

Effacité d'une lagune dans l'élimination de polluants chimiques : cas des nitrates et des phosphates.

MUR Joanna
ORTEGA Danaëlle
SOLBET Cassandre
TAOUIL Lisa



1^{ère} STL (sciences et techniques de laboratoire)
Option "Biotechnologie"

Promotion
2017/2018

LYCEE JAY DE BEAUFORT
9 rue de Turenne
BP 7083
24000 PERIGUEUX CEDEX

1. Introduction.....	3
2. Notre problématique.....	3
2.1. Les ions nitrates NO_3^- (5)	3
2.2. Les ions phosphates PO_4^{3-} (6)	4
3. Le dispositif.....	5
4. Les techniques de dosage employées	6
4.1 Photométrie d'absorption et dosages spectrophotométriques :	6
4.1.1 La loi de Beer Lambert	6
4.1.2 Dosage des nitrates	7
4.1.3 Dosage des phosphates.....	7
4.2 Mesure de la charge microbienne.....	7
4.3 Présentation des résultats.....	7
5. Résultats	8
5.1. Cas des ions nitrates.....	8
5.1.1. Préparation des échantillons.....	8
5.1.2 Courbe d'étalonnage du spectrophotomètre (GENESIS 10S UV-VIS).....	10
5.1.3 Détermination de la teneur en nitrate dans les échantillons d'eau des bacs	11
5.2. Cas des phosphates	12
5.2.1. Préparation de la solution étalon de P	12
5.2.2 Dosage des phosphates (méthode de Misson) : Courbe d'étalonnage du spectrophotomètre	13
5.2.3 Détermination de la teneur en phosphate dans nos différents échantillons d'eau.....	14
5.3. Evolution de la biomasse bactérienne	16
5.4 Relation biomasse et nitrates.....	17
5.4.1. Cas du bac 2.....	18
5.4.2 Cas du bac 3.....	19
6. Discussion des résultats	19
7. Conclusion	20
Que nous a apporté ce projet ?.....	20
Bibliographie	20
ANNEXE 1 : FICHE TECHNIQUE DU DOSAGE DES NITRATES	21
ANNEXE 2 : FICHE TECHNIQUE DU DOSAGE DU PHOSPHORE DANS UNE EAU	23
ANNEXE 3 : FICHE TECHNIQUE POUR LA MESURE DE LA BIOMASSE	24

1. Introduction

Toutes consommations confondues (personnelle, agricole et industrielle), annuellement un terrien nécessite 730 000 litres d'eau, soit 2000 litres par jour (1).

L'eau potable, denrée indispensable à la vie, est de plus en plus rare. L'eau est polluée par les nombreuses activités humaines. Chaque jour l'humanité pollue deux milliards de m³ d'eau qui sont rejetés dans les rivières et les mers, soit plus de 730 milliards de m³ d'eau usée par an (2).

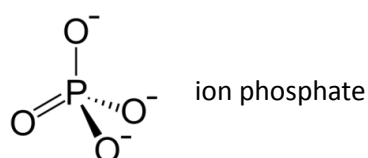
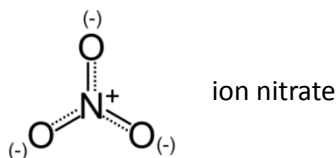
Les stations d'épuration traitent des eaux usées, mais certains pays sont peu ou non équipés ou ont des stations d'épuration de capacité insuffisante (pays d'Asie, ...). De ce fait, les eaux usées et les matières solides qu'elles contiennent sont rejetées directement dans les rivières et les fleuves (3).

L'eau polluée constitue un facteur dangereux pour de nombreuses espèces terrestres et aquatiques dépendantes de cette eau. Cette pollution met en danger les écosystèmes ainsi que notre propre santé. Même si nous ne buvons pas directement ces eaux, celles-ci contaminent les sols et les nappes phréatiques. Ces eaux polluées posent donc des problèmes sanitaires ; elles sont à l'origine de nombreuses pathologies hydriques (4):

- pathologies bactériennes :
 - choléra, (*Vibrio cholerae*)
 - diarrhées (*Escherichia coli*, *Shigella sp*, ...)
 - fièvre typhoïde (*Salmonella Typhi*) et paratyphoïde (*Salmonella Paratyphi*), ...
- pathologies parasitaires :
 - schistosomias (*Schistosoma*), ...
- pathologies dues à la présence de toxiques biologiques :
 - toxines cyanobactériennes produites par diverses espèces de cyanobactéries, ...
- pathologies dues à la présence de composés chimiques :
 - méthémoglobinémie (due à un excès de nitrate),
 - métaux lourds (mercure, ...), ...

2. Notre problématique

Dans cette étude nous nous intéresserons à deux polluants chimiques facilement analysables par nous même dans les laboratoires de notre lycée : il s'agit des ions nitrate et des ions phosphate. Ces deux ions présentent un réel danger pour l'environnement lorsqu'ils sont présents en trop grande quantité: eutrophisation des eaux,



2.1. Les ions nitrates NO₃⁻ (5)

L'azote rejeté d'une habitation se trouve rapidement dans le réseau sous ses deux formes réduites :

- organique, fonction amine des acides aminés (-NH₂), urée (NH₂CONH₂) :
- ammoniacale (NH₃ et NH₄⁺).

Des apports de formes oxydées de l'azote, particulièrement de nitrates, peuvent exceptionnellement être observés lors des épisodes pluvieux, ou lorsque des eaux parasites riches en nitrates s'infiltrent dans le réseau.

Les quantités d'azote rejetées sont estimées en d'équivalent-habitant en azote (EqH_N). Cette valeur se situe entre 12 et 15 g N réduit/jour selon la taille de l'agglomération (5).

Lors du traitement des eaux usées, une certaine proportion de l'azote se retrouve sous forme oxydée : NO₃⁻. Il doit être en partie éliminé avant la réintroduction de l'eau traitée dans le réseau naturel. Cette élimination fait intervenir divers processus :

- Dénitratation puis dénitratation avec libération de N₂ par les bactéries du cycle de l'azote ;
- Captation des nitrates par les végétaux d'une lagune.

2.2. Les ions phosphates PO₄³⁻ (6)

Dans les eaux usées, l'origine des phosphates est multiple. Il provient :

- du métabolisme humain : un homme excrète entre 1 et 2 grammes de P par jour ;
- des produits lessiviels et de nettoyage : 1 à 2 grammes de P par jour et par habitation ;
- des rejets industriels : les effluents d'industries agro-alimentaires, d'abattoirs, de laveries industrielles, d'industries de traitement de surface et d'industries chimiques spécialisées ;
- les rejets agricoles ou d'origine naturelle sont retenus dans les sols. Ils ne se retrouvent pas dans les eaux usées. Mais les eaux de surface, issues de l'érosion et du ruissellement lors des pluies, entraînent des particules de ces sols dans les cours d'eau.

L'élément P, à travers les ions phosphates, est responsable de l'eutrophisation¹ des rivières, lacs et réservoirs. C'est un problème majeur en France et en Europe.

Cette eutrophisation a des conséquences néfastes sur l'écosystème qui se déséquilibre :

- prolifération des microalgues (cyanobactéries, ...) entraînant une augmentation de la turbidité de l'eau. Il y a moins de lumière qui pénètre, les végétaux meurent et pourrissent. Cette destruction se traduit par la surconsommation de dioxygène, donc un appauvrissement rapide du taux de dioxygène dissous dans l'eau, entraînant *de facto* l'asphyxie des poissons.
- production d'odeurs nauséabondes et parfois de gaz toxiques (H₂S, ...),
- production des composés toxiques qui peuvent être à l'origine d'intoxications animales (7), voire humaines.

Cette pollution nuit à la qualité de ces eaux de surface ce qui en limite leur utilisation : production d'eau potable, loisirs (pêche, baignade, sport nautique, lâcher d'eau), activités industrielles (transport, production d'énergie électrique).

Dans la croissance des végétaux (algues en particulier), l'élément P est un facteur limitant. La réduction de la charge en P dans l'eau réduira l'eutrophisation de celle-ci.

Notre problématique est la suivante :

Est-ce qu'une lagune à macrophytes endémiques peut éliminer de façon significative ces deux polluants : nitrates et phosphates. Est-ce que cette élimination est due aux bactéries, aux plantes ou aux deux ?

¹ L'eutrophisation est due à un enrichissement en nutriments (azotés et phosphorés en particulier) conduisant à un développement excessif d'algues.

Pourquoi des plantes endémiques :

De part le passé, des plantes exotiques (dans le sens non endémique) se sont révélées être des plantes invasives lorsque l'Homme les a importées (Elodée du Canada, *Caulerpa taxifolia*...) à des fins autres (aquariophilie par exemple). Nous souhaitons donc éviter ce type de désagrément.

3. Le dispositif

Le dispositif, présenté dans le document 1, permet de tester une eau polluée par nos soins, en bacs, dans différentes conditions :

- eau polluée,
- eau polluée + plantes (cresson, menthe aquatique, roseaux ...),
- eau polluée + plantes + désinfectant. Le désinfectant (cachet pour stériliser les biberons à froid) permettra de réduire la charge microbienne dans l'eau au départ.

L'eau polluée a été préparée de la façon suivante :

- | | |
|-------------------------------------|-----------------------|
| - nitrate de sodium | 2g |
| - dihydrogénophosphate de potassium | 2g |
| - H ₂ O du robinet | qsp 1 dm ³ |

Nous avons préparé 15 dm³ de cette eau.

