



HAL
open science

Effet des phosphates sur la physiologie des bactéries et la composition taxonomique des eaux potables

Magali Batté

► **To cite this version:**

Magali Batté. Effet des phosphates sur la physiologie des bactéries et la composition taxonomique des eaux potables. Sciences du Vivant [q-bio]. Université Henri Poincaré - Nancy 1, 2001. Français. NNT : 2001NAN10287 . tel-01748666

HAL Id: tel-01748666

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01748666>

Submitted on 29 Mar 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

UNIVERSITE HENRI POINCARÉ – NANCY I

2001

ECOLE DOCTORALE « BIOLOGIE SANTE ENVIRONNEMENT »

38 25604

THESE

Présentée et soutenue publiquement
Le 24 septembre 2001



pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE

HENRI-POINCARÉ – NANCY I

Mention CHIMIE ET MICROBIOLOGIE DE L'EAU

par Magali BATTÉ

Titulaire du Diplôme d'Etudes Approfondies « Chimie et Microbiologie de l'Eau »

EFFET DES PHOSPHATES SUR LA PHYSIOLOGIE DES BACTÉRIES ET LA COMPOSITION TAXONOMIQUE DES EAUX POTABLES

MEMBRES DU JURY

Membres
du jury : Madame Michèle PRÉVOST (Ecole Polytechnique de Montréal, Montréal)
Madame Laurence MATHIEU (Ecole Pratique des Hautes Etudes, Nancy)
Monsieur Jean-Claude BLOCK (Université Nancy I, Nancy)
Monsieur Philippe HARTEMANN (Université Nancy I, Nancy)

Rapporteurs : Madame Nicole MERLET (Université de Poitiers)
Monsieur Pierre SERVAIS (Université Libre de Bruxelles)

BU PHARMA-ODONTOL



D 104 058943 7

Remerciements

Je souhaite remercier ici les organismes partenaires du programme de recherche « Biofilm » (et leurs représentants), qui, par leur participation financière, ont permis la réalisation des travaux préparés à Nancy :

- *Agence de l'eau Seine-Normandie*
- *Centre International de l'Eau De Nancy*
- *Communauté Urbaine du Grand Nancy*
- *Vivendi-Waters*
- *Pont-à-Mousson S.A.*
- *Syndicat des Eaux d'Ile de France*
- *U.S. Environmental Protection Agency*

Je remercie également le CRSNG (Conseil de Recherches en Sciences Naturelles et en Génie) ainsi que les partenaires de la Chaire Industrielle CRSNG en Eau potable, qui ont permis par leur appui financier, la réalisation des travaux effectués à Montréal :

- *Ville de Montréal,*
- *Ville de Laval,*
- *Vivendi-Waters - John Meunier-US Filter*
- *Triax*

Je tiens avant tout à remercier mes directeurs, Madame Michèle Prévost et Monsieur Philippe Hartemann pour m'avoir accueillie dans leurs équipes de recherche, avoir supporté les contraintes du montage de cette thèse et pour avoir toujours recherché à obtenir le meilleur de moi-même.

J'adresse des remerciements chaleureux à Madame Nicole Merlet pour ses conseils concernant la désinfection, fournis en toute cordialité et pour avoir jugé ce travail en tant que rapporteur.

Je remercie également Monsieur Pierre Servais pour l'intérêt qu'il a bien voulu manifester pour ce travail en acceptant de le juger et pour avoir partagé ses connaissances concernant les méthodes de détection des bactéries.

Qu'il me soit permis de remercier très vivement Monsieur Dominique Tricart pour avoir accepté d'être membre de ce jury.

Que Monsieur Jean-Claude Block trouve ici mes profonds remerciements pour ses conseils de tous ordres et pour m'avoir permis d'initier les travaux sur les phosphates et la physiologie des bactéries. Merci également pour sa participation en tant que membre et président du jury.

Je remercie Madame Laurence Mathieu pour m'avoir réorientée dans les moments d'égarements, avec une rigueur scientifique irréprochable et estimable, pour les efforts que notre collaboration a suscités et également pour avoir accepté d'être membre de ce jury.

Mes remerciements s'adressent bien sûr à Boniface Koffivi Koudjonou pour les conseils et l'aide qu'il a pu m'apporter pendant les trois années de notre collaboration et à Josée Coallier pour avoir partagé des connaissances en microbiologie. Que Patrick Laurent accepte ma profonde gratitude pour ses conseils et pour le temps qu'il a investi dans ce travail.

Merci également à Jacinthe Mailly, Julie Philibert et Mélanie Rivard, sans qui cette thèse n'aurait pu être réalisée et pour leur accueil chaleureux. A ce titre également, je remercie les autres employés de la Chaire en Eau potable pour leur sympathie et les bons moments, sans oublier Virginia.

Je tiens à exprimer des remerciements à mes amis du Québec pour avoir enduré les doutes et les sautes d'humeur que cette thèse a engendrés, et à ceux de France et d'ailleurs qui ont su me soutenir, malgré la distance, par de petits mots. Alors merci, Thierry et Laurence, Peggy et Franck, Pat le GB, Nathalie et Didier, Josefina qui sait bien ce que j'ai pu vivre, Anne-Christine, Benoît et Marianne, Anna, Pierre-Marie, Sébastien, Nathalie, Élisabeth, et tous ceux que j'oublie. Merci, merci tout le monde.

Merci à mes parents, à mes frères et à la famille de Vincent pour leur soutien. Je remercie tout particulièrement Philippe pour sa belle contribution...

Enfin, je ne sais comment remercier Vincent qui, par amour, a enduré une deuxième thèse, mon caractère et qui a su me soutenir à sa façon, discrètement.

Fonce
Droit devant
Même désespéré
Même en sang
Droit devant
Même s'il n'y a rien qui t'attend
Il ne faut jamais revenir
Aux marches qui nous font souffrir
Mieux vaut affronter l'avenir
Que de laisser
Le passé nous blesser

Gilbert Gélinas

Sommaire Général



Liste des Publications	2
Liste des Illustrations	3
Chapitre I - Introduction	5
Chapitre II - Analyse Bibliographique	8
II.1 Caractérisation des phosphates suivant une problématique eau potable	9
II.2 Le biofilm	27
II.3 La désinfection par le chlore et la monochloramine	54
Chapitre III - Matériel et Méthodes	74
Chapitre IV- Effet des Phosphates sur la Physiologie des Bactéries Libres et Fixées	98
IV.1 Introduction	99
IV.2 Effet des phosphates sur la croissance et cultivabilité des bactéries libres	100
IV.3 Biofilm responses to ageing and to a high phosphate load in a pilot drinking water system	103
IV.4 Effect of adding phosphate to drinking water on bacterial growth in slightly and highly corroded pipes	124
IV.5 Discussion	131
Chapitre V – Effet des Phosphates sur la Désinfection à la Monochloramine	134
V.1 Introduction	135
V.2 Résultats	135
V.3 Discussion	149
Chapitre VI– Effet des Phosphates sur la Composition des Populations	154
VI.1 Introduction	155
VI.2 Effet de l'ajout de phosphates en conditions statiques sur une sous-population de coliformes, cultivables	156
VI.3 Effet de l'ajout de phosphates en conditions dynamiques sur l'implantation d'une sous-population de coliformes cultivables injectée dans un réacteur	163
VI.4 Influence of phosphate and disinfection on the phylogenic composition of drinking water biofilms as measured by in situ hybridization (FISH)	167
VI.5 Discussion	190
Chapitre VII – Conclusions Générales	192
Chapitre VIII - Références Bibliographiques	195
Chapitre IX - Annexes	214

Liste des Publications

Publications publiées, soumises et en préparation

Appenzeller B. M. R, Batté M., Mathieu L., Block J.-C., Lahoussine V., Cavard J. et Gatel D. (2001) Effect of adding phosphate to drinking water on bacterial growth in slightly and highly corroded pipes. *Wat. Res.* 35(4), 248-253.

Batté M., Koudjonou B., Laurent P., Mathieu L., Coallier J. et Prévost M. Biofilm responses to ageing and to a high phosphate load in a pilot drinking water system. Soumis à la revue *Water Research*.

Batté M., Mathieu L. et Prévost M. Influence of phosphate and disinfection on the phylogenic composition of drinking water biofilms as measured by in situ hybridization (FISH). Soumis à la revue *Applied and Environmental Microbiology*.

Batté M., Koudjonou B., Mathieu L. et Prévost M. Effects of phosphate load on monochloramine efficiency for biofilm disinfection in drinking water. A soumettre.

Liste des communications

Batté M., Koudjonou B., Prévost M., Block J.-C., Hartemann P. et Mathieu L. (1999) Approaches to evaluate impact of corrosion inhibition with polyphosphate on disinfection of a drinking water biofilm. In conférence « *Conferences on biofilm systems* »: New York. 17-20 octobre. International Association on Water Quality.

Batté M., Koudjonou B., Laurent P., Coallier J. et Prévost M. (2000) Does phosphate-based anticorrosion treatment enhance biofilm resistance to disinfection ? In conférence « *Water Quality Technology Conference* »: Salt Lake City. 5-9 Novembre, American Water Works Association.

Appenzeller B. M. R, Batté M., Mathieu L., Block J.-C., Lahoussine V., Cavard J. et Gatel D. (2000) Effet de l'ajout de phosphate dans l'eau potable sur la croissance en canalisation faiblement ou fortement corrodées. In colloque « *les matériaux et l'eau potable, facteurs interférants* » : La Rochelle. 7-8 décembre. Association Scientifique Européenne pour l'Eau et la Santé.

Listes des Illustrations



Liste des Figures

Figure II.1 : Les pKa de l'acide orthophosphorique à l'ion orthophosphate	9
Figure II.2 : Effet du pH sur les équilibres entre les différentes formes de phosphate	10
Figure II.3 : Les équilibres des différents complexes phosphatés en fonction du pH	10
Figure II.4 : Principe de la corrosion	11
Figure II.5 : Formule développée des polyphosphates	16
Figure II.6 : Les systèmes de transport du phosphate chez <i>Escherichia coli</i>	20
Figure II.7 : Utilisation des phosphates chez la bactérie	22
Figure II.8 : Suivi des densités de bactéries cultivables suite à l'ajout d'orthophosphate	26
Figure II.9 : Estimation du point de charge nul de diverses substances	27
Figure II.10 : Phase d'accumulation du biofilm sous forme d'une courbe sigmoïdale	28
Figure II.11 : Modèle architectural d'un biofilm	30
Figure II.12 : Phénomènes cinétiques et hydrodynamiques dans un biofilm	32
Figure II.13 : Composition des enveloppes des Gram+ et des Gram-	34
Figure II.14 : Les différents sucres rencontrés dans les eaux naturelles	35
Figure II.15 : Exemples d'acides uroniques	35
Figure II.16 : Structure générale des acides aminés	36
Figure II.17 : Formules développées des différents acides aminés composant les protéines	37
Figure II.18 : Section transversale d'un biofilm mixte de <i>K. pneumoniae</i> et <i>P. aeruginosa</i>	41
Figure II.19 : Arbre phylogénétique montrant les relations entre les différents groupes bactériens principaux	45
Figure II.20 : Composition phylogénétique de la population cultivable des biofilms	48
Figure II.21 : Effet de la vitesse du flux sur la composition de la fraction cultivable d'un biofilm	49
Figure II.22 : Composition phylogénétique d'un biofilm	53
Figure II.23 : Interprétation schématique de la demande en chlore	56
Figure II.24 : Structure du glutathion	60
Figure II.25 : Équilibres entre les différentes chloramines en fonction du pH	62
Figure III.1 : Schéma d'un réacteur annulaire de type RotoTorque™	76
Figure III.2 : Photos du système de prélèvement des lamelles de biofilms	86
Figure III.3 : Équation de dégradation de la L-Leucine-β-Naphthylamine par les exoenzymes	89
Figure IV.1 : Nombres de cellules marquées au DAPI et nombre d'unités formant colonies (UFC)	102
Figure IV.2 : Évolution pendant 9 jours des moyennes de bactéries marquées au DAPI et de bactéries cultivables	103
Figure 1: Réacteur annulaire et système de prélèvement des lamelles en polycarbonate	110
Figure 2: Protocole expérimental	112
Figure 3: Effets des phosphates sur les densités bactériennes dans les biofilms	114
Figure 4: Teneurs relatives des divers acides aminés dans les biofilms	115
Figure 5: Teneurs relatives des divers hydrates de carbone dans les biofilms	117
Figure V.1 : Schéma du plan d'expérience réalisé au cours des deux essais.	136
Figure V.2 : Résiduels de monochloramine en sortie des pilotes	139
Figure V.3 : Effet de la désinfection à la monochloramine sur des biofilms Mesure par BHA, AEP et CDT.	140
Figure V.3 : Effet de la monochloramination sur les pourcentages relatifs en hydrates de carbone dans les biofilms	146
Figure V.4 : Effet de la monochloramine sur les pourcentages relatifs des différents acides aminés dans les biofilms	148
Figure VI.1 : Survie des coliformes dans de l'eau de stérilisée enrichie avec des acides aminés et des phosphates.	158
Figure VI.2 : Évolution des dénombrements de coliformes cultivables pendant un séjour dans des eaux potables	162
Figure VI.3 : <i>C. freundii</i> cultivables dans de l'eau de distribution, en fonction de la dose de phosphate ajoutée.	162
Figure VI.4 : <i>E. coli</i> cultivable dans de l'eau de distribution, en fonction de la dose de phosphate ajoutée	163
Figure VI.5 : Concentrations en <i>Citrobacter freundii</i> Cultivables sur gélose mT7 ou mEndo en sortie des pilotes.	166
Figure VI.6 : <i>Citrobacter freundii</i> Cultivables en sortie des pilotes témoins et des pilotes traités aux phosphates.	167
Figure 1: Effet des phosphates sur la composition taxonomique des biofilms.	176
Figure 2: Évolution de la composition taxonomique des populations libres en entrée et sortie des pilotes.	180

Liste des Tableaux

Tableau II.1 : Echelle des potentiels de Nernst	11
Tableau II.2: Paramètres chimiques influençant la corrosion	14
Tableau II.3 : Pourcentages exprimant la composition des exopolymères en terme d'hydrates de carbone	36
Tableau II.4 : Pourcentages exprimant la composition des exopolymères en terme d'acides aminés	38
Tableau II.5 : Composition des exopolymères extraits de biofilms de cultures mixtes	40
Tableau II.6 : Composition des biofilms en terme de genres bactériens	44
Tableau II.7 : Composition taxonomique des bactéries cultivables	50
Tableau II.8 : Composition des biofilms d'eau potable étudiés par la méthode FISH	52
Tableau II.9: Composition de la population libre étudiée par FISH	54
Tableau II.10 : Le potential standard d'électrode (E°) de quelques désinfectants communs	55
Tableau II.12 : Constantes cinétiques apparentes des demandes en chlore des acides aminés	58
Tableau II.13 : Constantes cinétiques apparentes de la demande en chlore à long terme de quelques peptides et protéines	58
Tableau II.11 : Demande en chlore de quelques acides aminés	59
Tableau II.14 : Exemples de la demande en chlore de quelques peptides et protéines	60
Tableau II.15 : Constantes cinétiques de la réaction du chlore avec des acides humiques	61
Tableau II.16 : Constantes cinétiques apparentes de décomposition de la monochloramine par les substances humiques	64
Tableau II.17 : Pourcentage de consommation de la monochloramine par les acides aminés et les acides nucléiques	65
Tableau II.18 : Exemples de biofilms en présence de désinfectants	67
Tableau III.1 : Caractéristiques des réacteurs RotoTorque TM	77
Tableau III.2: Les quatre sondes oligonucléotidiques utilisées pour l'analyse taxonomique des populations	83
Tableau III.3: Caractéristiques des bandes passantes (nm) des cubes à fluorescence utilisés sur les microscopes	92
Tableau IV.1 : Caractéristiques des eaux utilisées aux cours des essais en conditions statiques, condition A (n=2)	101
Tableau IV.2 : Caractéristiques des eaux utilisées aux cours des essais en conditions statiques, condition B	101
Table 1: Caractéristiques physico-chimiques de l'eau lors d'essais en réacteurs annulaires	109
Table 2: Conditions expérimentales et caractéristiques moyennes de l'eau d'alimentation des pilotes	113
Table 3: Concentrations en hydrates de carbone, acides aminés et phosphates dans des biofilms plus ou moins âgés	115
Table 4: Teneurs reportées par bactéries	119
Tableau V.1: Caractéristiques physico-chimiques de l'eau potable (Montréal, Canada)	137
Tableau V.2 : Suivis des conditions expérimentales	138
Tableau V.3 Taux initiaux de décroissance des densités bactériennes dans les biofilms traités ou non aux phosphates lors de la première semaine d'application de la monochloramine	140
Tableau V.4 : Teneurs des biofilms traités aux phosphates et témoins, avant et après désinfection, en terme d'hydrates de carbone totaux, acides aminés et phosphates	144
Tableau V.5 : Ratio des concentrations molaires en hydrates de carbone (HC) par rapport aux acides aminés (aa).	145
Tableau VI.1 : Caractéristiques physico-chimiques de l'eau initiale et en fin d'expérience	158
Tableau VI.2 : Caractéristiques physico-chimiques et microbiologiques des eaux utilisées pour les 2 types d'essais.	161
Tableau VI.3 : Caractéristiques physico-chimiques et microbiologiques des eaux utilisées au cours de l'expérience d'injection de <i>Citrobacter freundii</i> dans des pilotes RotoTorque TM en phase de phosphatation	165
Table 1: Composition physico-chimique des eaux pendant l'étude de caractérisation taxonomique	171
Table 2 : Description des traitements appliqués aux biofilms pendant l'étude de caractérisation taxonomique	174
Table 3: Composition des biofilms en bactéries (dénombrements et caractérisation taxonomique)	175
Table 4: Évolution de la composition des biofilms pendant la chloration	177
Table 5: Évolution de la composition des biofilms pendant la monochloramination avec la dose n°1	179
Table 6: Évolution de la composition des biofilms pendant la monochloramination avec la dose n°1	179

Chapitre I Introduction

Les travaux présentés ici s'intéressent particulièrement aux effets des phosphates sur la physiologie des bactéries en tant que nutriment bactérien, en réseau de distribution.

Il est admis que les nutriments carbonés et biodégradables sont en général ceux qui limitent la croissance bactérienne dans la plupart des réseaux d'adduction d'eau potable (van der Kooij et Hijnen, 1985 ; Prévost *et al.*, 1998). Bien que les phosphates soient des nutriments essentiels, les besoins des bactéries en phosphates sont moindres que ceux en composés carbonés. Par exemple, le phosphore représente de l'ordre de 1% de la masse cellulaire de *E. coli*, contre 50% pour le carbone (Pelmont 1993).

Cependant, la faible teneur en phosphates dans les eaux potables (souvent $<10\mu\text{g P L}^{-1}$) par rapport aux nutriments carbonés (jusqu'à $470\mu\text{g}$ de carbone organique assimilable reportés par Miettinen *et al.* (1997)) a conduit quelques auteurs à supposer que la croissance bactérienne en réseau de distribution d'eau potable peut parfois être limitée par une carence en phosphates (Miettinen *et al.*, 1997 ; Sathasivan *et al.*, 1997 ; Sathasivan et Ohgaki, 1999).

Étant donné le peu de cas signalés et la particularité des eaux concernées, cette éventuelle carence des eaux en phosphates aurait un caractère uniquement anecdotique, si les phosphates n'étaient pas également des molécules aux propriétés anticorrosives, parfois appliquées en réseaux de distribution d'eau potable, pour limiter la corrosion des canalisations ou la dissolution du plomb. La mise en œuvre d'un traitement aux phosphates modifie inévitablement les conditions trophiques de l'écosystème réseau et pourrait donc conduire à une détérioration de la qualité microbiologique des eaux.

Par ailleurs, la littérature stipule que l'action des phosphates sur les dépôts de corrosion influence l'efficacité de la désinfection puisque (i) la demande en désinfectant due à la corrosion est réduite, et que (ii) les densités de bactéries dans le biofilm dépendent des quantités de dépôts de corrosion (LeChevallier *et al.*, 1990 ; Lyons *et al.*, 1995 ; Abernathy et Camper, 1997 et 1998 ; Rompré *et al.*, 2000).

En conséquence des effets indirects des phosphates sur les bactéries au travers de leurs effets sur la corrosion, l'effet des phosphates sur la physiologie des bactéries est peu documenté, notamment lorsqu'il s'agit des bactéries fixées dans le biofilm.

De plus, la plupart des travaux de recherche concernant les effets des phosphates sur la flore bactérienne prennent plus particulièrement en considération le risque d'une croissance bactérienne suite à l'ajout de phosphates dans les eaux potables.

Cependant, en tant que nutriments, l'ajout de phosphates dans les eaux pourraient induire des changements physiologiques variés chez les bactéries. En effet, la littérature reporte que des changements dans les conditions trophiques (teneurs en phosphates, en carbone, en azote, teneur globale en nutriments, etc) peuvent parfois induire (i) une croissance (Miettinen *et al.*, 1997 ; Sathasivan et Ohgaki, 1999) mais également (ii) une évolution dans la biodiversité des populations bactériennes (Norton et LeChevallier, 2000), (iii) des modifications des diverses activités de synthèses (Torriani-Gorini, 1994) ou (iv) des modifications de l'efficacité des désinfectants appliqués dans les eaux (Olson et Stewart, 1992).

Il a également été pris en compte l'hypothèse selon laquelle, puisque l'efficacité des désinfectants dépend de leur diffusion et /ou réactivité au sein du biofilm (Brown et Gilbert, 1995), les propriétés filmogènes des phosphates (Cordonnier, 1997) pourraient modifier l'efficacité de la désinfection.

Les travaux présentés ici ont eu pour objectifs d'évaluer l'effet des phosphates sur la physiologie des bactéries, dans des eaux potables où la croissance est généralement limitée par les nutriments carbonés. Ils ont visé à évaluer si l'ajout de phosphates dans ces eaux :

- stimule la croissance des bactéries libres ou fixées,
- engendre des changements dans la composition chimique des biofilms,
- modifie l'efficacité de désinfection des biofilms,
- influence la biodiversité bactérienne au sein du biofilm.

L'analyse bibliographique constitue le chapitre II et est consacrée (i) aux connaissances actuelles sur les phosphates notamment en termes de produits anticorrosion et de nutriments bactériens (ii) aux biofilms, notamment à leur établissement dans les réseaux d'adduction d'eau potable et à leurs variations de composition (microbiologique et chimique) (iii) aux désinfectants que sont le chlore et la monochloramine, à leur mode d'action et aux paramètres influençant leur efficacité de désinfection.

Le chapitre III détaille le matériel et les méthodes employés pendant les essais.

Le chapitre IV est consacré à l'impact de l'ajout de phosphates (i) sur les populations libres, en conditions statiques ou dynamiques et (ii) sur les populations fixées, en conditions dynamiques. Il présente des essais traitant des effets des phosphates en absence de désinfectants sur les populations autochtones des eaux, effectués à Nancy et à Montréal. Au cours des essais réalisés à Nancy, l'effet des phosphates sur les populations libres a été testé en conditions statiques, en absence de corrosion et à diverses doses ou, en conditions dynamiques et en présence de corrosion. À Montréal, les essais ont été effectués sur des populations autochtones fixées, en conditions dynamiques et en absence de corrosion. Afin de déterminer les effets des

phosphates sur les réponses physiologiques des bactéries fixées, des pilotes ont été utilisés afin de simuler les conditions dynamiques observées dans les réseaux de distribution.

Le Chapitre V présentent une étude effectuée à Montréal afin de déterminer les effets des phosphates sur la réponse du biofilm à la monochloramination, en termes de cultivabilité bactérienne, densités bactériennes globales et composition chimique en hydrates de carbone et acides aminés.

Le chapitre VI évalue l'effet des phosphates sur le comportement de sous populations bactériennes. Ce chapitre présente (i) des travaux réalisés à Nancy et Montréal, où la cultivabilité de sous-populations injectées (coliformes) a été suivie et (ii) des travaux réalisés à Montréal où la composition taxonomique des populations bactériennes autochtones a été estimée avec la méthode FISH (Fluorescent *in situ* hybridization).

Le chapitre VII synthétise les principaux résultats obtenus et dégage les principales conclusions.

Les chapitres VIII et IX présentent respectivement les références bibliographiques et les annexes.

Chapitre II Analyse Bibliographique

II.1	<u>CARACTÉRISATION DES PHOSPHATES SUIVANT UNE PROBLÉMATIQUE EAU POTABLE</u>	9
II.1.1	Caractérisation chimique des phosphates	9
II.1.2	Phosphates et lutte anticorrosion	11
II.1.2.1	Chimie de la corrosion	11
II.1.2.2	Effet de la corrosion dans les réseaux de distribution	12
II.1.2.3	Paramètres influençant la corrosion	13
II.1.2.4	Produits à base de phosphates limitant la corrosion	15
II.1.3	Phosphates et physiologie bactérienne	17
II.1.3.1	Les mécanismes de chemotaxie et motilité chez la bactéries pour la rencontre des phosphates de l'environnement	18
II.1.3.2	Transport des phosphates dans la cellule	19
II.1.3.3	Incorporation des phosphates dans la cellule bactérienne	21
II.1.4	Phosphates et croissance/activité bactérienne	24
II.1.4.1	Effets <i>in vitro</i> des molécules contenant des phosphates sur la croissance des bactéries	24
II.1.4.2	Inhibiteurs de corrosion à base de phosphates et croissance bactérienne	25
II.2	<u>LE BIOFILM</u>	27
II.2.1	Processus de formation du biofilm	28
II.2.2	Développement structural du biofilm	29
II.2.2.1	Modèle architectural	29
II.2.2.2	Le quorum sensing	30
II.2.2.3	L'hydrodynamisme	31
II.2.3	Composition d'un biofilm	33
II.2.3.1	Les exopolymères	33
II.2.3.2	Composés piégés dans le biofilm et adsorption par les exopolymères	38
II.2.3.3	Les microorganismes	40
II.2.4	Phylogénie et biofilm	43
II.2.4.1	La phylogénie	45
II.2.4.2	Limitation et avantages de l'approche taxonomique	47
II.2.4.3	Composition phylogénétique des biofilms d'eau potable	51
II.2.4.4	Comparaison phylogénétique des bactéries sessiles et des bactéries en suspension	53
II.3	<u>DÉSINFECTION PAR LE CHLORE ET LA MONOCHLORAMINE</u>	54
II.3.1	Chimie du chlore	54
II.3.1.1	Demande en chlore	55
II.3.1.2	Maintien du résiduel de chlore et réactivité	57
II.3.2	Chimie de la monochloramine	61
II.3.2.1	Formation de la monochloramine	62
II.3.2.2	Maintien du résiduel de monochloramine et réactivité	63
II.3.3	Efficacité de désinfection	66
II.3.4	Divers Paramètres influençant l'efficacité de désinfection	68
II.3.4.1	Caractéristiques physicochimiques de l'environnement	68
II.3.4.2	Désinfectants et réactivité avec le biofilm	69
II.3.4.3	Cibles des désinfectants dans les bactéries	70
II.3.4.4	Caractéristiques génétiques des bactéries	71

II.1 Caractérisation des Phosphates suivant une Problématique Eau Potable

Les phosphates rencontrés dans les eaux naturelles sont soit sous forme dissoute et colloïdale (orthophosphates, polyphosphates, phosphore organique), soit particulaire ($>0,45\mu\text{m}$), correspondant alors aux phosphates incorporés dans les organismes (Martin, 1987) et/ou à des précipités. Les eaux superficielles présentent des valeurs en orthophosphates variables de $< 0,07$ mg P/L jusqu'à $>1,7$ mg/L, selon les cours d'eau, les saisons, etc... (Martin, 1987). Brunet et Astin (1998) reportent des valeurs atteignant 8 mg P/L en phosphore dissous dans les eaux de la rivière Adour pendant une crue.

II.1.1 Caractérisation chimique des phosphates

Le phosphore est majoritairement présent dans les eaux naturelles avec un degré d'oxydation V (Stumm et Morgan, 1970 ; Shaw, 1994 ; LeChevallier, 1990), principalement sous forme d'acide orthophosphorique (H_3PO_4), mais également sous forme d'acide pyrophosphorique ($\text{H}_4\text{P}_2\text{O}_7$) ou métaphosphorique (HPO_3 ou encore $(\text{HPO}_3)_n$) (Stumm et Morgan, 1970 ; Shaw, 1994 ; LeChevallier, 1990).

Suivant le pH, l'acide orthophosphorique est en équilibre avec des ions moins hydrogénés : l'ion dihydrogénophosphate, l'ion hydrogénophosphate et l'ion orthophosphate (Martin, 1987 ; Mc Quarrie et Rock, 1992) (Figure II.1).

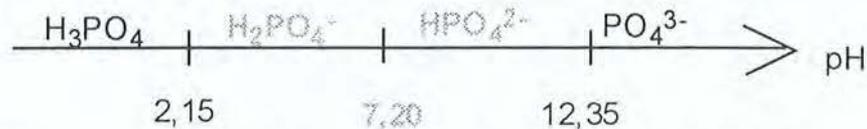


Figure II.1 : Les pKa de l'acide orthophosphorique à l'ion orthophosphate (adapté de Martin, 1987)

Étant donné les pKa des différentes formes, seuls les ions hydrogénophosphate et dihydrogénophosphate sont significativement présents dans les eaux potables dont le pH moyen est en général compris entre 7 et 8 (Figure II.2).

Les orthophosphates forment des complexes avec divers composés tels que :

- d'autres orthophosphates (formation de polyphosphates sous forme pyrophosphorique ou métaphosphorique $(\text{HPO}_3)_n$)
- des métaux (ex : fer, plomb...) sous des formes telles que des oxydes de fer amorphes (Gerke et Hermann, 1992)
- des substances humiques de haut poids moléculaire (>100 kDa) (Francko et Health, 1979)
- des formations colloïdales contenant du fer et des phosphates (Buffle *et al.*, 1989)

- des complexes humiques-fer (Francko et Health, 1979 et 1983 ; Gerke et Hermann, 1992)

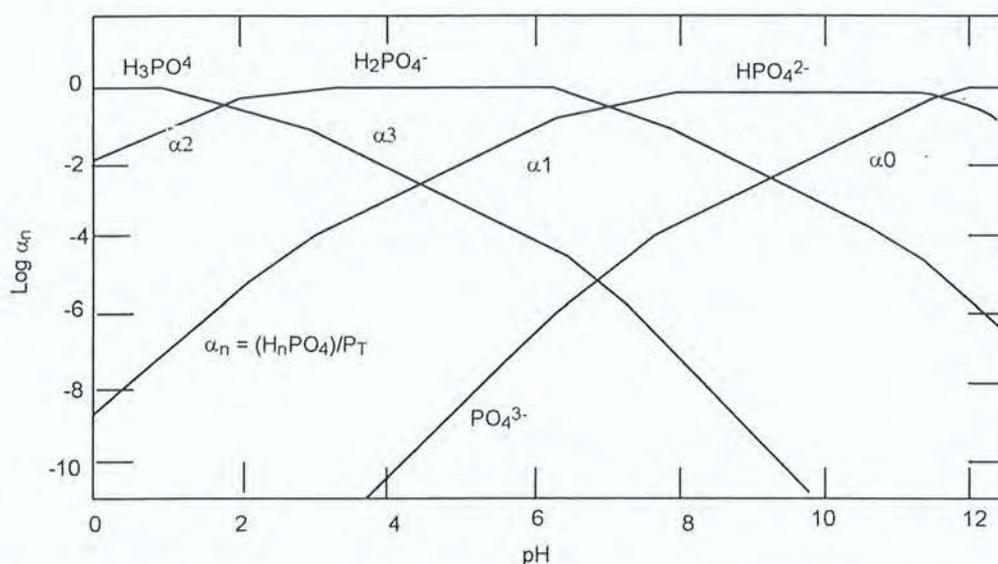


Figure II.2 : Effet du pH sur les équilibres entre les différentes formes de phosphates (α_1 , α_2 ... an traduit la pente correspondant au rapport entre la quantité d'acide HPO_4 , H_2PO_4 ,... H_nPO_4 formée et la quantité totale de P présent) (Stumm et Morgan, 1970).

La formation de ces divers composés est régie par des équilibres entre les différentes formes, en fonction du pH et de la concentration molaire des différentes espèces chimiques d'orthophosphates (Figure II.3).

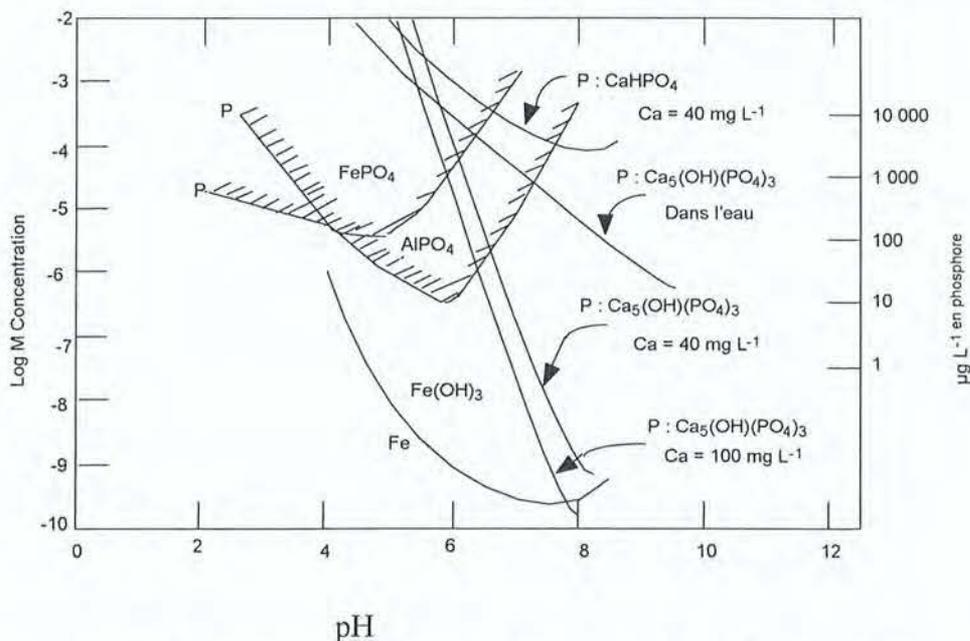


Figure II.3 : Les équilibres des différents complexes phosphatés en fonction du pH (Stumm et Morgan, 1970).

Le pH et la température peuvent également engendrer la précipitation des complexes en solution (Martin, 1987). À titre d'exemple, le pH de précipitation de certaines solutions

phosphatées de concentration $10^{-2}M$ en orthophosphate est de 8,9 pour la formation du sel $MgNH_4PO_4$, de 5,5 pour la formation de $CaHPO_4$, de 3,8 pour la formation de $AlPO_4$ et de 2 à 3 pour la formation de $FePO_4$ (Martin, 1987).

II.1.2 Phosphates et lutte anticorrosion

La corrosion et la lutte anticorrosion n'ont pas fait l'objet des principaux travaux présentés dans ce mémoire. Cependant, elle est abordée ici afin de cerner l'intérêt de l'utilisation des phosphates dans les réseaux de distribution.

II.1.2.1 Chimie de la corrosion

La corrosion est un phénomène d'oxydoréduction où le métal tient le rôle de cathode et d'anode simultanément (Figure II.4). Elle a lieu lorsque le potentiel d'oxydoréduction global du métal est différent de 0 (Tableau II.1). Les électrons se déplacent via le métal conducteur vers la cathode, les ions métalliques (M^{n+}) tendent à se déplacer vers la cathode dans la solution conductrice (Snoeyink et Wagner, 1996). Ces processus engendrent des tubercules de corrosion ou de la corrosion uniforme suivant l'homogénéité de composition des alliages soumis à la corrosion (Jones, 1996 ; Deslouis *et al.*, 1998).

