

BTS METIERS DE L'EAU

SESSION 2001

EPREUVE : BIOCHIMIE, BIOLOGIE ET MICROBIOLOGIE

Durée : 4 heures

Coef : 4

Calculatrice autorisée

DYSFONCTIONNEMENT D'UNE STATION D'EPURATION ET ECOTOXICITE

Une station d'épuration de 120 000 équivalents habitants à boue activée fonctionne en aération prolongée. Ses rejets se font dans une rivière de classe 1B, peu sensible à l'eutrophisation et fréquentée par de nombreux pêcheurs.

1. Dysfonctionnement de la STEP (21 points).

Après plusieurs mois de fonctionnement très satisfaisant, le traitement se dégrade brutalement : dans le décanteur, le voile de boue s'élève rapidement, l'indice de Mohlman augmente. En sortie de station, la turbidité augmente fortement, l'eau de la rivière se trouble.

Très rapidement des pêcheurs signalent la mort de nombreux poissons.

La première cause de mortalité évoquée est la très forte augmentation de la DCO des rejets.

1.1. Expliquer la base de la classification française des eaux de rivière.

1.2. Pourquoi peut-on impliquer l'augmentation de la DCO dans la mort des poissons ? Pourquoi est-ce plus sensible l'été ?

Toutefois l'hypothèse de la présence d'une substance toxique dans l'effluent est rapidement émise. En effet :

- L'examen microscopique des boues montre une forte mortalité de la microfaune, une désagrégation des floes avec forte diminution des bacilles Gram -, sans prolifération notable des bactéries filamenteuses.

- Les mesures, effectuées sur l'effluent moyen de 24 heures de ce jour, montre que la DCO est augmentée alors que la DBO₅ est diminuée.

1.3. Que mesure l'indice de Mohlman ? Comment l'établit-on ? Donner une explication à l'augmentation de la valeur de l'indice de Mohlman sur cette station.

1.4. La microfaune des boues de station d'épuration se subdivise en deux embranchements. Citer le nom des deux embranchements et donner pour chacun, deux exemples.

1.5. En quoi l'hypothèse de la présence d'une substance toxique permet-elle d'expliquer l'augmentation de la DCO et la diminution de la DBO₅ des rejets ?

BTS METIERS DE L'EAU		SESSION : 2001
CODE : MTBBM	DUREE : 4 HEURES	COEFFICIENT : 4
EPREUVE : BIOCHIMIE, BIOLOGIE ET MICROBIOLOGIE DES EAUX		PAGE : 1 sur 6

2. Toxicité aiguë des effluents (26 points).

La toxicité des prélèvements effectués le jour du dysfonctionnement, en entrée et en sortie de station, est mise en évidence par le test d'inhibition de la mobilité des daphnies.

2.1. Test d'inhibition de la mobilité de *Daphnia magna* Straus.

Le test est conduit selon le protocole de la norme dont le document n°1 donne un résumé.

Il est réalisé en tubes à essai dans lesquels on introduit 5 daphnies pour un volume de 10 mL de dilution d'échantillon à tester. L'essai préliminaire est mené avec 1 tube par dilution, l'essai final avec 4 tubes par dilution.

Le document n°2 fournit des résultats obtenus.

2.1.1. Pourquoi ce test est-il judicieux dans le contexte présent ?

2.1.2. Expliquer la préparation du tube à 5 % de dilution de l'essai préliminaire du document n°2.

2.1.3. Justifier le choix de la gamme de concentration retenue pour l'essai final du document n°2.

2.1.4. A partir des résultats du document n°2, tracer la courbe donnant la variation du pourcentage d'immobilisation en fonction du logarithme de la concentration exprimée en % de dilution. Déterminer la CE50_{,-24h} de l'échantillon

2.1.5. Peut-on valider ce résultat ? Justifier votre réponse.

2.2. Dosage des ions cyanures.

L'analyse chimique de l'affluent de la station met en évidence la présence d'ions cyanures qui peuvent être dosés selon le protocole de la norme résumé dans le document n°3.

