

Estimation de la biomasse bactérienne dans les effluents urbains par mesure de l'activité exoprotéolytique potentielle

Estimation of bacterial biomass in urban wastewaters by measuring potential exoproteolytic activity

P. SERVAIS *, A. ANZIL, D. FREBUTTE

Reçu le 30 mai 2000, accepté le 8 janvier 2001**.

SUMMARY

Recent studies have shown that when wastewaters are discharged into a river, heterotrophic bacterial biomass in the effluent exerts considerable influence on the biodegradation kinetics of organic matter and provokes the oxygen deficits often observed downstream from outfalls. Quantification of bacterial biomass in wastewaters is required for a good understanding of the biodegradation kinetics. Bacterial biomass can be estimated by epifluorescence microscopy after staining cells with fluorochrome. Applying this technique to wastewater samples, however, is painstaking and difficult. In this study, an alternative method for estimating bacterial biomass in wastewaters was tested; it consists of measuring the potential exoproteolytic activity (PEA) of bacteria. Previous studies on other types of aquatic systems have shown that bacterial biomass can be estimated from PEA. After optimising the PEA procedure for use with wastewater, we found a significant correlation between PEA and the bacterial biomass estimated by epifluorescence microscopy. This opens the way for PEA measurements for rapid and easy estimates of bacterial biomass in wastewaters. As an example of the application of this technique, the impact of wastewater treatment on bacterial biomass in effluents was investigated at various treatment plants. On the basis of our procedure, specific loads of bacterial biomass (load per inhabitant and per day) were calculated for raw and treated wastewaters.

Key-words : *bacterial biomass, wastewater, exoproteolytic activity.*

Écologie des systèmes aquatiques, Université libre de Bruxelles, campus de la Plaine, CP 221, 1050 Bruxelles, Belgique.

* Correspondance. E-mail : pservais@ulb.ac.be

** Les commentaires seront reçus jusqu'au 31 janvier 2002.

RÉSUMÉ

Des études récentes ont montré que, lors du rejet d'eaux usées dans une rivière, la quantité de biomasse bactérienne hétérotrophe amenée par les effluents influence considérablement la cinétique de biodégradation de la matière organique dans la rivière et donc les caractéristiques du déficit d'oxygène généralement observé dans le milieu naturel en aval du rejet. La mesure de la biomasse bactérienne contenue dans un rejet domestique est donc nécessaire afin de bien comprendre la cinétique de biodégradation. Cette biomasse peut être estimée en microscopie à épifluorescence après coloration des cellules bactériennes par un fluorochrome. Cette technique appliquée aux eaux usées est néanmoins difficile et fastidieuse. Dans cette étude, une méthode alternative à l'estimation de la biomasse bactérienne dans les eaux usées a été testée ; elle consiste à mesurer l'activité exoprotéolytique potentielle (AEP) des bactéries. Nous avons montré qu'il existait, dans les eaux usées, une corrélation significative entre l'AEP et la biomasse bactérienne estimée en microscopie à épifluorescence ce qui permet d'utiliser l'AEP pour estimer facilement et rapidement la biomasse bactérienne dans ce type d'échantillon. Comme exemple d'application, des mesures d'AEP nous ont permis d'étudier l'impact de divers types de traitement dans plusieurs stations d'épuration sur la biomasse bactérienne hétérotrophe des effluents urbains. Sur base de ces mesures, les charges spécifiques en biomasse bactérienne (charge par habitant et par jour) des eaux brutes et traitées ont pu être calculées.

Mots clés : *biomasse bactérienne, effluents urbains, activité exoprotéolytique.*