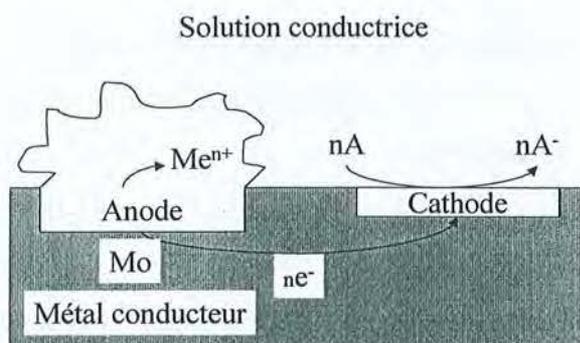


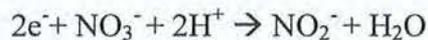
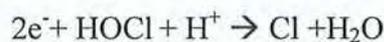
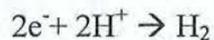
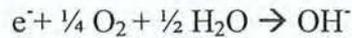
Figure II.4 : Principe de la corrosion (D'après Snoeyink et Wagner, 1996)

Tableau II.1 : Echelle des potentiels de Nernst (a : Jones, 1996 et b : Sawyer et McCarthy, 1978)

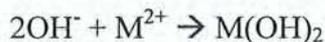
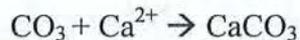
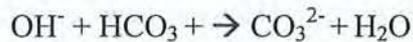
Élément	Réactions à l'électrode	Potentiel d'équilibre (E^0) (V)
Fer	$Fe \rightarrow Fe^{2+} + 2e^-$	$-0.447^a - 0,409$
	$Fe^{3+} + e^- \rightarrow Fe^{2+}$	$0,770^b$
	$Fe^{3+} + 3e^- \rightarrow Fe$	$-0,036^b$
Plomb	$Pb \rightarrow Pb^{2+} + 2e^-$	-0.126^a
Hydrogène	$H_2 \rightarrow 2 H^+ + 2 e^-$	-0.000 par convention ^{a, b}
Cuivre	$Cu \rightarrow Cu^{2+} + 2e^-$	$+0.342^a$ et $+0,337^b$
Platine	$Pt \rightarrow Pt^{2+} + 2e^-$	$+1,118$ par convention

Au niveau de l'anode, la première réaction va conduire à la libération de cations métalliques (Fe^{2+} , Pb^{2+} , etc.) qui vont se complexer avec les anions en solution (formation de PbCl^+ , PbHCO_3^+ , PbCO_3 , PbOH^+ , PbSO_4 , PbNO_3^+ , etc.). Puis, une seconde réaction conduit à la formation de composés plus complexes tels que $\text{Pb}_3(\text{OH})_2(\text{CO}_3)_2$ ou $\text{Pb}(\text{OH})_2$ ou $\text{Pb}(\text{CO}_3)$ dans le cas du plomb.

Au niveau de la cathode, les électrons provenant de l'anode réagissent avec l'eau suivant plusieurs réactions



Puis des réactions secondaires sont engendrées, de précipitation notamment :



II.1.2.2 Effet de la corrosion dans les réseaux de distribution

Les parois en contact avec l'eau potable (canalisations, soudures,...) peuvent subir une corrosion conduisant potentiellement :

- à la libération de métaux tels que le cuivre, le zinc ou le plomb dont les teneurs dans les eaux sont réglementées (Oliphant et Schock, 1996). En particulier le plomb, en tant que substance toxique, présente une limite admissible en France de $50 \mu\text{g Pb}^{2+}\text{L}^{-1}$ (Décret 89-3 du 3 janvier 1989 modifié par les décrets 90-330 du 10 avril 1990, 91-257 du 7 mars 1991 et 95-363 du 5 avril 1995) qui est susceptible d'être abaissée à $25 \mu\text{g L}^{-1}$ voire $10 \mu\text{g L}^{-1}$ suivant les recommandations de l'OMS (Wagner, 1994).
- à la dégradation de la qualité hydraulique des conduites par formation de nodule de corrosion (Oliphant et Schock, 1996),
- à la dégradation de la qualité esthétique de l'eau (eaux rouges) dans le cas de la corrosion du fer (Oliphant et Schock, 1996). En France, la teneur maximale admissible en fer est de 200mg L^{-1} (Décret 89-3 du 3 janvier 1989 modifié par les décrets 90-330 du 10 avril 1990, 91-257 du 7 mars 1991 et 95-363 du 5 avril 1995).

De plus, la corrosion peut engendrer des goûts et odeurs désagréables (Geldreich, 1996), notamment lorsque des bactéries sulfatoréductrices sont présentes (Legrand et Leroy, 1995).

II.1.2.3 Paramètres influençant la corrosion

De nombreux paramètres influencent la corrosion : le pH, la teneur en oxygène dissous, en chlore libre, en dioxyde de carbone, en calcium ou en silice (Kirmeyer et Logsdon, 1983 ; Legrand et Leroy, 1995 ; Snoeyink et Wagner, 1996 ; Vik *et al.*, 1996). Le tableau II.2 résume les effets des paramètres influençant la corrosion. Beaucoup de ces facteurs sont interdépendants, un changement de l'un engendrant des changements d'autres paramètres. Ainsi, le pH, la teneur en dioxyde de carbone, la teneur en carbone inorganique dissous et l'alcalinité sont reliés entre eux (Vik *et al.*, 1996). La présence de biofilm (White *et al.*, 1992 ; Geldreich, 1996), notamment de bactéries sulfatoréductrices (Tatnall, 1990) peut induire une corrosion appelée alors biocorrosion.

La formation de films de produits oxydés en surface des tuyaux tend à inhiber la corrosion. Ces composés tels que les oxydes, les hydroxydes, les carbonates vont adhérer aux surfaces des tuyaux et ainsi les protéger par un effet de passivation (Kirmeyer et Logsdon, 1983 ; Snoeyink et Wagner, 1996). Cependant, l'efficacité de la passivation est variable suivant les composés formés. Les composés de types $\text{Fe}(\text{OH})_2$ et $\text{Fe}(\text{OH})_3$ forment des revêtements poreux qui peuvent ne pas inhiber la corrosion (Kirmeyer et Logsdon, 1983). Par ailleurs, tous les produits métalliques issus de la corrosion et formés à l'anode ont des constantes de solubilité différentes. Ainsi, certains complexes formés par le plomb peuvent être solubles tels que la cérusite (PbCO_3 , $\text{pK}_s \approx 7$), d'autres moins solubles tels que l'hydroxycérusite ($\text{Pb}_3(\text{CO}_3)_2(\text{OH})_2$, $\text{pK}_s \approx -18$).

Différents produits phosphatés (acide orthophosphorique, orthophosphate de zinc, polyphosphate de sodium, etc) et silicatés sont utilisés pour la lutte contre la corrosion du fer et contre la corrosion du plomb (Legrand et Leroy, 1995 ; Vik *et al.*, 1996). L'utilisation des produits à base de phosphates engendre la formation de complexes tels que l'hydroxypyromorphite ($\text{Pb}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$) dont la solubilité est très limitée ($\text{pK}_s \approx -63$ pour l'hydroxypyromorphite) (Schock *et al.*, 1996). Ces complexes peuvent former un dépôt en surface des canalisations. La diminution des échanges entre l'eau et le métal limite alors la corrosion. Cependant, la formation d'un dépôt protecteur n'est pas systématique et dépend de la qualité des eaux, de la nature des dépôts de corrosion et de la nature des canalisations (Legrand et Leroy, 1995). Abernathy et Camper (1998) et Appenzeller *et al.* (2001) suggèrent que le maintien et la formation de ces dépôts protecteurs dépendent de l'équilibre entre le solide formé en surface des tuyaux et les composés en solution dans l'eau.

Tableau II.2: Paramètres chimiques influençant la corrosion (Vik et al., 1996).

Facteurs	Effets
pH	Un pH bas peut augmenter la corrosion, tandis qu'un pH élevé peut limiter la corrosion ou engendrer la libération de zinc ou de dépôts de cuivre.
Alcalinité et carbone inorganique dissous	Peuvent faciliter la formation de film protecteur, aident à contrôler les changements de pH. Une alcalinité faible à moyenne aide à réduire la corrosion de la plupart des matériaux. Les alcalinités élevées augmentent la corrosion du cuivre, du plomb et du zinc.
Oxygène dissous	Accélère la cinétique de nombreuses réactions de corrosion
Solide dissous totaux	Une forte teneur en solide dissous totaux tend à augmenter la conductivité et le taux de corrosion.
La dureté calcique	Le calcium peut précipiter sous forme de CaCO_3 et fournir une protection et une réduction des taux de corrosion, mais peut causer une turbidité ou de l'entartrage.
Chlorure, sulfate	De fortes teneurs augmentent le taux de corrosion du fer, du cuivre, et de l'acier galvanisé
Sulfure d'hydrogène	Augmente les taux de corrosion
Ammoniaque	Peut augmenter la solubilité de quelques métaux notamment le cuivre et le plomb
Polyphosphates	Peuvent réduire la formation de tubercules de fer et d'acier et fournir des canalisations aux parois lisses. Peuvent augmenter les taux de corrosion du fer et de l'acier à faible concentration. Peuvent détériorer les enduits en ciment et les tuyaux en amiante-ciment. Augmentent la solubilité du plomb et du cuivre. Empêchent la formation de CaCO_3 et sa précipitation. Séquestrants pour le fer ferreux, ils limitent l'apparition d'eaux rouges. Peuvent s'hydrolyser en orthophosphates et former des films protecteurs.
Orthophosphates	Peuvent former des films protecteurs
Silicates	Séquestrent les ions métalliques et forment des films protecteurs. Les solutions de silicates augmentent le pH et l'alcalinité.
Couleur naturelle, matière organique	Peuvent diminuer la corrosion en formant un film à la surface des tuyaux. Certains composés organiques peuvent se complexer aux métaux et accélérer le processus de corrosion ou la libération de métaux.
Fer ou Manganèse	Peuvent former un film protecteur dans les tuyaux en amiante-ciment. Peuvent précipiter dans les conduites métalliques, provoquant soit un film protecteur soit des points de corrosion dans le cuivre.
Zinc	Peut former un film protecteur dans les tuyaux notamment en amiante-ciment. Peut précipiter à la cathode et former un dépôt protecteur.
Cuivre	Engendre des points de corrosion dans les tuyaux galvanisés
Magnésium (et possiblement d'autres métaux traces)	Peuvent inhiber la précipitation sous forme de calcite du CaCO_3 et favoriser la forme plus soluble du CaCO_3 , l'aragonite

II.1.2.4 Produits à base de phosphates limitant la corrosion

Les traitements anticorrosion qui peuvent être appliqués dans les réseaux de distribution sont limités (i) à ceux n'ayant pas d'incidence sur la santé humaine et (ii) par le coût des produits (Jones, 1996). Plusieurs traitements existent : l'application d'enduits protecteurs (résine époxy, ciment...), ajustement du pH et de l'alcalinité afin de favoriser les dépôts carbonatés ou encore l'utilisation d'inhibiteurs chimiques notamment les phosphates et silicates (Jones, 1996 ; Cordonnier, 1997).

Quel que soit l'inhibiteur de corrosion utilisé, leur mode d'action repose sur le même principe (Jones, 1996). Un anion inorganique se fixe ioniquement à la surface et forme une barrière aux réactions de corrosion (Jones, 1996), suivant un mécanisme dit de passivation. Cependant, du fait de la complexité des mécanismes considérés, il n'existe pas de théorie générale permettant de prédire les performances des composés chimiques, (Jones, 1996). Certains inhibiteurs sont anodiques, notamment les orthophosphates et les silicates, c'est-à-dire qu'ils limitent la réaction de dissolution à l'anode (Jones, 1996). D'autres inhibiteurs sont cathodiques notamment l'ion calcium et les polyphosphates, c'est-à-dire qu'ils précipitent à la cathode limitant principalement la réduction de l'oxygène (Jones, 1996 ; Boffardi, 1993).

Les orthophosphates et les polyphosphates sont les produits les plus utilisés, parfois en association avec le zinc (Cordonnier, 1997). La teneur maximale admissible en phosphate est réglementée suivant les pays. En France, celle-ci est de $5 \text{ mg P}_2\text{O}_5 \text{ L}^{-1}$ (Décret 89-3 du 3 janvier 1989 modifié par les décrets 90-330 du 10 avril 1990, 91-257 du 7 mars 1991 et 95-363 du 5 avril 1995), de même qu'en Allemagne (Vik *et al.*, 1996). Il n'existe pas de standard dans le choix des phosphates ni de la concentration à appliquer (Geldreich, 1996). Le choix des produits chimiques utilisés sera différent suivant les objectifs, la qualité de l'eau (pH, de teneur en calcium notamment) (Vik *et al.*, 1996) et le matériau des canalisations (Geldreich, 1996). Par exemple, Boffardi (1993) reporte que les polyphosphates permettent le contrôle de la corrosion de l'acier avec un pH optimal entre 6,6 et 7,8. Or en eau stagnante, dans la plupart des cas étudiés par McNeill et Edwards (2000), les inhibiteurs à base de phosphates (orthophosphates et polyphosphates) sont inefficaces voire même néfastes, engendrant parfois une augmentation de la dissolution du fer. Dans le cas de la corrosion du plomb et du cuivre, Snoeyink *et al.* (1996) indiquent également que les polyphosphates peuvent éventuellement engendrer une accélération des processus ; Wagner (1994) observe que l'application de phosphates ne permet pas d'atteindre une limite de $10 \mu\text{g Pb L}^{-1}$.

En conséquence, afin de s'assurer de l'efficacité du traitement, Geldreich (1996) recommande d'effectuer un contrôle en installant des coupons de matériau témoin.

II.1.2.4.a Les orthophosphates

Les orthophosphates sont des inhibiteurs anodiques faibles (Kjell Corporation), efficaces lorsque le pH est légèrement alcalin (Vik *et al.*, 1996). Les orthophosphates permettent de limiter la dissolution du plomb (Boireau *et al.*, 1997 ; Cordonnier, 1997), en formant un dépôt protecteur (Snoyink *et al.*, 1996). La quantité de phosphates ajoutée afin d’obtenir un effet optimal est variable suivant le produit à base de phosphates utilisé. Initialement, lors des premières semaines de mise en place d’un traitement pour limiter la corrosion, la concentration en phosphate appliquée est plus élevée que celle appliquée par la suite, en traitement routinier. Cette pré-phosphatation plus élevée permet le maintien d’une concentration en phosphates dans l’ensemble du réseau pour permettre la formation de la couche de passivation malgré le fait que la demande des parois est alors plus élevée (Boffardi, 1993).

Lorsque des orthophosphates de zinc sont utilisés, la concentration en zinc doit être limitée du fait des normes législatives (0,5 mg Zn L⁻¹ aux Etats-Unis (Geldreich, 1996); 5mg L⁻¹ en France (décret 89-3)).

II.1.2.4.b Les polyphosphates

Les polyphosphates utilisés comme inhibiteurs de corrosion (Figure II.5) sont en général constitués de chaînes d’orthophosphates de 10 à 16 résidus (Vik *et al.*, 1996). Ils sont en général appliqués à des doses de 1 à 5 mg P₂O₅ L⁻¹ (Boffardi, 1991 et 1993 ; Geldreich, 1996), et une purge des canalisations précède en général la phosphatation afin d’arracher les dépôts de corrosion qui peuvent l’être (Geldreich, 1996).

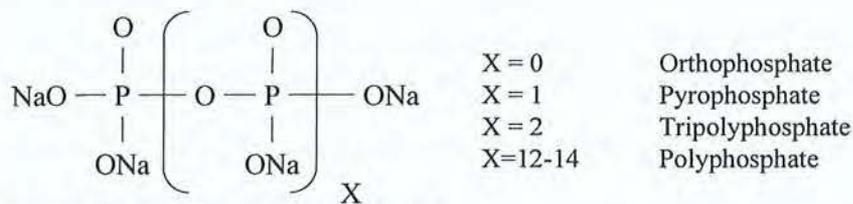


Figure II.5 : Formule développée des polyphosphates

Les polyphosphates inhibent la corrosion tant sous forme de polyphosphates (Boffardi, 1991) que, suite à leur hydrolyse, sous forme d’orthophosphates. Leur hydrolyse en orthophosphates est observée soit à température élevée (vers 60-80°C) ou dans des eaux ayant des temps de séjour élevés (Vik *et al.*, 1996 ; Cordonnier, 1997). Les polyphosphates limitent également le dépôt de carbonate de calcium et donc l’entartrage (Cordonnier, 1997). Enfin, les polyphosphates limitent les phénomènes d’eaux rouges (Cordonnier, 1997), par leur action séquestrante envers les ions Fe et Mn dissous (Vik *et al.*, 1996 ; Cordonnier, 1997).

Pour former une couche protectrice, les polyphosphates doivent être associés à des ions calcium dans un ratio massique minimal Ca : P₂O₅ de 1 : 5 (Boffardi, 1991 ; Boffardi, 1993 ; Vik

et al., 1996). La présence nécessaire des ions calcium suggère qu'il y a formation d'un complexe chargé au niveau de la cathode que Boffardi (1993) décrit comme un dépôt amorphe de polymères de phosphates.

II.1.2.4.c Les mélanges orthophosphates-polyphosphates

L'utilisation combinée des orthophosphates et des polyphosphates met à profit leurs propriétés complémentaires, les uns agissant à l'anode en formant un dépôt protecteur (orthophosphates) et les autres agissant à la cathode (polyphosphates) en séquestrant des ions (Boffardi, 1991 ; Vik *et al.*, 1996).

Les mélanges polyphosphates-orthophosphates utilisés comme inhibiteur de corrosion peuvent contenir de 5 à 40% des phosphates totaux sous forme d'orthophosphates (Vik *et al.*, 1996). Plus le mélange contient d'orthophosphates, plus la formation d'un dépôt protecteur est favorisée et plus l'action séquestrante est limitée (Vik *et al.*, 1996). L'utilisation de ce type de mélange est très délicate. Vik *et al.* (1996) suggèrent que, dans les eaux de dureté moyenne, les mélanges ortho-polyphosphates sont relativement efficaces pour limiter la corrosion du plomb et du cuivre. Cependant, les auteurs soulignent également que les polyphosphates peuvent augmenter les teneurs en plomb dans l'eau, par complexation. Par ailleurs, l'application d'un mélange d'orthophosphates et de polyphosphates, où les orthophosphates sont dans des proportions trop faibles, peut aggraver la corrosion localement, au niveau des sites anodiques conduisant à une corrosion excessive de type « pitting » (Vik *et al.*, 1996 ; Jones, 1996).

II.1.3 Phosphates et physiologie bactérienne

Une bactérie dont la composition élémentaire est estimée par la formule molaire $C_5H_7O_2NP_{0,03}$ contient de l'ordre de 1% (m/m) de phosphore (Pelmont, 1993). Celui-ci, sous la forme de phosphates, entre dans la composition de nombreuses molécules biologiques :

- les phospholipides, des constituants essentiels de la membrane cytoplasmique qui délimite le cytoplasme.
- l'ADN et l'ARN, molécules polymériques qui permettent le stockage des informations génétiques (ADN) jusqu'à ce que la cellule ait besoin de les exprimer (au moyen des trois types d'ARN, les ARNm messagers, les ARNt de transfert et les ARNr ribosomaux).
- l'ATP, source d'énergie pour la plupart des réactions biochimiques
- les polyphosphates...

Les phosphates vont également permettre d'empêcher la sortie de molécules telles que les sucres, par un mécanisme de phosphorylation dès leur incorporation (Pelmont, 1993).

Les phosphates ont donc un rôle primordial pour les bactéries, tant fonctionnel que constitutionnel. En conséquence, la survie de la cellule bactérienne dépend de la disponibilité des phosphates, ce qui se traduit par le maintien d'une concentration intracellulaire relativement élevé comparativement au milieu extérieur, de l'ordre de 10mM (9-13mM) en situation d'excès de phosphates chez *Escherichia coli* jusqu'à 7mM en situation de carence (Rao *et al.*, 1994 ; Wanner, 1994). Ce maintien de la concentration cytosolique est rendu possible par des mécanismes de transport sophistiqués qui régulent l'entrée des phosphates.

II.1.3.1 Les mécanismes de chemotaxie et motilité chez la bactéries pour la rencontre des phosphates de l'environnement

La chemotaxie est un phénomène connu depuis longtemps (Adler, 1976) au sujet duquel une revue de littérature a été récemment publiée (Armitage, 1999). La chemotaxie est une réponse locomotrice à un stimulus constitué par le gradient de concentration d'une substance chimique (Atlas et Bartha, 1993 ; Armitage 1999). Le mouvement du microorganisme peut par exemple être induit par la rotation des flagelles (Berg et Anderson, 1973). Par son mouvement, le microorganisme motile tend à s'approcher ou à s'éloigner du stimulus suivant ce qui lui est favorable (Atlas et Bartha, 1993 ; Armitage, 1999).

Dans les environnements limités en nutriments, Armitage (1992) suggère que les bactéries motiles sont avantagées. En effet, grâce à la chemotaxie, elles sont capables de « nager » (« swimming » en anglais) vers des conditions plus favorables, malgré les forces browniennes et la courbure de la trajectoire imposée par la rotation du flagelle (Armitage, 1999). Dépendamment des besoins de la bactérie, c'est-à-dire suivant l'espèce ou l'état physiologique de la cellule, une direction favorable peut changer et changer le sens de la chemotaxie (Armitage, 1999).

La chemotaxie envers les phosphates est un phénomène dont l'étude est récente (Armitage, 1992 ; Kato *et al.*, 1992 et 1994 ; et Wu *et al.* 2000). Les cellules de *Pseudomonas aeruginosa* en situation de carence en phosphates vont induire la synthèse d'un récepteur chimique leur permettant de se diriger vers la source de phosphates (Wu *et al.*, 2000). Ce récepteur appelé CtpL (Chemotactic transducer for inorganic phosphate low) est produit, lorsqu'il y a une carence en phosphate inorganique (concentration inférieure à 0,01mM soit 0,31 mg P-PO₄L⁻¹). Son fonctionnement dépend des protéines PhoB et PhoU, dont l'expression dans la cellule est également contrôlée par la carence en phosphate (Wu *et al.*, 2000).

Les bactéries peuvent par ailleurs exprimer une chemotaxie envers les phosphates lorsqu'il n'y a pas de carence, suivant les besoins immédiats de la cellule (Kato *et al.*, 1992 ;

Wu *et al.*, 2000). Le récepteur CtpH (Chemotactic transducer for inorganic phosphate high) est constitutif et il est nécessaire pour la chemotaxie lorsque la concentration est élevée en phosphate (au-delà 5 mM soit 155 mg P L⁻¹).

Les récepteurs CtpL et CtpH, récemment isolés par Wu *et al* (2000), sont localisés au niveau de la membrane cytoplasmique. Armitage (1999) précisent que des récepteurs cytoplasmiques (dans le cytoplasme) sont de plus en plus suspectés d'intervenir également dans les divers mécanismes de chemotaxie.

II.1.3.2 Transport des phosphates dans la cellule

Des mécanismes de transport spécialisés pour les phosphates ont été observés chez de nombreuses bactéries notamment *Escherichia coli*, *Acinetobacter johnsonii*, *Salmonella typhimurium*, *Bacillus subtilis* et *Streptococcus faecalis* (Rosenberg, 1987 ; Kadner *et al.*, 1994 ; Van Veen *et al.*, 1994 ; Webb et Cox, 1994 ; Yan et Maloney, 1994). Les systèmes présents chez *E. coli* et *A. johnsonii* sont les plus étudiés. Chez ces deux espèces bactériennes, l'entrée du phosphore dans la cellule fait participer des enzymes, divers systèmes de transport situés au niveau de la membrane cytoplasmique (Kadner *et al.*, 1994 ; Van Veen *et al.*, 1994 ; Webb et Cox, 1994 ; Yan et Maloney, 1994) et des porines de la membrane externe (Stock *et al.*, 1989) (Figure II.6).

II.1.3.2.a Hydrolyses des composés contenant des phosphates : exemple des polyphosphates

Les exoenzymes du groupe des exopolyphosphatases sont spécialisées dans l'hydrolyse de longues chaînes de polyphosphates de 500 à 1000 résidus d'orthophosphates. Ces chaînes sont hydrolysées par détachement des résidus orthophosphates jusqu'à obtenir des petites chaînes de 40 résidus. Puis, lorsque tous les polymères de phosphates ont été réduits en taille, les chaînes de 40 résidus sont alors réduites à des « chaînettes » de 4 résidus (Kornberg, 1994). Ces « chaînettes » peuvent passer dans le périplasma *via* les porines (Rosenbusch, 1994 ; Bauer *et al.*, 1988). Au niveau de la membrane cytoplasmique, seuls des phosphates mono- ou dibasique peuvent pénétrer dans la cellule (Van Veen *et al.*, 1994). Des enzymes périplasmiques telles que la phosphatase alcaline (PA) interviennent alors pour réduire les polyphosphates de faible degré de polymérisation ($n = 4$). La PA est une enzyme périplasmique dimère contenant du zinc (Reynolds et Schlesinger, 1969 ; Pelmont, 1993), qui nécessite la présence d'oxygène pour être active (Xu *et al.*, 1998). Cette enzyme active également la déphosphorylation les ester-phosphates et permet ainsi d'accéder aux phosphates organiques du milieu extérieur (Pelmont, 1993).

II.1.3.2.b Systèmes de transport membranaires

Lorsque les phosphates ne sont pas des nutriments limitants dans le milieu, *Escherichia coli* et *Acinetobacter johnsonii* utilisent un système présentant peu d'affinité pour le substrat « phosphate » : le système Pit (phosphate inorganic transport) (Figure II.6). Ce système transporte le phosphate sous forme d'un complexe avec un ion divalent (tel que Mg^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} ou Co^{2+}) et un proton (Van Veen *et al.*, 1994). La constante de Michaëlis-Menten (K_m) pour le complexe $MeHPO_4$ est de $7,9 \mu M$ et $8,8 \mu M$ respectivement chez *A. johnsonii* et *E. coli* (Van Veen *et al.*, 1994).

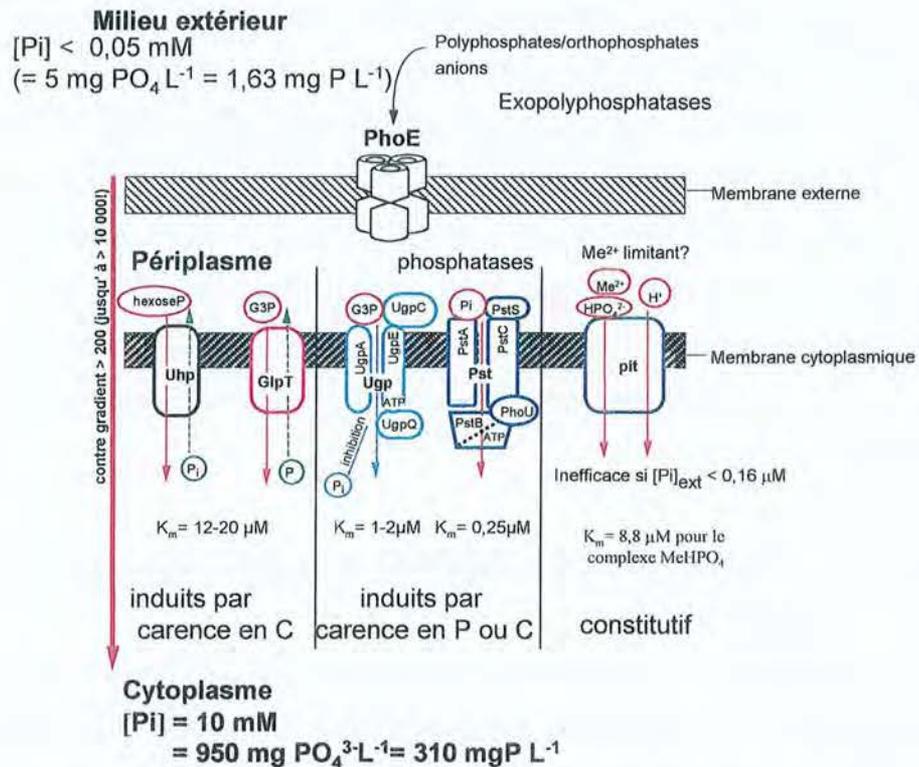


Figure II.6 : Les systèmes de transport du phosphate chez *Escherichia coli* (GlpT : glycerol phosphate transport ; Uhp : uptake of hexose phosphate ; Ugp : uptake of glycerol phosphate ; Pst : phosphate specific transport ; Pit : phosphate inorganic transport) (Adapté de Torriani-Gorini *et al.*, 1994).

Dès que la concentration en phosphate extracellulaire est limitante, la cellule met en place des systèmes de transport régulés génétiquement et codés par le régulon Pho. Ce régulon va engendrer les protéines permettant la mise en place de systèmes de transport : le Pst, l'Ugp et le GlpT. Rosenberg (1987) et Torriani-Gorini (1994) indiquent que la concentration limitante, au-dessous de laquelle la cellule induit le régulon Pho est de $0,16 \mu M$ ($= 4,96 \mu g P L^{-1}$), lorsque la cellule n'est plus capable d'utiliser le système Pit (Rosenberg, 1987 ; Torriani-Gorini, 1994). L'induction du régulon Pho ne nécessite pas de décroissance de la concentration intracellulaire en phosphate (Wanner, 1994), suggérant qu'elle est régulée par la concentration du milieu en

phosphates. Le régulon Pho peut être également induit par une carence en carbone (Wanner, 1994).

Les systèmes induits génétiquement par *Escherichia coli* ont une affinité forte vis-à-vis du phosphate (Rosenberg, 1987 ; Torriani-Gorini, 1994). Le Pst (Phosphate specific transport) présente un Km de l'ordre 0,25 µM. L'Ugp (Uptake of glycerol phosphate) présente un Km de l'ordre 1-2 µM. Rosenberg (1987) observe par ailleurs que le système de transport GlpT (glycerol phosphate transport) conduit à des échanges de phosphates entre les réserves intracellulaires et les phosphates extracellulaires, ce qui engendre un échange de charge utile (Rosenberg, 1987).

II.1.3.3 Incorporation des phosphates dans la cellule bactérienne

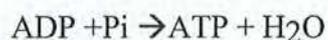
La cellule a besoin de phosphates dans la plupart de ses voies métaboliques, pour la formation de molécules énergétiques (ATP, ADP...) et la synthèse de biopolymères (ADN, ARN, phospholipides)... La cellule doit également maintenir une concentration intracellulaire en phosphates assez constante pour ne pas avoir de variations du pH intracellulaire ou de la pression osmotique (Kulaev, 1979) (Figure II.7).

II.1.3.3.a Phosphorylations

II.1.3.3.a.1 **Synthèse d'ATP par phosphorylation oxydative de l'ADP**

La cellule utilise principalement les phosphates pour former des molécules d'ATP. Différentes voies de synthèse existent mais la majeure partie des molécules d'ATP est synthétisée par la phosphorylation oxydative. La phosphorylation oxydative est le processus par lequel l'ATP est formé, lorsque les électrons sont transférés du NADH (nicotinamide adénine dinucléotide) ou du FADH₂ (flavine adénine dinucléotide) à O₂, par une série de transporteurs d'électrons (Stryer, 1992). Elle s'effectue au niveau des ATPases, enzymes de la membrane cytoplasmique. Ces enzymes utilisent la force protonmotrice générée par le flux entrant de protons et imposée par les oxydations (Pelmont, 1993). La synthèse d'une molécule d'ATP nécessite l'entrée de 3 à 4 protons (Pelmont, 1993).

La réaction catalysée par les ATPases est décrite par l'équation suivante :



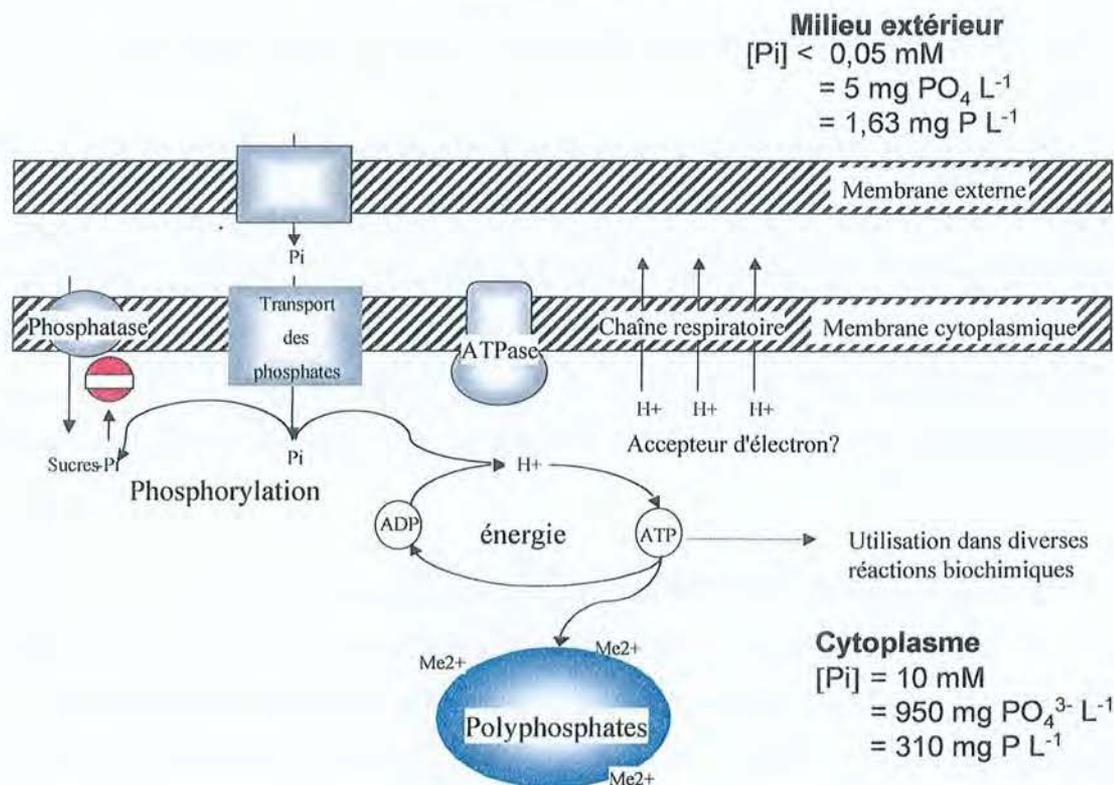


Figure II.7 : Utilisation des phosphates chez *E.coli* (Pi : phosphate inorganique ; ADP : adénosine diphosphate ; ATP : adénosine triphosphate ; Me^{2+} : ions divalents métalliques).

II.1.3.3.a.2 Phosphorylation des sucres par les systèmes de transport

Chez de nombreux microorganismes, le transport de substrats au travers de la membrane bactérienne est effectué sous forme de translocations de groupes (Gottschalk, 1986). Par ce type de transport particulier, le substrat une fois transporté se retrouve dans la cellule sous la forme chimiquement modifiée d'esters de phosphate (Gottschalk, 1986). Ce processus de phosphorylation est effectué par une enzyme phosphorylée (enzyme III) (Gottschalk, 1986). Cette enzyme phosphorylée est générée à partir du phosphoénolpyruvate (PEP) par une PEP-phosphotransférase (Gottschalk, 1986).

Ce mode de transport permet de contenir les substrats dans la cellule, de les rendre directement disponibles pour les réactions biochimiques de la cellule et d'économiser de l'ATP (Gottschalk, 1986 ; Kadner *et al.*, 1994). Il est principalement observé chez les bactéries anaérobies strictes ou facultatives, à l'exception de quelques bactéries aérobies obligatoires telles que *Bacillus subtilis* (Gottschalk, 1986). Chez *E. coli*, le glucose, le fructose, le mannose et le mannitol sont incorporés par translocation de groupes et chez *Staphylococcus aureus* le lactose et également d'autres disaccharides.

Deux systèmes principaux sont ainsi répertoriés chez *E. coli* : l'Uhp (uptake of hexose phosphates) et le GlpT (glycerol phosphatate transport) encore appelé l'Ugp (uptake of glycerol phosphates).

Le Uhp permet l'incorporer des sucres contenant de 3 jusqu'à 7 carbones ainsi que des sucres ayant des fonctions alcool ou amine (Kadner *et al.*, 1987). Ce système membranaire est un antiport, échangeant les sucres phosphorylés contre des orthophosphates (Kadner *et al.*, 1987).

Le GltT (ou Ugp) est un système de translocation de groupe de forme antiport qui échange du glycérol-3-phosphate (G3P) contre un phosphate. Ce système permet ainsi de limiter l'accumulation excessive de phosphates, lors de l'utilisation du G3P comme seule source de carbone (Brzoska *et al.*, 1987 et 1994).