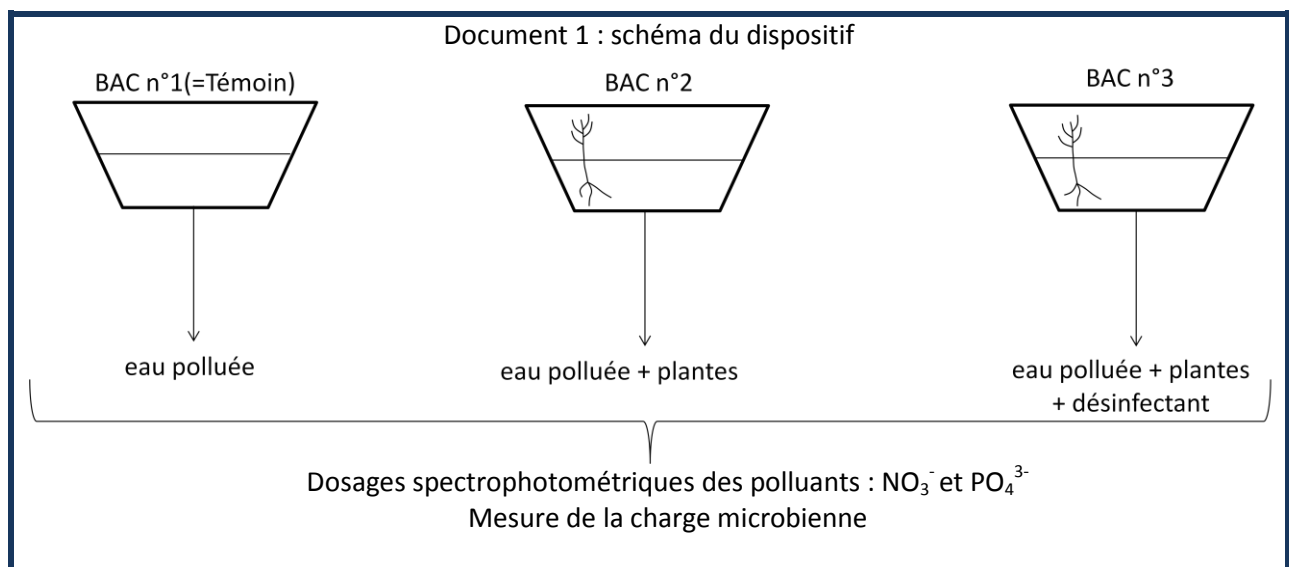


Dans ces bacs, nous suivrons régulièrement l'évolution :

- de la teneur en ions phosphate et nitrate par des techniques d'analyses spectrophotométriques.
- de la charge microbienne

Grâce à l'ensemble des résultats nous espérons mettre en évidence:

- l'efficacité d'une lagune à éliminer ces deux polluants chimiques ;
- le rôle des microorganismes dans cette dépollution.





Les plantes proviennent d'un bassin naturel personnel. A partir du bloc de végétation initial fourni, nous avons réalisé deux blocs identiques en taille pour "végétaliser" les bacs 2 et 3. Ces blocs de végétation apportant leur propre volume d'eau dans l'essai, ils génèrent donc une dilution de l'eau polluée de ces bacs. De ce fait, nous avons attendu 4 heures avant de réaliser le 1^{er} prélèvement. Ce délai permet au milieu aquatique de s'équilibrer sur le plan ionique mais aussi de laisser le temps au désinfectant du bac 3 d'agir sur la population microbienne.

Ces bacs ont été placés dans un laboratoire

- très peu chauffé : la température de la pièce à cette période reste inférieure à 16°C ;
- exposé en façade nord, donc peu ensoleillé en année normale et compte tenu de la météorologie particulière de novembre et décembre 2017 pas du tout ensoleillée cette année.

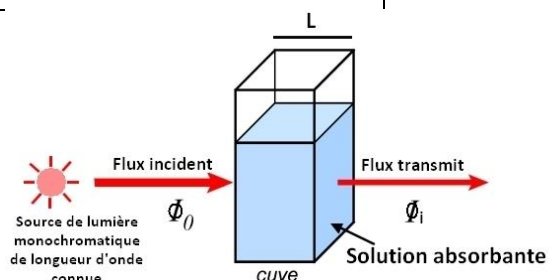
4. Les techniques de dosage employées

4.1 Photométrie d'absorption et dosages spectrophotométriques :

4.1.1 La loi de Beer Lambert

Lorsqu'un faisceau de lumière monochromatique traverse une solution contenue dans une cuve transparente, à une longueur d'onde donnée, plusieurs cas peuvent se présenter :

Le flux de photons sortant est égal au flux entrant : la solution est transparente.	Le flux de photons entrant est totalement absorbé par les espèces chimiques de la solution : la solution est opaque.	Le flux de photons sortant est atténué, une partie de la lumière a été absorbée par les espèces chimiques de la solution : La solution est absorbante.



L'absorbance (A) d'une solution mesure la capacité d'un milieu à absorber la lumière qui le traverse. L'absorbance se calcule selon la formule suivant : $A = \log_{10} \frac{\Phi_0}{\Phi_i}$, c' est un nombre sans unité.

La loi de Beer-Lambert établit une relation entre l'absorbance et la concentration de la substance.

L'absorbance (A) d'une substance absorbante en solution est proportionnelle à l'épaisseur de la solution traversée (l) et à la concentration (c) de la solution.

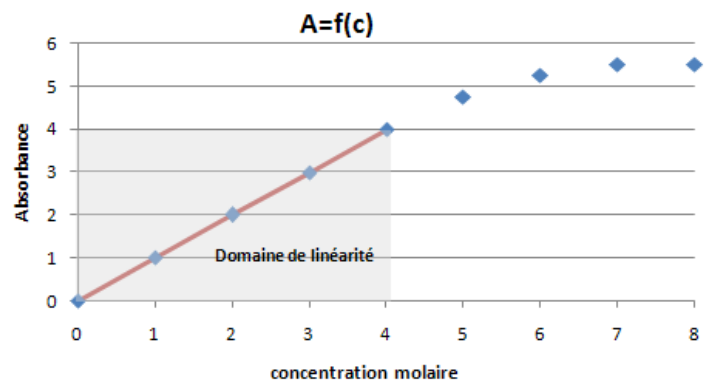
$$A = \epsilon \times l \times c$$

- l : longueur du trajet optique (souvent l'épaisseur de la cuve) : unité cm ;
- c (x : solution analysée) : concentration molaire du composé dosé x dans la solution analysée :
unité mol.L⁻¹
- ϵ : coefficient d'extinction molaire. C'est une constante qui dépend de la substance x, de la longueur d'onde λ et de la température. Son unité est L.mol⁻¹.cm⁻¹.

Par conséquent : la courbe présentant $A = f(c)$ est une droite passant par l'origine. Elle établit la proportionnalité entre l'absorbance et la concentration.

Cette loi est valable seulement :

- pour des faibles concentrations de la substance absorbante, au-delà d'une certaine valeur de **c** la courbe s'infléchit et il n'y a plus de proportionnalité entre **A** et **c** ;
- en lumière monochromatique.



4.1.2 Dosage des nitrates

Nous avons utilisé le kit de dosage **suivant** commercialisé par LIBIOS: NITRATES / NITRITES ASSAY KIT (méthode **enzymatique /colorimétrique**) Référence : **NITRATES-100C (version : 072013-7)**

La fiche technique est présentée en annexe 1

4.1.3 Dosage des phosphates

Nous avons utilisé la technique colorimétrique de Misson. La fiche technique est présentée en annexe 2

4.2 Mesure de la charge microbienne

Après des dilutions décimales de l'échantillon, la biomasse bactérienne est évaluée sur une prise d'essai de chacune de ces dilutions comme cela est précisé dans la fiche technique présentée en annexe 3.

4.3 Présentation des résultats

Les divers résultats obtenus sont enregistrés sur un tableur/grapheur. Il nous permet :

- de présenter les résultats ;
- de faire les calculs intermédiaires ;
- vérifier la qualité de notre travail ;
- de tracer les différentes courbes obtenues pour en faire les analyses.

5. Résultats

5.1. Cas des ions nitrates

5.1.1. Préparation des échantillons

Le kit de dosage utilisé précise que la limite de linéarité de la loi de Beer-Lambert s'obtient pour une concentrations de masse $\rho_{(\text{nitrate}; \text{échantillon})} \leq 44 \text{ ppm}$. Soit 44 μg de nitrate pour 1g ou 1 cm^3 d'eau.

Dans notre travail, l'eau a été polluée par du nitrate de sodium NaNO_3 pur et anhydre pour une concentration massique $\rho_{(\text{NaNO}_3; \text{eau polluée})} = 2 \text{ g.L}^{-1}$. Il faut déterminer la concentration massique en nitrate dans cette eau : $\rho_{(\text{NO}_3^-; \text{eau polluée})}$ en g.L^{-1} . Puis, déterminer la dilution à appliquer aux échantillons d'eau polluée pour que ceux-ci présentent une concentration massique en nitrate inférieure à la limite précisée dans le kit de dosage employé.

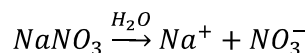
5.1.1.1. Calcul de la concentration massique en nitrate de l'eau polluée

a) déterminer la concentration molaire en NaNO_3 dans l'eau polluée $c_{(\text{NaNO}_3; \text{eau polluée})}$

$$c_{(\text{NaNO}_3; \text{eau polluée})} = \frac{\rho_{(\text{NaNO}_3; \text{eau polluée})}}{M_{(\text{NaNO}_3)}}$$

b) déterminer la concentration molaire en ion nitrate dans l'eau polluée

Selon l'équation de dissolution du nitrate de sodium dans l'eau :



Nous constatons que dans l'eau, une mole de NaNO_3 donne une mole de NO_3^- alors nous pouvons affirmer que

$$c_{(\text{NaNO}_3; \text{eau polluée})} = c_{(\text{NO}_3^-; \text{eau polluée})}$$

c) déterminer la concentration de masse de nitrate dans l'eau polluée $\rho_{(\text{NO}_3^-; \text{eau polluée})}$

$$\rho_{(\text{NO}_3^-; \text{eau polluée})} = c_{(\text{NO}_3^-; \text{eau polluée})} \times M_{(\text{NO}_3^-)}$$

Par combinaison de (a), (b), (c) on obtient :

<u>Equation aux grandeurs</u>	$\rho_{(\text{NO}_3^-; \text{eau polluée})} = \frac{\rho_{(\text{NaNO}_3; \text{eau polluée})}}{M_{(\text{NaNO}_3)}} \times M_{(\text{NO}_3^-)}$
<u>Equation aux unités</u>	$\left[\frac{\text{g}}{\text{L}} \right] = \left[\frac{\frac{\text{g}}{\text{L}}}{\frac{\text{g}}{\text{mol}}} \times \frac{\text{g}}{\text{mol}} \right]$
<u>Equation aux valeurs</u>	$\rho_{(\text{NO}_3^-; \text{eau polluée})} = \frac{2}{85} \times 62 = 1,46$

Donnée : $M_{(\text{NaNO}_3)} = 85 \text{ g.mol}^{-1}$, $M_{(\text{NO}_3^-)} = 62 \text{ g.mol}^{-1}$,

Donc la concentration massique en ions nitrate de l'eau polluée est de 1,46 g.L^{-1} .