1 - INTRODUCTION

Dans les rivières, il est courant d'observer à l'aval de rejets d'eaux usées, une chute de la concentration en oxygène dissous. Cette diminution de concentration est due à une consommation accrue d'oxygène due à la biodégradation de la matière organique contenue dans les effluents. L'importance du déficit en oxygène observé dépend à la fois du débit relatif de la rivière et des effluents, de la température et de la quantité de matière organique biodégradable rejetée, généralement mesurée par la demande biochimique en oxygène (DBO₅). Toutefois, des études récentes ont montré que la biomasse bactérienne amenée par les rejets domestiques contribue de manière significative au processus de biodégradation dans la rivière (GARNIER *et al.*, 1992 a, b ; SERVAIS et GARNIER, 1993). Dès lors, la quantité de biomasse bactérienne rejetée influence la cinétique de biodégradation et donc les caractéristiques du déficit d'oxygène. Il est donc apparu important de pouvoir estimer de manière correcte, en plus de la quantité de matière organique, la biomasse bactérienne contenue dans un rejet domestique afin de bien comprendre la cinétique de biodégradation et de consommation d'oxygène dans la rivière. Pourtant, jusqu'à présent, l'estimation de la biomasse bactérienne totale dans les effluents urbains n'a reçu que peu d'intérêt, l'attention étant surtout concentrée sur les bactéries d'intérêt sanitaire (MIESCER et CABELLI, 1982).

Le dénombrement des bactéries et la mesure de leur taille en microscopie à épifluorescence, après coloration des cellules par un fluorochrome, le DAPI

(PORTER et FEIG, 1980), qui se lie spécifiquement au matériel génétique, est devenue depuis le début des années 80, la méthode classique d'estimation de l'abondance et de la biomasse des bactéries hétérotrophes dans les milieux aquatiques. Des premières mesures de l'abondance et de la biomasse bactérienne dans les effluents urbains ont été réalisées par cette méthode (GARNIER *et al.*, 1992a ; SEIDL *et al.*, 1999 ; SERVAIS *et al.*, 1999a, b). La méthode de dénombrement des bactéries en microscopie à épifluorescence appliquées aux eaux usées reste néanmoins fastidieuse et difficile pour l'observateur. Elle requiert, de plus, de briser les nombreux agrégats présents dans ce type d'eau avant la préparation microscopique (SERVAIS *et al.*, 1999a).

Dans la présente étude, une méthode alternative pour l'estimation de la biomasse bactérienne dans les eaux usées a été testée. Il s'agit de la mesure de l'activité exoprotéolytique potentielle (AEP) des bactéries qui consiste en une mesure de l'activité des exoprotéases des bactéries dans des conditions standards. La matière organique est présente dans les milieux aquatiques essentiellement sous la forme de composés de haut poids moléculaire (protéines ou polysaccharides) qui ne peuvent être directement assimilés par les bactéries, sans une hydrolyse préalable par des enzymes extra-cellulaires. Dans le cas des protéines, cette hydrolyse est réalisée par des enzymes protéolytiques extra-cellulaires, les exoprotéases. L'activité des exoprotéases peut être mesurée assez facilement en ajoutant aux bactéries un substrat non fluorescent présentant une liaison similaire à un lien peptidique. Le substrat est hydrolysé par les exoprotéases et libère un composé fluorescent (SOMVILLE et BILLEN, 1983). En conditions standards, la vitesse d'apparition de la fluorescence est proportionnelle à la quantité d'exoprotéases. Cette technique est maintenant couramment appliquée pour l'étude du compartiment bactérien dans les milieux aquatiques naturels (DEBROAS, 1998 ; HOPPE *et al.*, 1998 ; LAMY *et al.*, 1999 ; CUNHA *et al.*, 2000). Certains auteurs ont montré que dans divers types de milieux aquatiques tels que rivières et milieux marins (BILLEN, 1991) et eaux potables (LAURENT et SERVAIS, 1995), l'AEP était proportionnelle à la biomasse bactérienne. La mesure de l'AEP pouvait alors être considérée comme une alternative pour estimer la biomasse bactérienne. Dans ce travail, après avoir défini un protocole optimal de mesure de l'AEP dans les eaux usées, des mesures de biomasse bactérienne en microscopie et des mesures d'AEP ont été réalisées en parallèle sur diverses eaux usées brutes et traitées. L'objectif était de vérifier l'existence d'une corrélation entre l'AEP et la biomasse bactérienne estimée par microscopie dans ce type d'échantillons. Finalement, la méthode AEP a été utilisée afin d'étudier l'impact du traitement sur la biomasse bactérienne dans différentes stations d'épuration (STEP).