II.1.3.3.b Réserves de polyphosphates

Les polyphosphates sont des chaînes d'orthophosphates formées par les cellules afin de faire des réserves de phosphates. L'accumulation de polyphosphates est observée chez de nombreux microorganismes lorsque les conditions sont défavorables (pH bas, anaérobiose, carence en soufre (Harold, 1966), suite à une carence en phosphate inorganique (Harold, 1966 ; Ohtake *et al.*, 1985). Lors de la carence en phosphates, les enzymes augmentent leur activité du fait de la dérégulation de leur synthèse et non pas par activation d'enzymes préexistantes (Kulaev, 1979). L'accumulation de polyphosphates précède la synthèse rapide de biomasse et nécessite une étape préalable d'accumulation d'orthophosphates intracellulaires (Kulaev, 1979). Les polyphosphates ne sont pas présents chez *E. coli* en phase stationnaire, mais ils sont détectés lors des premières étapes de la phase de croissance exponentielle de la culture (Kulaev, 1979).

En présence de glucose, la phosphorylation glycolytique de la glycolyse est la principale voie de biosynthèse de polyphosphates, cependant la formation des polyphosphates peut également avoir lieu grâce à l'oxydation de composés inorganiques et occasionnellement par l'utilisation d'autres substrats d'oxydation biologique tels que le fructose et autres composants du cycle de Krebs (Kulaev, 1979).

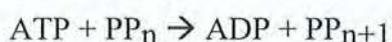
Les polyphosphates peuvent être localisés dans le cytoplasme et également au niveau de la membrane cytoplasmique (Kulaev, 1994 et 1999).

Dans le cytoplasme, ils servent de source d'énergie (l'hydrolyse de la liaison P-O-P libère 32 kJ mol^{-1}), de réserve de phosphates sans effet sur la pression osmotique, de chélateur pour de nombreux ions divalents, de tampon contre le stress alcalin, de régulateur de transcription, de régulateur de l'induction génétique par contrôle de l'ARN polymérase (Kulaev, 1979, 1994 et 1999 ; Kornberg, 1994 ; Rao et Kornberg, 1996 ; Shiba *et al.*, 1997 ; Kornberg et Fraley, 2000 ; Rashid *et al.*, 2000a et b). Ils interviennent également dans l'induction du régulon *rpoS*, dans la communication intercellulaire (le quorum sensing), dans le développement architectural du

biofilm et dans la motilité bactérienne (Kornberg, 1994 ; Rao et Kornberg, 1996 ; Shiba *et al.*, 1997 ; Kornberg et Fraley, 2000 ; Rashid *et al.*, 2000a et b).

Au niveau de la membrane cytoplasmique, les polyphosphates interviennent dans la charge négative de la cellule (Kulaev et Kulakovskaya, 2000) et par ailleurs, ils forment des complexes avec des molécules de poly- β -hydroxybutyrate et des ions calciums. Ces complexes qui forment des pores voltage-dépendant dans la membrane, sont suspectés de permettre l'entrée de molécule d'ADN dans la cellule (Kulaev, 1994 ; Kulaev et Kulakovskaya, 2000).

L'utilisation des polyphosphates notamment comme source d'énergie nécessite leur dégradation (Wood et Clark, 1988 ; Hardoyo *et al.*, 1994 ; Kornberg, 1994). Dans certains cas, chez *E. coli*, la dégradation des polyphosphates est également réalisée pour effectuer un relargage dans le milieu : lorsque la bactérie a accumulé des polyphosphates, elle ne cesse pas d'emmagasiner des orthophosphates mais, en parallèle, elle en libère dans le milieu (Hardoyo *et al.*, 1994 ; Kato *et al.*, 1994). Cette dégradation est catalysée par des polyphosphatases et par des kinases spécifiques (ex : polyPglucokinase ; polyPfructokinase) (Wood et Clark, 1988 ; Hardoyo *et al.*, 1994 ; Kornberg, 1994). Notamment la polyphosphate kinase (PPK) catalyse de façon réversible la synthèse de polyphosphates à partir du groupement phosphate terminal de l'ATP (Kulaev, 1979). Les K_m sont respectivement de 47 μM , 26 μM et 1,4 μM pour l'ADP, les polyphosphates et l'ATP. Lorsque la concentration en ATP est très basse, la PPK catalyse la formation d'ATP (Kulaev, 1979), en inversant la réaction :



Les K_m sont respectivement de 47 μM , 26 μM et 1,4 μM pour l'ADP les polyphosphates et l'ATP (Kulaev, 1979).

II.1.4 Phosphates et croissance/activité bactérienne

II.1.4.1 Effets *in vitro* des molécules contenant des phosphates sur la croissance des bactéries

Les molécules présentes dans l'environnement de la bactérie et contenant des phosphates ont des effets antagonistes sur la physiologie bactérienne, pouvant augmenter l'activité enzymatique de la cellule (van Ommen Kloeke et Geesey, 1999) ou limiter l'activité des bactéries et la formation des biofilms (Somers *et al.*, 1994 ; Korber *et al.*, 1997 ; Varelziz *et al.*, 1997 ; Maier *et al.*, 1999).

Chez les *Enterobacteriaceae*, les molécules organiques contenant des phosphates (les nucléosides 3'- et 5' monophosphate, les nucléosides di et tri-phosphates, les hexoses-phosphates, les pentoses-phosphates, les α et β glycerol-phosphates, le α -naphthyl phosphate) et même le pyrophosphate favorisent l'activité des enzymes phosphatases acides non spécifiques (dite de classe A). (van Ommen Kloeke et Geesey, 1999). La présence dans le milieu d'orthophosphates à 100mM (3 100 mg P/L) inhibe faiblement l'activité des phosphatases acides des *Enterobacteriaceae* (Ommen Kloeke et Geesey, 1999).

En contre partie, les polyphosphates, les tripolyphosphates de sodium, et les phosphates trisodique (PTS) sont reportés dans la littérature comme ayant un effet inhibiteur sur la croissance des bactéries et sur le développement des biofilms (Somers *et al.*, 1994 ; Korber *et al.*, 1997 ; Vareltzis *et al.*, 1997 ; Maier *et al.*, 1999).

Les PTS sont utilisés dans l'industrie agroalimentaire et permettent de limiter la formation du biofilm bactérien sur les aliments (Somers *et al.*, 1994). Le processus par lequel les TSP agissent pour limiter la croissance est mal connu, cependant, les propriétés complexantes des phosphates sont suspectées. Korber *et al.* (1997) ont montré par marquage au BacLight™ que les PTS inactivent la totalité d'un biofilm de *Salmonella typhimurium* dans un biofilm de 48h, et inactivent plus de 98% des cellules dans un biofilm de 72 heures.

Vareltzis *et al.* (1997) ont observé que les tripolyphosphates de sodium inhibent le développement de biofilms bactériens sur des carcasses de poulet.

Maier *et al.* (1999) ont mis en évidence que les polyphosphates présents dans l'environnement *Bacillus cereus* engendrent une lyse cellulaire et également limitent le développement des septa lors de la multiplication cellulaire, conduisant à la formation de filaments. Maier *et al.* (1999) observent par ailleurs que l'ajout de cations divalents rétablit la formation des septa en 30 minutes, suggérant que l'action séquestrante des polyphosphates sur les cations intervient dans le phénomène observé.

II.1.4.2 Inhibiteurs de corrosion à base de phosphates et croissance bactérienne

Dans les réseaux de distribution en France, l'application de phosphates jusqu'à 5 mg P₂O₅ L⁻¹ sous forme d'ortho- ou poly-phosphates peut être effectuée, afin de limiter les phénomènes de corrosion (Geldreich, 1996 ; Lytle *et al.*, 1996 ; Boireau *et al.*, 1997 ; Cordonnier, 1997 ; Volk *et al.*, 1998). Plusieurs études montrent une augmentation du nombre de bactéries cultivables par ajout de phosphates, les densités en bactéries libres cultivables augmentant de près de 4 fois soit de 0,6 log (Lyons *et al.*, 1995 ; Miettinen *et al.*, 1997 ; Sathasivan *et al.*, 1997 et 1998 ; Sathasivan et Ohgaki, 1999). Cependant, l'interprétation de ces résultats est subjective puisque certains auteurs considèrent que les eaux étudiées sont limitantes

en phosphates et favorisent la cultivabilité voire la croissance bactérienne (Miettinen *et al.*, 1997 ; Sathasivan *et al.*, 1997 et 1998 ; Sathasivan et Ohgaki, 1999), tandis que d'autres considèrent que l'augmentation de la cultivabilité est insignifiante car les densités bactériennes restent inférieure aux normes de potabilité (Lyons *et al.*, 1998 ; Figure II.8). De plus, l'absence de mesure de la population globale pour la plupart des résultats (Lyons *et al.*, 1995 ; Miettinen *et al.*, 1997 et en partie dans les résultats de Sathasivan *et al.* (1997)) ne permet pas de déterminer s'il y a eu une croissance bactérienne véritable ou seulement une augmentation de la cultivabilité. Enfin, dans le cas de Lyons *et al.* (1995), les résultats étant obtenus en réseau, l'action du traitement anticorrosion sur la corrosion peut avoir provoqué un décrochage de biofilm et de tubercules de corrosion, conduisant à une augmentation indirecte des densités suspendues. Geldreich (1996) suggère notamment qu'une variation brusque du pH, suite à un traitement anticorrosion, peut entraîner ce type de décrochage.

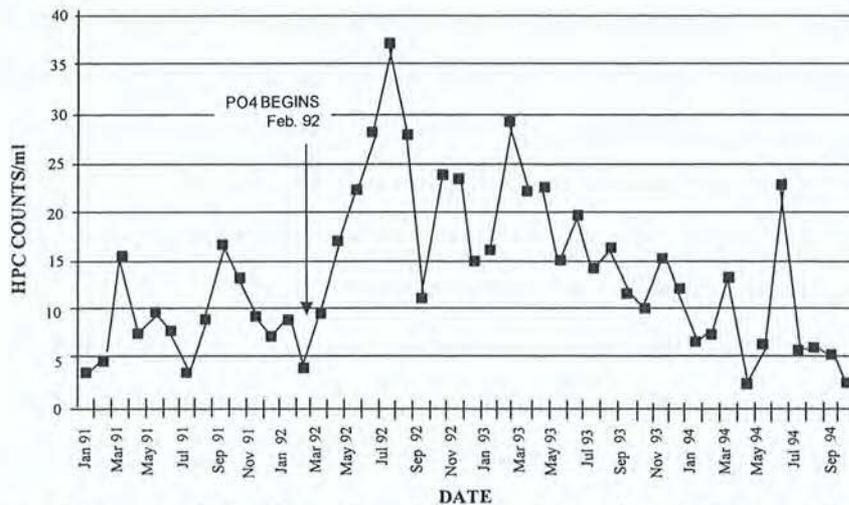


Figure II.8 : Suivi des densités de bactéries cultivables suite à l'ajout d'orthophosphate (Lyons, 1995)

D'autres auteurs ont noté que l'ajout de phosphates ne favorisait pas la croissance bactérienne en réseau voire même limitait indirectement les densités totales de bactéries dans les biofilms, en agissant sur la corrosion (Smith *et al.*, 1989 ; LeChevallier *et al.*, 1993 ; LeChevallier, 1997 ; Abernathy et Camper, 1998 ; Rompré *et al.*, 2000 ; Charlton, 1999). LeChevallier *et al.* (1993) observent que l'application de polyphosphates dans un système corrodé, désinfecté à la monochloramine, entraîne une diminution de 2 log des densités de bactéries cultivables dans le biofilm. Abernathy et Camper (1998) observent également une diminution de plus 0,5 log des bactéries cultivables par application de polyphosphates en présence de monochloramine. Cependant, à l'inverse, en présence de chlore, les polyphosphates engendrent des comptes de bactéries cultivables plus importants. La quantité de dépôt de corrosion est prépondérante pour déterminer le nombre de bactéries cultivables par unité de surface

(Abernathy et Camper, 1998 ; Rompré *et al.*, 1999). Plus un traitement limite la quantité de dépôts de corrosion et moins il y a de bactéries, du fait de la limitation des surfaces disponibles pour la colonisation bactérienne.

Abernathy et Camper (1998) suggèrent que la passivation des conduites contenant du fer par les phosphates entraîne la formation de FePO_4 , dont le point de charge nulle (PCN) est dans la gamme de celle des substances humiques et des bactéries (Figure II.9). Le traitement anti-corrosion à base de phosphates entraînerait une diminution des densités bactériennes, puisque la bactérie serait moins adsorbée sur la surface. . De plus, la passivation entraînerait une limitation de la fixation de substances humiques (Abernathy et Camper ; 1998) ce qui pourrait limiter la croissance des bactéries fixées.

À l'inverse, la goethite présentant une charge positive dans la plupart des eaux potables, elle favoriserait la fixation des bactéries par attraction électrostatique

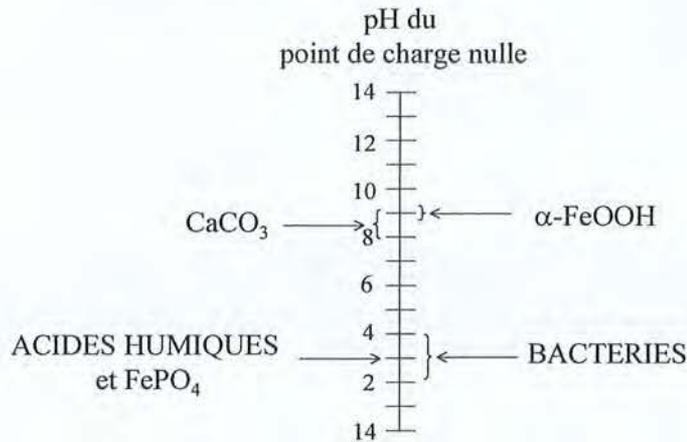


Figure II.9 : Estimation du point de charge nul de diverses substances (Abernathy et Camper, 1998)

Finalement, peu d'études reportent une croissance bactérienne dans les eaux potables suite à un ajout de phosphate en absence de corrosion (Sathasivan *et al.*, 1997 et 1998 ; Sathasivan et Ohgaki, 1999). Dans ces quelques cas, les tendances ont été observées au niveau des populations suspendues, en conditions de laboratoire. En présence de corrosion, la quantité de dépôts de corrosion influence la quantité de bactéries cultivables dans le biofilm par unité de surface. De plus, les phosphates modifiant la quantité de dépôts de corrosion, l'effet des phosphates sur la corrosion interfère avec l'effet des phosphates sur la croissance des cellules bactériennes

II.2 Le biofilm

Costerton *et al.* (1995) suggèrent que les bactéries en suspension permettraient la dissémination tandis que les bactéries fixées dans le biofilm permettrait la croissance de la population. Le biofilm peut être considéré comme un ensemble d'organismes organisés au sein

d'un glycocalyx formés d'exopolymères (Brown et Gilbert, 1993, Characklis et Marshall, 1990 ; Costerton *et al.*, 1995).

II.2.1 Processus de formation du biofilm

La formation d'un biofilm est décrite par Characklis et Marshall (1990) comme une accumulation de biomasse suivant une courbe sigmoïdale (Figure II.10).

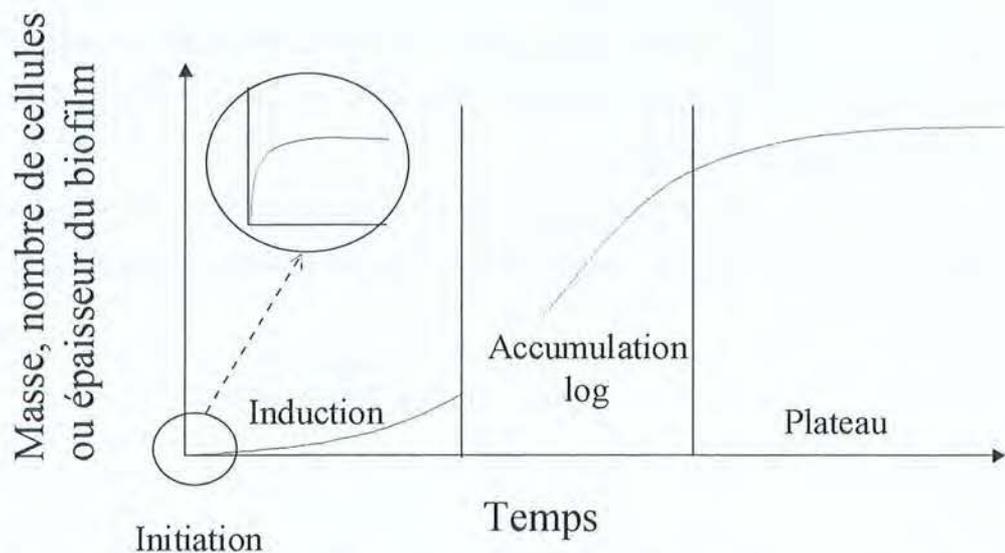


Figure II.10 : La progression de l'accumulation du biofilm sous forme d'une courbe sigmoïdale. La progression peut être divisée arbitrairement en 3 phases : (1) les événements initiaux (2) l'accumulation exponentielle ou logarithmique (3) un plateau ou un état pseudo-stationnaire. L'initiation représente l'accumulation initiale du film conditionnant, qui est essentiellement négligeable en terme d'épaisseur et de masse déposée (Characklis et Marshall, 1990).

Un biofilm se forme suite à un pré-conditionnement de la surface par une couche de composés organiques macromoléculaires tels que des polysaccharides, des glycoprotéines, des acides humiques, etc., qui s'adsorbent au support (Bryers et Characklis, 1982 ; Bryers, 1987 ; Characklis et Marshall, 1990 ; Mozes, 1995 ; Frolund *et al.*, 1996 ; Schneider, 1997 ; Leis *et al.*, 2000). La formation de ce dépôt par des particules de >0.01 à $0.1 \mu\text{m}$ est rapide (quelques minutes) car, par rapport à des particules plus grosses (bactéries), le transport des molécules et des petites particules est relativement rapide (Characklis et Marshall, 1990). Ce transport est engendré par l'action des mécanismes de sédimentation, de diffusion moléculaire et de diffusion turbulente (Characklis et Marshall, 1990). L'adsorption des petites particules est souvent reportée comme ayant lieu instantanément (Characklis et Marshall, 1990).

Divers processus permettent (i) la rencontre entre une surface et une bactérie puis (ii) la fixation de la cellule à la surface : la sédimentation, les forces hydrodynamiques et les mouvements browniens ainsi que la chemotaxie et l'hydrophobicité de la surface cellulaire, (Marshall, 1985).

La fixation de la cellule à la surface a lieu suivant plusieurs étapes :

- une sorption réversible (théorie DLVO d'après Marshall, 1985). Fixation réversible par les forces de van der Waals lorsque la distance est supérieure à 50 nm (Busscher et Weerkamp, 1987).
- une sorption irréversible (Marshall *et al.*, 1971). D'après Busscher et Weerkamp (1987) celle-ci intervient lorsque la distance est inférieure à 1,5 nm. Elle met en jeu une forte adhérence due à la production de fibrilles polymériques (Lappin-Scott et Costerton, 1989). Ces exopolymères peuvent être des protéines, des lipopolysaccharides, des appendices protéiques, des couches de polysaccharides complexes (appelées adhésines) (Byers, 1987). L'adhésion irréversible des micro-organismes se produit différemment suivant l'espèce bactérienne concernée, la phase de croissance des bactéries et le matériau composant la surface (McEldowney et Fletcher, 1986).
- Busscher et Weerkamp (1987) suggèrent également une transition entre fixation réversible et irréversible, où des interactions électrostatiques participeraient à la fixation et qui interviendrait lorsque la distance est de 10 à 20 nm de la paroi.

Lors du processus d'adhésion, les cellules bactériennes modifient leur phénotype en réponse à la proximité de la surface (Costerton *et al.*, 1995 ; Vandevivere et Kirchman, 1993 ; Prigent-Combaret *et al.*, 1999). Ces changements conduisent notamment à un doublement (Vandevivere et Kirchman ; 1993), voire un triplement chez *Pseudomonas aeruginosa* (Davies *et al.*, 1993), de la synthèse d'exopolymères et à des synthèses de nouvelles molécules (nouvelle porine et nouvel exopolymère) (Prigent-Combaret *et al.*, 1999). Plusieurs hypothèses ont été posées pour expliquer l'augmentation d'activité des bactéries suite au contact avec une paroi. Notamment, la disponibilité des nutriments piégés ou passant à proximité des bactéries et la protection vis-à-vis des bactéricides engendreraient des changements physiologiques induits génétiquement (Brown et Gilbert, 1993).

II.2.2 Développement structural du biofilm

II.2.2.1 Modèle architectural

L'étude de la morphologie des biofilms a pris un essor important grâce à la mise au point de la microscopie confocale et des sondes fluorescentes (Lawrence *et al.*, 1991, Neu et Lawrence, 1997). Ces méthodes conjuguées entre elles, permettent d'étudier, *in situ* et en temps réel, les modifications du biofilm sans destruction de la structure, ni atteinte de la viabilité (Costerton *et al.*, 1995).

Suite à la fixation des bactéries, le biofilm évolue vers un état de pseudo-équilibre avec le développement de microcolonies bactériennes, liées par un glycocalyx contenant des matériaux organiques et inorganiques, des produits microbiens et d'autres organismes (Costerton *et al.*, 1981 ; Lappin-Scott et Costerton, 1989). Des canaux et des pores font progressivement leur apparition dans la structure (Figure II.11) (Costerton *et al.*, 1995). Costerton *et al.* (1995) suggèrent que ce développement architectural du biofilm facilite l'apport de nutriments et d'oxygène et la sortie des déchets. Davies *et al.* (1998) observent que l'architecture du biofilm serait la cause de la plus grande résistance du biofilm à l'action du Sodium Dodécyl Sulfate (SDS).

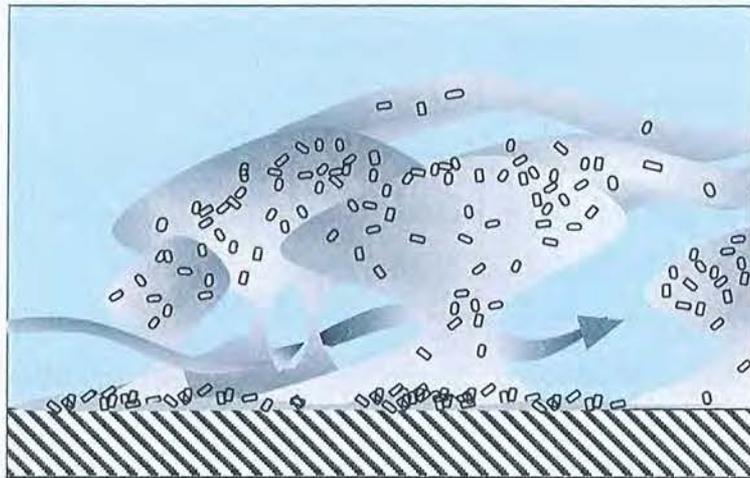


Figure II.11 : Modèle architectural d'un biofilm présentant les amas bactériens en forme de champignons, les filaments exopolymériques flottant dans le flux et les canaux permettant la circulation d'eau dans la structure (Costerton *et al.*, 1995).

Du fait de l'architecture du biofilm, la composition d'un biofilm en pseudo-équilibre n'est pas homogène, ni biologiquement (répartition des microorganismes), ni physico-chimiquement (répartitions des exopolymères, densité du biofilm) (Lawrence *et al.*, 1991, Neu et Lawrence, 1997 ; Zhang et Bishop, 1994). Zhang et Bishop (1994) ont observé que la porosité du biofilm (portion du biofilm occupée par de l'eau) est plus importante en surface du biofilm (84 à 93%) qu'en profondeur (58-67%). Les cellules bactériennes peuvent représenter de 2 à 27% du volume du biofilm (Lawrence *et al.*, 1991, Neu et Lawrence, 1997).

II.2.2.2 Le quorum sensing

Le développement architectural du biofilm dépend d'un mécanisme de communication intracellulaire, dénommé « quorum sensing » (Davies *et al.*, 1998 ; Stickler *et al.*, 1998). Le quorum sensing est un signal biochimique (auto-inducteur) produit par les bactéries (Greenberg, 1997 ; Bachofen et Schenk, 1998). Son induction génétique dépend de la densité bactérienne

(Greenberg, 1997 ; Bachofen et Schenk, 1998). Deux systèmes de quorum sensing sont bien connus actuellement; le système las et le système rhl, dont les auto-inducteurs produits sont respectivement la N-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone (3OC12-HSL) et la N-butyryl homoserine lactone (C₄-HSL) (de Kievit *et al.*, 2001). Le système las comprend un activateur de transcription (LasR) et une enzyme synthétisant l'auto-inducteur (la LasI). Le système rhl comprend un activateur de transcription (rhlR) et une enzyme synthétisant l'auto-inducteur (la rhlI) (de Kievit *et al.*, 2001). Les deux systèmes ne sont pas indépendants. LasR est nécessaire pour l'activation de *rhlR*. L'architecture du biofilm se développe lorsque le signal extracellulaire constituée par la 3OC12-HSL, autoinducteur du système las, est présent en quantité suffisante (Davies *et al.*, 1998). Davies *et al.* (1998) ont observé que chez *Pseudomonas aeruginosa*, le développement architectural du biofilm n'est pas engendré par une augmentation de la synthèse d'exopolysaccharides par les cellules fixées comparativement aux cellules libres. L'organisation tridimensionnelle des exopolysaccharides est différente entre cellules libres et fixées, les cellules libres présentant des exopolymères plus compactes (Brown *et al.*, 1995 ; Davies *et al.*, 1998).

Au cours de la formation du biofilm, tandis que l'expression de *lasI* décroît progressivement, l'expression de *rhlI* reste constante mais à faible concentration (de Kievit *et al.*, 2001). Par ailleurs, Whiteley *et al.* (2000) ont montré que le système de quorum sensing rhl est réprimé par le facteur sigma RpoS, lequel induit l'expression de plus 35 gènes lors de la mise en place de la phase stationnaire.

II.2.2.3 L'hydrodynamisme

De nombreux auteurs ont montré l'influence de divers facteurs tels que le taux d'oxygène (Suh *et al.*, 1990 cités par Rodriguez *et al.*, 1996 ; Schmitt *et al.*, 1995) ou la concentration en nutriments carbonés ou azotés (Suh *et al.*, 1990 cités par Rodriguez *et al.*, 1996 ; Schmitt *et al.*, 1995 ; Stoodley *et al.*, 1999 ; Percival *et al.*, 1999), sur la composition des biofilms. L'hydrodynamisme agit sur la plupart de ces paramètres puisqu'il détermine la cinétique de transfert des molécules entre la phase aqueuse et le biofilm, ainsi que les forces de cisaillement appliquées au biofilm (Characklis et Marshall, 1989).

II.2.2.3.a Définition

La proximité des parois engendre une diminution des vitesses dans la zone définie comme la couche limite (Lewandowski *et al.*, 1994) (Figure II.12). De fait, il existe deux couches limites : une couche hydrodynamique et une couche limite de diffusion conséquence de la première (Lewandowski *et al.*, 1994). La couche limite hydrodynamique dépend du nombre de Reynolds (Re) qui détermine les conditions laminaires ou turbulentes du flux d'eau (Characklis et Marshall, 1989).

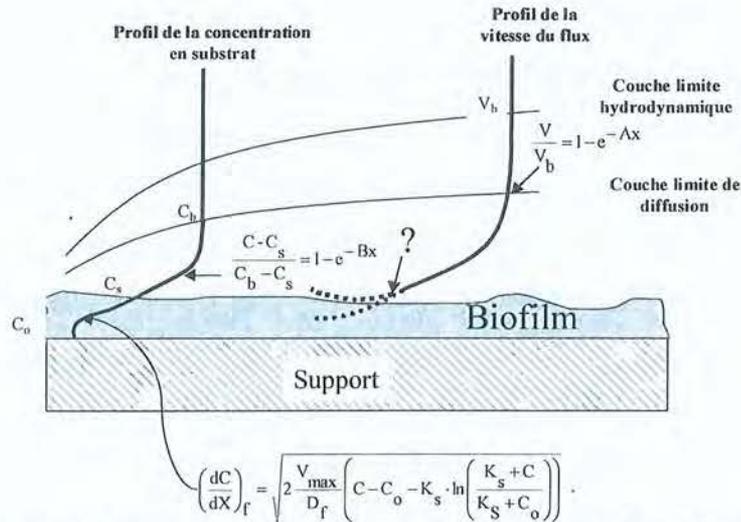


Figure II.12 : Phénomènes cinétiques et hydrodynamiques dans un biofilm. (C_b : concentration dans le flux circulant ; C : Concentration locale ; C_s : concentration en surface du biofilm ; C_o : concentration à la surface du support ; X : Distance depuis la surface du biofilm (Lewandowski *et al.* 1994).

À proximité des parois, là où le flot est minimal, la turbulence est absente et le transport des substrats est entièrement dû à la diffusion moléculaire (Lewandowski *et al.*, 1994). Sous la surface du biofilm, le profil des concentrations en substrats est influencé par la diffusivité moléculaire et par la consommation du substrat par la flore microbienne (Lewandowski *et al.*, 1994). La diffusivité dépend du coefficient de diffusion qui reflète le taux auquel une molécule diffuse dans un matériau en fonction d'un gradient de concentration (Characklis, 1990).

II.2.2.3.b Effets des paramètres influencés par l'hydrodynamisme sur le biofilm

Lorsque les conditions environnementales changent, les bactéries adaptent leur physiologie et le biofilm peut présenter des changements en terme d'espèces (Bryan *et al.*, 1986), de composition d'exopolymères (Schmitt *et al.*, 1995 ; Characklis et Marshall, 1989) et de quantité d'exopolymères synthétisés (Suh *et al.*, 1990 cités par Rodriguez *et al.*, 1996 ; Schmitt *et al.*, 1995). Ainsi, les flux de cations divalents et de nutriments, de même que le ratio C : N et la source de carbone sont influencés par l'hydrodynamisme et leurs changements engendrent une adaptation de la production d'exopolysaccharides par les bactéries (Chan *et al.*, 1984 ; Bryan *et al.*, 1986),.

II.2.2.3.c Détachement

L'adaptation des bactéries aux conditions environnementales (vitesse du flux, nutriments disponibles, nature et rugosité du support, âge du biofilm) se traduit par des modifications dans l'architecture et dans la répartition des densités de bactéries et d'exopolymères dans le biofilm (Characklis, 1981 ; Characklis et Marshall, 1989 ; Nielsen *et al.*, 1997 ; Percival *et al.*, 1999 ; Stoodley *et al.*, 1999).

L'adaptation architecturale du biofilm peut faire intervenir des modifications dans les synthèses, des augmentations des nombres de bactéries et/ou des phénomènes de détachement (Dott et Schoenen, 1985 ; Bryan et al., 1986 ; Suh *et al.*, 1990 cités par Rodriguez *et al.*, 1996 ; Stewart, 1993 ; Schmitt *et al.*, 1995 ; Sawyer et Hermanowicz, 1998 ; Stoodley *et al.*, 1999 ; Morgenroth et Wilderer, 2000). Les détachements sont de plusieurs types : l'abrasion et l'érosion de petites portions de biofilm, le « sloughing » (exfoliation, détachement de larges portions de biofilm) et la prédation (Stewart, 1993 ; Morgenroth et Wilderer, 2000 ; Dott et Schoenen, 1985 ; Suh *et al.*, 1990 cités par Rodriguez *et al.*, 1996 ; Schmitt *et al.*, 1995 ; Stoodley *et al.*, 1999).

II.2.3 Composition d'un biofilm

Lorsqu'un biofilm est établi, il est composé de microorganismes, d'une matrice d'exopolymères et de substances détritiques retenues dans cet ensemble (lipides, ions métalliques, tartre, substances organiques, minéraux, etc.).

II.2.3.1 Les exopolymères

Le dosage des exopolymères peut être rendu difficile par la présence de substances éventuellement interférantes (telles que les produits de corrosion). Aussi, les exopolymères ont été assez peu caractérisés au niveau des biofilms d'eau potable. Leur composition sera donc abordée ici à partir de données rapportées dans la littérature qui ne concernent pas exclusivement les eaux potables.

Les exopolymères sécrétés par les bactéries sont des molécules de poids moléculaire supérieur à 100 kDa (Decho et Lopez, 1993). Ils sont principalement formés de polysaccharides et glycoprotéines (Sutherland, 1977 ; Nielsen *et al.*, 1997). Ces polymères peuvent être sous forme d'homopolymères, et également atteindre une très grande complexité sous la forme d'hétéropolymères (Brown et Gilbert, 1993). Les polysaccharides prédominent parmi les composés polymériques extracellulaires (Nielsen *et al.*, 1997), représentant jusqu'à 65,8% du matériel extracellulaire (Horan et Eccles, 1986).

Des étapes préalables d'extraction et de digestion, essentielle à l'étude de la matrice, peuvent différer entre les auteurs et limiter la comparaison entre les études. La diversité des polymères, la présence de microorganismes et de matières détritiques rendent difficile l'étude des exopolymères.

II.2.3.1.a Les polysaccharides

Les polysaccharides sont des polymères (homo- ou hétéro-), linéaires ou ramifiés, localisés autour des acides téichoïques chez les bactéries Gram-positives ou autour des lipopolysaccharides chez les Gram-négatives (Figure II.13) (Leclerc *et al.*, 1995). Ils sont principalement formés d'hydrates de carbone qui peuvent avoir des substituants organiques ou inorganiques (Sutherland, 1990). Les substituants organiques répandus sont le pyruvate et l'acétate, parfois les acides aminés (Sutherland, 1990). Les phosphates sont des substituants inorganiques fréquents chez de nombreuses souches de *E. coli* (Sutherland, 1990). Cependant, de nombreuses bactéries Gram-négatives, notamment *Klebsiella*, *Xanthomonas* et *Pseudomonas* n'en contiennent pas dans leurs polysaccharides (Sutherland, 1990).

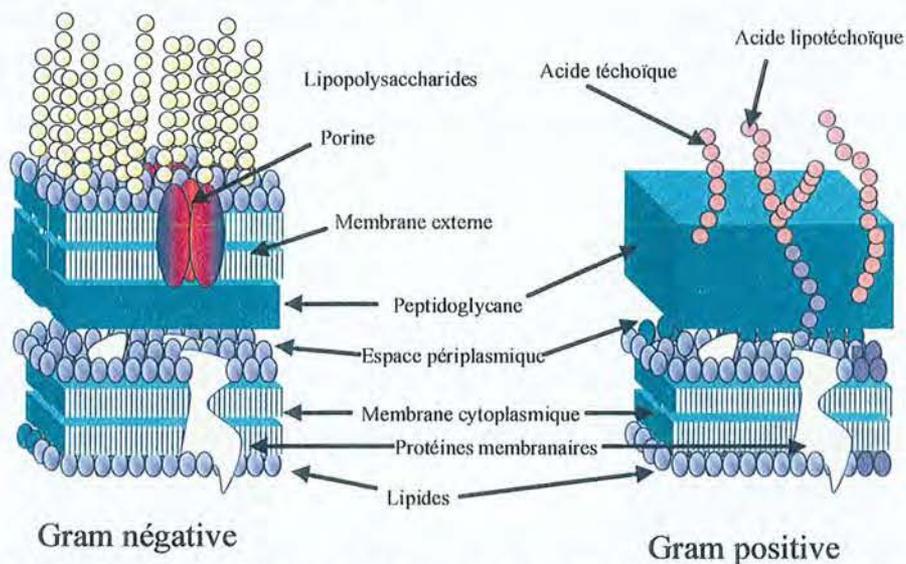


Figure II.13 : Composition des enveloppes des bactéries Gram-positives et Gram-négatives (Maier, 2000)

Les saccharides sont formés par la glucogénèse, voie de synthèse du glucose et du fructose à partir de molécules non glucosidiques. Par la suite, les autres sucres sont formés par réarrangements moléculaires (Prescott *et al.*, 1995). Les treize monosaccharides pour lesquels les techniques de dosage existent sont fréquemment rencontrés dans les polysaccharides formant les biofilms bactériens d'eau potable ou thermale (Koudjonou *et al.* 1997 et 1998a, b ; Crissot-Laruade, 1999) (Figure II.14).

Les polysaccharides contiennent également des acides uroniques (Leclerc *et al.*, 1995) c'est-à-dire des monohydrates de carbone ayant la particularité de contenir un groupement carboxyle (Figure II.15). Les polysaccharides forment de longues chaînes d'acides aldobioniques, association d'un ose avec un acide uronique (Leclerc *et al.*, 1995).

Kennedy et Sutherland (1987) cités par Flemming (1995) ont montré qu'une large variété de bactéries d'eau de mer et d'eau douce présente des exopolysaccharides contenant de 20 à 50% d'acides uroniques.