5.1.1.2 Calcul de la valeur de la dilution : D à appliquer aux échantillons

Les données du problème sont les suivantes

$$\rho(\text{NO}_3^-; \text{eau polluée diluée}) \leq 44 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$$

$$\rho(\text{NO}_3^-; \text{eau polluée}) = 1,46 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} = 1,46 \cdot 10^3 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$$

La dilution se définit de la façon suivante :

<u>Equation aux grandeurs</u>	$D = \frac{\rho(\text{NO}_3^-; \text{eau polluée diluée})}{\rho(\text{NO}_3^-; \text{eau polluée})}$
<u>Equation aux unités</u>	$[1] = \left[\frac{\frac{\mu\text{g}}{\text{cm}^3}}{\frac{\mu\text{g}}{\text{cm}^3}} \right]$
<u>Equation aux valeurs</u>	$D = \frac{44}{1,46 \cdot 10^3} = 0,030 = \frac{1}{33,2}$

La dilution à réaliser pour chacun des échantillons est de 1/33,2, valeur difficile à obtenir. Nous avons choisi de diluer les échantillons au 1/50 sous un volume final $V_{(\text{échantillon eau polluée diluée})} = 1 \text{ cm}^3$.

Quel est le volume $V_{(\text{échantillon eau polluée})}$ à prélever et quel est le volume de diluant $V_{(\text{diluant})}$ utilisé ?

<u>Equation aux grandeurs</u>	$D = \frac{V_{(\text{échantillon eau polluée})}}{V_{(\text{échantillon eau polluée diluée})}} \text{ donc}$ $V_{(\text{échantillon eau polluée})} = D \times V_{(\text{échantillon eau polluée diluée})}$
<u>Equation aux unités</u>	$[\text{cm}^3] = [1 \times \text{cm}^3]$
<u>Equation aux valeurs</u>	$V_{(\text{échantillon eau polluée})} = \frac{1}{50} \times 1 = 0,02$



Pour réaliser cette dilution au 1/50 des échantillons d'eau polluée ; il faut :

- prélever $0,02 \text{ cm}^3$ ou 20 mm^3 de chacun des échantillons
- ajouter 980 mm^3 de diluant (eau distillée) pour obtenir un volume final de 1000 mm^3 ou 1 cm^3 .

5.1.2 Courbe d'étalonnage du spectrophotomètre (GENESIS 10S UV-VIS)

A partir de l'étalon de dosage fourni dans le kit, nous avons réalisé la gamme d'étalonnage : les concentrations massiques obtenues $\rho(NO_3^-; \text{solution étalon})$ en $\mu\text{g.mL}^{-1}$ dans chacun des tubes sont présentées dans le tableau 1.

Le blanc réactif a été réalisé en remplaçant la solution étalon par de l'eau distillée.

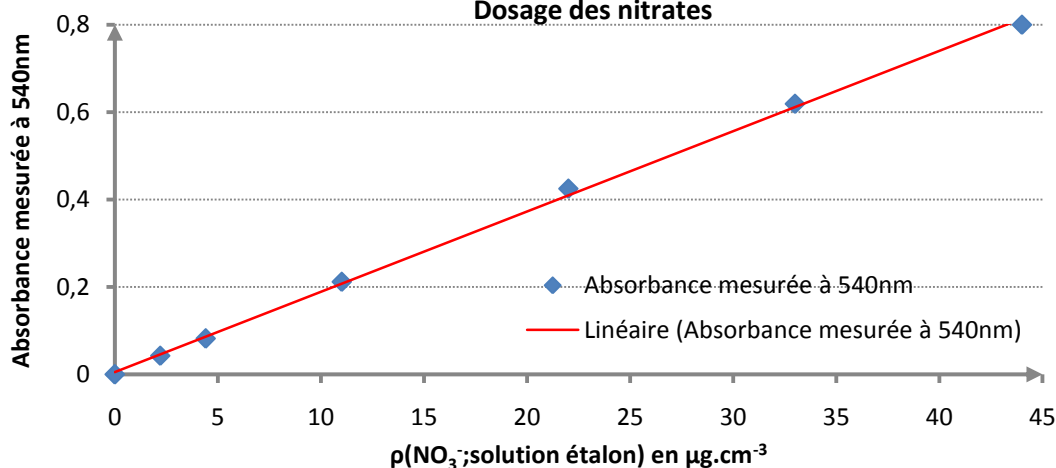
La gamme d'étalonnage réalisée a été lue contre le blanc à la longueur d'onde de 540nm.

Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 1 :

Tableau 1 : Variation de l'absorbance à 540nm pour les solutions étalons utilisées		
Tube	$\rho(NO_3^-; \text{solution étalon})$ en $\mu\text{g.mL}^{-1}$	Absorbance mesurée à 540nm
Blanc	0	0
1	2,2	0,043
2	4,4	0,082
3	11	0,212
4	22	0,425
5	33	0,619
6	44	0,8

Tableau 2 : caractéristique de la courbe d'étalonnage obtenue	
Pente de la courbe	0,0184
Ordonnée à l'origine	0,0057
Coef. de corrélation	0,9995

**Graphe 1 : Etalonnage du spectrophotomètre
Dosage des nitrates**



L'analyse des données calculées du tableau 2 et du graphe 1 montre que :

- le coefficient de corrélation est très proche de 1, par conséquent les points obtenus sont bien alignés. Ce dosage demande de réaliser au total 6 pipetages nous avons travaillé correctement ;
- nous avons obtenu une droite : la loi de Beer Lambert est vérifiée dans le domaine $[0 ; 44] \mu\text{g}$ de nitrate par cm^3 d'eau analysée ;
- l'équation du dosage est donc : $A = 0,0184 \cdot \rho(NO_3^-; \text{échantillon}) + 0,0057$ où :
 - **A** est l'absorbance de l'échantillon d'eau analysé
 - **ρ** sa concentration massique en nitrate en $\mu\text{g.cm}^{-3}$ (notre valeur inconnue que nous calculerons grâce à cette équation).

5.1.3 Détermination de la teneur en nitrate dans les échantillons d'eau des bacs

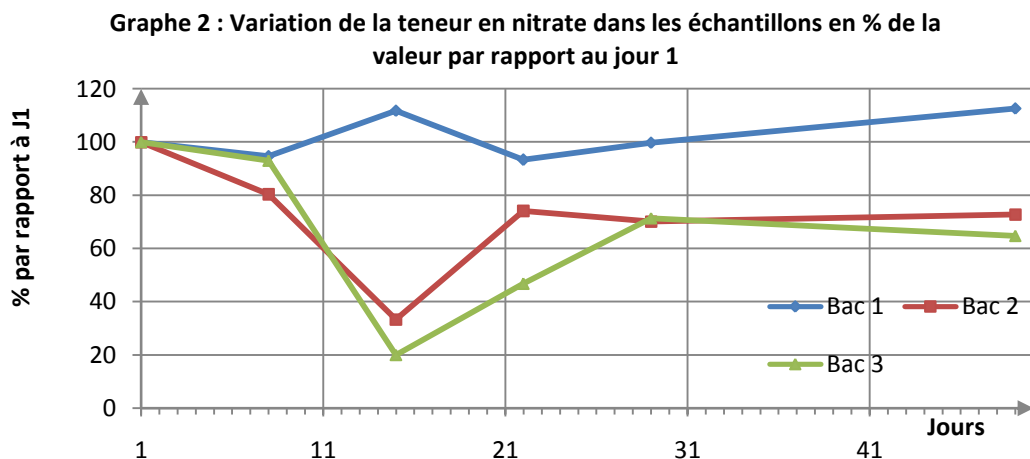
Nous avons réalisé l'étalonnage et le dosage des échantillons en même temps, le même jour et dans les mêmes conditions ; nous pouvons utiliser cette équation pour déterminer la concentration massique en nitrates dans tous les échantillons prélevés lors de notre expérimentation.

La formule de calcul sera la suivante :

<u>Equation aux grandeurs</u>	$\rho(NO_3^-; \text{eau polluée de l'échantillon } x) = \frac{(A_{\text{eau polluée d'kuée de l'échantillon } x} - 0,0057)}{0,0184} \times \frac{1}{D}$
<u>Equation aux unités</u>	$[\mu g.cm^{-3}] = \left[\frac{\frac{1}{1}}{\frac{1}{\mu g.cm^{-3}}} \times 1 \right]$
Exemple pour l'échantillon d'eau du bac 1 prélevé au jour 15 de la manipulation : A = 0,404	
<u>Equation aux valeurs</u>	$\rho(NO_3^-; \text{eau polluée bac1J15}) = \frac{(0,404 - 0,0057)}{0,0184} \times \frac{1}{\frac{1}{50}} = 1082$

La concentration en nitrate dans le bac 1 au jour 15 est 1082 $\mu g.cm^{-3}$ soit 1,08mg. cm^{-3} ou 1,08g.dm $^{-3}$

Les courbes du graphe 2 présentant la variation de la teneur en nitrate en pourcentage par rapport à la valeur au jour 1 dans chacun des bacs en fonction temps ont été tracées.