2.2.1. Quelles sont les caractéristiques d'une réaction chimique permettant un dosage par colorimétrie ?

2.2.2. On dispose d'une solution étalon contenant 1g de cyanure par litre (le diluant est l'hydroxyde de sodium à 0,2 mol.L⁻¹). Comment, à partir de cette solution, peut-on réaliser la gamme proposée par la norme ?

2.2.3. On souhaite réaliser le dosage des cyanures d'une eau dont la concentration approximative en cyanures est de 1 mg.L⁻¹ (protocole document 3). Expliquer le calcul du volume de solution utilisée pour le dosage spectrophotométrique.

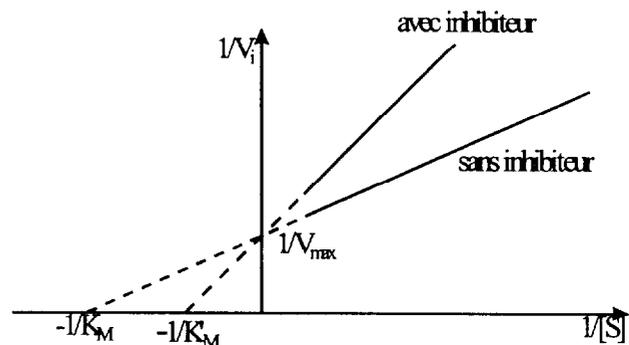
BTS METIERS DE L'EAU		SESSION : 2001
CODE : MTBBM	DUREE : 4 HEURES	COEFFICIENT : 4
EPREUVE : BIOCHIMIE, BIOLOGIE ET MICROBIOLOGIE DES EAUX		PAGE : 2 sur 6

3. Toxicité liée aux cyanures (24 points).

L'ion cyanure est un poison respiratoire qui se fixe sur le dernier complexe de la chaîne respiratoire des eucaryotes et en inhibe le fonctionnement.

- 3.1. Donner les rôles de la chaîne respiratoire dans le métabolisme énergétique. Préciser sa localisation cellulaire.
- 3.2. Pourquoi les cyanures entraînent-ils la mort des organismes eucaryotes et de certaines bactéries ?
- 3.3. En quoi la présence de cyanures explique-t-elle l'évolution des boues et la dégradation du traitement ?

3.4. Il existe différents mécanismes d'inhibition enzymatique. Leur étude se fait par détermination de la vitesse initiale de catalyse (v_i) pour différentes concentrations en substrat, en présence ou non d'inhibiteur à une concentration fixe. Puis on réalise une représentation graphique, souvent en double inverse $1/v_i = f(1/[S])$. Différents résultats peuvent être obtenus, comme, par exemple, celui représenté ci-contre.



- 3.4.1. Définir ce qu'est la vitesse initiale. Expliquer comment on peut la déterminer.
- 3.4.2. Que représentent K_M et V_{max} ?
- 3.4.3. Quel est le type de l'inhibition représentée ? Justifier la réponse et proposer un mode d'action pour cet inhibiteur.

4. Toxicité de rejets industriels (9 points).

Suite à la pollution par les cyanures, une enquête est menée et elle montre que dans une industrie rattachée au réseau, il y a eu effectivement rejet accidentel d'un bain de traitement de surface à base de cyanures.

Cette industrie rejette aussi des métaux lourds, essentiellement du chrome et du nickel. Une réglementation sévère limite les rejets tolérables de métaux lourds de façon à limiter les risques de toxicité chronique et de bioaccumulation.

- 4.1. Qu'appelle-t-on toxicité aiguë et toxicité chronique ?
- 4.2. Présenter la chaîne trophique de la rivière et montrer pourquoi des rejets faibles mais constants de métaux lourds peuvent rendre les poissons de cette rivière impropres à la consommation.