Une même espèce bactérienne peut synthétiser différents polysaccharides, suivant les conditions environnementales (Marshall *et al.*, 1995). La grande diversité de constitution des polysaccharides suivant les espèces engendre des spécificités antigéniques (Leclerc *et al.*, 1995). Malgré, ces différences entre les exopolysaccharides, tant par le nombre et la nature des sous-unités constitutives que par l'enchaînement de ces sous-unités, les exopolysaccharodes comportent certaines similitudes (Tableau II.3).

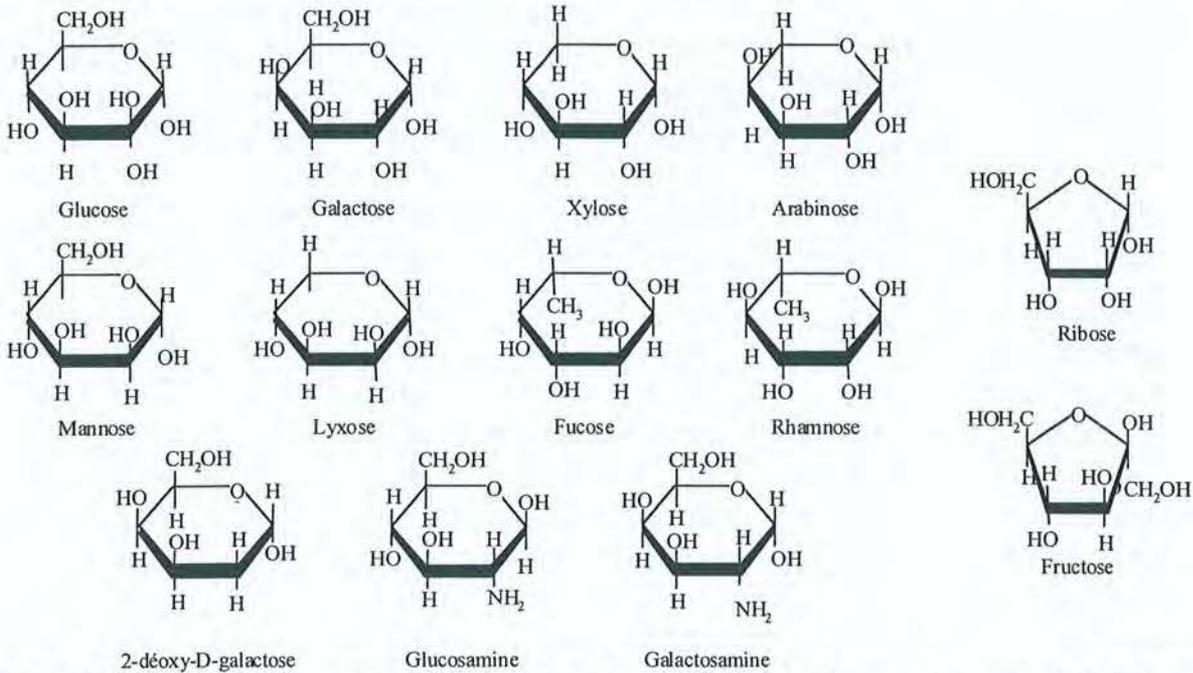


Figure II.14 : Les différents sucres rencontrés dans les eaux naturelles (d'après Thurman, 1985 et Gremm et Kaplan, 1998).

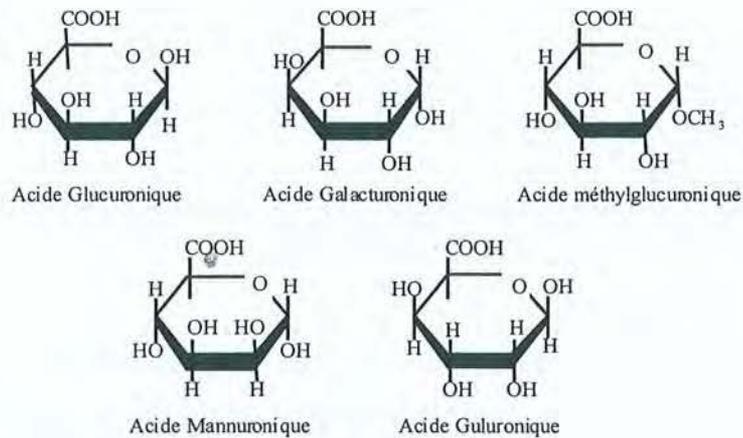


Figure II.15 : Exemples d'acides uroniques (Thurman, 1985).

Certains oses - glucose, galactose et mannose - sont parmi les plus représentés dans les exopolymères que ce soit dans les biofilms d'eau potable (Koudjonou *et al.*, 1997 et 1998a et b ; Crissot-Laruade, 1999), d'eau de rivière (Neu *et al.*, 1997), dans les boues activées (Horan et Eccles, 1986) ou en général (Characklis et Marshall, 1990). Parmi les oses les plus représentées, Neu *et al.* (1997) relèvent également la présence de L-fucose, et N-acetyl-D-galactosamine dans

un biofilm de rivière, et Horan et Eccles (1986) relèvent la présence supplémentaire d'acide gluconique et d'acide galacturonique dans les boues activées. Characklis et Marshall (1990) indiquent également la présence possible de rhamnose et d'acide glucuronique.

Tableau II.3 : Pourcentage exprimant la composition des exopolymères en terme d'hydrates de carbone (de bactéries libres, biofilms ou boues activés) (Crissot-Laruade, 1999).

Échantillons	Cowie et Hedges (1992)	Sandford (1979) ²	Hejzlar et Chudoba (1986)	Horan et Eccles (1986)	Crissot- Laruade (1999)	Koudjonou et al. (1997)		
	Bactéries libres - Eau marine côtière	<i>Erwinia</i> <i>tahitica</i>	Boues activées	Boues activées	Biofilm en eau thermale	Biofilm eau potable + extrait de levure		
Unités	nmol/L	μmol/g ¹	mg/L	nmol/cm ²	nmol/cm ²	#1	#2	#3 ³
Fucose (%)	3.2	12.4	ND	ND	3.60	5.2	4.1	3.0
Rhamnose (%)	9.1	0	ND	ND	2.30	17.0	10.6	6.9
Fucose+rhamnose (%)	ND	ND	55.6	ND	ND	ND	ND	ND
2-deoxy D gal (%)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Arabinose (%)	6.1	ND	ND	ND	3.00	7.8	8.3	13.3
Glucosamine (%)	ND	ND	ND	ND	0.50	ND	ND	ND
Galactose (%)	2.9	27.8	9	35.2	19.20	19.3	11.8	13.7
Glucose (%)	41.9	37.3	33.9	25.4	54.50	25.4	39.2	40.7
Mannose (%)	6.3	0	1.5	22.6	ND	ND	ND	ND
Xylose (%)	0.6	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Mannose+Xylose (%)	ND	ND	ND	ND	6.80	13.9	12.7	18.9
Fructose (%)	ND	ND	ND	ND	3.80	1.1	1.0	0.0
Ribose (%)	29.4	ND	ND	ND	5.20	10.4	12.3	3.4
Lyxose (%)	0.6	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Acide glucuronique (%)	ND	18.2	ND	11.6	ND	ND	ND	ND
Acide galacturonique (%)	ND	ND	ND	5.2	ND	ND	ND	ND

¹par gramme de matière sèche

²Cité par Sutherland (1983)

³#1=réacteur témoin ; #2 = réacteur chloré (1mg/L appliqué); #3 = réacteur chloré (2,5 mg/L appliqué)

⁴par millilitre de billes de verre expansé (support du biofilm)

II.2.3.1.b Les protéines

Les protéines sont des polymères composés d'acides aminés, c'est-à-dire de molécules contenant au moins un groupement carboxylique (-COOH) et un groupement aminé (-NH₃) (Figure II.16). Les acides aminés les plus fréquents sont au nombre de 20 (Figure II.17).

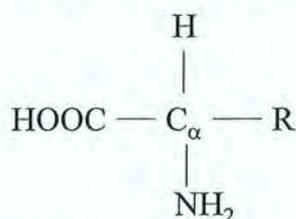


Figure II.16 : Structure générale des acides aminés. R = groupement variable suivant les acides aminés.

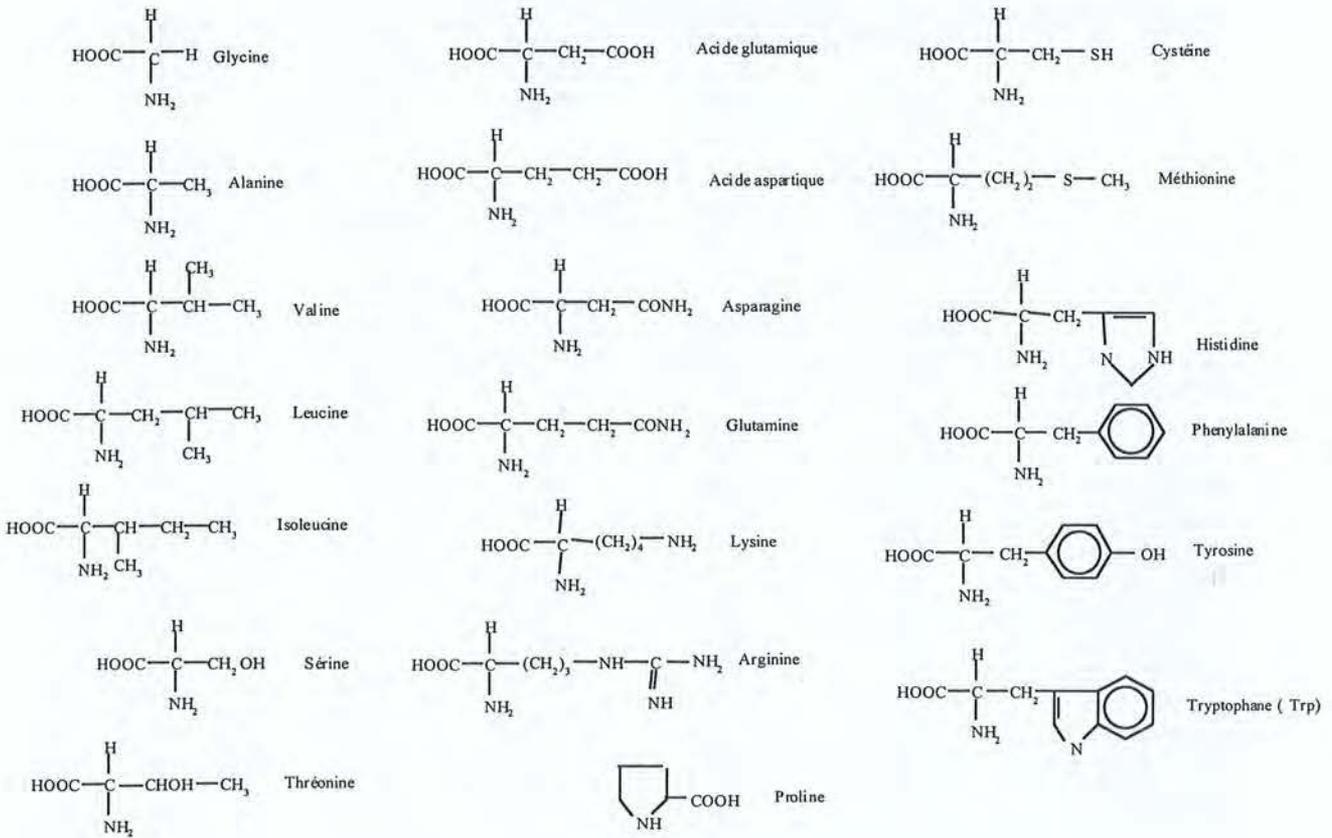


Figure II.17 : Formules développées des différents acides aminés composant les protéines.

La composition des biofilms en terme d'acides aminés est variable. Les biofilms développés dans des environnements nutritifs proches présentent des similitudes (Tableau II.4). Ainsi, malgré les conditions différentes entre les études, l'hydrolyse de biofilms développés à partir de réseaux de distribution d'eau potable ou thermale, montrent que la glycine, l'acide aspartique et l'alanine sont parmi les principaux acides aminés trouvés dans les biofilms de ces environnements pauvres en nutriments (Koudjonou *et al.*, 1997 et 1998a, b ; Crissot-Laruade *et al.*, 1999). Crissot-Laruade (1999) observe que 4 acides aminés (acide glutamique, glycine, alanine et la sérine) représentent plus de 50% de l'ensemble des acides aminés exprimés en moles (Tableau II.4). Cette composition est proche de celle observée pour des exopolymères d'eaux côtières où près de 50% des moles totales d'acides aminés sont formés par l'acide glutamique, la glycine, l'alanine et l'asparagine (Cowie et Hedges ; 1992). À l'inverse, dans des floes de boues activées, Hejzlar et Chudoba (1986) ont observé que les protéines contiennent une grande variété d'acides aminés en quantités similaires, la plupart (9 sur 17 dosés) représentant entre 5 et 10% de la masse totale en acides aminés.

Tableau II.4 : composition des exopolymères de bactéries libres, biofilms ou boues activées, en terme de pourcentages des divers acides aminés (Adapté de Crissot-Laruade, 1999).

	Cowie et Hedges (1992)	Neidhardt <i>et al.</i> (1994)	Hejzlar et Chudoba (1986a)	Crissot- Laruade (1999)	Koudjonou <i>et al.</i> (1997)		
	Bactéries libres (eau marine côtière)	cellules	Boue activée	Biofilm eau thermale	Biofilms eau potable + extrait de levure ³ #1 -#2 -#3 ²		
	nmol L ⁻¹	μmol/g ¹	mg ⁻¹ L	nmol cm ⁻²	nmol mL ⁻¹		
Asparagine (%)	10,6	9,0	13,8	6,8	13,1	15,4	5,1
Ac. Glutamique (%)	14,5	9,8	7,9	10,7	2,7	4,6	3,5
Sérine (%)	4,1	4,0	8,3	14,9	2,7	5,5	13,7
Histidine (%)	1,7	1,8	1,6	1,3	0,8	2,0	4,9
Arginine (%)	4,1	5,5	3,5	2	21,0	3,4	4,9
Glycine (%)	10,1	11,5	9,1	18,7	34,8	33,3	22,7
Thréonine (%)	4,6	4,7	10,7	4,2	1,7	2,9	5,8
Alanine (%)	12,4	9,6	9,1	10,4	6,3	9,8	7,4
Tyrosine (%)	2,2	2,6	ND	2	0,9	1,7	2,1
Méthionine (%)	2,4	2,9	0,4	1,2	1,5	3,5	6,5
Valine (%)	6,7	7,9	6,3	6,8	1,2	2,0	4,4
Phénylalanine (%)	3,2	3,5	5,9	2,3	2,3	2,0	2,8
Isoleucine (%)	4,7	5,4	3,9	2,4	0,8	1,4	2,8
Leucine (%)	7,6	8,4	6,3	7,3	2,9	4,0	4,4
Ornithine (%)	0,3	ND	ND	4,8	ND	ND	ND
Lysine (%)	9,3	6,4	4,8	3,9	7,2	8,7	9,3
β-Alanine (%)	0,3	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Alanine (%)	1,3	ND	0,8	ND	ND	ND	ND
Proline (%)	ND	4,1	3,9	ND	ND	ND	ND
Tryptophane (%)	ND	1,1	3,7	ND	ND	ND	ND
Cystéine (%)	ND	1,7	ND	ND	ND	ND	ND

¹ par gramme de matière sèche.

² #1=réacteur témoin ; #2 = réacteur chloré (1mg/L appliqué); #3 = réacteur chloré (2,5 mg/L appliqué)

³ par millilitre de billes de verre expansé (support du biofilm)

ND = non déterminé

Concernant les teneurs relatives en acides aminés et en hydrates de carbone dans les exopolymères, les études ne sont pas concordantes. Les biofilms, peuvent contenir plus d'hydrates de carbone que d'acides aminés (Dott et Schoenen, 1985 ; Vandevivere et Kirchman, 1993 ; Koudjonou *et al.*, 1998a, b) ou plus d'acides aminés que hydrates de carbone (Nielsen *et al.*, 1997 ; Crissot-Laruade *et al.*, 1999). Dott et Schoenen (1985) ont par ailleurs observé que plus l'âge du biofilm augmente et plus le ratio hydrates de carbone/acides aminés augmente, passant 2 à 30 entre 0 et 12 mois dans le cas rapporté.

II.2.3.2 Composés piégés dans le biofilm et adsorption par les exopolymères

Peu d'études se sont intéressées aux sites de sorption dans les biofilms (Flemming, 1995). Baribeau (1995) suggère que le biofilm possède des capacités d'adsorption limitées car l'auteur observe qu'il est rapidement saturé (en quelques heures).

Flemming (1995) rappelle que les exopolymères présentent des charges de surface :

- des charges anioniques par les groupements sulfates, phosphoryles et carboxyles (notamment ceux des acides uroniques).
- des charges cationiques par les groupements aminés des sucres, acides aminés et protéines.

Les cellules bactériennes peuvent également adsorber des ions au niveau de leur membrane notamment par les lipides, et également accumuler des substances dissoutes dans leur cytoplasme (Flemming, 1995).

Les charges des exopolymères leur confèrent un comportement de résines échangeuses d'ion (Costerton, 1999) et permettent la fixation de molécules organiques et d'ions inorganiques présents dans l'eau circulante (Decho et Lopez, 1993 ; Wolfaardt *et al.*, 1994 ; Jahn et Nielsen, 1995 ; Costerton, 1999 ; Chen *et al.*, 1996).

La fixation de matières organiques dissoutes a été observée dans des biofilms d'eaux usées ou en laboratoire, avec des substances aussi diverses que :

- des pesticides (Wolfaardt *et al.*, 1994),
- des acides nucléiques (ARN et ADN) provenant de la lyse cellulaire (Jahn et Nielsen, 1995)
- des substances humiques (Nielsen *et al.*, 1997 ; Camper *et al.*, 1998)
- des lipides (Nielsen *et al.*, 1997).

Les substances humiques, identifiées comme étant la fraction des molécules adsorbables sur résine macroporeuse XAD 8 (Leenheer, 1981), peuvent représenter une fraction significative des substances organiques dissoutes, piégées dans la matrice des biofilms (Nielsen *et al.*, 1997). Dans des biofilms d'eaux usées, Nielsen *et al.* (1997) ont observé que leur masse est plus importante que celle des hydrates de carbone et acides uroniques réunis (Tableau II.5). Camper *et al.* (1998) indiquent également que les substances humiques se fixent dans les biofilms d'eau potable sans donner d'ordre de grandeur de cette fixation.

La fixation de cations, notamment de métaux, aurait lieu *via* les charges des acides uroniques (Flemming, 1995), et vraisemblablement par les protéines formant les exopolymères puisqu'un biofilm déprotéiné ne fixe plus les ions (Chen *et al.*, 1996). Leclerc *et al.* (1995) suggèrent que les chaînes polymériques sont reliées entre elles par des liaisons électrostatiques, établies grâce à des ions métalliques divalents tels que Mg^{2+} ou Ca^{2+} . Ainsi, les cations auraient un rôle dans l'architecture du biofilm. Flemming (1995) met en évidence que les capacités de sorption des biofilms varient fortement en fonction des biofilms utilisés et des ions étudiés ($0,13 \mu M \mu g^{-1}$ d'exopolysaccharides concernant le plomb et $3,5 \cdot 10^{-4} \mu M \mu g^{-1}$ pour le cuivre).

Tableau II.5 : Composition des exopolymères extraits de biofilms de cultures mixtes. Valeurs exprimées en mg par g de protéines totales dans le biofilms (Nielsen et al., 1997).

	Protéines	Hydrates de carbone	Acides Uroniques	ADN	Substances humiques
Biofiltre d'usine de traitement (Eau usée domestique)	419	35,8	8,9	9,6	60
Filtre à ruissellement (trickling filter) (Eaux usées domestiques)	315	29,2	9,9	14,0	60,2
Biofiltre de recirculation (aquaculture)	579	44,8	22,3	7,4	91,2
Canalisation d'égout	141	11,2	5,3	10,2	270
Canalisation d'égout	90	11,7	2,8	7,5	55,9

Les groupes aminés seraient des sites de sorption pour les anions (Flemming ; 1995). L'adsorption de phosphates, chlorate et chlorites dans les biofilms a été observée (Baribeau, 1995 ; Flemming, 1995) et Baribeau (1995) notent que l'adsorption d'anions (chlorate, chlorites) est un phénomène réversible.

II.2.3.3 Les microorganismes

Les microorganismes présents dans les biofilms sont variés : des bactéries, des protozoaires, des macroinvertébrés (crustacées, nématodes etc.), des algues, des levures et des champignons font partie intégrante de l'écosystème développé dans les réseaux de distribution au niveau des biofilms (LeChevallier, 1990 ; Block *et al.*, 1993 et 1997; Servais *et al.*, 1995 ; Amblard *et al.*, 1996 ; Astier, 1996 ; Sibille, 1997 ; Gauthier, 1998 ; Kinner *et al.*, 1998 ; Sibille *et al.*, 1998).

II.2.3.3.a Les bactéries

Les bactéries sont des microorganismes dont les densités typiques dans un biofilm sont de l'ordre de 10^3 à 10^7 cellules cm^{-2} (Block *et al.*, 1993). Environ 1 à 5% des cellules bactériennes sont cultivables sur gélose R2A (Block *et al.*, 1993), même en présence de chlore (Mathieu *et al.* 1992).

La position des cellules dans le biofilm est en partie due à des prédispositions génétiques comme reporté dans une revue de littérature réalisée Costerton *et al.* (1995). Les auteurs suggèrent que la disposition des agrégats bactériens au sein du biofilm varie suivant les espèces. Ohashi *et al.* (1998) et Stewart *et al.* (1997) observent que les bactéries à croissance rapide se situent près de la surface tandis que celles à croissance lente sont plus en profondeur. Ohashi *et al.* (1998) suggèrent que les cellules proches du support ont l'avantage d'être protégées du détachement. À l'inverse, Stewart *et al.* (1997) suggèrent que les bactéries proches de la surface

eau/biofilm seraient avantagées physiologiquement, du fait de la limitation de la diffusion vers le support. Elles bénéficieraient d'un apport d'oxygène et de substrats plus important, tandis que la croissance des bactéries proches du support serait ralentie par cette limitation. Cependant, les avantages et désavantages conférés par la proximité de la surface du biofilm sont pondérés par l'existence de canaux et de pores au sein de la structure des biofilms. Ces structures facilitent l'apport des nutriments (tels que l'oxygène) et la pénétration des désinfectants dans le biofilm, même à proximité du support (de Beer *et al.*, 1994 ; Costerton *et al.*, 1995 et 1999).

Le maintien d'une diversité dans le biofilm doit être favorable à l'ensemble de la communauté, malgré la compétition pour les nutriments (Zhang *et al.*, 1994). Le maintien d'espèces dans un même biofilm est possible même si elles ont des taux de croissance différents. Stewart *et al.* (1997) ont observé que les colonies de *Klebsiella pneumoniae* ($\mu = 0,87 \text{ h}^{-1}$) se dispersent sur la surface d'un film de *Pseudomonas aeruginosa* dont le taux de croissance est deux fois plus faible ($\mu = 0,35 \text{ h}^{-1}$) (Figure II.18). La présence d'une autre espèce bactérienne dans le biofilm peut permettre une plus grande résistance à la désinfection (Srinivasan *et al.*, 1995).

La meilleure survie d'une espèce bactérienne en présence d'autres espèces a été reporté dans plusieurs études (Bade *et al.*, 2000 ; Armon *et al.*, 1997). Par exemple, le taux de survie de *Legionella pneumophila* dans le biofilm est modifié par la présence d'autres bactéries et en fonction de la température (Armon *et al.*, 1997). *L. pneumophila* survivrait mieux lorsque l'eau n'est pas stérile à 36°C, mais mieux lorsque l'eau est stérile à 24°C (Armon *et al.*, 1997). Les relations entre les bactéries dans un biofilm sont complexes et varient en fonction des conditions environnementales (Armon *et al.*, 1995).

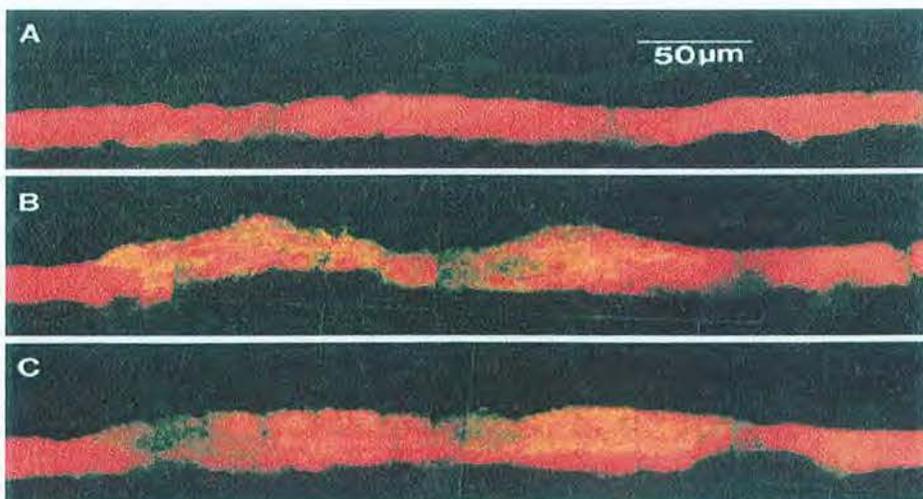


Figure II.18 : Montage photographique d'une section transversale de biofilm mixte de *Klebsiella pneumoniae* et *Pseudomonas aeruginosa* (Tiré de Stewart *et al.*, 1997). Marquage à l'iodure de propidium (rouge) des deux souches bactériennes par leur acides nucléiques, marquage de *Klebsiella pneumoniae* par anticorps (Vert). Le jaune apparaît lorsque les deux marqueurs utilisés se recouvrent (*Klebsiella pneumoniae* et *Pseudomonas aeruginosa* ou *Klebsiella pneumoniae* seule). Les zones rouges indiquent la présence de *Pseudomonas aeruginosa* seul.

Pour une bactérie, de nombreux avantages sont conférés par l'intégration dans un biofilm tant pour la nutrition que pour la protection face à des agents tels que le chlore (Lappin-Scott et Costerton, 1989). Certaines bactéries sont capables de développer des relations commensales entre elles, au sein des biofilms (Costerton *et al.*, 1995 ; Bade *et al.*, 2000). Costerton *et al.* (1995) suggèrent que le *quorum sensing* (déjà évoqué comme influençant l'architecture du biofilm) serait à la base de la communication et du commensalisme au sein des biofilms. Ce phénomène permettrait aux bactéries dans le biofilm de se comporter comme une partie d'un ensemble (telles les cellules de métazoaires) et également de limiter la croissance des microcolonies (Costerton *et al.*, 1995 ; Greenberg, 1997 ; Stickler *et al.*, 1998).

II.2.3.3.b Les protozoaires

Les protozoaires forment une part significative de la biodiversité des biofilms. Ils sont des prédateurs et des détritivores, puisqu'ils consomment les bactéries (Kinner *et al.*, 1998 ; Servais *et al.*, 1995 ; Sibille *et al.*, 1998) et éventuellement les exopolymères du biofilm (Sherr, 1988 ; Wolfaardt *et al.*, 1994). La plupart des groupes de protozoaires (flagellés, ciliés, amibes nues et thècamébiens) a été recensée dans les biofilms d'eau potable (Sibille *et al.*, 1998). Amblard *et al.* (1996), Servais *et al.* (1995) et Sibille (1997) ont montré la présence de protozoaires dans les eaux potables, à des concentrations variant de $3 \cdot 10^4$ à $7 \cdot 10^5$ protozoaires L^{-1} . Sibille (1997) a montré leur présence dans un biofilm d'eau potable à une concentration totale de $1,4 \cdot 10^3$ protozoaires cm^{-2} . Pace *et al.* (1988) et Kinner *et al.* (1998) suggèrent que la prédation par les protozoaires est une cause essentielle de mortalité bactérienne dans les milieux aquatiques. Cependant le phénomène reste méconnu en ce qui concerne les réseaux d'eau potable. Kalmbach *et al.* (1997b) suggèrent que la prédation par les protozoaires pourrait avoir engendré des variations dans la composition des populations fixées qu'ils observent. En ce sens, Kinner *et al.* (1998) ont observé une prédation par les protozoaires principalement sur les bactéries d'une eau d'aquifère ayant la croissance la plus rapide. Cependant, Hahn et Höfle (1999) ont noté des effets de la prédation sur la taille des cellules, mais pas sur la composition des populations libres. Étant donné que les biofilms ne sont pas homogènes suivant la profondeur en terme de répartitions des espèces bactériennes, s'il y a une prédation qui s'effectue sur les biofilms en réseau de distribution, il est probable qu'elle engendre des changements dans la composition des populations fixées.

II.2.4 Phylogénie et biofilm

La plupart des études menées sur les biofilms d'eau potable s'intéressent aux bactéries en général, avec des techniques de dénombrements globaux, sur gélose ou en épifluorescence. Cependant, le biofilm est formé d'espèces bactériennes distinctes, n'ayant pas les mêmes besoins physiologiques. Certaines méthodes utilisent les caractéristiques physiologiques des bactéries et ciblent des groupes bactériens d'intérêt public tels que les Coliformes, les Mycobactéries ou les Légionelles avec des milieux de culture spécifiques. Cependant, peu d'études ont été menées afin de caractériser la composition des populations rencontrées dans le biofilm. Quelques études ont été effectuées sur la fraction des bactéries hétérotrophes aérobies cultivables afin de connaître sa composition en terme d'espèces (Briganti et Wacker, 1995, Norton et LeChevallier, 2000 ; Rompré et al., 1998 ; Percival *et al.*, 1999). Ces études sont basées sur l'identification des bactéries cultivables par recherche des profils d'acides gras (Briganti and Wacker, 1995 ; LeChevallier *et al.*, 1998 ; Rompré *et al.*, 1998) ou par des tests biochimiques (Percival *et al.*, 1999). Elles mettent en évidence la grande variété de genres bactériens dans le biofilm (Tableau II.6).

Actuellement peu d'études se sont intéressées populations bactériennes dans les eaux potables suivant leur taxonomie (Manz *et al.*, 1993, Kalmbach *et al.*, 1997a, b ; Schwartz *et al.*, 1997 et 1998 ; Kalmbach, 1998 ; Obst, 2000). Ce type d'étude est davantage répandu dans les autres milieux aquatiques tels que les lacs (Alfreider *et al.*, 1996 ; Glöckner *et al.*, 1996 ; Pernthaler *et al.*, 1998), les océans et les sédiments (Llobet-Brossa *et al.*, 1998) ou les eaux usées (Wagner *et al.*, 1993).

Tableau II.6 : Composition des biofilms en terme de genres bactériens.

Genres Bactériens	% par échantillon	% d'échantillons positifs	Groupe Phylogénétique
<i>Acidovorax</i>	ND-35 ^a	83.3 ^a	β - Protéobactéries
<i>Acinetobacter</i>	ND-9 ^a	16.7 ^a	γ - Protéobactéries
	1-5.5 ^c	5-92% ^c	
<i>Aeromonas</i>		0.9-27 ^c	γ - Protéobactéries
<i>Alcaligenes</i>	ND-41 ^a	33.3 ^a	β - Protéobactéries
<i>Aquaspirillum</i>	ND-32 ^a	33.3 ^a	β - Protéobactéries
<i>Arthrobacter</i>	<5 ^a	8.3 ^a	Actinobactéries
<i>Azospirillum</i>	<5 ^a	8.3 ^a	α - Protéobactéries
<i>Bacillus</i>	ND-38 ^a	91.7 ^a	Groupe <i>Bacillus-Clostridium</i>
	0.6-84.6 ^b	100 ^b	
	26,8-44,7 ^d		
<i>Enterococcus</i>	ND-8 ^a	16.7 ^a	Groupe <i>Bacillus-Clostridium</i>
<i>Flavobacterium</i>	ND-12 ^a	25.0 ^a	Flavobactéries
	ND-26.5 ^b	87.5 ^b	
	15,5-40,8 ^d		
<i>Hydrogenophaga</i>	ND-16 ^a	41.7 ^a	β - Protéobactéries
<i>Kurthia</i>	ND-8.7 ^b	62.5 ^b	Groupe <i>Bacillus-Clostridium</i>
<i>Legionella</i>		32.7 ^c	Légionellaceae
			(famille des γ-Protéobactéries)
<i>Methylobacterium</i>	ND-10 ^a	33.3 ^a	α - Protéobactéries
	ND-12 ^b	87.5 ^b	
<i>Microbacterium</i>	ND-26 ^a	8.3 ^a	Actinobactéries
<i>Micrococcus</i>	ND-40 ^a	66.7 ^a	Actinobactéries
	8,5-9,7 ^d		
<i>Moraxella</i>	ND-7 ^a	16.7 ^a	γ - Protéobactéries
	15.5-25.4 ^d	10% ^c	
<i>Mycobacterium avium</i>		17-25% ^c	Mycobactéries
<i>Nocardia</i>	<5 ^a	8.3 ^a	Actinobactéries
<i>Paracoccus</i>	<5 ^a	8.3 ^a	α - Protéobactéries
<i>Pseudomonas</i>	ND-25 ^a	58.3 ^a	γ - Protéobactéries
	46,5-53,5 ^d	2 ^c	
<i>Rhodococcus</i>	ND-17 ^a	16.7 ^a	Actinobactéries
<i>Staphylococcus</i>	<5 ^a	25.0 ^a	Groupe <i>Bacillus-Clostridium</i>
	0.5-21.7 ^b	100 ^b	
<i>Sphingomonas</i>	ND-12 ^a	50.0 ^a	α - Protéobactéries
	1.6-36.0 ^b	100 ^b	
<i>Xanthomonas</i>	ND-17 ^a	25.0 ^a	γ - Protéobactéries
	0-1.2% ^c		

a : Rompré *et al.* (1998)

b : Briganti and Wacker (1995)

c : Rusin *et al.* (1997)

d : Payment *et al.* (1988)

II.2.4.1 La phylogénie

Tous les microorganismes actuels dérivent d'un ancêtre commun, apparu sur terre il y a plus de 3 milliards d'années (Figure II.19). Les mutations qui ont lieu entre les générations permettent l'évolution de chaque espèce et éventuellement conduisent à l'apparition de nouvelles espèces. Chaque organisme possède un génome propre. Plus l'ancêtre commun à deux organismes est récent, plus les génomes de ces deux organismes présentent des similitudes.

Plutôt que l'ADN qui contient de nombreuses données sans intérêt phylogénétique direct, les ARN ribosomiques sont largement utilisés pour la recherche de la phylogénie car ils permettent de comparer :

- des organismes très éloignés génétiquement par études des zones hautement conservées pendant des millions d'années.
- des organismes très proches génétiquement dans les régions où les mutations se sont accumulées depuis des millions d'années.

À partir des similitudes entre les ARNr, il est possible de construire un arbre généalogique des espèces (Figure II.19)

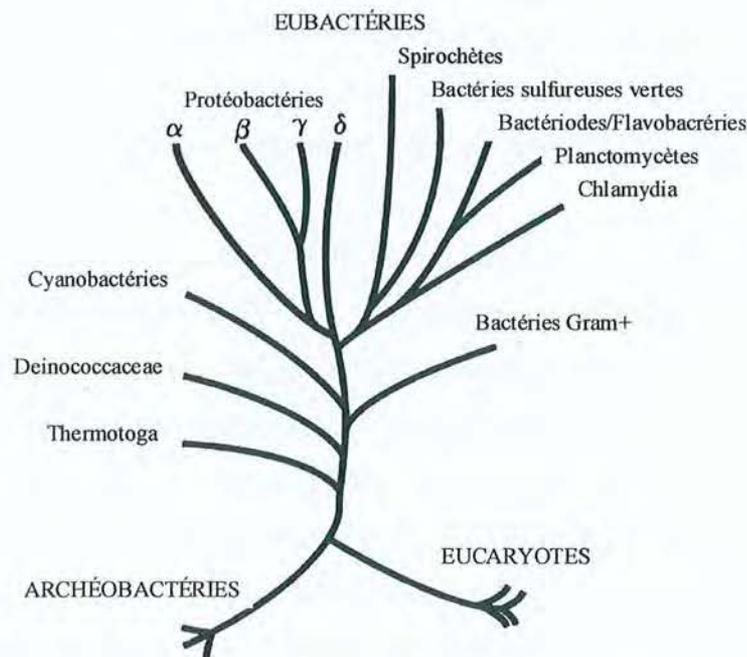


Figure II.19 : Arbre phylogénétique montrant l'évolution et les relations entre les différents groupes bactériens principaux (Zavarzin et al., 1991).