La lecture des courbes du graphe 2 montrent que :

- dans le bac 1 (eau polluée) la teneur en nitrate ne varie pas en fonction du temps ;
- dans le bac 2 (eau polluée + plantes) la teneur en nitrate évolue en deux phases :
 - Entre J1 et J15, la teneur en ions nitrate décroît fortement : - 70 % ;
 - ensuite la teneur en ions nitrate augmente pour revenir à un taux voisin de 70 % de la valeur de départ à la fin de notre expérimentation ;
- dans le bac 3 (eau polluée + plantes + traitement antimicrobien) la teneur en nitrate évolue en trois phases :
 - Entre J1 et J8, la teneur en ions nitrate reste quasiment stable comme pour le bac témoin ;
 - Après J8, la teneur en ions nitrate décroît fortement : - 80 % à J15 ;

- Elle augmente ensuite pour revenir à un taux voisin de 70 % de la valeur de départ à la fin de notre expérimentation.

Pourquoi une augmentation de la teneur en ions nitrate après le 15^{ème} jour dans les bacs 2 et 3 ?

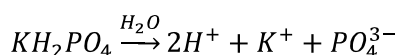
Au milieu de l'expérimentation, nous avons constaté l'apparition d'une odeur nauséabonde de putréfaction dans la pièce utilisée. Cela pourrait correspondre à un début de putréfaction des blocs de plantes qui ont servi à coloniser ces bacs. Le manque de lumière durant cette période (fin automne début hiver) associé à un mauvais choix d'exposition de notre dispositif (façade nord du lycée) n'aurait pas permis un bon développement des plantes. Celles-ci auraient alors pourri et de ce fait auraient libéré de l'ammoniaque. Ce dernier étant alors oxydé en nitrate par la flore microbienne présente. De ce fait, la teneur en nitrate augmente à nouveau dans l'eau. Ce que montrent les courbes correspondantes.

5.2. Cas des phosphates

Nous avons suivi le protocole de manipulation présenté dans l'annexe 2.

5.2.1. Préparation de la solution étalon de P

Il faut préparer une solution étalon dont la concentration massique, exprimée en g de P (phosphore) par litre d'eau soit $\rho_{(P;sol.étalon)} = 20\mu g.cm^{-3}$ à partir de dihydrogénophosphate de potassium pur et anhydre. Quelle est la masse de dihydrogénophosphate de potassium à peser pour préparer $1dm^3$ de cette solution ?



1 mole de KH_2PO_4

correspond

1 mole de P

$C_{(KH_2PO_4;sol.étalon)}$

$\Leftrightarrow$

$C_{(P;sol.étalon)}$

$\frac{\rho_{(KH_2PO_4;sol.étalon)}}{M_{(KH_2PO_4)}}$

$\Leftrightarrow$

$\frac{\rho_{(P;sol.étalon)}}{M_{(P)}}$

$$\frac{\rho_{(KH_2PO_4;sol.étalon)}}{M_{(KH_2PO_4)}} = \frac{\rho_{(P;sol.étalon)}}{M_{(P)}}$$

<u>Equation aux grandeurs</u>	$\rho_{(KH_2PO_4;sol.étalon)} = \frac{\rho_{(P;sol.étalon)}}{M_{(P)}} \times M_{(KH_2PO_4)}$
<u>Equation aux unités</u>	$[g.dm^{-3}] = \left[\frac{g.dm^{-3}}{g.mol^{-1}} \times g.mol^{-1} \right]$
<u>Equation aux valeurs</u>	Données : $M_{(KH_2PO_4)} = 136g.mol^{-1}$; $M_{(P)} = 31g.mol^{-1}$ $\rho_{(P;sol.étalon)} = 20\mu g.cm^{-3}$ soit $20.10^{-3}g.dm^{-3}$ $\rho_{(KH_2PO_4;sol.étalon)} = \frac{20.10^{-3}}{31} \times 136 = 0.08774$

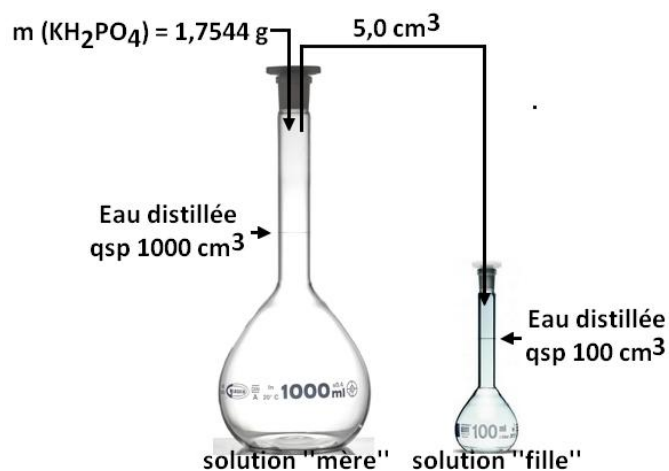
Pour préparer une solution étalon de $1dm^3$ dont la concentration massique est de $\rho_{(P;sol.étalon)} = 20\mu g.cm^{-3}$, il faut peser 0.08774 g de dihydrogénophosphate de potassium.

Compte tenu des caractéristiques des balances de précision du lycée :

- un affichage à 10^{-4} g ;
- une précision de $\pm 3.10^{-4}$ g.

Il est possible de réaliser cette solution étalon en une seule étape. Comme le montre le schéma ci-contre, nous avons préparé une solution étalon "mère" 20 fois plus concentrée par pesée de $m_{(KH_2PO_4)}=1,7549$ g. Cette solution a été ensuite diluée au 1/20 pour donner la solution étalon "fille" à la concentration attendue.

Nous avons pesé exactement $m_{(KH_2PO_4)} = 1,7544$ g mis dans une fiole de 1000cm^3 . Quelle est la concentration massique $\rho_{(P; \text{sol.étalon})}$ de la solution étalon fabriquée par nos soins ?



D'après l'équation précédente	On peut extraire
$\frac{\rho_{(KH_2PO_4; \text{sol.étalon})}}{M_{(KH_2PO_4)}} = \frac{\rho_{(P; \text{sol.étalon})}}{M_{(P)}}$	$\rho_{(P; \text{sol.étalon fille})} = \frac{\rho_{(KH_2PO_4; \text{sol.étalon mère})}}{M_{(KH_2PO_4)}} \times M_{(P)} \times D$
<u>Equation aux grandeurs</u>	
<u>Equation aux unités</u>	$[g \cdot dm^{-3}] = \left[\frac{g \cdot dm^{-3}}{g \cdot mol^{-1}} \times g \cdot mol^{-1} \times 1 \right]$
<u>Equation aux valeurs</u>	Données : $M_{(KH_2PO_4)} = 136 g \cdot mol^{-1}$; $M_{(P)} = 31 g \cdot mol^{-1}$ $\rho_{(P; \text{sol.étalon})} = 20 \mu g \cdot cm^{-3}$ soit $20 \cdot 10^{-3} g \cdot dm^{-3}$ $\rho_{(KH_2PO_4; \text{sol.étalon fille})} = \frac{1,7544}{136} \times 31 \times \frac{1}{20} = 0,01999$

La solution étalon, préparée selon le protocole décrit, a une concentration de masse $\rho_{(P; \text{sol.étalon})}=19,99 \cdot 10^{-3} g \cdot dm^{-3}$. Compte tenu des règles de l'arrondi et du nombre de chiffres significatifs : 3 on a $\rho_{(P; \text{sol.étalon})}=20,0 \cdot 10^{-3} g \cdot dm^{-3}$.

5.2.2 Dosage des phosphates (méthode de Misson) : Courbe d'étalonnage du spectrophotomètre

Dans ce dosage, la courbe d'étalonnage est déterminée par rapport à la quantité de masse de l'élément P présent dans chacune des cuves étalons. Comment calculer cette valeur ? On a :

<u>Equation aux grandeurs</u>	$m_{(P; \text{cuve } X)} = \rho_{(P; \text{sol étalon})} \times V_{(\text{sol étalon}; \text{cuve } X)}$
<u>Equation aux unités</u>	$[g] = [g \cdot dm^{-3} \times dm^{-3}]$
<u>Equation aux valeurs</u>	Données : $\rho_{(P; \text{sol étalon})} = 20,0 \cdot 10^{-3} g \cdot dm^{-3}$ et $V_{(\text{sol étalon}; \text{cuve } 6)} = 1 \cdot 10^{-3} dm^3$ $m_{(P; \text{cuve } 6)} = 20,0 \cdot 10^{-3} \times 1 \cdot 10^{-3} = 20,0 \cdot 10^{-6}$

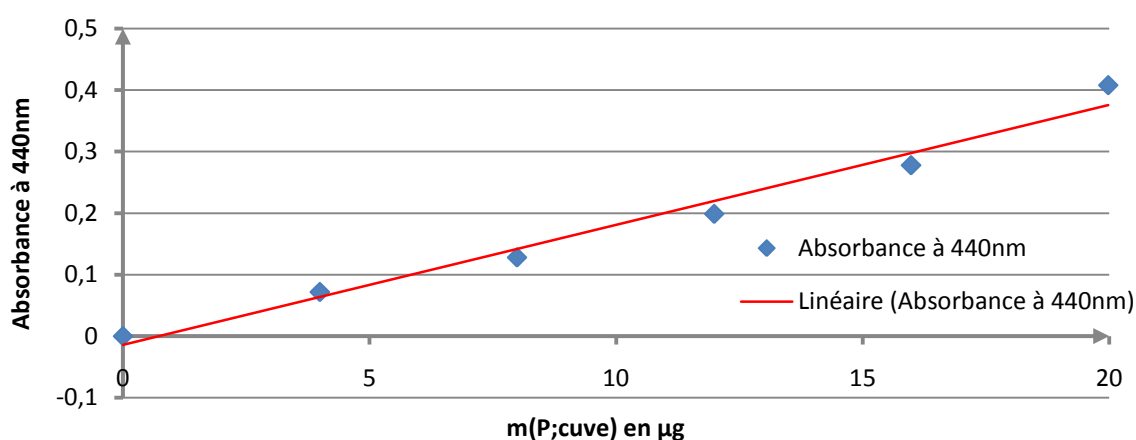
Dans la cuve 6 : $m_{(P; \text{cuve } 6)} = 20,0 \cdot 10^{-6} g$ soit $20 \mu g$

Les valeurs pour les autres cuves sont précisées dans le tableau 3.