Dans cette étude, les estimations de biomasse bactérienne en microscopie ont été réalisées selon le protocole suivant. L'abondance bactérienne a été déterminée au microscope à épifluorescence (grossissement 1 000) après coloration des cellules au DAPI (concentration finale : 1 µg/ml) selon le protocole proposé par PORTER et FEIG (1980). Préalablement à la réalisation de la préparation microscopique, afin de briser les agrégats, l'échantillon est passé aux ultrasons à une puissance de 30 W durant 60 secondes. Ces conditions de passage aux ultrasons ont été optimisées sur les échantillons d'eau analysés durant cette étude (résultats non présentés). Lors du dénombrement, la taille des bactéries est également estimée par comparaison à un graticule et le biovolume des cellules est estimé. Pour calculer la biomasse bactérienne, le bio-

volume des cellules est converti en biomasse par la relation : $C = 92 \times V^{0.596}$ établie sur base des résultats de SIMON et AZAM (1989) où C est le contenu en carbone par bactérie (fgC) et V le biovolume (μm^3).

Pour mesurer l'activité exoprotéolytique des bactéries, SOMVILLE et BILLEN (1983), ont proposé d'utiliser un substrat artificiel non fluorescent, la L-Leucine- β -Naphthylamide (LL β N), qui est ajouté en concentration saturante à l'échantillon d'eau contenant les bactéries. Ce substrat possède un lien analogue à un lien peptidique qui est hydrolysé par les exoprotéases principalement fixées à la membrane des bactéries (VIVES REGO *et al.*, 1985). De la leucine et de la β -Naphthylamine (β N) fluorescente sont libérées. La vitesse d'augmentation de fluorescence correspondant à l'apparition de β N permet d'estimer l'AEP. Pratiquement, on ajoute de la LL β N (concentration finale 1 mM) à un mélange en proportion équivalente de l'échantillon d'eau usée et de tampon phosphate stérile (afin de fixer le pH à 8) et on incube à 20 °C pendant 20 à 30 minutes. Durant l'incubation des sous-échantillons sont prélevés et directement filtrés sur membrane en acétate de cellulose de porosité 8 μm ; la fluorescence des sous-échantillons est mesurée aux longueurs d'onde d'excitation et d'émission de 337 nm et 412 nm respectivement. Le fluorimètre est calibré avec des solutions étalons de β N. La concentration de β N libérée par hydrolyse est portée en fonction du temps d'incubation, le coefficient angulaire de la régression donne l'AEP qui est exprimée en nmole de β N libérée par litre d'échantillon et par minute (le calcul doit tenir compte de la dilution de l'échantillon dans le tampon). Des expériences préliminaires (résultats non présentés) ont permis de montrer que 1 mM de LL β N était une concentration saturante pour des mesures d'AEP dans les eaux usées, que l'activité enzymatique était maximale à pH 8 et que la filtration sur membrane de porosité 8 μm était nécessaire pour retenir des particules qui interféraient lors de la mesure de fluorescence.

Des mesures d'AEP selon le protocole décrit ci-dessus et de biomasse bactérienne déterminée en microscopie ont été réalisées en parallèle sur une quarantaine d'échantillons d'eaux usées collectées à l'entrée, à l'issue de l'étape de décantation primaire et en sortie de diverses STEP belges et françaises et à la sortie du collecteur principal des eaux usées de Bruxelles. Les résultats de ces mesures sont présentés à la *figure 1*. Une corrélation significative ($r^2 = 0,79$; $n = 40$; $p < 0,001$) est observée entre les deux mesures bien que celles-ci soient complètement différentes dans leur principe. Sur base de séries de triplicats de mesures réalisées sur un même échantillon, la précision relative des méthodes a été estimée à 14 % pour la détermination de la biomasse par microscopie et à 5 % pour l'AEP. La dispersion des points autour de la droite de régression de la *figure 1* peut s'expliquer par la précision respective des deux méthodes ainsi que par une contribution possible d'autres micro-organismes (champignons, protozoaires) que les bactéries à l'AEP, et par une possible variabilité de la quantité d'exoprotéases par unité de biomasse d'une souche bactérienne à l'autre et donc d'un échantillon à l'autre. La qualité de la corrélation suggère que les processus de régulation de la synthèse des enzymes exoprotéolytiques, décrits dans la littérature pour certaines souches (PRIEST, 1997 ; HOLZER, 1980) n'interfèrent pas dans la mesure de l'AEP. La pente de la droite de corrélation entre les deux mesures obtenue dans cette étude est un peu plus faible (0,06) que les pentes obtenues lors de comparaisons similaires effectuées sur d'autres milieux aquatiques. Ainsi, BILLEN (1991) trouvait respectivement une valeur de pente de 0,20 pour des