Les ARNr (ARN ribosomiques) sont contenus dans les ribosomes. Les ribosomes sont indispensables à la synthèse protéique. Le nombre de ribosomes par cellule est lié à l'activité bactérienne (Davis et al., 1986 ; McKillip et al., 1998).

Dans l'eau potable, la plupart des bactéries appartiennent à quelques groupes phylogénétiques (Tableau II.6).

Les Flavobactéries sont des bactéries qui sont apparues récemment dans l'évolution. Elles regroupent quelques bactéries Gram-négatives et sont proches phylogénétiquement des *Cytophaga*, autres bactéries Gram-négatives fréquentes dans les eaux (Leclerc *et al.*, 1995).

Les Protéobactéries regroupent la plupart des genres bactériens Gram-négatifs (Zavarzin *et al.*, 1991). La sous-classe des β -Protéobactéries est surtout orientée vers l'utilisation de gaz réduits ayant une faible solubilité tels que H_2 , CO et NH_4^+ (Zavarzin *et al.*, 1991). La sous classe des α -Protéobactéries est présentée comme regroupant les bactéries oligotrophes (Zavarzin *et al.*, 1991). L'ensemble des bactéries Gram-négatives, anaérobies facultatives et fermentatives est regroupé dans le groupe des γ -Protéobactéries (Zavarzin *et al.*, 1991). Parmi ce groupe, se trouve la famille des *Enterobacteriaceae* dont de nombreuses espèces sont capables d'utiliser les oligosaccharides produits par les autotrophes (Zavarzin *et al.*, 1991).

Les sous-classes *Bacillus-Clostridium* et les Actinobactéries sont regroupées dans la classe des Firmicutes, plus communément appelée la classe des bactéries Gram-positives. La sous-classe des *Bacillus-Clostridium*, aussi appelés « Gram positives à faible teneur en G+C » regroupe des bactéries Gram-positives dont l'ADN contient une large proportion de C+G, tandis que la sous classe des Actinobactéries ou « Gram positives à forte teneur en G+C » regroupe les bactéries Gram-positives ayant une forte proportion de C+G dans leur ADN.

Les différences phylogénétiques sont actuellement difficilement reliables à des différences de physiologies bactériennes (Zavarzin *et al.*, 1991) : même dans des milieux extrêmes, tels que les lacs alcalins, les principaux embranchements sont représentés : les Cyanobactéries, les Archéobactéries aérobies et anaérobies, les Thermogales, les Protéobactéries, les Spirochètes et les Gram positives (Zavarzin *et al.*, 1999). Il n'y a donc pas de groupes phylogénétiques spécifiques et caractéristiques d'un environnement. En conséquence, très peu des informations disponibles sur la physiologie et la morphologie des bactéries ont pu être attribuées aux classes phylogénétiques. De plus, la plupart du temps, lorsque de telles informations (physiologiques en particulier) caractérisent un groupe phylogénétique, elles ne sont pas exclusivement observées dans ce groupe, quelques exceptions dans d'autres groupes taxonomiques possédant également cette caractéristique physiologique. Par exemple, de nombreuses bactéries de la Famille des *Enterobacteriaceae* (famille appartenant aux γ -Protéobactéries) sont décrites comme ubiquistes. *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Enterobacter* peuvent être isolées de nombreux environnements tels que le tube digestif, le sol, les eaux, les aliments, les végétaux, etc. (Leclerc *et al.*, 1995). Cependant,

Alcaligenes et *Acinetobacter* - genres bactériens des β -Protéobactéries - sont également ubiquistes.

II.2.4.2 Limitation et avantages de l'approche taxonomique

Certaines informations sont perdues aux niveaux phylogénétiques supérieurs. L'étude des populations bactériennes par les groupes taxonomiques peut occulter certains messages, notamment sur la spécificité de certaines espèces bactériennes à des niches écologiques. Ainsi, Phillips *et al.* (1999) observent que, dans l'eau de mer, le groupe des β -Protéobactéries dominant dans la population libre et dans celle fixée aux particules. Cependant, les espèces de β -Protéobactéries sont différentes dans chacune des populations. Stackebrandt (1998) remarquent également que des souches relativement proches taxonomiquement ont pu être isolées d'habitats très différents.

Cependant, certaines informations ne peuvent être observées qu'aux niveaux phylogénétiques supérieurs. Des espèces bactériennes ayant un fort lien de parenté pourraient être adaptées à une niche écologique identique et développer des luttes inter-spécifiques (Barbault, 1990) pour l'occupation de celle-ci. Ainsi, des études notent que les informations apportées par les espèces sont limitées, tandis que la distinction taxonomique entre bactéries Gram-positives et Gram-négatives apporte des conclusions intéressantes (Rompré *et al.*, 1998 ; Norton et LeChevallier, 2000).

Trois exemples ci-dessous présentent les avantages qui peuvent être obtenus en s'intéressant au niveau taxonomique supérieur au genre bactérien, à partir d'études présentant la composition de populations (Rompré *et al.*, 1998 ; Percival *et al.*, 1999 et Norton et LeChevallier, 2000). Ces populations sont la fraction cultivable de biofilms hétérotrophes d'eau potable dont la composition en terme d'espèces bactériennes a été déterminée par l'étude des profils d'acides gras (LeChevallier *et al.*, 1998 ; Rompré *et al.*, 1998) ou des tests biochimiques (Percival *et al.*, 1999).

EXEMPLE n°1 : Rompré *et al.* (1997) ont étudié la composition des biofilms de réseaux de distribution d'eau potable par culture sur gélose puis caractérisations des bactéries par leurs profils d'acides gras. En regroupant les bactéries suivant leur caractéristique Gram, les auteurs ont remarqué que les bactéries Gram-positives, sont plus abondantes en eau froide, tandis que les bactéries Gram-négatives sont plus abondantes en eau chaude. Les Gram-positives formant une classe taxonomique, les auteurs ont donc observé une différence taxonomique entre les conditions testées. Rompré *et al.* (1998) observent par ailleurs que la présence et l'absence

d'espèces bactériennes déterminées ne sont pas régies par le TRH ni la température des eaux, puisque dans des conditions similaires ils observent des espèces bactériennes différentes. En étudiant la composition des biofilms obtenus par Rompré *et al.* (1998) à un niveau phylogénétique supérieur à celui du genre bactérien, il apparaît que parmi les bactéries Gram-positives, ce sont les Actinobactéries qui sont favorisées par l'eau froide, et non pas l'ensemble des Gram-positives. Ceci est illustré par la Figure II.20.

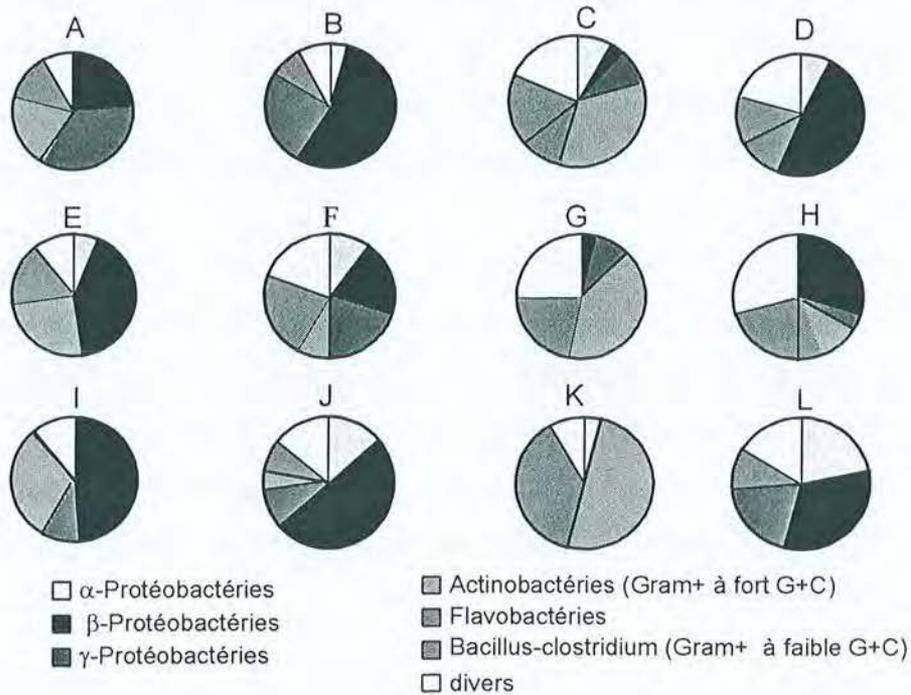


Figure II.20 : Composition phylogénétique de la population cultivable de biofilms à partir des analyses des profils d'acides gras réalisés par Rompré *et al.* (1998). A, B, C et D : Usine 1 ; et E, F, G et H : Usine 2 ; I, J, K, L : usine 3.

A, E, I : Temps de résidence long (>12 heures), température de l'eau basse (~1°C);

B, F, J : Temps de résidence long, température élevée (~20°C);

C, G, K : Temps de résidence court (<1 heure), température de l'eau basse ;

D, H, L : Temps de résidence court, température de l'eau élevée ;

À l'inverse, parmi les bactéries Gram-négatives, la fraction des bactéries de la sous-classe des β-Protéobactéries est au contraire uniquement bien représentée lorsque les eaux sont froides et avec un faible temps de résidence hydraulique. Les bactéries de la sous-classe des γ-Protéobactéries sont surtout présentes pour des temps de résidence élevés (sauf le cas de l'usine 2, en température froide), et ils ne sont pas présents dans les biofilms lorsque le temps de résidence hydraulique est faible (sauf pour l'usine 3, en température chaude).

Ainsi, le traitement des résultats au niveau des groupes taxonomiques permet d'affiner les tendances. Cependant, les connaissances actuelles des liens entre la taxonomie et la physiologie bactérienne ne permettent pas d'approfondir la réflexion.

EXEMPLE n°2 : Un second exemple est basé sur les travaux de Percival *et al.* (1999).

D'après Percival *et al.* (1999), suivant le régime hydrodynamique, le biofilm d'eau potable est plus ou moins développé et contient divers types de bactéries en plus ou moins grandes proportions. Ces auteurs ont travaillé sur un pilote et ont observé (mais n'ont pas commenté ces résultats) que plus la vitesse est élevée dans une conduite, plus les densités bactériennes au niveau du biofilm développé sur acier inoxydable étaient élevées. Par ailleurs, Percival *et al.* (1999) ont également montré la dominance de la portion cultivable des bactéries de leur biofilm par *Arthrobacter/Corynebacterium* du groupe phylogénétique des Actinobactéries, lorsque le flux d'eau présentait une faible vitesse ($0,32 \text{ m s}^{-1}$; $Re = 5540$) (Figure II.21-A).

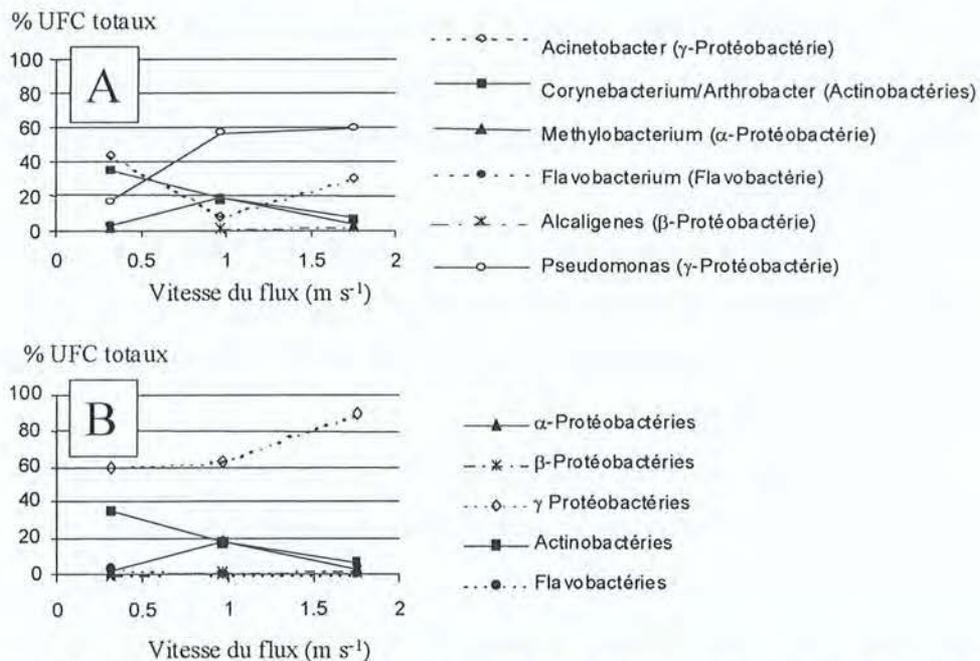


Figure II.21: Effet de la vitesse du flux sur la composition de la fraction cultivable d'un biofilm développé sur acier inoxydable de type 316-2D. A : Composition suivant les genres bactériens rencontrés. B : Composition suivant les groupes phylogénétiques rencontrés. (Percival *et al.*, 1999).

À haute vitesse ($1,75 \text{ m s}^{-1}$; $Re=30297$), les bactéries du genre *Pseudomonas* de la sous-classe γ -Protéobactéries dominaient leurs biofilms. Les auteurs suggèrent que *Acinetobacter* et *Arthrobacter/Corynebacterium* ne sont pas capables de lutter contre *Pseudomonas sp.*, lorsque la vitesse du flux est rapide. En regroupant les bactéries de même groupe phylogénétique, il apparaît que :

- plus la vitesse du flux est élevée et plus les bactéries de la sous-classe γ -Protéobactéries occupent une proportion importante des bactéries cultivables de leur biofilm (Figure II.22.B).
- en contre partie, plus la vitesse est faible et plus le biofilm cultivable est représenté par des bactéries du groupe des Actinobactéries.

Ces tendances ont été vérifiées quel que soit le matériau-support utilisé dans leur étude. Les Actinobactéries semblent donc plus adaptées aux conditions de flux lent tandis que les γ -

Protéobactéries sont davantage ubiquistes et s'adaptent suivant les espèces aux conditions engendrées par un flux lent ou rapide. Les auteurs décrivent la présence de bactéries en forme de bâtonnets et l'existence de structures filamenteuses, suggérant la présence de matériel extracellulaire uniquement à une vitesse de flux élevée. La viscosité des polymères pourrait être une conséquence de l'adaptation des bactéries.

EXEMPLE n°3 : Finalement, le troisième exemple présente une étude menée par Norton et LeChevallier (2000). Les auteurs ont étudié l'effet combiné de la charge de nutriment des eaux et de la nature du support sur la composition du biofilm. Les auteurs ont déterminé la composition en bactéries cultivables de biofilms âgés de deux mois, développés sur de la fonte noire (black iron) ou du chlorure de polyvinyle chloré (PVCc) (Tableau II.7). Deux eaux d'alimentation ont été testées : toutes deux ont été chlorées et enrichies en phosphates mais l'une a été filtrée sur sable et l'autre a été ozonée et filtrée sur charbon actif en grain afin de l'appauvrir en nutriments. Les auteurs ont observé les différences en terme de bactéries Gram-positives et Gram-négatives.

Au niveau taxonomique, lorsque l'eau est traitée par filtration sur sable, la composition des biofilms est similaire, quel que soit le support. Environ 1/3 des cellules appartiennent aux Actinobactéries et 1/3 aux Protéobactéries, tandis que 1/3 des cellules ne sont pas classées (non identifiées par les auteurs).

Lorsque l'eau est traitée par ozonation+CAG, les biofilms formés sur des parois en fonte noire (black iron) ou en PVCc, comporte principalement des bactéries des groupes des Protéobactéries (1/3) et des Actinobactéries (1/3). Sur PVCc, les γ -Protéobactéries représentent à elles seules 74% des cellules cultivables du biofilm, grâce à un seul genre bactérien : *Stenotrophomonas*. Dans ces conditions, les γ -Protéobactéries sont plus nombreuses dans le biofilm formés sur PVCc que dans celui formés sur la fonte noire (black iron), du fait de l'abondance de *Stenotrophomonas* observé sur PVC.

Tableau II.7 : Composition taxonomique des bactéries cultivables dans les biofilms, déterminée à partir des identifications des espèces par leur profil d'acides gras. Effet du traitement de l'eau et du support (d'après Norton et LeChevallier, 2000). Exprimé en pourcentage du nombre totale de bactéries cultivables.

Groupes taxonomiques	Eau filtrée sur sable		Eau Ozonée +filtrée sur CAG*	
	PVCc	fonte noire (black iron)	PVCc	fonte noire (black iron)
Actinobactéries	38	33	20	26
Protéobactéries (α + β + γ)	34	44	78	66
divers	27	23	2	8
γ -Protéobactéries seules	6	20	74	20
β -Protéobactéries seules	24	23	0	24
α - Protéobactéries seules	4	1	4	22

* CAG = charbon actif en grains

II.2.4.3 Composition phylogénétique des biofilms d'eau potable

L'étude de la composition d'un biofilm en terme d'espèces bactériennes ne peut être réalisée de manière fiable par culture sur gélose puisque plus de 95% des bactéries dans les systèmes d'eau potable ne peuvent être cultivée (Kalmbach et al., 1997a et b ; Staley et Konopka, 1985 ; Block *et al.*, 1993 ; Manz et al., 1993). De plus, la culture sur gélose entraîne un biais de sélection des populations (Wagner *et al.*, 1993). Enfin, les résultats peuvent être contradictoires suivant les méthodes utilisées pour la caractérisation des espèces bactériennes (Brown et Leff ;1996). Une technique permettant de pallier le problème des cultures est apparue au cours de la décennie : l'hybridation *in situ* avec des sondes fluorescentes (FISH) et a permis d'étudier les biofilms d'eau potable (Tableau II.8). Cette technique utilise l'hybridation de sondes composées de nucléotides marqués soient radioactivement, soient à l'aide de colorants ou de fluorochromes. Son application *in situ* a été développée à l'aide de sondes ciblant les ARN ribosomiques. L'abondance en ribosomes permet la détection des bactéries et détermine la sensibilité de la méthode (seuil au-dessous duquel la cellule ne sera plus détectée) (DeLong, 1993).

Les études utilisant la méthode FISH ont mis en évidence une détection des bactéries de biofilm d'eau potable atteignant 48 à 90% du total des bactéries avec une sonde ciblant l'ensemble des bactéries, la sonde EUB338 (Tableau II.8).

Par ailleurs, avec des sondes ciblant des sous-classe bactériennes, ces différentes publications ont montré que :

- 80% à 40% des cellules totales des biofilms peuvent être affiliées aux β -Protéobactéries avec la sonde BET42a (Kalmbach *et al.*, 1997 ; Schwartz *et al.*, 1997 et 1998 ; Obst *et al.*, 2000)
- <5% jusqu'à 23% environ des cellules totales (marquées au DAPI) sont identifiées comme appartenant aux α -Protéobactéries par marquage avec la sonde ALF1b (Kalmbach *et al.*, 1997a et b ; Schwartz *et al.*, 1997 et 1998 ; Obst *et al.*, 2000). En utilisant la méthode DVC (Direct Viable Counts développée par Kogure *et al.* 1984) combinée à la méthode FISH, Kalmbach *et al.*(1997a) observent que dans les biofilms matures, les α -Protéobactéries peuvent parfois être sous-estimées par la méthode FISH classique. Les auteurs n'ont cependant pas explicité les causes de ces problèmes de détection.

- La littérature présente également des différences de composition concernant les bactéries appartenant à la sous classe γ -Protéobactéries, marquées avec la sonde GAM42a.

Tableau II.8 : Composition des biofilms d'eau potable étudiés par la méthode FISH, exprimée en pourcentage des dénombrements totaux effectués par marquage au DAPI.

PEBD = polyéthylène basse densité ; PDHD – polyéthylène haute densité ; PVC = chlorure de polyvynyle.

Référence	Âge des biofilms	Milieu fixé étudié	EUB338	ALF1b	BET42a	GAM42a
Kalmbach <i>et al.</i> (1997a)	35 jours	PELD-verre	58-52	<1-11	57-34	<1-4
	56 jours	Réseau domestique ¹	48-48	2-5	37-36	2-2
	70 jours		52-49	4-3	34-34	4-6
Kalmbach <i>et al.</i> (1997b)	14 jours	Sur PELD-Verre				
		Connection dans une habitation ¹	87-84	1-2	78-80	2-2
		Connection sur eau souterraine ¹	86-86	39-41	33-35	7-5
		Connection sur une conduite principale ¹	85-86	1-2	80-79	1-2
Kalmbach <i>et al.</i> (2000)	14 jours	Sur PE-BD				
		Berlin ¹ (réseau domestique)	90	0.9	89	0.7
		Sur PE-HD				
		Mainz ² (réseau domestique)	88	7	75	7
		Hamburg ¹ (réseau domestique)	86	0.4	75	0.3
		Stockholm ³ (Sur le réseau)	81	5	60	3%
Manz <i>et al.</i> (1993)	ND	Sur verre	68	ND	ND	ND
Obst (2000)	ND	sur PEHD-PVC-Acier inoxydable (Biofilm à l'usine de traitement)				
		En eau filtrée	ND	<10-18-23	34-33-42	28-25-27
		Eau souterraine	ND	<10-<10-<10	45-52-42	<10-42-<10
Schwartz <i>et al.</i> (1998)	4 jours	Sur PEHD-PVC-Acier inoxydable				
		Sortie GAC	ND	10-10-8	37-33-69	20-21-11
		réseau domestique ³	ND	4-18-23	34-33-42	38-41-27
		onnection sur des conduites en fonte ductile)				

¹ Eau non désinfectée

² Eau chlorée et traitée aux polyphosphates

³ Eau traitée au bioxyde de chlore

Suivant les populations, les γ -Protéobactéries représentent soit une population minoritaire (<5%) (Kalmbach *et al.*, 1997a), soit une sous-population atteignant 10 à 40 % des cellules totales (Schwartz *et al.*, 1997 et 1998 ; Obst *et al.*, 2000). Ces différences pourraient être liées à l'âge des biofilms étudiés ainsi qu'aux conditions d'études (Figure II.22). Kalmbach (1998) a montré que lors des premières semaines, le développement du biofilm se traduit par des changements progressifs dans les groupes taxonomiques qui dominent le biofilm. La composition d'un biofilm développé en conditions de bout de réseau est dominé par les γ -Protéobactéries lors des dix premiers jours son installation.

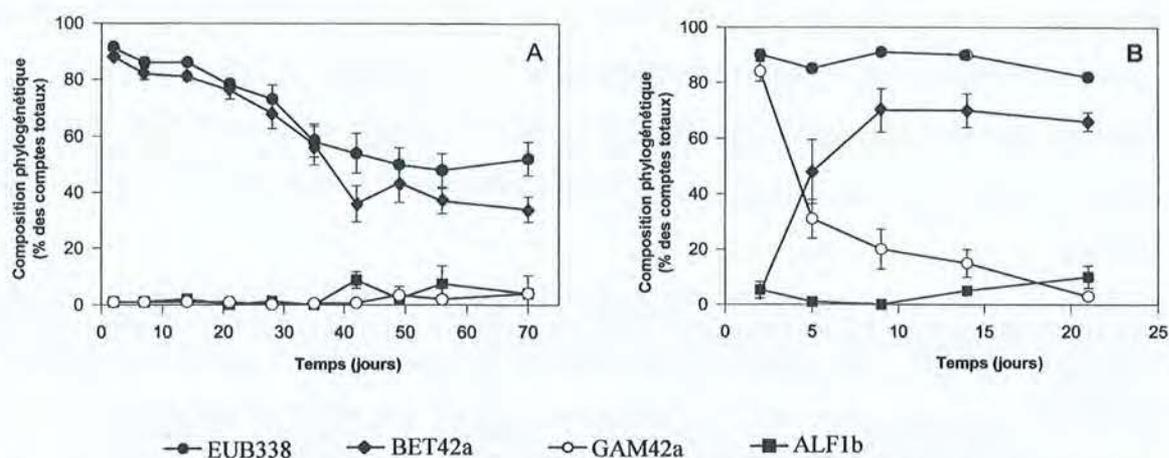


Figure II.22 : Composition phylogénétique d'un biofilm développé dans des Robin device en PE-LD. A : Connexion sur une canalisation d'eau potable (Berlin) fréquemment utilisée. B : Connexion à une canalisation d'eau potable en cul-de-sac. EUB338 : sonde phylogénétique pour l'ensemble des bactéries, BET42a : sonde phylogénétique pour les bactéries du groupe des β -Protéobactéries, GAM42a : sonde phylogénétique pour les bactéries du groupe des γ -Protéobactéries, ALF1b : sonde phylogénétique pour les bactéries du groupe des α -Protéobactéries (Kalmbach, 1998).

Par ailleurs, de nombreux biofilms âgés de quelques jours présentent une part plus importante de bactéries appartenant aux γ -Protéobactéries (Schwartz *et al.*, 1998) que des biofilms plus âgés (Kalmbach, 1998).

II.2.4.4 Comparaison phylogénétique des bactéries sessiles et des bactéries en suspension

Peu d'études ont comparé la composition des populations libres et fixées (Norton et LeChevallier, 2000 ; Kalmbach *et al.*, 1997).

Norton et LeChevallier (2000) ont observé que les populations libres dans un environnement désinfecté au chlore contenait une majorité de bactéries Gram-positives, tandis qu'à l'inverse, le biofilm contenait une majorité de bactéries Gram-négatives. Les auteurs suggèrent que (i) des différences dans les capacités d'attachement des bactéries Gram-positives et Gram-négatives ainsi que (ii) une pression sélective exercée par la désinfection sur la population suspendue, pourraient causer les différences entre les populations.

De façon plus détaillée, par la méthode FISH, Kalmbach *et al.* (1997a) reportent des résultats de composition des populations d'eau potable libres (Tableau II.9). Ces auteurs dénombrent peu de cellules par marquage au DAPI (%EUB/comptes totaux = 24%) ce qui est similaire aux observations de Manz *et al.* (1993). Ces dénombrements sont inférieurs à ce que les auteurs trouvent dans les biofilms (Tableau II.5). Les auteurs suggèrent que le faible nombre de cellules marquées serait la conséquence d'une faible teneur en ribosomes des bactéries libres. Poulsen *et al.* (1993) ont en effet montré une corrélation entre l'intensité du signal de fluorescence par FISH et le contenu en ribosome des cellules. Dans le cas de Manz *et al.* (1993), la présence d'un résiduel de monochloramine pourrait induire une faible activité des bactéries.

Cependant dans le cas de Kalmbach *et al.* (1997a), les eaux ne contiennent aucun désinfectant. Kalmbach observe une plus importante proportion de la population fixée composée de β -Protéobactéries que dans la population libre. Les auteurs suggèrent, sans toutefois le démontrer, que les β -Protéobactéries auraient une plus grande facilité à s'attacher que les autres classes bactériennes.

Tableau II.9: composition phylogénétique de populations libres étudiées par FISH, exprimée en pourcentage des dénombrements totaux, effectués par marquage au DAPI. EUB338 : sonde ciblant toutes les bactéries ; ALF1b : sonde ciblant les α -Protéobactéries ; BET42a : sonde ciblant les β -Protéobactéries ; GAM42a : sonde ciblant les γ -Protéobactéries.

Référence	EUB338	ALF1b	BET42a	GAM42a
Kalmbach <i>et al.</i> (1997a) ¹	23%	4	15	1
Manz <i>et al.</i> (1993) ²	37	ND	ND	ND

¹ eau potable non désinfectée, prélevée dans une habitation

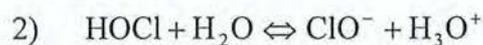
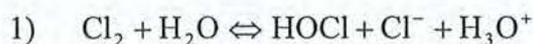
² eau potable désinfection à la monochloramine

II.3 Désinfection par le chlore et la monochloramine

La désinfection dans le réseau de distribution est établie à la sortie de l'usine de traitement (post désinfection), avec parfois une rechloration au niveau du réseau. Le chlore, le désinfectant le plus répandu, présente une réactivité avec de nombreux composés chimiques présents dans l'eau ce qui peut entraîner la formation de sous-produits de chloration tels que les trihalométhanes (Singer et Chang, 1989), augmenter le taux de corrosion (Kirmeyer et Logsdon, 1983 ; Snoeyink et Wagner, 1996 ; Vik *et al.*, 1996), ou conduire à une dégradation de la saveur de l'eau (Astier, 1996). La monochloramine permet de s'affranchir de certains problèmes dus à la réactivité du chlore, tout en permettant en général de limiter la recroissance dans le réseau. Par comparaison au chlore, les chloramines induisent une formation négligeable de sous-produits de désinfection et une plus faible production de goûts et odeurs chloreux (Neden *et al.*, 1992 ; Kirmeyer *et al.*, 1993). De plus, la monochloramine étant moins réactive que le chlore, le résiduel de désinfectant obtenu est plus stable (Neden *al.*, 1992 ; Thogersen et Dahi, 1996). Cependant, au pH de l'eau, la monochloramine est naturellement instable et tend à s'autodégrader (Vikesland *et al.*, 2001).

II.3.1 Chimie du chlore

Parmi les espèces de chlore, le chlore gazeux (Cl_2), l'hypochlorite (OCl^-) et l'acide hypochloreux (HOCl) forment le chlore libre :



La constante d'équilibre de la réaction 1) varie de $1,5 \cdot 10^{-4}$ à $4 \cdot 10^{-4} \text{ mol}^2 \text{ L}^{-2}$ et celle d'acidité de la réaction 2) de $1,6 \cdot 10^{-8}$ à $3,2 \cdot 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ entre 0 et 25°C (Hureiki, 1993).

Le pH détermine les concentrations relatives entre les espèces (Kirmeyer *et al.*, 1993). En milieu aqueux ayant un pH proche de la neutralité, l'acide hypochloreux et l'anion hypochlorite sont les espèces les plus représentées. Leur pouvoir oxydant est assez important, comparativement aux autres espèces chlorées (Tableau II.7). Bien qu'une corrélation entre l'efficacité de désinfection et le potentiel d'oxydoréduction existe dans de nombreux cas, ils ne sont pas directement reliés (Block, 1982). Garnerone *et al.* (1982) ainsi que Haas et Engelbrecht (1980) suggèrent plutôt que la plus grande efficacité de HOCl par rapport à ClO^- serait liée à la plus grande capacité des espèces non dissociées à traverser la membrane des cellules bactériennes. Les cellules bactériennes étant globalement chargées négativement un pH voisin de la neutralité, la charge négative d'une molécule limiterait son entrée dans les cellules.

Tableau II.10 : Potentiels standards d'électrode (E°) de quelques désinfectants. (Kirmeyer *et al.*, 1993)

Désinfectants	Formules brutes	E° (V) à 25°C
Ozone	O_3	2.07
Peroxide d'hydrogène	H_2O_2	1.78
Dioxyde de chlore	ClO_2	1.71
Permanganate	MnO_4^-	1.68
Acide hypochloreux	HOCl	1.49
Hypochlorite	ClO^-	0.90
Dichloramine	NHCl_2	0.79
Monochloramine	NH_2Cl	0.75

II.3.1.1 Demande en chlore

L'estimation de la réaction du chlore avec un composé est effectuée par une réaction de demande en chlore (APHA, 1998, méthode 2350B). La demande en chlore est établie après un temps de réaction déterminée entre le chlore et la substance chimique testée. Elle correspond alors à la différence entre la quantité de chlore appliquée initialement et le chlore résiduel. Le modèle cinétique (Figure II.23) de consommation du chlore développé par Jadas-Hécart (1989) divise la courbe de consommation du chlore en deux phases (Dossier-Berne, 1994) :

- Une première phase de consommation rapide sur 4 heures, appelée demande initiale.
- Une phase de consommation lente s'étalant sur plusieurs centaines d'heures appelée consommation à long terme.

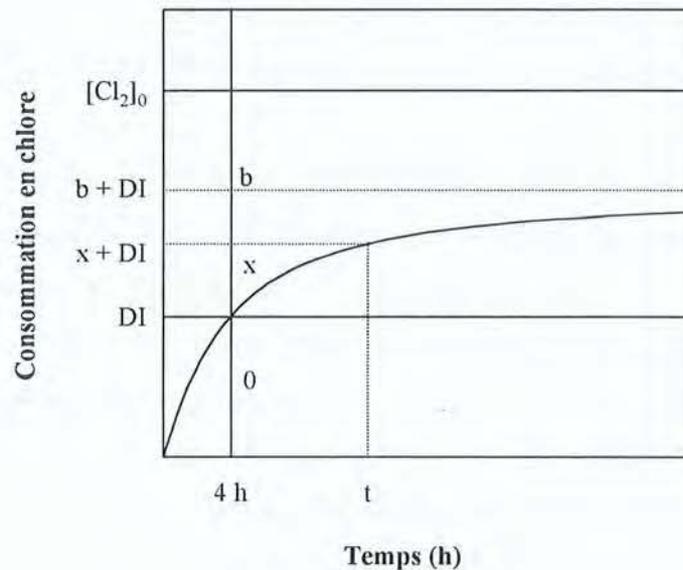
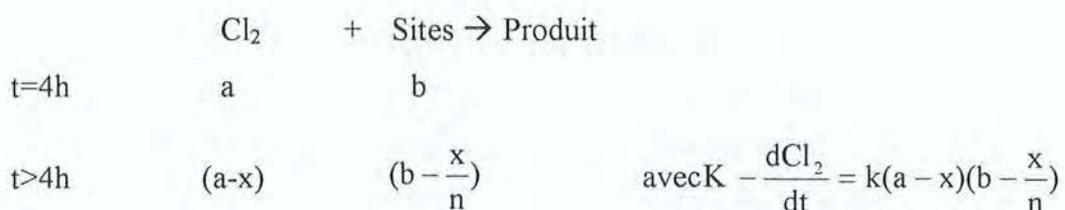


Figure II.23 : Interprétation schématique de la demande en chlore (Jadas-Hécart, 1989).

Jadas-Hécart (1989) a montré que la vitesse de dégradation du chlore lors de la deuxième phase, après la demande initiale, peut être exprimée par une loi cinétique de second ordre (ordre 1 par rapport au substrat, ordre 1 par rapport au chlore) à partir de la réaction :



Où k représente la constante cinétique apparente de la réaction,
 a , la concentration résiduelle en chlore à $t=4$ h,
 x , la consommation en chlore à partir de $t=4$ h et
 n , la stoechiométrie de la réaction à partir de $t=4$ h.

Le paramètre b est la concentration en sites réactifs à $t=4$ heures, ou encore le potentiel de demande à long terme, c'est-à-dire la valeur de l'asymptote vers laquelle tend la consommation à long terme (Dossier-Berne, 1994). On peut ainsi définir le potentiel total de demande en chlore à long terme, ou demande totale à long terme, comme étant la somme $(b+DI)$ (Dossier-Berne, 1994). Cependant Jadas-Hécart (1989) remarque que les courbes de demande en chlore des eaux n'atteignent jamais un plateau véritable même après 250 heures de chloration.

II.3.1.2 Maintien du résiduel de chlore et réactivité

Le résiduel de chlore décroît tout au long de son séjour dans un réseau d'eau potable en fonction de la réaction du chlore avec les parois, les produits de corrosion, le biofilm (Parent *et al.*, 1996b ; Grayman *et al.*, 2000) et également avec les composés présents dans l'eau circulante (Grayman *et al.*, 2000) tels que des composés inorganiques (le fer, les bromures, les sulfures, le manganèse, les nitrites et l'azote ammoniacal) et organiques (acides aminés, protéines, substances humiques, etc.) (Doré, 1989). Le chlore ne réagit pas avec toutes les substances organiques ; compte tenu du pouvoir oxydant de HOCl et OCl⁻ et de la structure polarisée de la liaison Cl-O suivant, suivant Cl^{δ+}-O^{δ-} (Doré, 1989), le chlore libre réagit par :

- oxydation des fonctions réductrices
- addition au niveau de liaisons insaturées
- substitutions électrophiles sur les sites nucléophiles.

En conséquence, les plus fortes consommations en chlore sont observées par des composés présentant des fonctions sulfhydryle, hydroxyle, azotée ou encore un cycle aromatique (De Laat *et al.*, 1982 ; Doré, 1989 ; Hureiki, 1993) notamment, les acides nucléiques (Gould *et al.*, 1984a et 1984b ; Dossier-Berne, 1994), les nucléotides (Dennis *et al.*, 1979 ; Prutz, 1998 ; Jacangelo and Olivieri, 1985 ; Doré, 1989) et les acides aminés (Jadas-Hécart, 1989).