Tableau 3 : Dosage des phosphates. Variation de l'absorbance à 440nm pour les solutions étalons utilisées		
Cuve	$m_{(P;cuve)}$ en μg	Absorbance mesurée à 440nm
Blanc	0	0
1	4,00	0,072
2	8,00	0,128
3	12,0	0,199
4	16,0	0,278
5	20,0	0,408

Tableau 4 : caractéristiques de la courbe d'étalonnage obtenue	
Pente de la courbe	0,0195
Ordonnée à l'origine	-0,0141
Coef. de corrélation	0,9893

Graphe 3 : Etalonnage du spectrophotomètre dosage des phosphates (méthode de Misson)



L'analyse des données calculées du tableau 4 et du graphe 3 montre que :

- le coefficient de corrélation est très proche de 1, par conséquent les points obtenus sont bien alignés. Nous avons travaillé correctement ;
- nous avons obtenu une droite : la loi de Beer Lambert est vérifiée dans le domaine $[0 ; 20] \mu g$ de phosphore par cuve ;
- l'équation du dosage est donc : $A = 0,0195 \cdot m_{(P;cuve \text{ échantillon})} - 0,0141$ où :
 - **A** est l'absorbance de l'échantillon d'eau analysé
 - **m** la masse de l'élément phosphore en μg contenue dans la cuve.

5.2.3 Détermination de la teneur en phosphate dans nos différents échantillons d'eau

L'étalonnage et le dosage des échantillons ont été réalisés en même temps, dans les mêmes conditions, nous pouvons utiliser cette équation pour déterminer la masse de P contenu dans chacune des cuves.

$$m_{(P;cuve \text{ échantillon } x)} = \frac{(A_{\text{échantillon } x} - (-0,0141))}{0,0195}$$

La masse obtenue est en μg par cuve

Connaissant le volume de la prise d'essai : 40 mm³, il est possible de calculer la concentration massique en phosphore dans tous les échantillons prélevés lors de notre expérimentation.

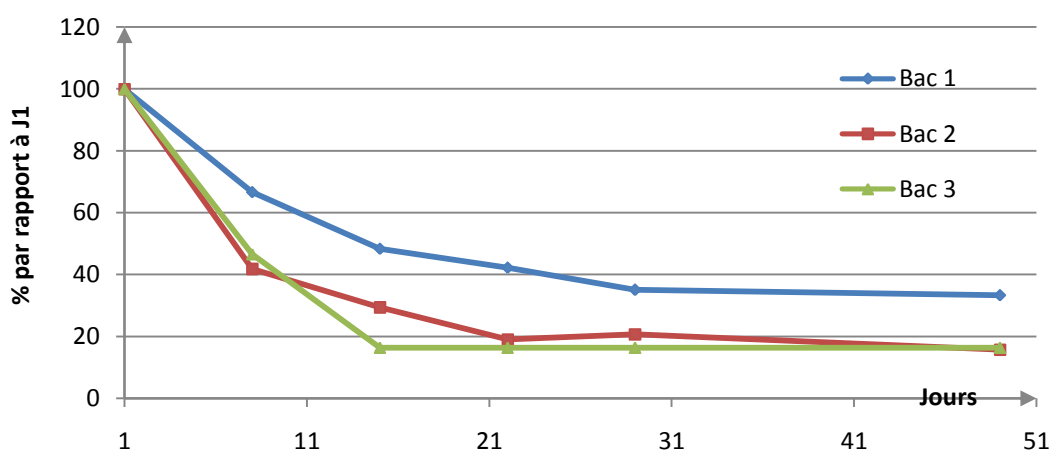
La formule de calcul sera la suivante :

<u>Equation aux grandeurs</u>	$\rho_{(P;sol\ étalon)} = \frac{m_{(P;cuve\ X)}}{V_{(sol\ étalon;cuve\ X)}} = \frac{(A_{échantillon\ X} - (-0,0141))}{0,0195} \times \frac{1}{V_{(sol\ étalon;cuve\ X)}}$
<u>Equation aux unités</u>	$[\mu g . mm^{-3}] = \left[\frac{1}{\frac{1}{\mu g}} \times \frac{1}{mm^3} \right] = \left[\frac{\mu g}{mm^3} \right]$
<u>Equation aux valeurs</u>	Données : J = 15 jours bac 1 : A = 0.073 Véchantillon = 40mm ³ $\rho_{(P;sol\ étalon)} = \frac{(0,073 - (-0,0141))}{0,0195} \times \frac{1}{40} = 0,112$

Dans le bac 1 à J = 15 jours la concentration de masse en P est de 0,112µg.mm³ soit 0,112g.dm³.

Les courbes du graphe 4 présentent la variation de la teneur en phosphore en pourcentage par rapport à la valeur au jour 1 dans chacun des bacs en fonction du temps

Graphe 4 : Variation de la teneur en phosphore dans les échantillons en % de la valeur par rapport au jour 1



L'ion phosphate contenant un seul atome de P, toute variation de l'élément P se traduit par la variation identique de l'ion phosphate. Donc pour faciliter notre discours, nous parlerons par la suite de l'ion phosphate.

La lecture des courbes du graphe 4 montrent que :

- dans le bac 1 (témoin) la teneur en phosphate mesurable chute à 35 % de la valeur initiale.
- dans les bacs 2 et 3 nous observons la superposition des deux courbes. A la fin de l'expérimentation il ne reste plus qu'environ 16 % du phosphate initial aussi bien dans le bac 2 que le bac 3.

La chute naturelle du phosphate dans le bac 1, en absence de végétaux, peut s'expliquer par le fait que les phosphates réagissent naturellement avec le calcaire présent dans l'eau². De ce fait, ils ne sont plus disponibles en solution pour réaliser leur dosage.

² http://www.cnrs.fr/cw/dossiers/doseau/decouv/degradation/08_pollution.htm

Dans les bacs 2 et 3, nous observons une baisse de la teneur en phosphate beaucoup plus importante que dans le bac 1 : au bout de 49 jours, il reste seulement 16 % de phosphates dans les bacs 2 et 3 contre 35 % dans le bac 1. Les plantes et les bactéries ont participé à l'élimination d'une partie du phosphate contenu dans cette eau polluée : soit environ 20 %, la différence entre le bac 1 et les bacs 2 et 3.

Le fait de détruire la flore microbienne au départ n'a pas d'influence sur l'élimination des phosphates. Faut-il voir une action prépondérante des plantes par rapport aux bactéries sur l'élimination des ions phosphates ?

5.3. Evolution de la biomasse bactérienne

La technique employée (annexe 3) permet d'évaluer la biomasse bactérienne correspondante :

- aux bactéries aérobies : c'est-à-dire capable de cultiver en présence de dioxygène ;
- aux bactéries non exigeantes : la gélose employée ne contient pas de facteurs de croissance ;
- cultivant à température ambiante. Les milieux de culture ont été incubés à la température du laboratoire ;
- ne permet pas d'évaluer une biomasse supérieure à $C_{(UFC \text{ bactéries :échantillon})} = 3.10^5 \text{ UFC bactéries.cm}^{-3}$. A chaque fois que cette valeur est atteinte, il faut lire $C_{(UFC \text{ bactéries :échantillon})} \geq 3.10^5 \text{ UFC bactéries.cm}^{-3}$.

Pour estimer la biomasse, nous avons compté les colonies présentes dans les boîtes de culture. Pour ce calcul, nous avons retenu les boîtes où le nombre de colonies est compris entre 10 et 300.

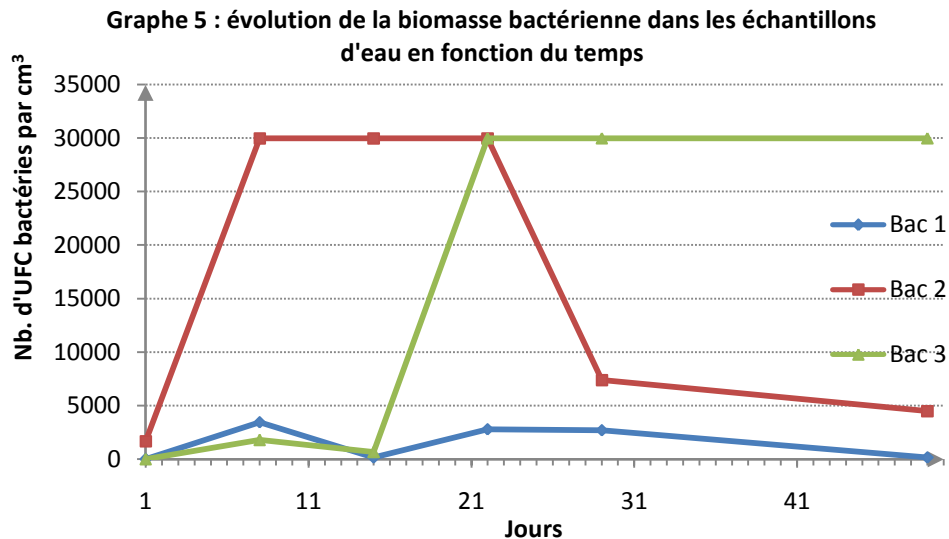
Remarque : 1 colonie bactérienne correspond au développement d'au moins une bactérie. Le résultat final tient compte de ce problème dans son expression. On parle d'UFC (unit forming colony) au lieu de bactéries. Par conséquent : 1 colonie $\Leftrightarrow$ 1 UFC.

Les calculs sont les suivants

<u>Equation aux grandeurs</u>	$C_{(UFC \text{ bactérie;échantillon})} = \frac{n_{(Colonies)}}{V_{(échantillon) \times D}}$
<u>Equation aux unités</u>	$[UFC.cm^{-3}] = \left[\frac{UFC}{cm^3.1} \right]$
<u>Equation aux valeurs</u>	Exemple, pour l'échantillon du bac 3 au jour 15 : $n = 68 \text{ UFC}$ dans $V_{(échantillon)} = 1 \text{ cm}^3$ de la dilution $D = 10^{-1}$ (1/10) $C_{(UFC;échantillon \text{ bac 3 } J15)} = \frac{68}{1 \times 10^{-1}} = 680$

Dans 1 cm^3 de l'échantillon du bac 3 au jour 15, il y a 680 UFC bactéries.