bactéries marines des régions tempérées et 0,18 pour des bactéries des eaux antarctiques, tandis que LAURENT et SERVAIS (1995) avaient obtenus une pente 0,15 pour des bactéries décrochées de biofilms. Ces différences de pente pourraient être dues à une quantité d'exoprotéases par unité de biomasse bactérienne différente selon le type de bactéries et donc selon l'origine des échantillons. Elles peuvent également être dues à des différences dans les procédures d'estimation de la biomasse bactérienne en épifluorescence. Ainsi dans les précédentes comparaisons, les bactéries étaient colorées à l'acridine orange avant dénombrement alors que dans notre étude elles ont été colorées au DAPI.

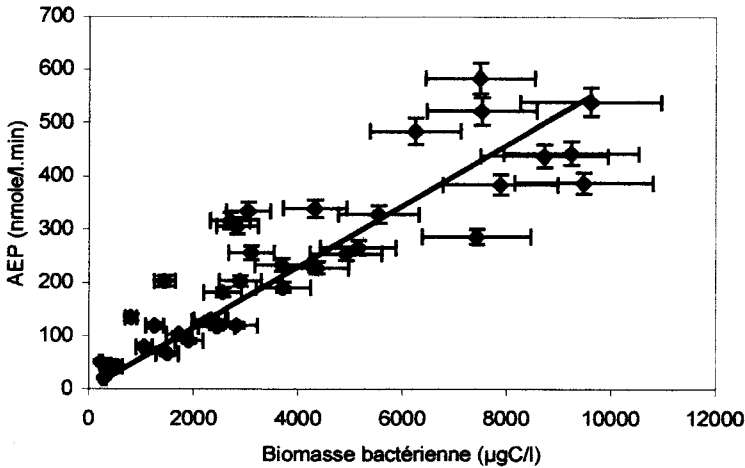


Figure 1 Relation entre l'AEP potentielle et la biomasse bactérienne estimée en microscopie dans des effluents urbains bruts et traités. Équation de la droite de corrélation forcée par l'origine : $AEP \text{ (nmole/l.min)} = 0,0574 * BIOMASSE \text{ (}\mu\text{g C/l)}$ ($r^2 = 0,79$; $n = 40$).

*Relationship between the potential exoproteolytic activity (PEA) and the bacterial biomass estimated by microscopy in raw and treated wastewaters. Equation of the correlation straight line passing through the origin: $PEA \text{ (nmole/l.min)} = 0.0574 * BIOMASS \text{ (}\mu\text{g C/l)}$ ($r^2 = 0.79$; $n = 40$).*

Vu le caractère significatif de la corrélation, la mesure de l'AEP apparaît donc comme une alternative intéressante pour l'estimation de la biomasse bactérienne dans les eaux usées. En effet, la simplicité du protocole expérimental de l'AEP et la rapidité de sa réponse (30 minutes) rendent les déterminations de biomasse plus aisées et moins fastidieuses ce qui devrait permettre d'accroître le nombre d'échantillons analysés.

Comme exemple d'application de la méthode de mesure de l'AEP sur des eaux usées, nous présentons ici les résultats d'estimations de biomasse faites sur des échantillons provenant de trois STEP situées en Belgique : Wavre (165 000 équivalent-habitants), Wasmuël (400 000 équivalent-habitants) et Corroy-le-Château (22 000 équivalent-habitants). La filière de traitement de deux premières STEP comprend un prétraitement (dégrillage, désablage, déshuilage), une décantation primaire et un traitement biologique par boues activées suivi d'une décantation secondaire. Dans la troisième STEP étudiée (Corroy-le-

Château), il n'y a pas de décantation primaire ; le traitement par boues activées suit immédiatement le prétraitement et est à aération prolongée.