Le chlore est relativement inerte vis-à-vis des composés aliphatiques tels que les lipides, les alcanes et les hydrates de carbone (dont font partis les saccharides) (Baum et Morris, 1978 ; Crane *et al.*, 1980 ; LeChevallier, 1988b ; Jadas-Hécart, 1989). Jadas-Hécart (1989) suggère que, parmi les composés aliphatiques, le chlore réagit principalement avec les composés où deux groupements oxygénés attracteurs d'électrons cumulent leurs effets inductifs sur un même carbone (ex : les acides malonique, pyruvique, citrique ou encore l'acétylacétone). Les demandes en chlores ne sont pas significatives concernant le xylose, le dextrose, l'arabinose, le fructose et le mannose (Baum et Morris ; 1978).

Chen et Stewart (1996) ont montré que le chlore réagissait avec un « biofilm » artificiel d'agarose (-[D-galactose-3,6 Anhydro-L Galactose]_n-) suivant une constante cinétique de deux ordres de magnitude inférieure à la constante cinétique du même biofilm artificiel contenant des cellules de *Pseudomonas aeruginosa*.

II.3.1.2.a Les acides aminés

Les acides aminés ainsi que les amines en général exercent une consommation en chlore importante (Tableau II.11). Cette réactivité conduit rapidement à la formation de chloramines organiques, plus stables que les chloramines minérales (Hureiki, 1993). Les cinétiques de réactions du chlore avec les acides aminés sont relativement rapides, dans les conditions de

chloration appliquées par El Morer (1992) (3,5 à 3,8 mg Cl₂ L⁻¹, 1 à 1,5 mg L⁻¹ en acide aminé initial, pH=8, 20°C). (Tableau II.12)

Tableau II.12 : Constantes cinétiques apparentes des demandes en chlore des acides aminés à 1 mg L⁻¹ obtenus par El Morer (1992).

Acides aminés	k (M ⁻¹ s ⁻¹)
Alanine	13,4
Acide Glutamique	15,4
Lysine	12,6
Tyrosine	18,8

II.3.1.2.b Les protéines

En conséquence de la réaction du chlore avec les acides aminés, les protéines présentent également une demande en chlore (Jadas-Hécart ; 1989 ; Hureiki, 1993) (Tableau II.13). La réactivité des protéines dépend des acides aminés constitutifs (Hureiki, 1993).

El Morer (1992) a montré que les vitesses de demande en chlore des polypeptides et protéines sont beaucoup plus faibles que celle des acides aminés libres (Tableau II.11 et II.12).

Les constantes cinétiques de réaction des polypeptides et des protéines avec le chlore montrent que ceux-ci réagissent environ cent fois moins vite que les acides aminés libres. Du fait de la faible vitesse de réaction des polypeptides et des protéines, seule la demande en chlore à long terme peut être prise en compte (Hureiki, 1993). Les demandes en chlore à long terme des polypeptides et des protéines sont considérées comme suivant une loi de second ordre (ordre 1 par rapport au chlore, ordre 1 par rapport aux sites).

Tableau II.13 : Constantes cinétiques apparentes de la demande en chlore à long terme de quelques peptides et protéines, d'après El Morer (1992).

Polypeptides et protéines	Albumine (Sérum de bœuf)	Histone II	Histone IV	Protamine sulfate	Ala-gly- sér-glu	Arg-lys-glu- val-tyr
k (M ⁻¹ s ⁻¹)	0,12	0,05	0,04	0,03	0,17	0,22

Globalement, la demande en chlore à long terme (5 à 16 jours) des polypeptides et protéines sont de l'ordre de 3 à 8 mg Cl₂ mg C⁻¹ (Scully *et al.*, 1988 ; Jadas-Hécart, 1989 ; El Morer, 1992) (Tableau II.13). La comparaison des demandes en chlore des acides aminés libres (Tableau II.8) et des polypeptides/protéines (Tableau II.14) pour des courts temps de chloration met en évidence la faible réactivité à court terme de la liaison peptidique. À titre d'exemple, Madec *et al.* (1985) montrent que la demande en chlore initiale du polypeptide ala-ala-ala-ala atteint 0,43 mg mgC⁻¹ alors que celle de l'alanine seule est de 4 mg mg C⁻¹.

Tableau II.11 : Demande en chlore de quelques acides aminés (Adapté de Hureiki, 1993).

Acides aminés	pH	T°C	Temps de contact (heures)	Cl ₂ appliqué ¹		Cl ₂ consommé ²		Références
				mol/mol	mg/mg C	mol/mol	mg/mgC	
α-Alanine	8	20	72	8	15,7	2,8	5,5	Hureiki, 1993
	7	20	2/4	3,8	7,4	2,2	4,3	LeCloirec-Renaud, 1984
	7	20	15	20	39,4	2	3,9	Doré, 1989
	4 à 9	25	4	4	7,9	2	3,9	Benoufella <i>et al.</i> , 1990
		20	4	3,8	7,4	3,1	6,1	Alouini <i>et al.</i> , 1986
	8	20	4	4,4	8,7	2	3,9	El Morer, 1992
	7,2	nd	1	1,8	3,5	1,4	2,8	Murphy <i>et al.</i> , 1975
8,1	20	20 min	4	7,9	2	3,9	Madec <i>et al.</i> , 1985	
β-Alanine	8	20	72	8	15,7	2,8	5,5	Hureiki, 1993
	7	20	30 min	2,5	5,0	1,9	3,7	LeCloirec-Renaud, 1984
Glycine	8	20	72	8	23,7	5,6	16,5	Hureiki, 1993
	8,1	20	20 min	4	11,9,5	2,3	6,9	Madec <i>et al.</i> 1985
Valine	8	20	72	8	9,5	2,7	3,2	Hureiki, 1993
	4 à 9	25	4	4	4,7	2	2,4	Benoufella <i>et al.</i> 1990
Sérine	8	20	72	8	15,6	5,3	10,4	Hureiki, 1993
	4 à 9	25	4	4	7,9	2	3,9	Benoufella <i>et al.</i> 1990
	8,1	20	20 min	4	7,9	2,5	5,0	Madec <i>et al.</i> , 1985
Méthionine	8	20	72	8	9,44	6	7,1	Hureiki, 1993
	7	20	15	20	23,6	5	5,9	Doré, 1989
	8,1	20	20 min	4	4,7	2,3	2,8	Madec <i>et al.</i> , 1985
Acide glutamique	8	20	72	8	9,4	2,4	2,8	Hureiki, 1993
	8	20	4	7,9	9,3	2,0	2,4	El Morer, 1992
Acide aspartique	8	20	72	8	10,3	5,5	8,1	Hureiki, 1993
	6,4	nd	2h42	6,2	9,1	4,8	7,0	Trehy <i>et al.</i> , 1986
	8,1	20	20 min	4	5,9	2,1	3,0	Madec <i>et al.</i> , 1985
Lysine	8	20	72	8	7,8	3,8	3,7	Hureiki, 1993
	8	20	4	7,2	7,1	3,8	3,7	El Morer, 1992
Histidine	8	20	72	15	14,8	12	11,9	Hureiki, 1993
	nd	20	24	3,1	3,1	2,9	6,3	Alouini, 1986
	7,2	nd	2	1,8	1,7	1,7	1,6	Murphy <i>et al.</i> , 1975
Arginine	8	20	72	15	14,8	8,2	8,1	Hureiki, 1993
Phénylalanine	8	20	72	8	5,2	2,7	1,8	Hureiki, 1993
	nd	20	24	7,7	5,1	6,5	4,2	Alouini <i>et al.</i> , 1986
	7	20	15	20	13,1	2	1,3	Doré, 1989
	7	20	2	3,7	2,4	2,8	1,8	Le Cloirec-Renaud, 1984
	8,1	20	20 min	4	2,6	2,1	1,4	Madec <i>et al.</i> , 1985
Tyrosine	8	20	72	15	9,8	13,4	8,8	Hureiki, 1993
	7	20	15	20	13,14	11,4	7,49	Doré, 1989
	nd	20	24	7,04	4,63	6,94	4,56	Alouini, 1987
	8	20	4	9,70	6,37	6,05	3,97	El Morer, 1992
	8,1	20	20 min	4	2,63	3,78	2,48	Madec <i>et al.</i> , 1985
Tryptophane	8	20	72	20	10,7	16	8,5	Hureiki, 1993
	7,5	nd	7	20	10,7	16,25	8,73	Morris et Baum, 1978
Proline	8	20	72	8	9,4	5,4	6,3	Hureiki, 1993
	6,6 à 11	nd	25	16,5	19,5	14,95	17,68	Morris et Baum, 1978

¹Quantité de chlore appliqué (en moles) par mole de réactifs testés.²Quantité de chlore consommé (en mole) par mole de réactifs testés.

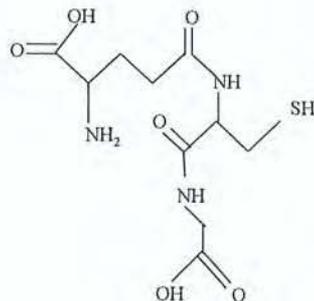
Tableau II.14 : Exemples de la demande en chlore de quelques peptides et protéines (Hureiki, 1993).

Polypeptides Protéines	pH	T°C	Temps de contact (heures)	Cl ₂ appliqué		Cl ₂ consommé		Références
				mol/mol	mg/mg C	mol/mol	mg/mg C	
Gly-gly-ala	6,2	Ambiante	24	1,7/3,4	1,43/2,85	0,7/2,6	0,5/2,2	Horth, 1989
Gly-phé	6,2	Ambiante	24	6,9/16,7	3,7/9,0	2,4/4,6	1,3/2,5	Horth, 1989
Phé-gly	6,2	Ambiante	24	6,7/16,8	3,6/9,1	1,6/3,8	0,8/2,1	Horth, 1989
Ala-gly-sér-glu	8	20	72	11,6	5,2	7,8	3,4	Hureiki, 1993
	8	20	LT	35,7/17,8	16,5/8,3	7,7/8,7	3,6/4,0	El Morer, 1992
Arg-lys-glu-val-tyr	8	20	72	31,2	5,4	20,6	3,6	Hureiki, 1993
	78	20	LT	80,7/40,3	14,05/7,0	16,7/18,0	2,9/3,1	El Morer, 1992
Ala-ala-ala-ala	8,1	20	20 min	8	3,9	0,9	0,4	Madec <i>et al.</i> , 1985
Albumine de sérum de bœuf	6,2	Ambiante	24	1826/4525	4,4/11,0	530/1415	1,3/3,4	Horth, 1989
	7	20	96	4988	11,9	3437	8,2	Scully <i>et al.</i> , 1988
	7	20	120	4525/4627	11/11,4	3118/3532	7,6/8,6	Scully <i>et al.</i> , 1988
	88	20	LT	14055	307	2844	6,2	Jadas-Hécart, 1989
Histone H.S (Thymus de veau)	8	20	LT	1014	8,0	766	6,1	El Morer, 1992
Histine IV.S (Thymus de veau)	8	20	72	472	6	269	3,1	Hureiki, 1993
	8	20	LT	710	8,1	501	5,7	El Morer, 1992

LT : demande à long terme établie par modèle mathématique

Cependant, à long terme, la demande en chlore des peptides et protéines est de l'ordre de grandeur de celle des acides aminés libres. D'après Scully *et al.* (1988), la cinétique plus lente de réaction du chlore avec les peptides serait due à la résistance de la liaison peptidique à la chloration, seul le groupement NH₂ terminal réagissant. Bierer et Trehy (1983) suggèrent que le mécanisme de réaction d'un peptide avec le chlore correspondrait à une dégradation par étape avec réaction de substitution sur le groupement NH₂ terminale.

Il est notable que les polypeptides bactériens identifiés comme ayant un rôle dans les systèmes de défense à la chloration possèdent des caractéristiques leurs permettant de réagir rapidement avec le chlore ; le glutathion (Figure II.24), notamment est un polypeptide court (tripeptide γ -glutamylcystéineglycine) possédant un groupement sulfhydryle (Saby, 1999).

Figure II.24 : Structure du glutathion (Awashi *et al.*, 2000).

Sans présenter un nombre de liaisons peptidiques important, sa structure lui permet de réagir rapidement par le groupement NH_2 terminal et surtout d'utiliser le groupement SH (suivant $2\text{GSH} + \text{Cl}_2 \rightarrow \text{GSSG} + 2\text{HCl}$).

II.3.1.2.c Les substances humiques

Enfin, le chlore réagit également fortement avec des substances humiques (De Laat *et al.*, 1982 ; Legube *et al.*, 1990). Croué (1987) indique que, quelle que soit l'origine des substances humiques, leurs demandes en chlore sont du même ordre de grandeur. Legube *et al.* (1990) mesurent un potentiel de consommation de chlore de 1 à 1,8 $\text{mg Cl}_2 \text{ mg C}^{-1}$ selon l'origine de la substance testée. Noack et Doerr (1978) suggèrent une réaction suivant :

$$-\frac{d[\text{Cl}_2]}{dt} = k_1[\text{Cl}_2] + k_2[\text{Cl}_2][\text{X}]$$

À partir de ce modèle, Noack et Doerr ont obtenu diverses valeurs pour k_1 et k_2 , en fonction du pH (Tableau II.15). Cependant, les acides humiques commerciaux utilisés par Noack et Doerr présentent des caractéristiques différentes de celles des acides humiques présents dans les eaux potables.

Tableau II.15 : Constantes cinétiques de la réaction du chlore avec des acides humiques Aldrich à 5mg/L à 25 °C (Noack et Doerr, 1978)

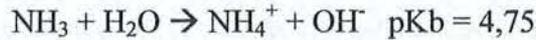
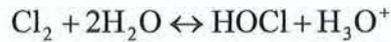
pH	k_1 ($\text{s}^{-1} \text{ min}^{-1}$)	k_2 ($\text{M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)
6	$1,29 \cdot 10^{-6}$	2,4
7	$9,38 \cdot 10^{-7}$	1,8
9,5	$1,14 \cdot 10^{-6}$	0,8

II.3.2 Chimie de la monochloramine

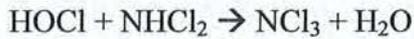
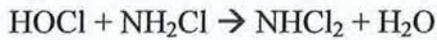
La monochloramine est utilisée depuis 1916 pour la désinfection de l'eau potable (Dice, 1985), initialement pour contrôler les problèmes de goûts et odeurs (EPA, 1999). Couramment utilisée pendant les années 30 et 40, la pénurie sur l'ammoniaque pendant la seconde guerre mondiale a conduit au déclin de sa popularité en tant que désinfectant (EPA, 1999). Comparativement au chlore, peu d'études ont été menées pour connaître le mode d'action de la monochloramine et sa réactivité. L'idée la plus répandue est que la monochloramine agit suivant les mêmes mécanismes que le chlore ; Baudry (1984) suggère que l'activité bactéricide de la monochloramine serait engendrée par la libération progressive d'acide hypochloreux, par hydrolyse. Cependant, les quelques travaux menés sur la réactivité de la monochloramine mettent en évidence des différences notables avec la réactivité du chlore (Ingols, 1953 ; Jacangelo et Olivieri, 1985, Suzuki *et al.*, 1998).

II.3.2.1 Formation de la monochloramine

La monochloramine est formée par réaction entre le chlore et l'ammoniaque (Valentine *et al.*, 1998) :



La réaction de formation de la monochloramine est en compétition avec d'autres réactions conduisant à la formation de dichloramine (NHCl_2) ou trichloramine (NCl_3). En solution aqueuse, le chlore réagit avec l'ammonium suivant une série de réactions bimoléculaires pour former des chloramines inorganiques :



Le pH de la solution (Figure II.25) ainsi que les rapports stœchiométriques entre chlore et ammoniaque déterminent les molécules prépondérantes dans le milieu (Valentine *et al.*, 1998). La monochloramine est principalement formée lorsque le ratio Cl_2/N est inférieur à 5 : 1, et le pH est au-dessus de pH 7. D'après les calculs de White (1992), le temps nécessaire pour former 99% de monochloramine à partir du chlore est de 0,069s à pH 8,3, 0,2 s à pH = 7, et 147 s à pH = 4.

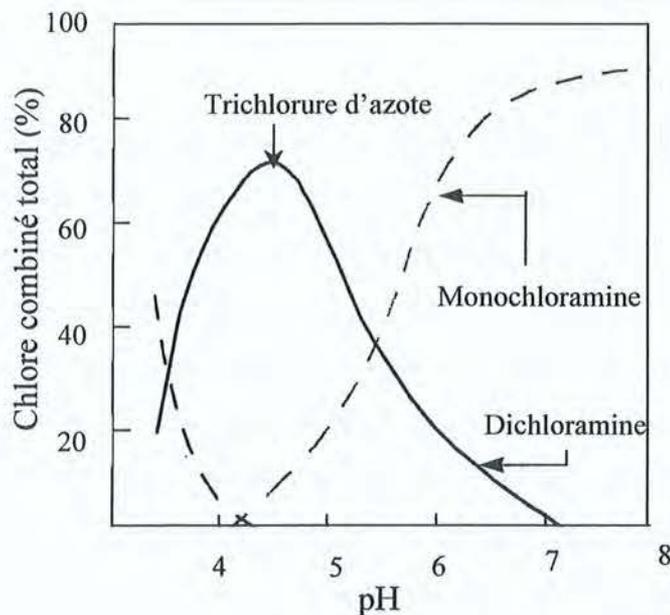
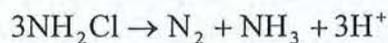


Figure II.25 : Équilibres entre les différentes chloramines en fonction du pH (Valentine *et al.*, 1998).

II.3.2.2 Maintien du résiduel de monochloramine et réactivité

La réactivité de la monochloramine est plus faible que celle du chlore (Lin et Carlson, 1984 ; Jacangelo et Olivieri, 1985 ; Hureiki, 1993), ce qui permet au résiduel de désinfectant obtenu d'être plus stable (Wolfe *et al.*, 1984 ; Neden *al.*, 1992 ; Thogersen et Dahi, 1996). Thogersen et Dahi (1996) ont obtenu, pour une eau de distribution, des constantes cinétiques de consommation du chlore et de la monochloramine de $2,25 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ et $0,036 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ respectivement.

Le résiduel de monochloramine tend à diminuer en fonction des équilibres avec les autres formes de chloramines. La force ionique, le temps de résidence, le pH, les composés inorganiques (phosphates, silicates, carbonates, nitrite et le fer) et la matière organique naturelle influencent les équilibres entre les différentes chloramines et peuvent accélérer la décroissance du résiduel de monochloramine (Vikesland *et al.*, 1998 et 2001 ; Odell et Ireland, 1999). Ainsi, l'acide acétique, les bromures et les nitrites catalysent la dégradation de la monochloramine (Valentine *et al.*, 1998). Les phosphates peuvent catalyser la réaction de d'auto-dégradation de la monochloramine, uniquement lorsque l'ammonium est en excès (Odell et Ireland, 1999). L'effet principal de la décomposition est d'engendrer une augmentation de la teneur en ammoniacque des eaux suivant la réaction :



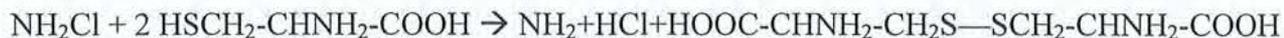
En conséquence, l'utilisation de la monochloramine comme désinfectant peut entraîner des problèmes de nitrification dans les réseaux lorsque la teneur en azote ammoniacal résiduel est trop élevée (Skadsen, 1993 ; EPA, 1999).

Valentine (1998) suggère également que des réactions d'oxydation de l'ammonium et/ou de réduction du chlore peuvent conduire à une diminution de la teneur en monochloramine.

II.3.2.2.a Les acides aminés, peptides et protéines

La plupart des acides aminés sont consommateurs de monochloramine (Jacangelo et Olivieri, 1985 ; LeChevallier *et al.*, 1988a), particulièrement le tryptophane et les acides aminés contenant des groupements sulfhydryles (Jacangelo et Olivieri, 1985) (Tableau II.17). Jacangelo et Olivieri (1985) ont observé que la plupart engendre une consommation >80% de la monochloramine en 3 heures pour un ratio molaire acide aminé/ NH_2Cl de 5/1. Seule, la glycine réagit très peu, ne consommant que 6% de la monochloramine, en 3h (Jacangelo et Olivieri, 1985). Peu d'informations existent quant aux produits formés par réaction de la monochloramine sur les acides aminés. Ingols (1953) a observé que l'exposition de la tyrosine à la monochloramine engendre la formation de composés organochloraminés et que la

monochloramine oxyde les groupes sulfhydryls de la cystéine, suivant une réaction réversible qui conduit à la formation de cystine par ponts disulfides :



II.3.2.2.b Les acides nucléiques et le matériel génétique

Jacangelo et Olivieri (1985) ont mis en évidence que les constituants du matériel génétique consomment moins de monochloramine que les aminoacides (Tableau II.17). La monochloramine ne dégrade pas les cycles des bases purique et pyrimidique dans les acides nucléiques (Jacangelo et Olivieri, 1985) contrairement au chlore. Elle agit principalement par coupure ou scission des acides nucléiques conduisant à des mutations génétiques (Jacangelo et Olivieri, 1985 ; Suzuki *et al.*, 1998).

II.3.2.2.c Les substances humiques

La plupart des données cinétiques de réaction de la monochloramine avec la matière organique concerne les substances humiques. Ainsi, Valentine *et al.* (1998) observent une augmentation de la vitesse de décomposition de la monochloramine, suite à une addition de substances humiques (Tableau II.16). Cependant, la cinétique globale de décomposition de la monochloramine en présence de substances humiques reste moins rapide que la cinétique de consommation du chlore (Noack et Doerr, 1978) : avec 5 mg/L d'acides humiques à un pH entre 6 et 7, la valeur de la constante cinétique apparente de réaction est près de 10 fois plus faible avec la monochloramine qu'avec le chlore (Tableau II.14).

*Tableau II.16 : Constantes cinétiques apparentes des cinétiques de second ordre de décomposition de la monochloramine à long terme (145 heures) et moyen terme (25h) en fonction de la concentration en substances humiques ajoutées. Essais à 25 °C, avec un ratio molaire Cl/N de 0,7 (Valentine *et al.*, 1998).*

Origines des substances humiques	Quantité ajoutée (mg C/L)	pH	Constantes (M ⁻¹ s ⁻¹)	
			pour 145h de cinétique	pour 25h de cinétique
Acides Humiques Aldrich	0	6,55/7,6	0,14/0,020	0,13/0,021
	0,33	6,55/7,6	0,12/0,019	0,12/0,031
	1,7	6,55/7,6	0,15/0,030	0,14/0,048
	3,3	6,55/7,6	0,20/0,043	0,16/0,057
	5,0	6,55	0,34	0,21
Acides Fulviques Rivière Suwanee	0	6,55/7,6	0,14/0,019	0,13/0,021
	1	6,55/7,6	0,13/0,029	0,12/0,033
	5	6,55/7,6	0,15/0,043	0,15/0,069

Tableau II.17 : Pourcentage de consommation de la monochloramine par les acides aminés et les acides nucléiques à différents temps de réactions, à 23 °C et à pH 7 et pour un ratio entre monochloramine et substance testée de 5 :1. Les concentrations initiales en monochloramine se situe vers (1,7 à 2,4) 10⁻⁴M. (Jacangelo et Olivieri, 1985).

		Temps de contact		
		2 min	180 min	300 min
Acides aminés	Alanine	0	86	ND
	Cystine	100	100	ND
	Phénylalanine	2	96	ND
	Tyrosine	10	100	ND
	Cystéine	100	100	ND
	Isoleucine	3	99	ND
	Sérine	6	98	ND
	Glycine	0	6	ND
	Thréonine	10	82	ND
	Histidine	11	100	ND
	Acide aspartique	8	100	ND
	Acide Glutamique	0	99	ND
	Tryptophane	100	100	ND
	Valine	2	93	ND
	Lysine	3	100	ND
	Glutamine	3	97	ND
	Arginine	8	98	ND
	Asparagine	2	100	ND
	Proline	2	90	ND
	Méthionine	100	100	ND
Leucine	13	95	ND	
Acides nucléiques	ADN	0	43	76
	ARN	1	57	60
Nucléotides	AMP	ND	ND	6
	GMP	ND	ND	10
	CMP	ND	ND	6
	UMP	ND	ND	0
	TMP	ND	ND	0
Nucléosides	Adénosine	ND	ND	0
	Guanosine	ND	ND	21
	Cytidine	ND	ND	4
	Uridine	ND	ND	17
	Thymidine	ND	ND	8
Bases puriques et pyrimidiques	Adénine	ND	ND	60
	Guanine	ND	ND	ND
	Cytosine	ND	ND	52
	Uracil	ND	ND	47
	Thymine	ND	ND	22
Sucres et phosphate	Ribose	ND	ND	0
	Désoxyribose	ND	ND	0
	Phosphate	ND	ND	0

II.3.3 Efficacité de désinfection

L'application de désinfectant est ajustée afin de satisfaire deux objectifs : (i) limiter la formation de produits organochlorés et (ii) limiter la croissance bactérienne dans le réseau. La limitation de la croissance bactérienne est déterminée par l'efficacité de désinfection. Celle-ci est estimée par des mesures des densités bactériennes. En fonction de l'activité bactérienne suivie (cultivabilité, respiration etc.), l'estimation de l'efficacité de désinfection est très variable (Stewart *et al.*, 1994 ; Lisle *et al.*, 1998). L'efficacité des désinfectants est, le plus couramment, estimée par la décroissance des dénombrements (abattement) de bactéries cultivables sur gélose. Bien que la cultivabilité est reconnue comme une mesure partielle (variable suivant la gélose utilisée, suivant les caractéristiques des eaux, sélective suivant les espèces, etc.), elle reste une mesure de référence.

La notion de CxT effectif (concentration en désinfectant x temps) est importante pour déterminer l'efficacité de désinfection. L'efficacité d'un désinfectant est estimée suivant le temps nécessaire pour atteindre l'abattement souhaité en fonction de la dose de désinfectant appliquée effectivement (c'est-à-dire en prenant en compte la cinétique de disparition du résiduel de désinfectant).

Les différents composés chlorés n'ont pas la même efficacité. L'efficacité supérieure de l'acide hypochloreux par rapport à la monochloramine au niveau des bactéries en suspension a été montrée par plusieurs auteurs (Baudry, 1984 ; LeChevallier *et al.*, 1988a et 1990 ; Berman *et al.*, 1988 ; Donlan et Pipes, 1988 ; Mathieu *et al.*, 1992 ; Kirmeyer *et al.*, 1993). Baudry (1984) observe qu'à 4°C, 3 mg L⁻¹ de monochloramine doivent être appliqués pour supprimer 99% des coliformes fécaux en 30 minutes. Or dans les mêmes conditions (4°C, 30 minutes), l'auteur reporte qu'une application de 0,005 mg L⁻¹ de chlore (HOCl ; pH =6) ou 0,3 mg L⁻¹ de ClO⁻ (pH = 10) suffisent pour engendrer un abattement de coliformes cultivables de 99%.

L'inactivation engendrée par l'application de chlore ou de monochloramine en conditions contrôlées (une souche pure en milieu artificiel) sur des bactéries libres, des virus et des protozoaires en suspension met en évidence la plus grande efficacité du chlore par rapport à la monochloramine pour ces organismes libres (Kirmeyer *et al.*, 1983). Ainsi, en conditions de laboratoire, sur des populations libres, le chlore est plus efficace que la monochloramine car :

- pour une même concentration et une même inactivation, le temps nécessaire est plus court.
- pour un même temps et une même inactivation, les concentrations sont plus faibles
- pour un même CxT, l'inactivation est une plus forte.

En ce qui concerne le biofilm, certaines études montrent la plus grande efficacité du chlore (Bermann *et al.*, 1988 ; Mathieu *et al.*, 1992). Berman *et al.* (1988) ont montré que le temps de réaction nécessaire pour inactiver 99% des coliformes associés à des particules était de 20 à 50

fois plus important avec la monochloramine qu'avec le chlore. Koudjonou *et al.* (1998a et b) ont observé que sur des biofilms développés sur des billes de verre expansé, la monochloramine présentait une efficacité de désinfection graduelle (décroissance progressive suivie sur 12 mois), tandis que le chlore atteignait le maximum de son efficacité plus rapidement, dès le 4^{ème} mois (première mesure effectuée). La monochloramine étant peu réactive, elle peut nécessiter un long temps de contact pour atteindre son efficacité maximale.

Cependant, au contraire, des études mettent en évidence une plus grande efficacité de la monochloramine (LeChevallier *et al.*, 1988a et 1990 ; Chen *et al.*, 1993 ; Griebe *et al.*, 1994). LeChevallier *et al.* (1990) ont observé que 3 à 4 mg L⁻¹ de chlore libre résiduel ne permettent pas de réduire les densités de bactéries cultivables dans un biofilm développé sur des conduites en fonte, tandis que 2 mg L⁻¹ de monochloramine conduisent à une réduction de 3 log dans les mêmes conditions.

Dans l'ensemble, la monochloramine est moins efficace que le chlore au niveau des bactéries libres cependant, son utilisation comme désinfectant secondaire présente des avantages pour la désinfection des biofilms. LeChevallier *et al.* (1988a) évoquent la faible réactivité de la monochloramine avec les polysaccharides, suggérant que cela lui permettrait une plus grande pénétration au sein du biofilm comparativement au chlore, et ainsi une plus forte action désinfectante de la monochloramine. La plus faible réactivité de la monochloramine lui permettrait d'agir même dans des environnements corrodés (Wolfe *et al.*, 1984 ; LeChevallier *et al.*, 1990).

Dans tous les cas, quel que soit le désinfectant employé, le biofilm n'est jamais complètement éradiqué (Tableau II.18).

Tableau II.18 : Exemples de biofilms en présence de désinfectants (chlore* ou monochloramine**) (Adapté de Saby, 1999).

Auteurs	Temp. (°C)	Résiduel de désinfectant (mg Cl ₂ /L)	Densité dans le biofilms		Composition des parois	Système expérimental
			Cultivables (cm ⁻²)	Total (Cellules) (cm ⁻²)		
Donlan et Pipes (1988)	22,8	0,89*	3,7 10 ⁷		fonte	Prélèvements sur le réseau
	4,7	1,20*	1,0 10 ²			
van der Wende <i>et al.</i> (1989)	21	>0,05*	106-10 ⁸		PVC	Réacteurs annulaires
		>0,5*	104-10 ⁵			
Mathieu <i>et al.</i> , 1992	19-23	0,5*	6,7 10 ²	10 ⁵	Ciment	Pilote
		0,56**	5,9 10 ⁴	2 10 ⁶		
Neden <i>et al.</i> , 1992	5-15	0,2-0,5*	3,2-5,7 10 ⁵		Unlined cast iron	Réseau
		>1,0	1,4-1,7 10 ⁵			

Toutefois, des études ont montré que la monochloramine limite davantage l'implantation dans les biofilms de bactéries indésirables tels que *Escherichia coli* (Momba *et al.*, 1999) ou *Legionella* (Kool *et al.*, 1999). De plus, lors de prélèvements en réseau d'eau potable, le nombre d'échantillon positif aux coliformes est significativement plus faible lorsque la monochloramine est le désinfectant secondaire que lorsque le chlore est utilisé (LeChevallier *et al.*, 1996).

II.3.4 Divers Paramètres influençant l'efficacité de désinfection

Les paramètres influençant l'activité bactéricide des désinfectants sont liés d'une part à aux espèces bactériennes présentes et à leur physiologie et d'autres part, aux caractéristiques physicochimiques de l'environnement

Au niveau du biofilm, les paramètres physicochimiques tels que la diffusion du désinfectant dans le biofilm, la nature du support, le temps de contact, la concentration en désinfectant, le pH, la température et la turbidité agissent sur l'efficacité de la désinfection.

En terme bactériologique, les mécanismes d'attachement des bactéries, l'âge du biofilm, les conditions de croissance des bactéries, l'âge cellulaire, et la production de capsules vont engendrer une résistance (Ridgway et Olson, 1982 ; Leyval *et al.*, 1984 ; LeChevallier *et al.*, 1988b).

II.3.4.1 Caractéristiques physicochimiques de l'environnement

Les activités bactéricides du chlore et de la monochloramine varient avec la température, le temps de contact et le pH (Wolfe *et al.*, 1984). Notamment, l'activité bactéricide de la monochloramine est fortement réduite lorsque le pH est élevé et la température basse (Wolfe *et al.*, 1984). À titre d'exemple, Wolfe *et al.* (1984) reportent qu' à 22-25°C, il faut 20 minutes pour obtenir 3 log d'inactivation avec *Enterobacter aerogenes* à pH 7,0, et 60 minutes à pH 8,5. De plus, la température de croissance des bactéries influence leur résistance, le CxT permettant un abattement des populations de 99,99% (CT99,99) étant de 14 et 8 mg min L⁻¹ pour des populations développées à 15 et 23°C respectivement (Stewart et Olson, 1992).

L'efficacité des désinfectants dans les réseaux de distribution est également dépendante du maintien des résiduels. La vitesse de disparition des résiduels est influencée par la température, la composition des eaux et les caractéristiques du réseau notamment, la nature des canalisations. La température va définir la vitesse des réactions. La réactivité des eaux avec les désinfectants est dépendante de sa teneur en composés consommateurs de chlore (organiques et inorganiques) présentés précédemment. La demande en chlore et en monochloramine des parois est dépendante des matériaux qui les composent (Kiéné *et al.*, 1996 ; Frateur *et al.*, 1998 ; Holt *et al.*, 1998) et

de la présence de biofilm (Thogersen et Dahi, 1996 ; Holt *et al.*, 1998). Holt *et al.* (1998) obtiennent le classement suivant des matériaux en fonction de leur demande en désinfectants :

fonte grise ou ductile > fonte ductile bitumée > fonte ductile cimentée > époxy > PVC > polyéthylène.

L'époxy et le PVC consomment de l'ordre de 20 à 130 fois moins de chlore que la fonte grise ou ductile et le polyéthylène 1400 à 34000 fois moins de chlore et de monochloramine (Holt *et al.*, 1998).

Par ailleurs, le chlore réagit avec le biofilm suivant une cinétique de second ordre (Kiéné *et al.*, 1996). Holt *et al.* (1998) ont observé que la présence d'un biofilm de 3 semaines diminue la consommation de désinfectant (chlore et monochloramine) par la fonte ductile tandis la demande en désinfectant des parois en polyéthylène colonisées est plus élevée que celle de parois sans biofilm (Holt *et al.*, 1998).

Dans tous les cas, par rapport au chlore, la monochloramine est moins réactive avec les parois (Holt *et al.*, 1998) et plusieurs études supposent que cela peut justifier la plus grande efficacité de la monochloramine au niveau des bactéries fixées à des surfaces corrodées (Wolfe *et al.*, 1984 ; Berman *et al.*, 1988 ; LeChevallier *et al.*, 1988b et 1990 ; Neden *et al.*, 1992). LeChevallier *et al.* (1990) ont observé qu'un résiduel de 3 mg L⁻¹ (4 mg L⁻¹ appliqués) n'engendre pas de diminution significative du nombre de bactéries cultivables dans le biofilm formé sur des conduites en fonte, tandis que 4 mg L⁻¹ de monochloramine y engendre une diminution de plus de 3 log. Ceci est également soutenu par le fait que, lorsque la corrosion est faible, le chlore peut être plus efficace que la monochloramine même au niveau des biofilms (Camper *et al.*, 1996 et 1997), ce qui a possiblement été observé par Mathieu *et al.* (1992). La plus grande efficacité de la monochloramine dans certains biofilms serait donc liée à sa plus faible réactivité qui lui permettrait d'agir plus dans la profondeur du biofilm (Wolfe *et al.*, 1984 ; LeChevallier *et al.*, 1988b et 1990), tandis que la réactivité du chlore avec la corrosion engendrerait une limitation de son efficacité de désinfection.