BTS METIERS DE L'EAU		SESSION : 2001
CODE : MTBBM	DUREE : 4 HEURES	COEFFICIENT : 4
EPREUVE : BIOCHIMIE, BIOLOGIE ET MICROBIOLOGIE DES EAUX		PAGE : 3 sur 6

DOCUMENT N°1

Détermination de l'inhibition de la mobilité de *Daphnia magna* Straus d'après la norme ISO 6341

Détermination, dans des conditions définies, de la concentration initiale en substance toxique présumée dans l'eau étudiée (concentration présente au début de l'essai). C'est la concentration qui immobilise 50 % des crustacés (*Daphnia magna*) mis en expérimentation, en 24 (ou 48) heures. Cette concentration, dite concentration efficace initiale inhibitrice est désignée par CE50_i-24h. Dans le cas d'un effluent, cette concentration est exprimée en % de dilution ou en mL / 100 mL.

La sensibilité des *Daphnia magna* aux toxiques étant fonction de leur âge et de leur provenance, toutes celles utilisées pour une analyse doivent provenir du même lot, âgé de moins de 24 h. La sensibilité du lot de daphnies aux toxiques est correcte si la CE50_i-24h du dichromate de potassium, déterminée en parallèle, est comprise entre 0,6 et 1,7 mg/L.

L'essai se conduit en une ou deux étapes :

- Un essai préliminaire sert à déterminer la gamme de concentration pour l'essai définitif et donne une valeur approximative de la CE50_i-24h. Il se pratique sur une large gamme de dilution et avec un nombre restreint de daphnies.
- Un essai définitif permet d'établir précisément la valeur de la CE50_i-24h ainsi que les concentrations correspondant à 0% et 100% d'immobilisation. Il doit être réalisé sur au moins 3 concentrations donnant des pourcentages d'immobilisation compris entre 10 et 90 %.

Les essais se mènent en réalisant des dilutions de l'échantillon à analyser. Après 24 heures à une température comprise entre 18 et 22 °C, on vérifie que la teneur en oxygène dissous est au moins égale à 2 mg/L ; on dénombre les daphnies qui sont encore mobiles (se déplaçant) et on calcule les pourcentages d'immobilisation.

Un témoin, constitué d'un même nombre de daphnies placées dans un même volume d'eau de dilution, est mené en parallèle. La mortalité doit y être inférieure à 10 %.

Le nombre de *Daphnia magna* introduit dans chaque essai est égal à 5.

BTS METIERS DE L'EAU		SESSION : 2001
CODE : MTBBM	DUREE : 4 HEURES	COEFFICIENT : 4
EPREUVE : BIOCHIMIE, BIOLOGIE ET MICROBIOLOGIE DES EAUX		PAGE : 4 sur 6

DOCUMENT N°2

Résultats obtenus pour détermination de la CE50,-24h d'un effluent

Les essais se font en tubes contenant 5 *Daphnia magna* et 10 mL de dilution de l'effluent.

1- Résultats de l'essai préliminaire (1 tube par dilution)

Le tableau ci-dessous donne les daphnies mobiles après 24 heures d'incubation à 20 °C.

Concentration (% de dilution)	90	50	10	5	1	0,5	0,1	0,05	0,01
<i>Daphnia magna</i> mobiles	0	0	0	0	0	3	5	5	5

2- Essai définitif (4 tubes par dilution)

Après 24 heures d'incubation à 20°C, la concentration en oxygène dissous des tubes est comprise entre 2,8 mg/l (pour les tubes témoins) à 7,2 mg/L pour les tubes de la concentration à 1%.

Le nombre de daphnies mobiles par tube après incubation est donné dans le tableau ci-dessous.

Concentration (% de dilution)	Nombre de <i>Daphnia magna</i> mobiles dans le tube				τ	p
	n°1	n°2	n°3	n°4		
0 (témoin)	5	5	5	5	20	
0,1	5	5	5	5	20	
0,2	5	5	4	5	19	
0,4	4	5	3	3	15	
0,6	2	1	3	2	8	
0,8	1	0	2	1	4	
1	0	1	0	0	1	

τ = nombre de *Daphnia magna* mobiles en fin d'essai pour chaque concentration

p = pourcentage de *Daphnia magna* immobilisées pour chaque concentration

3- Sensibilité du lot de *Daphnia magna* au dichromate de potassium

Un essai, mené en parallèle dans les mêmes conditions que pour l'échantillon à analyser, a donné une CE50,-24h de 1,12 mg/L.