Les résultats des mesures d'AEP converties en biomasse bactérienne par l'équation de la corrélation de la *figure 1* sont présentés à la *figure 2*. Ces valeurs résultent de la moyenne de trois ou quatre campagnes de mesures sur chaque STEP réalisées à diverses périodes de l'année. L'importance des barres d'erreur sur cette figure s'explique par la variabilité du contenu en biomasse bactérienne des effluents d'une campagne à l'autre et non par un problème de précision de la mesure. Une diminution de la biomasse bactérienne le long de la filière de traitement de l'eau dans les trois STEP est observée. L'abattement à l'issue de la décantation primaire fluctue entre 30 % à Wavre et 61 % à Wasmüel. Le pourcentage d'abattement global pour l'ensemble du traitement est assez proche dans les trois STEP ; il est compris entre 83 et 89 %. En sortie de STEP, les biomasses bactériennes ne sont pas très différentes d'une STEP à l'autre et sont comprises entre 700 et 950 $\mu\text{gC/l}$.

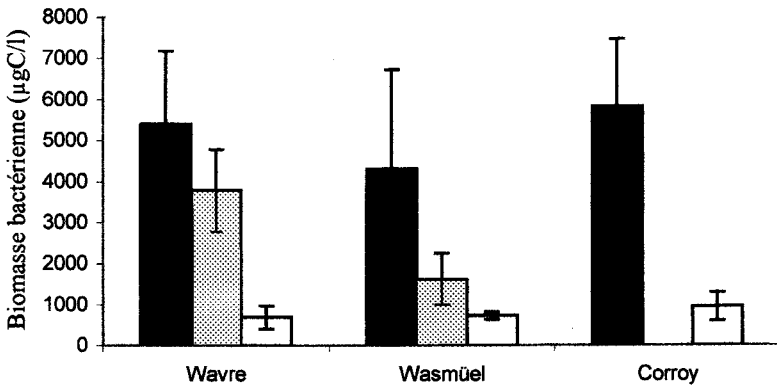


Figure 2 Biomasses bactériennes moyennes (calculées à partir de mesures d'AEP) dans les eaux brutes (en noir), dans les eaux décantées (en gris) et dans les eaux traitées (en blanc) des trois stations d'épuration étudiées.

Average bacterial biomass (calculated from PEA measurements) in raw waters (black), in settled waters (grey) and in treated waters (white) of three wastewater treatment plants.

Ces mesures de biomasse bactérienne permettent également de quantifier la charge spécifique totale exprimée en carbone bactérien par habitant et par jour présente dans les eaux brutes et les eaux traitées des trois stations d'épuration étudiées. Cette charge (exprimée en gramme de carbone bactérien par habitant et par jour) est calculée en multipliant la biomasse bactérienne mesurée par le débit traité lors de l'échantillonnage (exprimé en litre par jour) et en divisant la valeur obtenue par le nombre d'équivalent-habitant traité à la STEP considérée. Les charges spécifiques moyennes des eaux brutes et traitées pour les trois STEP sont reprises dans le *tableau 1*.

Tableau 1 Charges spécifiques moyennes et écarts types de la biomasse bactérienne dans les eaux brutes et les eaux traitées des trois STEP étudiées.

Table 1 Average specific loads and standard deviations of bacterial biomass in raw and treated waters of the three studied wastewater treatment plants.

Stations d'épuration	Eaux brutes gC/hab.j	Eaux traitées gC/hab.j
Wavre	1,15 ± 0,71	0,24 ± 0,11
Wasmuël	3,69 ± 1,73	0,71 ± 0,13
Corroy-le-château	2,09 ± 0,59	0,34 ± 0,12

Les valeurs des charges spécifiques en entrée de STEP sont comprises entre 1,15 et 3,69 g C/hab.j, (moyenne : 2,31 g C/hab.j). En sortie, elles varient entre 0,24 et 0,71 g C/hab.j (moyenne : 0,43 g C/hab.j). Ces valeurs sont du même ordre de grandeur que celles déterminées en microscopie pour trois STEP de la région parisienne par SERVAIS *et al.* (1999b) qui étaient en moyenne respectivement de 2,01 g C/hab.j pour les eaux brutes et de 0,16 g C/hab.j pour les eaux traitées. La connaissance de ces charges spécifiques permet à partir de la connaissance du nombre d'équivalent habitants d'un rejet de calculer approximativement la quantité de biomasse bactérienne apportée au milieu récepteur via le rejet.