II.3.4.2 Désinfectants et réactivité avec le biofilm

Globalement, l'activité bactéricide des désinfectants au niveau du biofilm est très limitée (LeChevallier *et al.*, 1988b ; Mathieu *et al.*, 1992 ; Camper *et al.*, 1997). La limitation du transport des désinfectants vers l'interface eau-surface (DeBeer *et al.*, 1994 ; Morin *et al.*, 1999), la réaction du chlore avec le biofilm (Chen et Stewart, 1996 ; Wai *et al.*, 1998) ainsi qu'avec les matériaux composant les parois (Holt *et al.*, 1998 ; Kiéné *et al.*, 1998) pourraient expliquer à eux seuls la limitation de l'efficacité de désinfection au niveau des biofilms. À titre d'exemple, DeBeer *et al.* (1994) observent que la concentration en chlore à la surface du biofilm est égale à 20 à 30% de celle dans la phase eau, du fait de l'existence de la couche limite. De plus, la

diffusibilité des désinfectants est plus faible dans les biofilms que dans l'eau, d'autant plus que le biofilm présente une forte densité (Brown et Gilbert, 1993). Or en dehors de ces facteurs physicochimiques, la plus grande résistance aux agents antimicrobiens des bactéries fixées par rapport aux bactéries libres a été largement démontrée (Herson *et al.*, 1987 ; Characklis et Marshall, 1990 ; Brown et Gilbert, 1993 ; Costerton *et al.*, 1995 ; Gauthier, 1998 ; Cochran *et al.*, 2000). LeChevallier *et al.* (1988b) ont observé que la résistance à la chloration de *Klebsiella pneumoniae* fixées sur lame de verre peut atteindre 150 fois celles des bactéries libres.

Dans une revue de littérature, Brown et Gilbert (1993) présentent les principales hypothèses justifiant la plus grande résistance des bactéries fixées :

- L'accessibilité des bactéries.
- La réaction de l'agent antimicrobien avec les exopolysaccharides
- La limitation du taux de croissance des bactéries par le manque de nutriment
- Les inductions/dérépressions des gènes associés à la vie sessile

II.3.4.3 Cibles des désinfectants dans les bactéries

Les mécanismes exacts par lesquels le chlore et la monochloramine inactivent les microorganismes ne sont pas complètement connus, notamment en raison des nombreux sites réactifs avec ces désinfectants (Kirmeyer *et al.*, 1993 ; Maris, 1995).

La grande variété de ces cibles du chlore ne permet pas de définir une cible unique comme la clé de l'efficacité de désinfection. Beaucoup d'hypothèses existent, principalement basées sur l'idée que le chlore agirait par attaque de cibles multiples conduisant à la mort cellulaire lorsque suffisamment de cibles ont été atteintes irréversiblement.

Les cibles de la monochloramine sont moins connues que celles du chlore. Elles ont été peu étudiées, d'une part parce que la monochloramine a été longtemps suspectée d'agir par libération progressive de chlore (Baudry, 1984) et d'autre part, parce que le chlore est le désinfectant le plus utilisé.

II.3.4.3.a Les cibles du chlore

Les sites d'action du chlore sur une cellule bactérienne sont nombreux et principalement localisés

- au niveau des membranes (Haas et Engelbrecht, 1980 ; Venkobachar *et al.*, 1977),
- dans le cytoplasme, notamment au niveau de l'ADN (Dukan et Touati, 1996 ; Saby *et al.*, 1997), mais également au niveau des ARN.

Au niveau membranaire, le chlore réagit avec, (i) les protéines (Dossier-Berne *et al.*, 1994), notamment l'ATPase synthase ce qui inhibe la production d'ATP et la respiration (Barette *et al.*, 1989), (ii) les transporteurs d'électron (Albrich *et al.*, 1981), (iii) les acides gras insaturés

(Haas et Engelbrecht, 1980 ; Venkobachar *et al.*, 1977). Cependant, les lipides sont peu réactifs avec le chlore par rapport aux autres classes de molécules (Jadas-Hécart, 1989).

L'action du chlore au niveau membranaire engendre une inhibition de la respiration (Venkobachar *et al.*, 1977 ; Albrich et Hurst, 1982), une augmentation de la perméabilité (Haas et Engelbrecht, 1980 ; Venkobachar *et al.*, 1977) et inhibition de l'ATPase synthétase (Barrette *et al.*, 1989).

En conséquence, des effets du chlore sur les composants membranaires et cytoplasmiques, Yu et McFeters (1994) ont noté que le chlore a des effets sur les mesures globales d'activité bactérienne. Le chlore a un effet plus important sur la cultivabilité que sur l'activité respiratoire mesurée par CTC, l'activité respiratoire étant elle-même plus affectée que le potentiel transmembranaire et le taux de renouvellement des ARN. L'effet du chlore sur la cultivabilité des bactéries, observé lors d'exposition à de faibles CxT ($0,1 \text{ mg h L}^{-1}$), engendre un état physiologique des bactéries connu sous l'appellation « état viable mais non cultivable » (VBNC, viable but non culturable) (McFeters *et al.*, 1995 ; Saby, 1999).

Les cibles de la monochloramine

Au niveau membranaire, Jacangelo *et al.* (1991) ont observé que la monochloramine inhibe les systèmes de transport du glucose et de la méthionine, et dans une moindre mesure ceux du lactose et du glycérol. La monochloramine induit l'inhibition de processus qui mettent en jeu des protéines, tels que la respiration (EPA, 1999). Cependant, étant donné le faible taux d'inactivation, la monochloramine doit agir sur plusieurs sites cellulaires simultanément avant que la cellule ne soit inactivée. L'action de la monochloramine au niveau membranaire engendre une augmentation de la perméabilité (Samrakandi *et al.*, 1997).

Au niveau cytoplasmique, la monochloramine agit sur l'ADN, mais contrairement au chlore, elle procéderait davantage par coupure dans les macromolécules génétiques (ADN et ARN) que par substitution (Ingols *et al.*, 1958 ; Jacangelo et Olivieri, 1985; Suzuki *et al.*, 1998, Shibata *et al.*, 1999).

Ainsi, les cibles du chlore et de la monochloramine sont globalement identiques, cependant les dommages causés peuvent être différents et engendrer ou non une perte de viabilité.

II.3.4.4 Caractéristiques génétiques des bactéries

Étant donné les cibles des désinfectants, les bactéries seront plus ou moins sensibles au chlore et à la monochloramine suivant leur composition (Stewart et Olson, 1992 ; Cochran *et al.*, 2000). La composition des cellules varie d'une part suivant leur phylogénie (génotype) et d'autre part, suivant les conditions environnementales qui déterminent leur état physiologique (phénotype). Par ailleurs, tandis que le génotype définit les moyens de défense disponibles pour

une bactérie donnée, le phénotype de la bactérie définit s'ils sont induits ou à induire (Cochran *et al.*, 2000 ; Saby, 1999). Le génotype et le phénotype de la bactérie influencent donc les cibles que les désinfectants pourront atteindre (Ridgway et Olson, 1982 ; Stewart et Olson, 1992 ; Mir *et al.*, 1997 ; Norton et LeChevallier, 2000) et donc l'efficacité de désinfection.

Le génotype détermine par exemple, la composition fondamentale de l'enveloppe des bactéries. Stewart et Olson (1992) ont mis en évidence qu'entre deux souches de *Klebsiella pneumoniae* étudiées, la souche la plus résistante à la monochloramine contenaient 7 fois plus d'acides gras saturés que d'acides gras insaturés. La souche sensible possédait des teneurs semblables en acides gras saturés et insaturés. Le chlore est connu pour réagir avec les acides gras insaturés (Haas et Engelbrecht, 1980 ; Venkobachar *et al.*, 1977), engendrant une augmentation de la perméabilité (Haas et Engelbrecht, 1980 ; Venkobachar *et al.*, 1977), ce qui pourrait expliquer la résistance accrue de la souche contenant davantage d'acides gras saturés.

Cependant, la distinction entre les résistances engendrées par le génotype et par le phénotype n'est donc pas toujours évidente à faire. Plusieurs études ont mis en évidence que les bactéries Gram-positives sporulées résistent mieux au chlore que les bactéries Gram-négatives à faible concentration (<10mg/L) sur une courte période (de quelques minutes jusqu'à 48 heures de temps de contact) (Ridgway and Olson, 1982 ; Mir *et al.*, 1997 ; Norton and LeChevallier, 2000). La sporulation, bien qu'étant une expression du phénotype, est déterminée par le génotype, toutes les bactéries Gram-positives n'étant pas sporulantes.

À long terme, il peut être supposé que la résistance à la désinfection nécessite l'adaptation des bactéries aux conditions environnementales défavorables (carence, présence d'un oxydant, température) par l'induction de systèmes de défense (Matin, 1991). Or, certaines adaptations phénotypiques sont supposées universelles, permettant d'engendrer une résistance accrue chez toutes les bactéries. Dans les eaux potables, la carence en nutriments (principalement carbonés) est le facteur environnemental principal qui influence la résistance des bactéries à la désinfection. Les bactéries dont la croissance a eu lieu dans un environnement riche en nutriments sont plus sensibles à la désinfection que les bactéries carencées, dont la croissance a eu lieu dans un environnement pauvre en nutriments (LeChevallier *et al.*, 1988b ; Matin, 1991 ; Stewart et Olson, 1992 ; Preez *et al.*, 1995 ; Lisle *et al.*, 1998).

Cependant, les études actuelles portent surtout

- sur les systèmes de défenses de bactéries-modèles (notamment *Escherichia coli*)
- sur les mécanismes induits par certains désinfectants, peroxide d'hydrogène et chlore (Saby, 1999).

Par ailleurs, du fait la complexité des mécanismes de résistance, les connaissances actuelles sont principalement limitées à l'identification des protéines et gènes impliqués ainsi

qu'au mode d'induction des systèmes de résistance. Le mécanisme global, par lequel la résistance bactérienne procède, reste méconnu : les défenses induites limitent l'accès des désinfectants jusqu'aux cibles et/ou détournent les désinfectants des cibles (Koudjonou *et al.*, 1997 et 1998 ; Chesney *et al.*, 1996 ; Lisle *et al.*, 1998 ; Wai *et al.*, 1998 ; Wang et Doyle, 1998 ; Saby *et al.*, 1999 ; Yajima *et al.*, 1999). À titre d'exemples :

- les cellules carencées sont protégées en partie du fait de la modification de la perméabilité membranaire (Lisle *et al.*, 1998 ; Wang et Doyle, 1998).
- le glutathion permet de piéger le chlore (Saby *et al.*, 1999) et la monochloramine (Chesney *et al.*, 1996 ; Yajima *et al.*, 1999) limitant les dommages aux sites vitaux et engendre la mise en place de systèmes de défense (Saby, 1999).
- la synthèse d'exopolymères a également été suggérée comme adaptation des bactéries à la désinfection (Koudjonou *et al.*, 1997 et 1998) et Wai *et al.* (1998) ont montré qu'une souche de *Vibrio cholerae* était plus résistante à la désinfection par H₂O₂ simplement par synthèse d'exopolysaccharides. Costerton (1999) suggère que l'épaisseur du biofilm permet une protection des bactéries et que les exopolymères se comportent comme des résines échangeuses d'anions grâce à leur nature polyanionique, ce qui limite la pénétration des désinfectants anioniques dans le biofilm. Cependant, l'augmentation des synthèses de polysaccharides n'est pas directement déclenchée par la présence du désinfectant, au moins dans le cas de la monochloramine (Cochran *et al.*, 2000), puisque cela n'induit pas le facteur *AlgT* (régulateur des gènes d'expression du phénotype muqueux de *Pseudomonas aeruginosa*). La résistance des bactéries fixées pourrait être en liée à la synthèse d'exopolymères induite par la fixation au support.

Enfin, Cochran *et al.* (2000) ont montré que, chez *Pseudomonas aeruginosa*, le facteur sigma *RpoS* (régulateur des gènes d'adaptation à la phase stationnaire) n'est pas impliqué dans la résistance du biofilm à la monochloramine mais qu'il augmente dans la résistance au chlore. Les mécanismes de résistance au chlore et à la monochloramine présentent donc des différences qui restent à expliciter.

Chapitre III Matériel et Méthodes

III.1 MATÉRIEL	75
III.1.1 Traitements particuliers de la verrerie	75
III.1.2 Réacteurs Rototorque™	75
III.1.3 Solutions de phosphates	77
III.1.4 Réactif pour le dosage des orthophosphates à l'acide ascorbique	78
III.1.5 Solutions de carbone	78
III.1.6 Solutions de désinfectants	79
III.1.7 Échantillons d'eaux de distribution	80
III.1.8 Inoculum de coliformes et préparation des suspensions	81
III.1.9 Géloses pour les dénombrements bactériens	81
III.1.10 Solutions pour les mesures d'AEP	82
III.1.11 Solution de 4',6 diamidino-2-phenylindole (DAPI)	83
III.1.12 Réactifs pour la méthode d'hybridation in situ (FISH)	83
III.2 MÉTHODES MICROBIOLOGIQUES ET CHIMIQUES	85
III.2.1 Échantillonnage des eaux sur les pilotes RotoTorque™	86
III.2.2 Échantillonnage de biofilm et prétraitement des échantillons en vue des analyses chimiques et microbiologiques	86
III.2.3 Dénombrements des Bactéries Hétérotrophes Aérobie (BHA) revivifiables sur gélose	87
III.2.4 Dénombrements des coliformes cultivables sur géloses spécifiques	87
III.2.5 Dénombrements directs totaux par marquage au DAPI	87
III.2.6 Activité exoprotéolytique potentielle	88
III.2.7 Hybridation <i>in situ</i> avec des sondes fluorescentes (FISH)	89
III.2.8 Caractérisation chimique du biofilm	92
III.2.9 Dosage du carbone organique total de l'eau (COT)	93
III.2.10 Dosage des phosphates dans l'eau	94
III.2.11 Dosage des phosphates dans le biofilm	95
III.2.12 Dosage du chlore et de la monochloramine	95
III.2.13 Demande en chlore	96
III.2.14 Calcul de la droite de dilution théorique	96

III.1 Matériel

III.1.1 Traitements particuliers de la verrerie

III.1.1.1 Essais réalisés avec des phosphates

Ce traitement a été appliqué uniquement lors des essais en conditions statiques, réalisés à Nancy. Afin de limiter les traces de phosphates, les bouteilles servant aux essais sont lavées suivant un protocole adapté de Sathasivan *et al.* (1997). Elles sont rincées à l'eau de distribution, nettoyées avec un détergent sans phosphate (Aquet, réf. 64 528; Polylabo), rincées 3 fois avec de l'eau déionisée, puis placées 24 heures dans de l'acide nitrique à 10 % et rincées à l'eau déionisée. Par la suite, les bouteilles sont placées à 500°C pendant 4 heures afin d'éliminer les traces de matière organique.

Les pipettes servant aux prélèvements sont des pipettes en verre, traitées à l'acide sulfochromique et stérilisées par chaleur sèche (2 h, 180°C).

Lors de ces essais en conditions statiques, une bonbonne de 20 litres est utilisée pour recueillir l'eau de distribution après l'avoir filtrée sur 0,8 µm pour limiter la présence de protozoaires. La bonbonne est au préalable nettoyée avec un détergent sans phosphate, rincées 3 fois avec de l'eau déionisée et autoclavée pendant 15 min à 121°C.

III.1.1.2 Bouteilles en verre brun pour la demande en chlore

Les bouteilles en verre brun utilisées pour les demandes en chlore et en monochloramine sont placées pendant au moins 8 heures dans une solution de chlore concentrée (20 à 100 mg Cl₂ L⁻¹) afin de satisfaire la demande en chlore des parois. Les bouteilles sont ensuite rincées abondamment avec de l'eau déionisée et mises à sécher sur un papier absorbant puis fermées par des bouchons hermétiques jusqu'à leur utilisation.

III.1.1.3 Tubes à essais pour les mesures de carbone organique total (COT)

Les tubes à essais utilisés pour les mesures en carbone organique total sont lavés avec un détergent sans phosphate et rincés avec de l'eau déminéralisée. Puis, les tubes fermés avec de l'aluminium sont passés à 500°C pendant 4 heures et conservés ainsi jusqu'à leur utilisation. Une fois le prélèvement effectué, les tubes sont fermés avec des bouchons lavés à l'eau déminéralisée et possédant un joint en téflon.

III.1.2 Réacteurs Rotatorque™

Un réacteur annulaire (Figure III.1 et Tableau III.1) de type Rotatorque™ est un réacteur parfaitement mélangé (Characklis and Marshall, 1990), composé de deux cylindres encastrés :

Le cylindre extérieur, appelé anneau extérieur ou coque, possède douze encoches sur sa face interne qui permettent de placer 12 lamelles de prélèvement sans que les lamelles ne soient en surépaisseur. Le prélèvement des lamelles colonisées se fait par des ouvertures sur la surface supérieure du pilote.

Le cylindre intérieur est un rotor qui entraîne l'eau environnante dans son mouvement. Ce cylindre en polycarbonate est percé de 4 tunnels excentriques permettant la circulation d'eau et engendrant son homogénéisation.

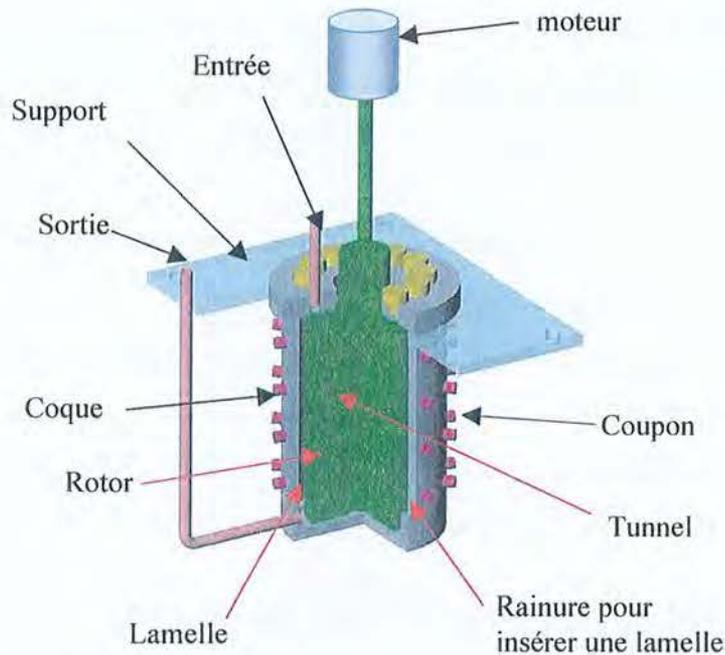


Figure III.1 : Vue en 3 dimensions d'un réacteur annulaire de type RotoTorque™ présentant une coupe.

L'eau circule entre la face interne de la coque et le rotor, ainsi que dans les tunnels du rotor. La vitesse de rotation du rotor est contrôlée par un moteur à vitesse variable et ce mouvement induit des forces de cisaillement telles que celles observées dans une canalisation d'eau potable (Characklis et Marshall, 1990).

Dans le cadre des essais, le rotor tourne vers $40 \text{ tours min}^{-1}$ afin de produire des contraintes de cisaillement à la paroi, comparables à celles qui existent dans une conduite de 15 cm de diamètre avec une vitesse moyenne d'écoulement de $0,6 \text{ m s}^{-1}$. Le temps de résidence de l'eau est déterminé par le débit en entrée du pilote. Le réacteur annulaire présente un rapport surface/volume élevé, supérieur à celui d'une conduite de diamètre égal à celui du cylindre extérieur. Son rapport surface/volume est équivalent à celui d'une conduite de 2 cm tandis que le diamètre intérieur de sa coque est de 11,7 cm. La demande en chlore d'un Rototorque™ en polycarbonate est négligeable d'après les essais de Baribeau (1994).

Tableau III.1 : Caractéristiques des réacteurs RotoTorque™

Coque externe	Mesures	Unités
Hauteur	20,2	cm
Diamètre interne	11,7	cm
Volume	2172	cm ³
Surface	742	cm ²
Nature du matériau	Polycarbonate	
Cylindre interne plein (Rotor)		
Diamètre	10 (9,6-10,2)	cm
Hauteur	18,8	cm
Nombre de tunnels	4	
Diamètre des tunnels	1,1	cm
Longueur des tunnels	19,3	cm ²
Volume d'un tunnel	18,3	cm ³
Surface d'un tunnel	66,7	cm ²
Volume du rotor (sans les tunnels)	1477 (1418-1536)	cm ³
Surface du rotor	590 (567-602)	cm ²
Nature du matériau	Polycarbonate	
Espace entre le rotor et la coque	0,75	cm
Volume des vides	777 (880-710)	cm ³
Volume sous le rotor	104	cm ³
Surface d'une lamelle	34,7	cm ²
Surfaces latérales + tunnels	1611	cm ²
Surface interne/Volume des vides	1,8	cm ² cm ⁻³
Diamètre d'une conduite équivalente	2	cm

III.1.3 Solutions de phosphates

III.1.3.1 Solution d'orthophosphates-polyphosphates de sodium

Lors des essais réalisés à Montréal, une solution de phosphates est préparée par dilution, dans 3,5 litres d'eau déionisée autoclavée, d'un produit commercial dont la formule brute est Na₅₆H₃P₅₇O₁₄₇ (réf. AquaMag, Kjell Inc, Canada) qui contient 66% de polyphosphate (soit 34% d'orthophosphate). Cette solution mère de 11 mg P-PO₄ L⁻¹ en phosphates totaux permet d'alimenter les pilotes pendant 1 semaine. Des essais non rapportés ici montrent que ni le stockage d'une semaine, ni la dilution n'affectent le ratio de 2/3 de polyphosphate. La stérilité de la solution est vérifiée par un test de cultivabilité sur gélose R₂A. Après une semaine, la solution contient moins de 1 mg C L⁻¹ en carbone organique total.

III.1.3.2 Solution d'acide phosphorique

Une solution mère à 1 g P-PO₄ L⁻¹ litres est préparée à partir d'une solution liquide très pure, à 85% en H₃PO₄ (réf. 573, Merck) (1 L = 1,71 kg). Cette solution contient donc de l'ordre de 268,9 g de P kg⁻¹ de solution (M_{H₃PO₄} = 98 g mol⁻¹ ; 31,6 % de P). À 372 mg de solution d'acide phosphorique concentrée sont ajoutés cent millilitres d'eau distillée stérile (réf. 610 277,

Braun-Fandre). Cette solution mère contient de l'ordre de 10^{-2} M de H_3PO_4 (pH = 1,5). La stérilité de la solution est vérifiée par un test de cultivabilité sur gélose R₂A.

III.1.4 Réactif pour le dosage des orthophosphates à l'acide ascorbique

Le réactif est composé de :

- 25,0 mL d'acide sulfurique 5,0 N
- 2,5 mL d'antimonyl-tartrate de potassium à 2,7 g L⁻¹ (réf. A867-250, Fisher Scientific)
- 7,5 mL de molybdate d'ammonium 40,0 g L⁻¹ (réf. A674-500, Fisher Scientific)
- 15,0 mL d'acide ascorbique à 17,6 g L⁻¹ (réf. A61-25, Fisher Scientific)

Les produits sont utilisés pendant le temps des essais et conservés à 4°C. Seule la solution d'acide ascorbique est renouvelée chaque semaine. Lorsque les produits sont mélangés, le mélange est utilisable pendant 4 heures (APHA, 1998).

III.1.5 Solutions de carbone

III.1.5.1 Solution mère d'acides aminés

Une solution mère d'acides aminés contenant 300 mg C L⁻¹ apportés par les acides aminés est réalisée afin d'enrichir les eaux en carbone organique biodégradable au cours des d'essais préliminaires (§ VI.2.A). Cette solution consiste en un mélange de 3 acides aminés, de façon à ce que chaque acide aminé apporte une quantité de carbone équivalente. Elle contient 245 mg d'acide L-Glutamique (réf. G6904, Sigma), 215 mg de L-Histidine (réf. H8776, Sigma) et 195 mg de L-Valine (réf. V0258, Sigma) par litre d'eau distillée et est stérilisée par filtration sur 0,2 µm. Le choix des acides aminés a été réalisé à partir des résultats de Dossier-Berne *et al.* (1994) et Agbekodo et Legube (1995). Bien que ces trois acides aminés soit de nature différente (acide aminé neutre, basique ou acide) ils ont présenté les plus forte diminution de leur teneur entre l'eau décantée et l'eau filtrée sur sable à l'usine de Méry-sur-Oise (Dossier-Berne *et al.*, 1994), suggérant leur possible biodégradation. Par ailleurs, ils présentent une biodégradabilité de l'ordre de >70% par la mesure de CODB (Agbekodo et Legube, 1995). La solution est préparée la veille de l'ajout dans les eaux.

III.1.5.2 Solution de divers composés organiques biodégradables

L'eau de Montréal contient en général de 1,9 à 2,4 mg C L⁻¹ en COT dont 0,2 à 0,3 mg C L⁻¹ de CODB (Desjardins *et al.*, 1997). Afin d'augmenter la vitesse de colonisation dans les réacteurs, l'eau est enrichie en carbone à l'aide d'une solution contenant un mélange de produits carbonés biodégradables (Camper, 1995).

Cette solution de carbone contient 20 mg C L⁻¹ obtenus par mélange équimolaire en carbone de :

- éthanol à 94°,
- propionaldéhyde (réf. P-6889, Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario, Canada),
- acide parahydroxybenzoïque (réf. H-5376, Sigma-Aldrich),
- acide benzoïque (réf. B-3375, Sigma-Aldrich),
- acétate (réf. S-7545, Sigma-Aldrich).

Après dilution avec l'eau d'alimentation des pilotes, celle-ci contient de l'ordre de 250 µg C L⁻¹ de carbone biodégradable en plus. Les 3,5 litres de solution mère sont conservés à température ambiante et permettent d'alimenter une semaine les pilotes. La stérilité de la solution est vérifiée par culture sur gélose R₂A à partir de 10 mL de solution filtrée sur un filtre de 0,45 µm de porosité. La contamination de la bouteille par les bactéries de l'eau d'alimentation des pilotes est évitée par utilisation d'un goutte-à-goutte stérile (réf. JC5442, Baxter) installé entre la bouteille et l'eau d'alimentation des pilotes.

III.1.6 Solutions de désinfectants

III.1.6.1 Solutions de chlore

La préparation des solutions de chlore est réalisée dans de l'eau ultrapure, à partir d'une solution commerciale d'eau de Javel (réf. Javex, Colgate-Palmolive, Toronto, Canada). Les solutions de chlore pour les essais de désinfection par chloration contiennent 11 et 18 mg Cl₂ L⁻¹. La concentration en chlore est contrôlée quotidiennement et la solution est remplacée tous les 5 à 7 jours. Avant chaque emploi, le titre exact de la solution mère utilisée est déterminé par iodométrie (réf. 4500-Cl B. ; APHA, 1998). La limite de détection de la méthode est de l'ordre de 1 mg Cl₂ L⁻¹ (APHA, 1998).

III.1.6.2 Préparation de la monochloramine

Les solutions de monochloramine utilisées sont préparées par réaction équimolaire Cl₂/N (ratio massique de 5), sans contrôle du pH. Dans la pratique, l'utilisation d'un ratio 3 :1 ou 4 :1 est justifiée par les changements de la qualité de l'eau qui peuvent induire un dépassement du ratio limite 5 :1, au-delà duquel le chlore et la dichloramine peuvent apparaître (Kirmeyer *et al.*, 1993 ; EPA, 1999). Cependant, dans nos essais, i) afin de ne pas induire un changement de population par excès d'ammonium (apparition de bactéries nitrifiantes), ii) parce que la monochloramine tend naturellement à se transformer de la dichloramine au cours du temps (Kirmeyer *et al.*, 1993 ; EPA, 1999), et iii) parce que dans nos essais, le résiduel de désinfectant est contrôlé plus facilement que sur un réseau de distribution, le ratio utilisé est 5 :1.

La monochloramine est préparée en ligne par un mélange en volume équivalent (1 :1 en volume) d'une solution de chlore et d'une solution de chlorure d'ammonium. Le chlorure d'ammonium (réf. A661-3, Fisher) est utilisé pour préparer deux solutions conservées dans des bouteilles en verre brun et contenant 33,75 et 113,75 mg NH_4Cl L^{-1} respectivement. Les solutions de chlore pour la préparation de monochloramine contiennent 45 et 150 mg Cl_2 L^{-1} en chlore libre. Le mélange est réalisé sur une plaque agitatrice avec un temps de séjour dans le flacon de mélange de l'ordre de 30 minutes. L'absence de chlore libre détectable dans le mélange est contrôlée deux fois par jour. Les solutions mères de chlore et d'ammonium sont remplacées tous les 3 à 4 jours.

III.1.7 Échantillons d'eaux de distribution

III.1.7.1 Essais réalisés à Nancy en conditions statiques

L'eau est prélevée au Laboratoire d'Hygiène et de Recherche en Santé Publique (Vandœuvre-lès-Nancy) et provient de l'usine Édouard Imbeaux de Nancy qui traite l'eau de la Moselle pour alimenter l'agglomération de Nancy. Cette eau de surface est préchlorée puis elle subit une coagulation, une floculation-décantation, une ozonation, une filtration sur sable et sur charbon active en grain (CAG). Avant d'être envoyée dans le réseau, elle est postchlorée.

Afin de limiter les phénomènes de prédation par les protozoaires, l'eau est filtrée sur une membrane de porosité 0,8 μm , en polycarbonate, d'un diamètre de 47 mm (réf.111159, Costar).

Le chlore résiduel est mesuré par colorimétrie au D.P.D., puis il est neutralisé par un ajout de thiosulfate de sodium ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) à raison de 2 moles par mole de Cl_2 .

III.1.7.2 Essais réalisés à Montréal

Les pilotes RotoTorqueTM sont alimentés avec l'eau du système de distribution de Montréal, utilisée après déchloration par stockage dans un réservoir de 200 litres avec un temps de séjour de 20 heures. Le réseau de distribution est alimenté par un mélange d'eau provenant des usines Atwater et Charles J. Desbaillets qui traitent l'eau du Fleuve Saint-Laurent. Le traitement de l'eau à l'usine Atwater procède par une filtration sur sable suivie d'une désinfection au chlore. L'usine Charles J. Desbaillets procède par filtration sur sable suivie par une désinfection combinant ozone et chlore.

La demande en chlore de l'eau injectée dans les pilotes est de l'ordre de 0,2 mg Cl_2 L^{-1} après deux heures de temps de contact avec 0,8 mg Cl_2 L^{-1} appliqués initialement. La demande en monochloramine de cette eau est de l'ordre de 0,06 et 0,14 mg NH_2Cl L^{-1} , lorsque respectivement 0,75 ou 1,9 mg NH_2Cl L^{-1} sont appliqués initialement.

III.1.8 Inoculum de coliformes et préparation des suspensions

Lors des essais en conditions statiques, réalisés sur l'eau du réseau de Nancy, quatre souches de bactéries coliformes ont été utilisées : *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae* et *Citrobacter freundii*. Il s'agit de souches sauvages, isolées des eaux potables et conservées congelées à -80°C.

Avant les essais, les souches de coliformes sont décongelées et placées à 37 (± 1)°C pendant 16 à 24 heures. Chaque espèce est isolée sur gélose CASO (réf. 1.05458, Merck) puis identifiée par coloration de Gram et galerie API 20E.

La souche testée est cultivée sur gélose R₂A avec une incubation à 37(± 1)°C pendant 18 à 24 heures. Les bactéries sont mises en suspension dans 30 mL d'eau de distribution stérilisée par autoclavage (15 min, 121°C). La suspension est placée à incuber à 22 (± 2)°C pendant 18 à 24 heures. Elle contient de l'ordre de 10^8 bactéries mL⁻¹ ($DO_{640nm} = 0,2 \pm 0,05$). Les bactéries sont lavées deux fois par centrifugation à 10 000 g pendant 10 minutes à 20°C avec de l'eau de réseau de distribution stérile. Puis le culot est remis en suspension dans l'eau de distribution stérile et la suspension est utilisée immédiatement.

III.1.9 Géloses pour les dénombrements bactériens

III.1.9.1 Dénombrements de bactéries hétérotrophes revivifiables sur gélose

La gélose R₂A (réf. 1826-17-1, Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA) est préparée avec de l'eau déminéralisée et contient 0,5 g L⁻¹ d'extrait de levure, 0,5 g L⁻¹ de caséine hydrolysée à l'acide et exempte de vitamines, 0,5 g L⁻¹ de D-(+)-Glucose anhydre, 0,5 g L⁻¹ d'amidon soluble, 0,5 g L⁻¹ de pyruvate de sodium, 0,3 g L⁻¹ de K₂HPO₄, 0,25 g L⁻¹ de peptone de caséine obtenue par digestion pancréatique, 0,25 g L⁻¹ de peptone de viande obtenue par digestion pectique, 0,0492 g L⁻¹ de MgSO₄.7H₂O et 15 g L⁻¹ d'agar. La gélose est autoclavée à 121°C pendant 15 minutes. Le pH est alors de 7,2 ($\pm 0,2$) à 25°C. La gélose est conservée 6 mois en flacons et 1 mois lorsqu'elle est coulée en boîte de Pétri. La stérilité est vérifiée au cours des incubations (pas de développement de colonies sur la gélose et dans la gélose).

III.1.9.2 Géloses pour les dénombrements de coliformes cultivables

Les géloses pour le dénombrement des coliformes sont conservées au maximum pendant 15 jours à 4-10°C.

III.1.9.2.a Gélose au TTC-tergitol

La gélose au TTC-tergitol (norme AFNOR NF T90-414) est réalisée à partir de 54 g L⁻¹ de base gélosée TTC-Tergitol 7 (réf. AEB151452, AES) à laquelle sont ajoutés 5 g L⁻¹ d'agar-agar,

50 mL L⁻¹ tergitol 7 à 0,2%, 50 mL L⁻¹ TTC à 0,05%. Le pH est ajusté avec du NaOH 1N, stérile. La gélose est autoclavée à 121°C pendant 15 minutes. Le pH est alors de 7,2 (± 0,2) à 25°C.

Préparation du TTC à 0,05% : 0,5 g de TTC sont placés dans 1L d'eau déminéralisée. La solution est stérilisée par filtration sur 0,2 µm (réf. SLGS 025 0S, Millipore).

Préparation du tergitol 7 à 0,2% : 2 mL de tergitol sont placés dans 1 litre d'eau déminéralisée. La solution est stérilisée par filtration sur 0,2 µm (réf. SLGS 025 0S, Millipore).

III.1.9.2.b Gélose mT7

La gélose mT7 est réalisée par ajout de 48,6 g dans 950 millilitres d'eau déionisée (Réf. 0018-15-3, Difco). La gélose contient 20 g L⁻¹ de lactose, 15 g L⁻¹ d'agar, 5 g L⁻¹ d'ether de polyethylene, 3,0 g L⁻¹ d'extrait e levure, 2,5 g L⁻¹ de digestat pancréatique de caséine, 2,5 g L⁻¹ de digestat pectique de tissus animaux, 0,1 g L⁻¹ de SDS, 0,1 g de bleu de bromothymol, 0,1 g L⁻¹ de pourpre de bromocrésol. La gélose est autoclavée à 121°C pendant 15 minutes. Le pH est alors de 7,4 (± 0,2) à 25°C. Lorsque la température de la gélose est inférieure à 50°C, 50 millilitres d'une solution de cefsulodine à 0,1 g L⁻¹ sont ajoutés. Avant utilisation, les boîtes de gélose doivent être séchées pendant quelques minutes afin d'éliminer la vapeur d'eau condensée sur le couvercle, et ainsi éviter que les colonies bactériennes ne se dispersent pendant l'incubation.

Préparation de la cefsulodine : 10 mg de cefsulodine sont placés dans 100 millilitres d'eau déminéralisée. La solution est stérilisée par filtration sur 0,2 µm et se conserve 3 mois à 4-10°C.

III.1.9.2.c Gélose mEndo

La gélose mEndo (réf. 0736-17, Difco) est préparée par ajout de 51 g de gélose dans 980 mL d'eau déionisée additonée de 20 mL d'éthanol à 94%. La gélose contient 1,2 g L⁻¹ d'extrait de levure, 3,7 g L⁻¹ de bactocasitoneTM, 3,7 g de thiopeptone, 7,5 g L⁻¹ de bactotryptose, 9,4 g L⁻¹ de bactolactose, 3,3 g L⁻¹ de phosphate de sodium dibasique, 1 g L⁻¹ de phosphate de sodium monobasique, 3,7 g L⁻¹ de NaCl, 0,1 g L⁻¹ de sodium désoxycholate, 0,05 g L⁻¹ de SDS, 1,6 g L⁻¹ de sulfite de sodium, 0,8 g L⁻¹ de fushin basique, et 15 g L⁻¹ d'agar et 20 mL L⁻¹ d'éthanol. La gélose ne doit pas être autoclavée. Elle est cependant préparée dans une hotte à flux laminaire et la stérilité est vérifiée par incubation d'une boîte à 35°C pendant 24 heures. Le pH de la gélose est de 7,2 (± 0,2) à 25°C.