Les résultats de l'ensemble de cette analyse sont présentés dans le graphe 5.



Dans le bac 1 (témoin), la biomasse évolue peu et reste faible. Ce bac contient de l'eau du robinet polluée par des nitrates et des phosphates. Il n'y a pas de source de carbone organique. Sur le plan nutritif, ce milieu est peu propice à la culture microbienne.

Dans le bac 2, la biomasse faible au départ (moins de 5000 UFC.cm^{-3}) augmente très rapidement pour dépasser $3.10^5 \text{ UFC.cm}^{-3}$. Cette valeur reste à ce niveau pendant 2 semaines avant de chuter. L'augmentation rapide de la biomasse dans ce bac est due à deux phénomènes possibles :

- le bloc végétal contient sa propre biomasse bactérienne fixée sur les racines, ces bactériesensemencent l'eau du bac 2,
- le bloc végétal contient de la matière organique en décomposition ; elle enrichit l'eau polluée qui devient alors un milieu propice à la croissance des bactéries.

La chute observée après le 22^{ème} jour correspond au début de l'apparition d'une mauvaise odeur dans la pièce expérimentale. Y a-t-il un changement de flore microbienne avec disparition des bactéries aérobies au profit de bactéries anaérobies strictes que notre technique ne permet pas de compter ?

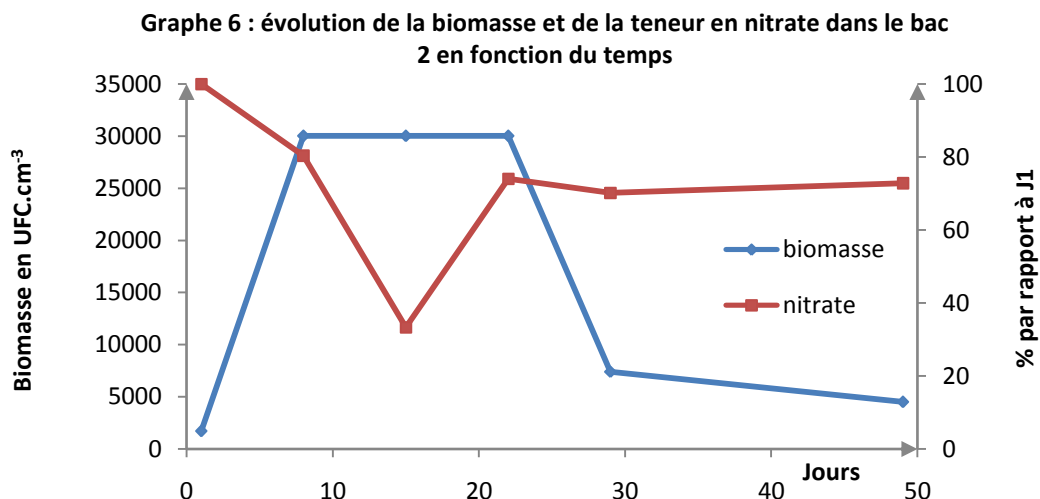
Dans le bac 3, au jour 1, on note l'absence de bactéries. Ce nombre de bactéries augmente lentement mais reste faible ($\sim 2000 \text{ UFC.cm}^{-3}$) jusqu'au jour 15 pour atteindre une valeur maximale $3.10^5 \text{ UFC.cm}^{-3}$ au 22^{ème} jour. Dans ce bac, nous avons introduit un désinfectant au début de l'expérience. Cette faible population microbienne au départ est donc le reflet de l'action de ce désinfectant. Il y a eu destruction de la flore microbienne de l'eau mais aussi d'une partie de celle contenue dans le bloc végétal. Après ce délai, le désinfectant n'agit plus et les bactéries qui ont survécu au niveau des racines des plantes se multiplient et colonisent l'eau du bac.

5.4 Relation biomasse et nitrates

Est-ce que les bactéries sont impliquées dans la disparition des ions nitrates ?

Nous avons superposé les courbes de biomasse et de taux de nitrate pour les bacs 2 et 3, nous obtenons les graphes 6 et 7.

5.4.1. Cas du bac 2

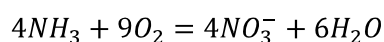
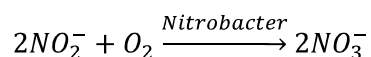
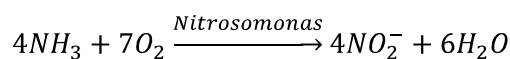


Dans le bac 2, on observe que :

- la diminution du taux de nitrate est liée à une forte augmentation de la biomasse microbienne mesurable jusqu'au 15^{ème} jour :
- l'augmentation du taux de nitrate est liée à la diminution de la biomasse bactérienne mesurable après le 15^{ème} jour,

Que se passe t-il ensuite ?

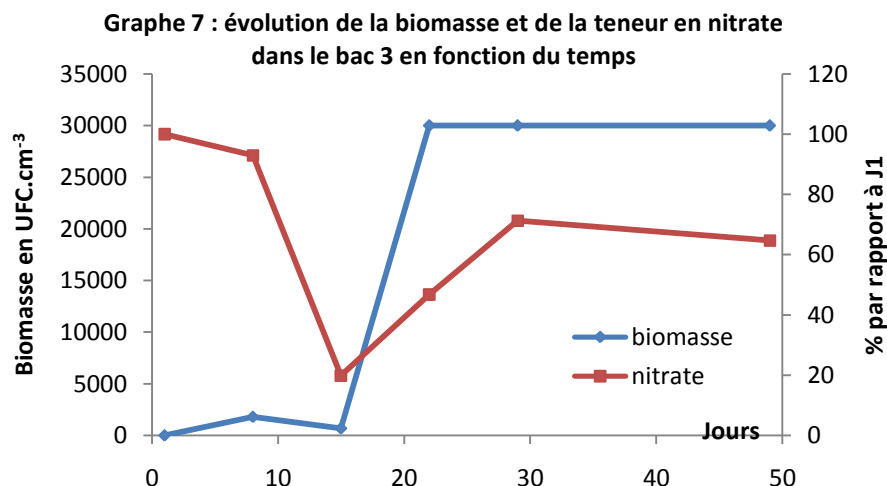
Dans le bac 2, notre hypothèse est la suivante : la mauvaise odeur notée correspondrait à la putréfaction de la matière organique. Il se libère de l'ammoniaque qui est converti en nitrate par des bactéries du cycle de l'azote : *Nitrosomonas* et *Nitrobacter*. Les équations des réactions chimiques sont les suivantes :



Comme le montrent les équations chimiques, le processus de désammonification consomme beaucoup de dioxygène³. Pour une mole d'ammoniaque produite, les bactéries consomment 2,25 moles de dioxygène pour la transformer en nitrate. Cela appauvrit l'eau du bac 2 en dioxygène, la flore bactérienne aérobie diminue, comme nous le constatons.

³ http://aquatrop.cirad.fr/encyclopedie/biologie_et_ecologie_aquatique/reseau_trophique_aquatique/l_activite_bacterienne

5.4.2 Cas du bac 3



Une biomasse même faible permet de faire chuter le taux d'ions nitrate dans l'eau de ce bac 3 au début de l'expérience.

A partir de J15 la teneur en ions nitrate augmente et elle est liée à une augmentation de la biomasse bactérienne.

Les phénomènes observés dans ce bac sont différents de ceux notés dans le bac 2 :

Le désinfectant, mis au début de l'expérience, a empêché la multiplication bactérienne dans l'eau du bac. Cet effet dure deux semaines. Mais les ions nitrate disparaissent tout de même. Des bactéries contenues dans le bloc de racine de l'échantillon végétal n'ont pas été atteintes par le désinfectant. Ces bactéries sont sûrement à l'origine de la disparition de l'ion nitrate mais aussi sûrement à l'origine de la recolonisation du milieu après le J15. Leur multiplication se fait alors aux dépens de la matière organique contenue dans le bloc de végétaux. Il se libère de l'ammoniaque qui permet d'alimenter une production de nitrates, comme décrit précédemment.

6. Discussion des résultats

Une lagune permet effectivement d'éliminer les polluants chimiques étudiés : ions nitrate et ions phosphate. L'efficacité du système réside dans l'association plante/bactérie. En effet, en absence de plantes, les bactéries n'arrivent pas à éliminer les ions nitrates (bac1). Les plantes seules sont peu efficaces (bac 3 au début : présence du désinfectant). Il y a donc une synergie entre les végétaux et les bactéries pour éliminer ce polluant.

Le mécanisme impliqué dans l'élimination de l'ion nitrate n'a pas été étudié. Théoriquement, il en existe trois :

- fixation de l'ion nitrate par les plantes pour produire leurs propres acides aminés nécessaires à la production des protéines ;
- fixation par les bactéries pour fabriquer leurs protéines ;
- respiration nitrate conduisant à la production de diazote à partir des nitrates. Cette dernière se fait principalement en conditions anaérobies. Les bactéries qui réalisent cette activité possèdent une nitrate réductase et une nitrite réductase.

La faible croissance des plantes dans les bacs suggérerait que l'élimination des nitrates est principalement due à l'action bactérienne. Les informations obtenues à ce sujet confortent nos résultats. Il a été démontré que ce sont les bactéries fixées à la rhizosphère qui interviennent dans l'élimination des ions nitrates.

En ce qui concerne l'ion phosphate, le système est plus complexe. Il disparaît naturellement dans le bac témoin (précipité d'apatite : phosphate de calcium). Cependant, en présence des plantes et bactéries, le système est amélioré. Une partie du phosphate est fixé par les plantes du bac et/ou par les bactéries. Pour les mêmes raisons que précédemment (faible, voire absence de croissance des plantes) nous aurions tendance à dire que là aussi l'action bactérienne est prépondérante.

7. Conclusion

Le système de lagunage est effectivement efficace dans l'élimination des polluants chimiques que nous avons étudiés. Les végétaux endémiques, à travers les bactéries présentes dans leur rhizosphère, sont capables de réaliser un traitement efficace de l'eau polluée. Notre système rudimentaire permet de le démontrer.