En conclusion, les résultats obtenus dans cette étude montrent que la méthode de mesure de l'AEP est applicable aux effluents urbains domestiques, qu'elle donne des résultats bien corrélés aux estimations faites en microscopie avec l'avantage de la simplicité de la mesure et de la rapidité d'obtention des résultats.

REMERCIEMENTS

Les travaux présentés ci-dessus ont été partiellement réalisés dans le cadre du programme de recherche « PIREN Seine » soutenu par le CNRS (France).

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- BILLEN G., 1991. Protein degradation in aquatic environments. *In: Microbial enzymes in aquatic environments* (Ed. R. Chrost). Springer Verlag, Berlin, 123-143.
- CUNHA M.A., ALMEIDA M.A., ALCANTRA F., 2000. Patterns of exoenzymatic and heterotrophic bacterial activities along a salinity gradient in a shallow tidal estuary. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 204, 1-12.

- DEBROAS D., 1998. Temporal and spatial distribution of endopeptidase and exopeptidase activities in a eutrophic lake. *Hydrobiologia.*, 382, 161-173.
- GARNIER J., SERVAIS P., BILLEN G., 1992a. Dynamics of bacterioplankton in the river Seine (France) : impact of parisian effluents. *Can. J. Microbiol.*, 38, 56-64.
- GARNIER J., BILLEN G., SERVAIS P., 1992b. Physiological characteristics and ecological role of small and large sized bacteria in a polluted river (Seine River, France). *Arch. Hydrobiol. Beih.*, 37, 83-94.
- HOLZER H., 1980. Control of proteolysis. *Ann. Rev. Microbiol.*, 49, 63-91.
- HOPPE H.G., GIESENHAGEN H.C., GOCKE., 1998. Changing patterns of bacterial substrate decomposition in a eutrophication gradient. *Aquat. Microb. Ecol.*, 15, 1-13.
- LAMY, F., BIANCHI M., VAN WAMBEKE, F., SEMPERE R., TALBOT V., 1999. Use of data assimilation techniques to analyze the significance of ectoproteolytic activity measurements performed with the model substrate MCA-Leu. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 177, 27-35.
- LAURENT P., SERVAIS P., 1995. Fixed bacterial biomass estimated by potential exoproteolytic activity. *Can. J. Microbiol.*, 41/48, 743-752.
- MIESCIEJER J.J., CABELLI V.J., 1982. Enterococci and other microbial indicators in municipal wastewater effluents. *J. Wat. Pol. Contr. Fed.*, 54, 1599-1606.
- PORTER K.G., FEIG Y.S., 1980. The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. *Limnol. Oceanogr.*, 25, 943-948.
- PRIEST F.G., 1977. Extracellular enzyme synthesis in the genus *Bacillus*. *Bacteriol. Rev.*, 41, 711-753.
- SERVAIS P., GARNIER J., 1993. Contribution of heterotrophic bacterial production to the carbon budget of the river Seine (France). *Microb. Ecol.*, 25, 19-33.
- SERVAIS P., SEIDL M., MOUCHEL J.M., 1999a. Comparison of parameters characterising organic matter in a combined sewer during rain events and dry weather. *Water Environmental Research*, 71, 408-417.
- SERVAIS P., GARNIER J., DEMARTEAU N., BRION N., BILLEN G., 1999b. Supply of organic matter and bacteria to aquatic ecosystems through waste water effluents. *Wat. Res.*, 33, 3521-3531.
- SEIDL M., SERVAIS P., MARTAUD M., GAN-DOUIN C., MOUCHEL J.M., 1998. Organic carbon biodegradability and heterotrophic bacteria along a combined sewer catchment during rain events. *Wat. Sci. Technol.*, 37, 25-33.
- SIMON M., AZAM F., 1989. Protein content and protein synthesis rates of planktonic marine bacteria. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 51, 201-213.
- SOMVILLE M., BILLEN G., 1983. A method for determining exoproteolytic activity in natural waters. *Limnol. Oceanogr.*, 28, 190-193.
- VIVES-REGO J., BILLEN G., FONTIGNY A., SOMVILLE M., 1985. Free and attached proteolytic activity in water environments. *Mar. Ecol. Progr. Ser.*, 21, 245-249.