BTS METIERS DE L'EAU		SESSION : 2001
CODE : MTBBM	DUREE : 4 HEURES	COEFFICIENT : 4
EPREUVE : BIOCHIMIE, BIOLOGIE ET MICROBIOLOGIE DES EAUX		PAGE : 5 sur 6

DOCUMENT N°3

Dosage des cyanures totaux selon la méthode NF T 90-107

Principe :

- Décomposition des cyanures complexes par chauffage à reflux en présence de sulfate de cuivre (II), de chlorure d'étain (II) et d'acide sulfurique, et entraînement par un courant gazeux de l'acide cyanhydrique libéré qui est recueilli dans une solution d'hydroxyde de sodium.
- Transformation des ions cyanures par addition de chloramine T et réaction du chlorure de cyanogène formé sur le réactif pyridine-phényl-1-méthyl-3-pyrazolone-5 (réaction d'Epstein).
- Mesure spectrophotométrique au maximum de l'absorbance du complexe, environ 620 nm.

Préparation de l'essai :

Le dosage se fait sur une prise d'essai d'échantillon de 100 mL.

Décomposition et séparation des cyanures :

- Montage à utiliser : un ballon tri-col dont l'un permet l'introduction de réactif, un deuxième, le passage du gaz interne d'entraînement de l'acide cyanhydrique, et le troisième, central, est fixé à un réfrigérant. L'autre extrémité du réfrigérant est relié à un récipient de recueil de l'acide cyanhydrique appelé "absorbeur".
- Introduire dans l'absorbeur 50 mL d'hydroxyde de sodium 0,2 mol.L⁻¹.
- Introduire dans l'ordre dans le ballon : 30 mL d'eau distillé, 10 mL de sulfate de cuivre à 200 g/L, 2 mL de chlorure d'étain à 500 g/L et la prise d'essai. Ajouter 100 mL d'eau distillée.
- Le montage fermé, introduire par un entonnoir 25 mL d'acide sulfurique au 1/2, porter rapidement à ébullition avec un bullage constant du gaz d'entraînement.
- Après 1 heure d'ébullition, laisser refroidir en maintenant le bullage.
- Transvaser le contenu de l'absorbeur dans une fiole jaugée de 250 mL et compléter au trait de jauge avec de l'eau distillée : on obtient la solution A.

Dosage spectrophotométrique

- Introduire dans une fiole jaugée de 50 mL un volume de solution A tel qu'il contienne entre 0,1 et 10 µg de CN⁻.
- Amener si nécessaire le volume à environ 25 mL par de l'eau distillée. Ajouter 5 mL de la solution tampon pH 6 et amener à pH 6,5 par de l'acide acétique (volume à déterminer).
- Poursuivre comme pour la gamme d'étalonnage.

Gamme d'étalonnage

- A partir d'une solution étalon de cyanure de potassium, préparer une gamme allant de 0 à 10 µg de cyanure en introduisant de 0 à 5 mL dans 6 fioles jaugées de 50 mL.
- Compléter le volume de chaque fiole à 5 mL par la solution d'hydroxyde de soude à 0,2 mol.L⁻¹.
- Ajouter 20 mL d'eau distillée.
- Ajouter 5 mL de tampon pH 6, ajuster le pH à 6,5 par de l'acide acétique (volume à déterminer préalablement). A partir de ce moment, les fioles doivent être maintenues fermées.
- Ajouter 0,5 mL de la solution de chloramine T, agiter, laisser poser 1 à 2 minutes à la température ambiante.
- Ajouter 1 ml de réactif pyridine-pyrazolone, compléter à 50 mL avec d'eau distillée, boucher et homogénéiser.
- Laisser au repos pendant 15 à 20 minutes à l'obscurité et à une température inférieure à 25 °C.
- Lire au maximum d'absorbance (environ 620 nm).

BTS METIERS DE L'EAU		SESSION : 2001
CODE : MTBBM	DUREE : 4 HEURES	COEFFICIENT : 4
EPREUVE : BIOCHIMIE, BIOLOGIE ET MICROBIOLOGIE DES EAUX		PAGE : 6 sur 6