Que nous a apporté ce projet ?

Ce projet fut une aventure à la fois humaine et scientifique. Il nous a appris à travailler en équipe et nous a permis de développer notre rigueur scientifique. Qualité que nous devons mettre en avant lors de la réalisation du Projet Technique Accompagné : une des principales épreuves de notre baccalauréat STL Biotechnologie que nous passerons en Juin 2019.

Avec ce travail, nous nous sommes perfectionnés dans l'utilisation de l'outil informatique : traitement de texte, tableur/graphueur, présentation.

Nous allons présenter ce travail devant différents auditoires (classes de seconde du lycée, festival des lycéens, ...). Cela va nous préparer à la présentation orale de notre PTA l'année prochaine.

Bibliographie

1	www.planetoscope.com/consommation-eau/135-consommation-d-eau-par-habitant-dans-le-monde.html
2	www.planetoscope.com/eau-oceans/1104-litres-d-eaux-usees-rejetees-dans-la-nature-dans-le-monde.html
3	www.partagedeseaux.info/Le-traitement-des-eaux-usees-en-Inde
4	www.who.int/water_sanitation_health/diseases/diseasefact/fr/
5	Traitement de l'azote dans les stations d'épuration biologique des petites collectivités G. Deronzier, S. Schétrite, Y. Racault, JP. Canler, A. Liénard, A. Héduit, P. Duchène CEMAGREF Groupement d'Antony : UR Qualité et fonctionnement hydrologique des systèmes aquatiques
6	Traitement du phosphore dans les petites stations d'épuration à boues activées Coordination – G. Deronzier, JM. Choubert CEMAREF Unité de recherche QHAN
7	Cyanobactéries en Loire : les mesures d'interdiction levées - Services ... www.maine-et-loire.gouv.fr/appeal-a-la-vigilance-presence-de-cyanobacteries-en-a530...

ANNEXE 1 : FICHE TECHNIQUE DU DOSAGE DES NITRATES

NITRATES / NITRITES ASSAY KIT (méthode enzymatique / colorimétrique)

Référence : NITRATES-1000
(version : 072013-7)



Kit de dosage enzymatique des Nitrates/Nitrites - Méthode enzymatique /
colorimétrique (540nm)

- Précision, Economie et Sécurité des analyses.
- Kit de 100 tests manuels.
- Standard nitrates inclus dans le kit.

Unités de nitrates	En Europe
Gamme de mesure	2-44 ppm nitrates

PRÉSENTATION DU TEST

Ce kit de détermination des nitrates est basé sur la réduction des nitrates en nitrites par l'enzyme Nitrate Réductase (NaR), à l'aide du donneur d'électrons naturel NADH. Les nitrites réagissent avec des réactifs et en phase acide pour développer une couleur visible. La concentration en nitrates dans l'échantillon à analyser est déterminée en mesurant l'absorbance de l'échantillon à 540nm par rapport à une gamme standard nitrates.

Les nitrates peuvent être déterminés dans les échantillons aqueux, les extraits de tissus végétaux, dans le sol et dans les aliments. Dans le cas des eaux de mer et les eaux salées, une note d'application est disponible. Merci de contacter notre service technique.

Le test est conçu pour mesurer les nitrates dans la gamme de 2,0 à 44 ppm nitrates. La concentration de nitrates peut également être exprimée en μM , auquel cas la gamme est de 36 à 714 μM nitrates, ou en nitrates-N, auquel cas la gamme est de 0,5 à 10 ppm nitrates-N.

Les nitrites peuvent être déterminés en omettant l'enzyme NaR et le NADH du test (voir page 5).

COMPOSITION DU KIT

- Tampon (25 mM KH_2PO_4 , 0,025 mM EDTA ; pH 7,5) – 3 tubes de 35 ml.
- Color reagent #1 (1% Sulfanilamide dans HCl 3N) en poudre – 1 flacon pour 60ml.
- Color reagent #2 (0,02% N-Naphthylethylenediamine dans l'eau désionisée) – 1 flacon pour 60ml.
- NADH sous forme lyophilisée (environ 2 mM NADH par tube) – 4 tubes dans une pochette avec dessicant.
- Nitrate Réductase (NaR) sous forme lyophilisée (1 unité par tube) – 4 tubes dans une pochette avec dessicant.
- Diluant enzyme – 4 ampoules scellées en plastique de 1ml.
- Standard Nitrate (440 ppm nitrates) – sous forme liquide – 1 tube de 1,5 ml.

- Tubes microcentrifuges – 6 tubes pour la préparation de la gamme standard nitrates.

MATERIELS NON FOURNIS

- Epprouvette graduée de 25 ou 100 ml.
- Micropipettes à volume variable (10 à 100 μl et 100 à 1000 μl).
- Vortex.
- Colorimètre ou Spectrophotomètre avec filtre à 540nm $\pm$ 20 nm et cuvettes (volume environ 2 ml).
- 100 tubes à essai 13 x 100 mm (propres et exempts de nitrates).
- Chronomètre.
- Eau distillée ou désionisée sans nitrates pour éviter un bruit de fond élevé.
- 15 ml d'acide chlorhydrique (HCl) concentré.
- Glace et récipient à glace.

PRÉPARATION DES REACTIFS

Étape 1 Tampon – prêt à l'emploi. Laisser le tampon atteindre la température ambiante. Si besoin, placer le tampon dans un bain-marie à 30°C.

Étape 2 Préparer une solution d'HCl (3N) en mélangeant 15 ml HCl concentré avec 45 ml d'eau désionisée. Mélanger.

Étape 3 Ajouter 60 ml de la solution HCl 3N dans le flacon Color reagent #1. Bien mélanger par agitation.

Étape 4 Ajouter 60 ml d'eau désionisée dans le flacon Color reagent #2. Bien mélanger par agitation.

Étape 5 Sortir un tube de NADH de la pochette, ajouter 1,5 ml d'eau distillée ou désionisée et refermer le tube. Mélanger en retournant le tube plusieurs fois. Garder le tube dans la glace pendant l'utilisation.

Étape 6 Sortir un tube de Nitrate Réductase (NaR) de la pochette et tapoter légèrement sur le fond du tube avant ouverture (afin que l'enzyme soit au fond du tube). Sortir l'ampoule de diluant de l'enzyme et tapoter légèrement sur le fond du tube avant ouverture, puis couper à la main l'ampoule et vider la entièrement dans le tube de NaR. Refermer le tube et mélanger par inversion plusieurs fois. Laisser reposer à température ambiante pendant au moins 10 minutes en le mélangeant par inversion à 5 et 10 minutes.

Étape 7 Pour les tubes NADH et NaR non encore utilisés, répéter les étapes 5 et 6 au fur et à mesure des besoins.

STABILITE DES REACTIFS

Les réactifs tels qu'ils sont fournis dans le kit sont stables entre 2° et 8°C jusqu'à la date de péremption inscrite sur le kit. Pour une plus longue conservation, l'enzyme NaR et le NADH peuvent être conservés au congélateur.

Stabilité de l'enzyme NaR reconstituée :

Les solutions d'enzyme NaR reconstituées avec le diluant enzyme, sont stables 7 jours entre 2° et 8°C (ou 6-12 mois à -20°C). Les étapes congélation/décongélation peuvent être répétées.

Stabilité du NADH reconstitué :

La solution NADH préparée est stable 7 jours entre 2° et 8°C. Pour une plus longue conservation (au-delà de 30 jours), la solution NADH peut être aliquotée et congelée.

PRÉPARATION DE LA GAMME STANDARD

Transférer 1 mL du standard nitrates à 440 ppm dans un tube à essai contenant 9 mL d'eau distillée ou désionisée pour obtenir une solution à 44 ppm de nitrates. Utiliser les 6 microtubes (fournis dans le kit) pour préparer la gamme standard comme indiqué dans le tableau ci-dessous. Refermer les tubes et mélanger les par inversion avant utilisation.

		Equivalence autres unités exprimées		
Volume à prélever du tube contenant 44 ppm nitrates (µl)	Volume d'eau distillée (µl)	Concentration (ppm nitrates)	Concentration (ppm nitrates-N)	Concentration (µM)
1000	0	44	10	712
750	250	33	7.5	534
500	500	22	5	356
250	750	11	2.5	178
100	900	4.4	1	71.2
50	950	2.2	0.5	35.6

PROCÉDURE DU TEST

La procédure suivante est décrite pour des tests en simple. Pour une plus grande précision, des tests en double (duplicates) peuvent être réalisés.

ÉLIMINATION DES DÉCHETS

Suivre les directives et la réglementation en vigueur. S'il n'y a aucune directive locale, verser et rincer abondamment la verrerie avec une grande quantité d'eau.

Étape 1 Pipeter 50 µl d'eau distillée ou désionisée dans un tube réactionnel – « blanc réactif ».

Étape 2 Pipeter 50 µl de chaque échantillon et standards dans des tubes réactionnels propres.

Étape 3 Ajouter 900 µl de tampon dans chaque tube.

Étape 4 Ajouter 50 µl de solution de NADH dans chaque tube. Boucher les tubes et mélanger bien.

Étape 5 Pour démarrer la réaction, ajouter 20 µl de solution NaR dans chaque tube. Reboucher les tubes et bien mélanger.

Étape 6 Laisser reposer les tubes –20 minutes à température ambiante. (Remarque : le temps d'incubation n'est pas très critiques mais il faudra au moins 20 minutes d'incubation pour que la réaction de réduction des nitrates soit complète).

Étape 7 Ajouter 500 µl de la solution Color reagent #1 dans chaque tube. Bien mélanger au vortex.

Étape 8 Ajouter 500 µl de la solution Color reagent #2 dans chaque tube. Bien mélanger au vortex.

Étape 9 Laisser reposer les tubes –10 minutes à température ambiante. Pour assurer une bonne homogénéité, mélanger le contenu des tubes brièvement au vortex.

Étape 10 Faire l'auto-zéro du colorimètre ou spectrophotomètre à 540 nm ± 20 nm avec une cuvette remplie d'eau distillée ou désionisée. Puis, lire les absorbances de tous les tubes.

