les eaux d’entrée des stations de Clichy sont moins chargées en bactéries hétérotrophes que les eaux de sortie, à la différence des observations faites sur les bactéries nitrifiantes (Clichy : 1400 contre 1800 $\mu\text{gC l}^{-1}$ à l’entrée et à la sortie respectivement ; Achères : 1400 contre 2200 $\mu\text{gC l}^{-1}$ à l’entrée et à la sortie respectivement) . Il semble qu’il y ait un globalement enrichissement en bactéries dans le continuum du réseau d’assainissement.

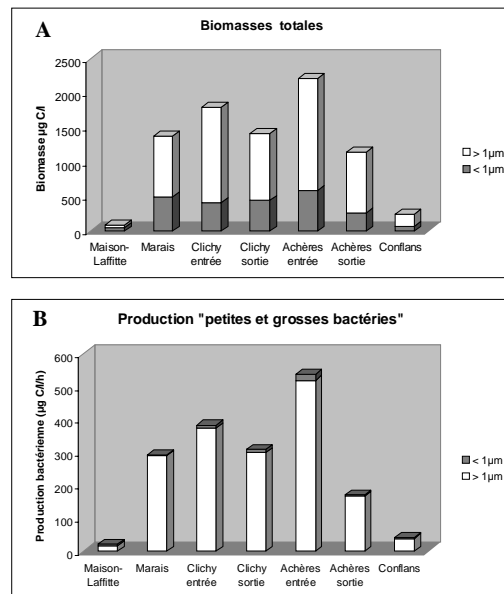


Figure 11. Production hétérotrophe dans le continuum « réseau d'assainissement – rivière ». A) Estimation de la biomasse totale par dénombrement par classes de taille en microscopie à épifluorescence. B) Activité bactérienne déterminée par traçage radioactif.

Activités hétérotrophes

L'activité des « grosses » bactéries est bien plus importante que celle des « petites » et représente plus de 95% de l'activité totale (de l'ordre de 300-500 $\mu\text{gC l}^{-1} \text{h}^{-1}$ contre 10 $\mu\text{gC l}^{-1} \text{h}^{-1}$ respectivement dans les eaux d'égout, figure 11). L'activité des « grosses » bactéries est relativement plus faible dans l'eau de rivière.

Le taux de croissance que l'on peut calculer à partir des activités (production nette, $\mu\text{gC l}^{-1} \text{h}^{-1}$) et de la biomasse ($\mu\text{gC l}^{-1}$) conduit à des valeurs **10 fois** plus importante du taux de croissance des grosses bactéries par rapport à celui des petites. En terme de modélisation, cette autre valeur de paramètre doit être testée.

Il faut donc mieux explorer les facteurs qui contrôlent les paramètres physiologiques de ces deux populations et/ou envisager la prise en compte d'une autre population dont on déterminerait les paramètres physiologiques à part.

5. Conclusions et perspectives

Une attention particulière continuera d'être portée aux mesures d'activités tant nitrifiantes qu'hétérotrophes, délicates dans les eaux chargées comme celle des réseaux d'assainissement. Si les

mesures d'activités nitrifiantes montrent une grande variabilité, les mesures d'activités hétérotrophes ont parfois montré une saturation en thymidine difficile à atteindre.

Cette étude confirme, ainsi que nous l'avons montré par le passé, l'existence de "populations" bactériennes à caractéristiques physiologiques différenciées. Les résultats obtenus en 1998, montrent que les différences sont encore plus importantes que ce que nous avons précédemment évalué (un facteur 10 au lieu d'un facteur 4).

La remontée dans le réseau d'assainissement met en évidence une activité bactérienne importante dès les têtes de réseau.

La biologie moléculaire permet de mettre en évidence des différences génétiques au sein de la communauté bactérienne. Il s'agit désormais de mettre en évidence les modifications des communautés bactériennes en fonction de diverses contraintes, par les comparaisons d'échantillons variés (sites d'Achères et de Troyes dans des conditions variées). La quantification des bactéries nitrifiantes par PCR compétitive ou par la technique du FISH mérite d'être poursuivie. Nous chercherons à mettre en relation l'activité potentielle (mesure indirecte de la biomasse) et nos estimations par la biologie moléculaire (mesure directe).

Le modèle des processus (RIVE) restera enfin notre outil de choix pour explorer et mieux comprendre les observations, y compris celle de la biologie moléculaire.

6. Références bibliographiques

Berthe T., Garnier J., Petit F., Quantification de bactéries nitrifiantes du genre *Nitrobacter* en milieu aquatique (l'estuaire de la Seine, France). C.R. Acad. Sci. Paris, Sous presse.

Billen G., Garnier J., Hanset Ph., Modelling phytoplankton development in whole drainage networks: the RIVERSTRAHLER model applied to the Seine river system, *Hydrobiologia* 289 (1994) 119-137.

Brion N., Billen G., Une réévaluation de la méthode d'incorporation de $H^{14}CO_3^-$ pour mesurer la nitrification autotrophe et son application pour estimer des biomasses de bactéries nitrifiantes, *Rev. Sci. Eau* 11 (1998) 283-302.

Brion N., Etude du processus de nitrification à l'échelle de grands réseaux hydrographiques anthropisés, Thèse de Doctorat, Université de Bruxelles, 1997.

Degrange V., Bardin R., Detection and counting of *Nitrobacter* populations in soil by PCR, *Appl. Environ. Microbiol.* 61 (1995) 2093-2098.

Fuhrman, J.A. & Azam, F. (1980). Bacterioplankton secondary production estimates for coastal waters of British Columbia, Antarctica, and California. *Appl. Environ. Microb.*, 39: 1085-1095.

Fuhrman, J.A. & Azam, F.(1982). Thymidine incorporation as a measure of heterotrophic bacterioplankton production in marine surface waters: evaluation and field results. *Mar. Biol.* 66:109-120.

Garnier J., Billen G. and Servais P., Physiological characteristics and ecological role of small and large sized bacteria in a polluted river (Seine river, France). *Archiv. Hydrobiol. Ergebn. Limnol.* 37 (1992a) 83-94.

Garnier J., Servais P., Billen G. Bacterioplankton in the river Seine France. Impact of the Parisian urban effluent. *Can. J. Microbiol.* 38 (1992b) 56-64.

Garnier J., Billen G., Coste M. Seasonal succession of diatoms and Chlorophyceae in the drainage network of the River Seine : Observations and modelling. *Limnol. Oceanogr.* 40 (1995) 750-765.

Porter K.G., Freig Y.S., Use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora, *Limnol. Oceanogr.* 25 (1980) 943-948.

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

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

Tsai Y.L., Olson B.H., Rapid method for direct extraction of DNA from soil and sediments. *Appl Environ Microbiol* 57 (1991) 1070-1074.

Zachar V., Thomas R.A., Goustin A.S., Absolute quantification of target DNA: a simple competitive PCR for efficient analysis of multiple samples, *Nucleic Acids Res.* 21 (1993) 2017-2018.

Sommaire  général

**Introduction du thème 4 :
Micro-organismes et matière organique**

**Encore un effort du côté de la dégradation de la matière
organique**

**Caractérisation des groupes bactériens fonctionnels dans le
continuum "réseau d'assainissement/Step/milieu récepteur**

**Nouvelles méthodes pour l'étude des bactéries fécales appliquées
au bassin de la Seine**

Site urbain amont : Troyes