Étape 11 Lire les absorbances des standards et des échantillons. (Remarque : pour une plus grande précision de résultats, lire les absorbances entre 10 et 30 minutes après la fin de la réaction de développement de couleur).

(Note : faire le zéro du colorimètre avec de l'eau distillée ; rincer la cuvette de lecture à l'eau distillée entre les mesures)

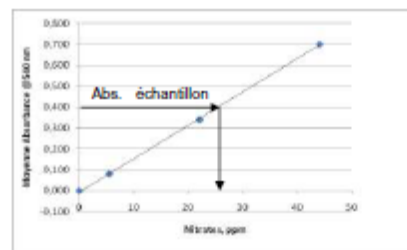
CALCULS

Étape 1 Corriger les absorbances de chaque standard et échantillon : Soustraire la moyenne des absorbances du blanc réactif de la moyenne des absorbances de chaque standard et échantillon.

(Moyenne absorbances corrigées) échantillon = (moyenne absorbances) échantillon – (moyenne absorbances) blanc réactif

Étape 2 Générer une courbe d'étalonnage (linéaire) avec les standards nitrates (voir exemple ci-dessous) (ppm nitrates sur l'axe des x et la moyenne des absorbances corrigées pour chaque standard nitrates sur l'axe des y).

Étape 3 En se reportant sur la courbe d'étalonnage, déterminer la concentration en ppm nitrates de chaque échantillon.



ÉCHANTILLONS A HAUTE TENEUR EN NITRATES

Ce kit de dosage permet de déterminer la concentration en nitrates jusqu'à 44 ppm de nitrates (équivalent à 11 ppm Nitrate-N ou 714 µM nitrates). Si un des échantillons à tester dépasse les 44 ppm en nitrates, l'échantillon peut être dilué au 1/10^{ème}. Par exemple, prendre 100 µl de l'échantillon et ajouter 900 µl d'eau désionisée (dilution au 1/10^{ème}), puis doser 50 µl de l'échantillon dilué. Enfin, multiplier la concentration obtenue par 10 (facteur de dilution).

Remarque : Maintenir le volume de l'échantillon constant dans le diluant, plutôt que d'utiliser un plus petit volume de l'échantillon lors du dosage.

PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS ALIMENTAIRES

Avant de commencer la procédure de dosage des nitrates, préparer vos échantillons alimentaires en suivant votre méthode standard.

DETERMINATION DES NITRATES DANS LES EXTRAITS DE FEUILLES DE PLANTES

Pour déterminer la quantité de nitrates dans 1 gramme de feuilles, broyer les dans 10 mL d'eau distillée ou désionisée et mesurer le volume total de l'extrait après filtration des particules solides. Prélever 50 µl d'extrait pour réaliser le dosage et calculer la quantité de nitrates présents en nmoles. Déterminer le montant total de nitrates dans l'extrait [= (volume total de l'extrait) x (nmoles Nitrates/50 µl d'extrait)]. Diviser ce montant total de nitrates par le poids pour calculer la quantité de nitrates par gramme de feuilles. La couleur verte ou brune de l'extrait de feuilles n'interfère pas significativement avec les déterminations de nitrates car l'extrait est dilué 20 fois lors du dosage. L'analyse la plus quantitative de la teneur en nitrates dans les feuilles est obtenue lorsque les feuilles sont chauffées pendant 20 minutes. Après ébullition, laisser refroidir dans la glace, puis filtrer l'échantillon pour récupérer l'extrait. Afin de compenser l'eau perdue lors de l'ébullition, compléter le volume d'extrait jusqu'à 10 mL.

Contacter notre service technique pour obtenir un protocole d'extraction détaillé, à partir de feuilles des plantes fraîches ou séchées.

ANNEXE 2 : FICHE TECHNIQUE DU DOSAGE DU PHOSPHORE DANS UNE EAU

A) Principe du dosage par la technique de Misson (1943)

C'est un dosage colorimétrique direct dans lequel les ions phosphate, PO_4^{3-} , en présence d'un excès de solution acide de molybdate d'ammonium forment un complexe phosphomolybdique jaune.

B) Protocole opératoire

B.1- Dilution de la solution étalon mère de dihydrogénophosphate de potassium (KH_2PO_4)

Préparer une solution étalon fille par dilution de la solution étalon mère au 1/20 dans une fiole jaugée de 100 cm³.

B.2- Préparation de la gamme d'étalonnage et des essais

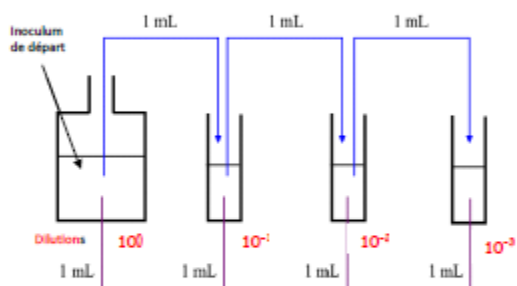
La gamme d'étalonnage et les essais doivent être réalisés dans les mêmes conditions et traités en même temps.

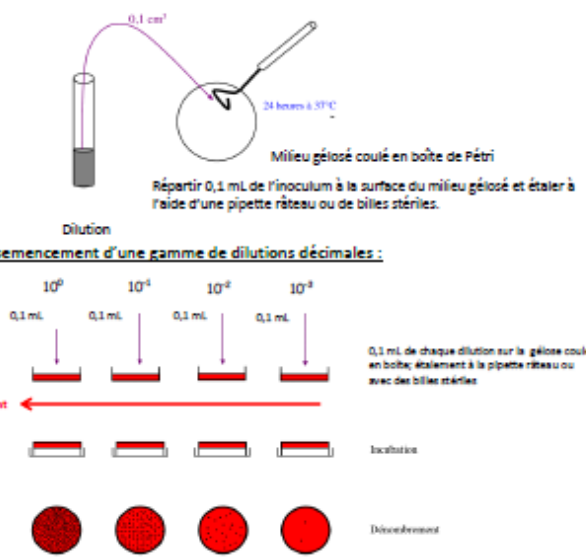
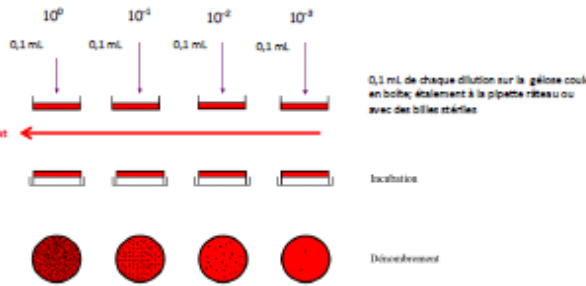
	Gamme d'étalonnage						Eau à analyser « X »
Cuves	Blanc	1	2	3	4	5	Essais X
Solution étalon fille de phosphore (mL)	0	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0	
Eau à analyser « X » (mL)							0,04
Eau distillée (mL)	1	0,8	0,6	0,4	0,2	0	1,96
Réactif de Misson (mL)	1	1	1	1	1	1	1
$m_{(\text{P;cuve})}$ en μg	0	4	8	12	16	20	A calculer
	Boucher toutes les cuves avec du parafilm, homogénéiser par retournement.						
	Attendre 5 minutes						
	Lire les absorbances de la gamme et des essais à 440 nm contre le blanc réactif.						

C) Identification du danger

Réactif de Misson		H 314 : provoque des brûlures de la peau et des lésions oculaires grave
-------------------	---	---

ANNEXE 3 : FICHE TECHNIQUE POUR LA MESURE DE LA BIOMASSE

Fiche technique : REALISER UNE GAMME DE DILUTIONS DECIMALES	
But	La gamme de dilutions en microbiologie a pour but de faire décroître la population bactérienne (suivant une progression géométrique le plus souvent de raison 10) dans un prélèvement dans lequel leur nombre est trop important.
Technique	<u>Exemple : Gamme de dilution décimale (de raison 10) de 10^0 à 10^{-3}</u>  • L'inoculum est homogénéisé avant le prélèvement ; • Le prélèvement se fait à l'aide d'une pipette graduée de 1 mL stérile après aspiration et refoulement ; • Le liquide est introduit dans un tube contenant 9 cm³ de diluant stérile (eau distillée, physiologique, peptonée...), sans toucher ce diluant ; • La pipette utilisée est éliminée (elle est contaminée et ne peut servir à la dilution suivante sans risques d'erreur par excès) ; • La dilution suivante est réalisée de la même façon (nouvelle pipette, aspiration, refoulement...).

DENOMBREMENT INDIRECT DE MICROORGANISMES EN SURFACE D'UN MILIEU GELOSE	
Principe	Le dénombrement indirect consiste à introduire les bactéries de l'inoculum et/ou de ses dilutions à la surface d'un milieu gélosé. Après incubation, le nombre total de colonies est compté sur les boîtes. Sachant qu'une colonie se forme à partir de la multiplication d'une cellule, on considère qu'une colonie équivaut à une cellule présente initialement dans l'inoculum. On exprime les résultats en UFC/ mL ou par g d'inoculum.
Technique	<u>Exemple : ensemencement de 0,1 mL d'une dilution en surface d'un milieu gélosé.</u>  <u>Dans le cas de l'ensemencement d'une gamme de dilutions décimales :</u>  • Liquéfier les milieux adéquats (autant que de dilutions à ensemencer) et les couler en boîtes de Pétri. Préparer le matériel en prenant 1 boîte par dilution ; • On commence toujours par prélever dans la plus grande dilution pour n'utiliser qu'une seule pipette (elle est peu polluée par la dilution précédente, elle n'introduira pas d'erreur pour la dilution suivante). Le prélèvement se fait à raison de 0,1 cm³ de dilution que l'on dépose en gouttes à la surface des géloses coulées en boîte de Pétri ; • Homogénéiser par étalement d'une dizaine de billes stériles à la surface des géloses (ces billes peuvent être transférées de la plus grande dilution vers la plus faible et éliminées après le dernier ensemencement) • Laisser sécher près du bec Bunsen et étuver les boîtes retournées à température adéquate.