III.1.10 Solutions pour les mesures d'AEP

La solution de 1 mL à 10 mg LLβN mL⁻¹ est réalisée à partir d'une poudre de L-Leucine-β-Naphthylamide (LLβN) (réf. L-0376, Sigma-Aldrich) pesés sur une balance de précision. Elle est

réalisée la journée de l'analyse avec de l'eau déionisée, stérilisée par filtration sur 0,2 µm (réf. SLGS0250S, Millipore).

La solution mère de β-Naphthylamine (βN) (réf. N-8381, Sigma-Aldrich) utilisée pour réaliser la courbe d'étalonnage est conservée à 4-10°C, à l'abri de la lumière et contient 10⁻³M de βN. Avant utilisation, elle est placée à température ambiante.

III.1.11 Solution de 4',6 diamidino-2-phenylindole (DAPI)

Une solution mère de DAPI à 1 mg mL⁻¹ est préparée à partir d'une poudre (réf. D-9542, Sigma-Aldrich), mise en suspension dans de l'eau distillée stérilisée par filtration. La solution est filtrée sur 0,2 µm (réf. SLGS 025 0S, Millipore) et des aliquots de 0,5 mL ou 60 µL sont congelés à -20°C. Ces solutions mères congelées sont conservées 2 ans. Une solution de travail à 5 µg mL⁻¹ de 10 mL est préparée à partir de 50 µL d'un sous-échantillon à 1 mg mL⁻¹ dilué avec de l'eau distillée stérile. Cette solution est conservée une semaine à 4-10°C.

III.1.12 Réactifs pour la méthode d'hybridation *in situ* (FISH)

III.1.12.1 Les sondes oligonucleotidiques

Les quatre sondes utilisées (EUB338, ALF1b, BET42a et GAM 42a) ont été développées par Amann (1990b) (Tableau III.2). EUB338 est une sonde générale qui cible une région de l'ARN_r 16S commune à toutes les bactéries connues actuellement (Amann, 1995). Elle permet d'estimer le nombre de cellules détectables dans l'échantillon par FISH, dans les conditions d'hybridation définies. ALF1b, BET42a et GAM42a sont des sondes qui ciblent des zones des ARN_r spécifiques de trois groupes bactériens (sous-classes α, β et γ) appartenant à la classe des *Proteobacteries* (Manz *et al.*, 1992).

Toutes les sondes sont marquées par un fluorochrome, le Cy3 (Interactiva, Ulm, Germany. <http://www.interactiva.de/>). Les sondes parviennent congelées et lyophilisées, 24 à 48 heures après leur fabrication. À partir des indications données par le fournisseur sur des quantités, les sondes sont remises en suspension dans un tampon stérile et de pH 8 de Tris-EDTA (Tris 10 µM ; EDTA 1 mM), afin d'obtenir une solution mère contenant 2500 ng de sonde par microlitre.

Tableau III.2: Les quatre sondes utilisées

Sondes	Séquences	Cibles	Positions	Groupes bactériens
EUB338	5'-GCTGCCTCCCGTAGGAGT-3'	ARNr 16S	338-355	Bactéries
ALF 1b	5'-CGTTCGYTCTGAGCCAG-3'	"	19-35	α-Protéobacteria
BET42a	5'-GCCTTCCCACTTCGTTT-3'	ARNr 23S	1027-1043	β-Protéobacteria
GAM42a	5'-GCCTTCCCACATCGTTT-3'	"	1027-1043	γ-Protéobacteria

III.1.12.2 Solution de paraformaldéhyde

La solution de paraformaldéhyde (PFA) utilisée pour la fixation des échantillons est réalisée par ajout de 4 g de paraformaldéhyde (réf. P-6148, Sigma-Aldrich) dans 100 mL de tampon phosphate salin (PBS). Le tampon phosphate salin contient 8 g L^{-1} de NaCl, $0,2 \text{ g L}^{-1}$ de KCl, $1,44 \text{ g L}^{-1}$ de Na_2HPO_4 , $0,24 \text{ g L}^{-1}$ de KH_2PO_4 (Kalmbach, 1998). Son pH est ajusté à $7,2 (\pm 0,05)$ par ajout de HCl 5 M et la solution est stérilisée par autoclavage. La dissolution du PFA est réalisée vers 50 à 60°C, sur une plaque agitatrice. La solution refroidie est ensuite filtrée sur $0,2 \mu\text{m}$ et conservée entre 0 et 4 °C dans la glace pendant 24 heures au maximum.

III.1.12.3 Solution d'hybridation

Les solutions utilisées au cours de l'hybridation in situ (FISH) ont été développées par Kalmbach (1998). Elles sont optimisées pour des sondes marquées avec le fluorochrome CY3 et pour des échantillons de biofilms d'eau potable.

La solution d'hybridation contient :

- 0,9 M NaCl (S271-3, Fisher Scientific),
- 20 mM Tris/HCl (pH 7.2) (réf. T-6791, Sigma-Aldrich),
- 0,01 % de sodium dodécyl sulfate (SDS) (réf. L-4522, Sigma-Aldrich),
- 35 % (EUB338) ou 40 % (v/v) (ALF1b, BET42a, GAM42a) formamide (réf. F-9037, Sigma-Aldrich).

Les solutions mères de Tris-HCl (1 M), le NaCl (5 M) et l'eau de dilution contenant 0,2% de diéthylpyrocarbonate (DEPC) (m/m) sont stérilisées par autoclavage, tandis que le SDS est stérilisé par filtration sur $0,2 \mu\text{m}$ (réf. SLG0250S, Millipore). Le formamide est un produit considéré stérile. Les solutions stérilisées par autoclavage sont conservées à 4-10°C pendant 3 mois. Le formamide est conservé à 4-10°C pendant 2 ans au maximum. Le SDS est conservé à température ambiante pendant 6 mois.

Par utilisation de chlorure de sodium et du formamide, la température d'hybridation est abaissée jusqu'à 46°C, afin que (i) que les protéines qui participent à la membrane bactérienne ne soit pas dénaturée (préservation de l'intégrité cellulaire) et (ii) que la manipulation ne nécessite pas le port de gants isolants. Le chlorure de sodium et le formamide permettent de neutraliser les charges et de limiter la répulsion entre la sonde et l'ARN_r ciblé, ce qui facilite l'hybridation et donc conduit à un abaissement de la température d'hybridation (Lathe, 1985 ; Moter et Göbel, 2000). Le chlorure de sodium est ajouté en concentration saturante puis la teneur en formamide est ajustée pour atteindre la température d'hybridation de 46°C quelle que soit la sonde. Les sondes comportent des teneurs variables en bases puriques et pyrimidiques, ce qui influence la température d'hybridation en fonction du nombre de liaisons hydrogène (les bases

puriques et pyrimidiques ont respectivement 2 et 3 liaisons hydrogènes). Le formamide est un composé dangereux à manipuler (cancérogène).

Le SDS est ajouté afin de limiter la fixation non spécifique des sondes avec la membrane en polycarbonate, donc limiter le bruit de fond (Kalmbach, communication personnelle).

Le tris-HCl permet de tamponner le milieu d'hybridation. Le DEPC permet de limiter l'activité des RNases éventuellement présentes (les RNases ne sont pas détruites par l'autoclavage).

III.1.12.4 Solution de lavage

La composition de la solution de lavage est déterminée afin de favoriser le détachement des sondes mal appariées. L'ajustement des conditions est réalisé par l'abaissement de la teneur en chlorure de sodium ce qui augmente la spécificité de la réaction (Herrington, 1998). La solution de lavage contient :

- 20 mM Tris/HCl (pH = 7,2)
- 0,01% SDS
- 88 mM NaCl ou 62,4 mM NaCl suivant la teneur en formamide pendant l'hybridation (respectivement 35 % ou 40 %).

Les solutions mères utilisées sont celles décrites pour la solution d'hybridation.

III.2 Méthodes Microbiologiques et Chimiques

Lors des essais à Nancy, les analyses des populations libres ont été effectuées par TDC et dénombrements des bactéries cultivables sur R2A et TTC-tergitol.

Lors des essais à Montréal, les bactéries libres ont été étudiées par dénombrements sur gélose R2A, mEndo, mT7, par dénombrements du total des bactéries par marquage au DAPI (CDT) et par la méthode FISH. De plus, sept méthodes différentes sont utilisées pour déterminer les caractéristiques des biofilms dont 4 sont microbiologiques et 3 chimiques :

- i) dénombrements des bactéries hétérotrophes aérobies (BHA) revivifiables sur gélose R₂A,
- ii) dénombrements totaux des bactéries (comptes directs totaux = CDT),
- iii) estimation de l'activité exoprotéolytique potentielle (AEP),
- iv) hybridation *in situ* avec des sondes fluorescentes (FISH : fluorescent *in situ* hybridization),
- v) estimation des teneurs des biofilms en hydrates de carbone,
- vi) estimation des teneurs des biofilms en acides aminés et
- vii) estimation des teneurs des biofilms en phosphates.

III.2.1 Échantillonnage des eaux sur les pilotes RotoTorque™

Les prélèvements d'eau au cours des essais à Montréal ont été réalisés (i) après l'étape de déchloration (voir § III.1.7), (ii) après l'enrichissement de l'eau en carbone, (iii) avant l'entrée dans les pilotes et (iv) à la sortie des pilotes.

III.2.2 Échantillonnage de biofilm et prétraitement des échantillons en vue des analyses chimiques et microbiologiques

Une lamelle en polycarbonate colonisée par le biofilm est prélevée sur un réacteur RotoTorque™ et installée dans un support à lamelles, permettant de collecter deux lamelles. (Figure III.2). Dix puits identiques délimitant des surfaces de biofilm identiques de 1,23 cm² permettent de faire des mesures simultanées avec les différentes méthodes microbiologiques. La culture sur gélose, le CDT, le FISH et l'AEP sont donc réalisés sur une même lamelle.

L'AEP est réalisée directement sur le biofilm non détaché de la lamelle.

Les BHA, les CDT ainsi que la méthode FISH sont effectuées une fois que le biofilm a été remis en suspension dans de l'eau stérile. Le décrochement est effectué par traitement aux ultrasons (2 Watts, 2 minutes) (ultrasonic processor, Cole Parmer) qui permet un décrochement optimal des bactéries pour les comptes CDT et de BHA (essais non rapportés).

Pour les analyses bactériologiques réalisées sur l'eau (BHA et CDT), les échantillons sont prélevés en entrée et sortie des pilotes. Pour les prélèvements en entrée, l'alimentation d'eau est déconnectée directement à l'entrée des pilotes et l'eau est collectée dans des tubes à essai stériles. Dans le cadre des mesures bactériologiques, lors des périodes de désinfection, pour les échantillonnages d'eau en sortie des pilotes, les désinfectants sont neutralisés par ajout de 0,1 mL de thiosulfate de sodium à 10% (m/m) par 10 mL d'échantillon.

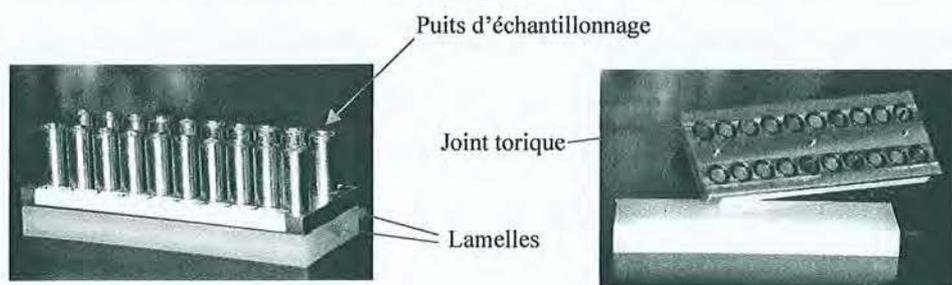


Figure III.2 : Photos du support à lamelle permettant le traitement à ultrasons et l'analyse directe du biofilm par AEP. Support monté (gauche) et ouvert pour montrer l'encoche où s'insère la lamelle et les joints permettant l'étanchéité (droite).

La caractérisation chimique des biofilms est réalisée après une hydrolyse qui conduit à la formation d'hydrates de carbone et d'acides aminés à partir des polysaccharides et des protéines présents. Les phosphates sont également déterminés à partir de cet hydrolysate. Ces analyses du biofilm sont réalisées sur une seconde lamelle en polycarbonate, coupée en morceaux et

hydrolysée avec 0,24 M HCl à 100°C, pendant 3 heures sous flux d'azote (adapté de Dossier-Berne *et al.*, 1994) à l'aide d'un appareil pour les hydrolyses (Réf. Waters Pico.Tag Workstation, Millipore).

L'échantillon est conservé à 4-10°C et analysé dans les 12 heures pour les acides aminés et les hydrates de carbones ou dans les 72 heures pour les phosphates.

III.2.3 Dénombrements des Bactéries Hétérotrophes Aérobie (BHA) revivifiables sur gélose

Un échantillon aliquote de 1 mL pur ou dilué est filtré sur une membrane en nitrate de cellulose de 47 mm de diamètre et de porosité 0,45 µm (réf. HAWG047S1, Millipore). Le filtre est placé dans une boîte de Pétri contenant de la gélose R₂A (voir § III.1I.a) et incubé pendant 7 jours à 22 (± 2) °C. Les dénombrements de bactéries hétérotrophes aérobies sont exprimés en unité formant colonie (UFC) par cm² (APHA, 1992 (réf. 9215)).

III.2.4 Dénombrements des Coliformes cultivables sur géloses spécifiques

Un aliquote de 1 mL d'un échantillon pur ou dilué est filtré sur une membrane en nitrate de cellulose de 47 mm de diamètre et de porosité 0,45 µm (réf. HAWG047S1, Millipore). Le filtre est placé dans une boîte de Pétri contenant de la gélose TTC-tergitol (lors des essais à Nancy) ou mT7 ou mEndo (lors des essais à Montréal) (voir § III.1I.b). L'incubation est menée pendant 24 heures à 37 (± 1)°C pour les essais à Nancy et 35 (± 2)°C pour les essais à Montréal. Les dénombrements de coliformes sont exprimés en unité formant colonie (UFC) par cm² (APHA, 1998). Les souches de *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae* et *Citrobacter freundii* engendrent la formation de colonies rouges sur gélose TTC-tergitol, par réduction du TTC. *Escherichia coli* forme des colonies jaunes sur la gélose TTC-tergitol. Les quatre souches forment des halots jaunes dans la gélose par virage de l'indicateur coloré (bleu de bromothymol). *Citrobacter freundii*, seul coliforme utilisé à Montréal forme des colonies jaunes ainsi qu'un halot jaune sur gélose mT7 par virage de l'indicateur coloré (bleu de bromothymol) et des colonies vert brillant sur gélose mEndo.

III.2.5 Dénombrements directs totaux par marquage au DAPI

Le nombre total de bactéries est déterminé par marquage au DAPI suivant une procédure adaptée de Saby *et al.* (1997). Un volume (500 µL) de la solution de DAPI à 5 µg mL⁻¹ (voir § III.1.J) est ajouté à l'échantillon pur ou dilué de 4,5 mL pour atteindre une concentration finale de 0,5 µg mL⁻¹. Le tube est homogénéisé au vortex puis incubé pendant 10 minutes à température ambiante. L'échantillon est alors filtré sur une membrane noire en polycarbonate de 25 mm de diamètre et 0,2 µm de porosité (réf. GB02500, Millipore), rincé avec de l'eau stérile ultrapure,

séché à l'air, hydraté avec une goutte glycérol tamponné et finalement couvert d'une lamelle. L'observation au microscope est réalisée sous une lampe UV avec un microscope équipé d'un objectif à immersion x100 (voir §hybridation *In situ* III.2.7.2.c). Dix champs sont comptés par filtre. La moyenne de deux filtres est réalisée (duplicats) et le résultat est exprimé en cellules par cm^2 de biofilm.

Le nombre de cellule N est déterminé par la formule

$$N = \frac{A}{a} \times \frac{n}{V} \times \frac{v}{S}$$

A : surface de filtration ($2,63 \text{ cm}^2$)
a : surface d'un champs ($0,1 \text{ cm}^2$ ou $0,064 \text{ cm}^2$ sur les microscope BX60 ou Labophot2 respectivement)
V : volume de filtration (mL)
v : volume de remise en suspension des biofilms (3 mL)
S : surface de biofilm ($1,25 \text{ cm}^2$)

Les limites de détection sont respectivement de $5 \cdot 10^5$ cellules cm^{-2} ou $5 \cdot 10^3$ cellules cm^{-2} et $2 \cdot 10^5$ cellules cm^{-2} et $1 \cdot 10^4$ cellules mL^{-1} pour les microscopes BX60 et Labophot2 respectivement.

III.2.6 Activité exoprotéolytique potentielle

III.2.6.1 Principe

L'AEP est une méthode qui mesure l'activité globale des bactéries en estimant le potentiel bactérien de lyse des protéines à l'aide d'un substrat protéique artificiel et non fluorescent (Laurent et Servais, 1995). La dégradation du substrat conduit à la formation d'un produit fluorescent détecté par spectrofluorimétrie (Figure III.3). La fluorescence est reportée sur un graphe en fonction du temps et le taux de dégradation donne une estimation de l'activité exoprotéolytique générale de l'échantillon.

III.2.6.2 Analyse

L'AEP est réalisée directement sur des échantillons de biofilms non remis en suspension (Laurent et Servais, 1995). Des triplicats sont réalisés en utilisant 3 puits du système de prélèvement d'échantillons (cf. §III.2.A), chacun des puits contenant 3 mL d'eau potable stérile et $0,75 \mu\text{L}$ de L-Leucine- β -N-Naphthylamide (10 mg mL^{-1}) (cf. §III.1.I.c). La cinétique de dégradation de ce substrat non-fluorescent (réf. L-0376, Sigma-Aldrich) par les exoenzymes est suivie pendant 60 minutes, à $22 (\pm 2) \text{ }^\circ\text{C}$ par mesure de la production de β -Naphthylamine (βN) à l'aide d'un fluorimètre (RF-1501, Shimadzu).

L'émission de fluorescence par la βN produite est mesurée à 420 nm (excitation 340 nm). La pente de la cinétique est proportionnelle à l'activité exoenzymatique bactérienne de l'échantillon (Laurent et Servais, 1995). Les résultats sont exprimés en

nmol β N produites min⁻¹cm⁻². La limite de détection est estimée à 1,2 10⁻⁴ nmol β N cm⁻² min⁻¹. Avant chaque série d'analyse la linéarité de la gamme de travail est vérifiée avec une gamme étalon de β N allant jusqu'à 1 mM β N L⁻¹ (soit une limite de 2,4 10⁻³ μ mol cm⁻²).

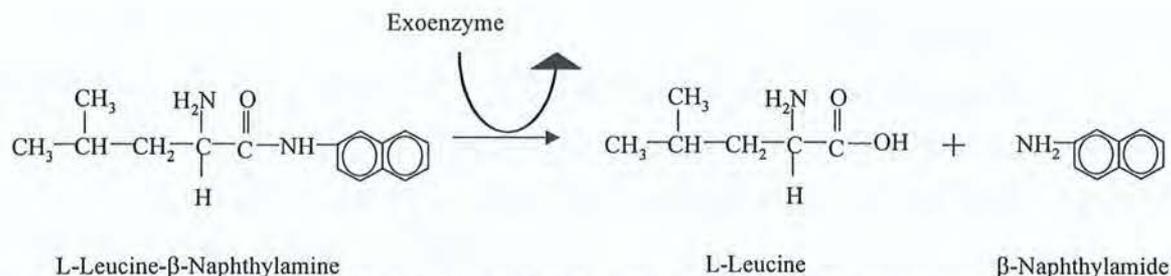


Figure III.3: Équation de dégradation de la L-Leucine- β -Naphthylamine par les exoenzymes

III.2.7 Hybridation *in situ* avec des sondes fluorescentes (FISH)

III.2.7.1 Rappels bibliographiques

III.2.7.1.a Principe de l'hybridation *in situ*

Les sondes oligonucléotidiques sont conçues pour hybrider avec une séquence complémentaire d'un ARN_r, molécule contenue dans chaque ribosome de la bactérie.

L'hybridation consiste à ajouter les sondes en concentration saturante et à contrôler la température et la composition du milieu afin de favoriser l'appariement entre la sonde et l'ARN_r-cible. La température et la composition du milieu sont essentielles pour rendre la réaction spécifique et éviter les erreurs d'appariement. Par la suite, les sondes en excès sont retirées par lavage et les bactéries sont visualisées *via* les marqueurs fluorescents des sondes.

La détection des bactéries marquées par les sondes oligonucléotidiques dépend de la quantité de cibles dans les cellules. En effet, lorsque la quantité de cibles est trop faible c'est-à-dire que la cellule contient peu de ribosomes (cellule petite, à croissance lente ou encore cellules en survie précaire), il est possible d'être sous le seuil de détection de la méthode (Manz *et al.*, 1993). Toutefois, certaines cellules dormantes ne contenant que 30 à 50% des ribosomes présents dans des cellules végétatives peuvent être détectables par FISH (Zarda *et al.*, 1997). La teneur en ribosome pour un même stade physiologique est variable suivant les espèces.

Afin d'augmenter la limite de détection de la méthode, l'intensité du signal fluorescent peut être renforcée,

- En utilisant des fluorochromes ayant une forte intensité tel que le CY3.
- En augmentant le nombre de site d'hybridation, par l'utilisation de plusieurs sondes ayant la même spécificité taxonomique (Amann *et al.*, 1990a).

- En utilisant des systèmes d'amplification enzymatique pour marquer les sondes, tels que la HRP-peroxidase (Schönhuber *et al.*, 1999).

Le signal de fluorescence dépend également des prétraitements effectués sur les échantillons tels que la fixation ou la perméabilisation, qui influence l'accessibilité des ARN_r.

III.2.7.1.b Perméabilisation

Le premier traitement appliqué à un échantillon est la fixation. Celle-ci doit permettre de préserver la quantité de ribosomes présents dans les cellules au moment du prélèvement et ne pas nuire à l'intégrité de la cellule (DeLong, 1993; Moter et Göbel, 2000) De plus, les fixatifs ne doivent pas contribuer à l'autofluorescence cellulaire, (Moter et Göbel, 2000). Ainsi, l'utilisation de formaldéhyde à 3,7% ou de paraformaldéhyde à 4% donne en général de bon résultats avec la plupart des cellules bactériennes (DeLong, 1993).

La fixation est effectuée à 0-4°C afin de limiter l'activité physiologique (DeLong, 1993).

Les sondes, composées d'une chaîne de 15 à 20 nucléotides et d'un marqueur fluorescent fixé à une extrémité (masse molaire de l'ordre de 6 g mol⁻¹), sont peu volumineuses: Bidnenko *et al.* (1998) précisent que 20 nucléotides représentent environ 6 kDa. En général, les cellules fixées sont perméables aux sondes oligonucléotidiques courtes (Amann *et al.*, 1995 ; Giovannoni *et al.*, 1988). Un traitement de perméabilisation supplémentaire avec de l'éthanol élimine des acides gras de la membrane bactérienne ce qui facilite l'entrée des sondes et permet d'augmenter le signal fluorescent (DeLong, 1993). Cependant, lorsque les sondes sont plus volumineuses ou lorsque les cellules ont une membrane épaisse (Bactéries Gram +), la pénétration des sondes oligonucléotidiques dans la cellule peut nécessiter la perméabilisation préalable de la membrane, à l'aide d'enzymes telles que les lysozymes (Bidnenko *et al.* 1998) ou à l'éthanol (DeLong, 1993).

III.2.7.2 Procédure appliquée dans les essais

Le biofilm décroché par un traitement aux ultrasons est (i) récupéré par filtration sur une membrane en polycarbonate blanche de porosité 0,2 µm (réf. GTTP0025, Millipore), (ii) fixé, (iii) perméabilisé, (iv) hybridé puis (v) marqué au DAPI. Ces différentes étapes sont décrites ci-dessous.

III.2.7.2.a Fixation et perméabilisation

La fixation est réalisée suivant les conditions décrites par Kalmbach (1998). L'échantillon est fixé avec une solution de paraformaldéhyde (§ III.1.K.b) à 4% (w/w) réalisée dans un tampon salin phosphaté (pH 7,2). Après 30 minutes de fixation à 4°C, l'échantillon est rincé, séché à l'air ambiant et stocké à -20°C jusqu'à l'hybridation.

Avant l'hybridation, le filtre est décongelé (5 minutes sur le plan de travail) puis traité pendant 3 minutes avec successivement 200 μL d'éthanol à 50°, 80° et enfin 94°.

III.2.7.2.b Hybridation : Incubation, Lavage et marquage au DAPI

Le protocole d'hybridation est adapté de Kalmbach (1998). Un volume de 15 μL de solution d'hybridation (cf. § III.1.K.c) est placé sous le filtre tandis que 50 μL de solution d'hybridation ainsi que 5 μL de sonde sont placés au-dessus. Les sondes BET42a et GAM42a étant très similaires, les risques d'erreur d'appariement (marquage de β -Protéobactéries avec la sonde GAM42a par exemple) sont limités par un ajout en quantité équivalente de la sonde complémentaire, non couplée avec le fluorochrome (exemple : ajout de BET42a dans la solution de GAM42a-CY3) (Manz *et al.*, 1992).

Afin de limiter l'évaporation pendant l'hybridation, une lamelle est déposée sur le filtre. L'ensemble est placé dans un tube à essai (réf. 05-539-6, Fisher Scientific, Nepean, Ontario, Canada) contenant un papier absorbant imbibé d'eau saline et formant une chambre d'incubation humidifiée. L'hybridation est réalisée à 46°C pendant 2 heures.

Après l'hybridation, un rinçage rapide est réalisé avec 1 mL de solution de lavage (cf. § III.1.11.d) préchauffée à 46°C. Puis le filtre est immergé dans 50 mL de solution de lavage pendant 15 minutes. Le filtre est alors rincé avec 5 millilitres d'eau déionisée autoclavée, puis marqué au DAPI (1 mL d'une solution de DAPI à 0,05 $\mu\text{g mL}^{-1}$) pendant 10 minutes et de nouveau rincé avec de 5 mL d'eau déionisée autoclavée. Le filtre est séché à l'air ambiant et monté entre lame et lamelle dans une solution de glycérine tamponnée préservant la fluorescence (réf. Citifluor AF1, Citifluor Ltd., Londres, Angleterre). Les cellules sont visualisées en microscopie à épifluorescence sous lumière verte pour le marquage au CY3 par les sondes (réf. U-MWG, Olympus) ou sous lumière UV pour le marquage au DAPI (Réf. U-MWU, Olympus). Le nombre de champ compté par filtre varie de dix (lorsqu'il y a plus de 10 cellules hybridées) à cinquante champs (lorsqu'il y a moins de 1 cellules hybridées par champ) et le résultat est exprimé en pourcentage de cellules totales (marquées au DAPI) détectées avec la sonde. La moyenne des pourcentages est effectuée sur les dix champs. Deux à trois filtres sont réalisés par échantillons et par sonde. Une moyenne générale (regroupant l'ensemble des moyennes par filtre) est effectuée. Le coefficient de variation est <10% lorsque les pourcentages de bactéries doublement marquée (DAPI et sonde-CY3) sont au moins >50%. Il atteint 50% pour des dénombrements de bactéries <10%. La limite de détection dépend des échantillons (nombre de cellules totale par champs, bruit de fond, intensité des bactéries variables). Elle a été fixée à 30 champs comptés ne présentant aucune cellule hybridée.

III.2.7.2.c Microscopes

Deux types de microscopes sont utilisés suivant les essais : un Labophot2 (Nikon, Melville, New York, USA) et deux BX60 (Olympus, Canada et Olympus, France). Les deux types de microscopes sont équipés de cubes les comptages au DAPI et au CY3 (Tableau III.3). Les résultats obtenus sont comparables entre les microscopes, mais le confort de l'utilisateur est nettement moindre sur le microscope Labophot 2 qui est plus ancien. Notamment, les contours bactériens sont plus nets et le bruit de fond moins intense avec les cubes équipant le microscope BX60.

Tableau III.3: Caractéristiques des bandes passantes (nm) des cubes à fluorescence utilisés sur les microscopes.

	Labophot 2 (Nikon)		BX60 (Olympus)	
	Cube DAPI	Cube CY3	Cube DAPI	Cube CY3
Référence	UV-2A	XF108	U-MWG	U-MWU
Bande passante Excitation (nm)	345	512-552	330-385	510-550
Miroir dichroïque(nm)	400	565	400	570
Barrière (nm)	455	615	420	590

III.2.8 Caractérisation chimique du biofilm

III.2.8.1 Dosages des Acides Aminés du Biofilm

L'analyse des acides aminés totaux du biofilm est réalisée par HPLC, suivant la méthode de dérivation par o-phtaldialdéhyde (OPA), sur un chromatographe (Waters) équipé d'une pompe à gradient 600 E (Waters), d'une colonne de séparation en phase inversée (réf. NovaPak 18 ; Waters) et avec un détecteur de fluorimétrie (réf. F1000, Hitachi).

L'OPA, molécule fluorescente, réagit avec les acides aminés et permet leur détection (Dossier-Berne *et al.*, 1994). Deux éluants sont combinés : l'éluant A (60 mM acétate- 50 mM phosphate) et l'éluant B (75%(v/v) méthanol-eau). L'élution est réalisée par un gradient d'élution depuis 40% jusqu'à 100% en éluant B. La détection de la fluorescence est effectuée par excitation à 350 nm et émission à 418 nm. Le temps d'analyse est d'environ une heure. La limite de détection est de 0,012 à 0,029 nmol cm⁻² pour les 16 acides aminés analysés.

Le traitement appliqué conduit à la destruction de certains acides aminés (méthionine, tryptophane) et à l'hydrolyse partielle d'autres (Dossier-Berne *et al.*, 1994). La proline et l'hydroxyproline sont des acides aminés secondaires qui ne réagissent pas avec l'OPA. Les dérivés soufrés ont une faible réponse fluorimétrique. Les dérivés formés sont instables en particulier ceux de la glycine, la lysine, de l'hydroxylysine et de l'ornithine. L'analyse est donc réalisée immédiatement après la dérivation.

III.2.8.2 Analyse des hydrates de carbone

Avant l'analyse, les échantillons sont filtrés sur cartouche Dionex OnGuard-Ag afin d'enlever les chlorures. L'analyse par CLHP est effectuée sur un chromatographe DX 500 (Dionex) équipé d'une précolonne (réf. CarboPak PA 10 Guard ; Dionex), d'une colonne (réf. CarboPac PA-10 ; Dionex) de 4 mm, et d'un détecteur ampérométrique pulsé (réf. ED40 electrochemical detector ; Dionex). Une élution isocratique avec du 18 mM NaOH est effectuée. L'éluant est préparé tous les 1 à 2 jours et conservé sous pression d'hélium afin d'éviter la carbonatation, préjudiciable à la séparation chromatographique. La détection est effectuée par électrochimie pulsée (PED). Le temps d'analyse est d'environ 45 minutes. La limite de détection et la sensibilité dépendent de l'espèce chimique analysée. Les limites de détection sont estimées entre 0,001 nmol cm⁻² (pour le fructose) et 0,019 nmol cm⁻² (pour le ribose).

Les solutions étalons sont réalisées avec chaque sucre (fucose, desoxyribose, rhamnose, arabinose, glucosamine, galactose, glucose, mannose, xylose, fructose, ribose, sucrose) et contiennent 1% (m/m) d'acétonitrile pour limiter le développement des microorganismes. Les solutions sont conservées à 4-10°C pendant 6 mois.

III.2.9 Dosage du carbone organique total de l'eau (COT)

Lors des échantillonnages sur les eaux de Nancy, 50 millilitres d'échantillon sont prélevés de la suspension bactérienne à l'aide d'une pipette en verre traitée pour les analyses de carbone. Les échantillons sont dosés au COTmètre (O.I. corporation - Model 700 TOC analyser) calibré avec une solution de phtalate de potassium (réf. 4874, Merck) à 5 mg L⁻¹. Le carbone inorganique est éliminé par de l'acide phosphorique (réf. 100573, Merck) 5% et un bullage à l'azote, puis le carbone organique total est oxydé à chaud (100°C) avec du persulfate de sodium (réf. 6609, Merck) à 100 g L⁻¹. Le CO₂ est amené avec un gaz vecteur (azote) jusqu'au détecteur infrarouge du COTmètre (réf. DC180, Dohrmann), préréglé à la longueur d'onde d'absorption du CO₂.

Les résultats sont exprimés en mg C L⁻¹. Les seuils de détection et de sensibilité sont respectivement de 0,1 et 0,05 mg C L⁻¹.

Les échantillonnages sur les eaux de Montréal sont effectués à l'aide de tubes à essai en verre (50 mL) passés à 500°C pendant 4 heures, équipés de bouchons hermétiques en téflon. Les échantillons d'eau sont prélevés en entrée et sortie des pilotes. Pour les prélèvements en entrée, l'alimentation d'eau est déconnectée directement à l'entrée des pilotes. La teneur en carbone organique total est mesurée en entrée et sortie des pilotes ainsi qu'avant et après le point d'injection de produits carbonés, en amont des pilotes. Afin de conserver les échantillons, 0,2 mL d'azide de sodium (NaN₃) à 1% sont ajoutés et les tubes sont placés à 4°C jusqu'à l'analyse. Le

carbone inorganique est éliminé par de l'acide phosphorique 20% et un bullage à l'oxygène. L'oxydation des molécules organique est effectuée par la méthode d'oxydation UV-persulfate de potassium (Réf. 5310-C ; APHA, 1998). Le CO₂ est amené avec un gaz vecteur (Oxygène) jusqu'au détecteur infrarouge du COTmètre (réf. DC180, Dohrmann), préréglé à la longueur d'onde d'absorption du CO₂. Les résultats sont exprimés en mg C L⁻¹. Les seuils de détection et de sensibilité sont respectivement de 0,1 et 0,05 mg C L⁻¹.

III.2.10 Dosage des phosphates dans l'eau

III.2.10.1 Lors des essais à Nancy

Lors des analyses en conditions statiques sur les eaux de Nancy, le phosphate inorganique ainsi que les nitrates et les nitrites sont analysés par chromatographie ionique, suivant la norme AFNOR NF ISO 10304. L'éluant A est une solution de Na₂CO₃ (2,7 mM) et de NaHCO₃ (0,3 mM), l'éluant B est de l'eau déminéralisée à 18 MOhms. Les phosphates et les nitrates sont détectés par conductimétrie, les nitrites par absorbance en UV-visible avec un chromatographe DX 500 (Dionex) équipé de colonnes de séparation (1 précolonne pour piéger les métaux, 1 précolonne de même nature que la colonne principale, 1 colonne de séparation), d'un supprimeur avant le détecteur.

La limite de sensibilité pour le dosage des phosphates est estimée à 10 µg P-PO₄ L⁻¹ et la limite de détection à 50 µg P-PO₄ L⁻¹. La sensibilité pour les nitrates est estimée à 0,1 mg NO₃ L⁻¹ et la limite de détection à 1 mg NO₃ L⁻¹. La sensibilité pour les nitrites est estimée à 10 µg NO₂ L⁻¹ et la limite de détection à 10 µg NO₂ L⁻¹.

III.2.10.2 Lors des essais à Montréal

Lors des essais à Montréal, les échantillons d'eau sont prélevés en entrée et sortie des pilotes, dans des flacons de 120 mL en polypropylène. Les dosages des orthophosphate et des phosphates totaux ont été réalisés par dosage à l'acide ascorbique (i) des orthophosphates directement et (ii) des phosphates totaux après digestion au persulfate en milieu acide et à chaud. La différence entre orthophosphate et phosphates totaux permet de connaître la teneur en polyphosphates.

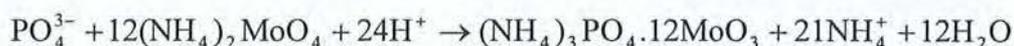
III.2.10.2.a Digestion des polyphosphates

La méthode d'analyse utilisée mesure les phosphates sous forme d'orthophosphates. Une digestion (hydrolyse) préalable des polyphosphates en orthophosphates est effectuée suivant une méthode dérivée de la méthode référencée 4500-P B.5 (APHA., 1998) et conduit au dosage des phosphates totaux.

Deux millilitres d'acide sulfurique (2 mL) à 5 N et 0,5 g de persulfate de potassium ($K_2S_2O_8$, masse molaire = 270,33 g mol⁻¹) (réf. P282-500, Fisher Scientific) sont ajoutés à 50 mL d'échantillon. Le mélange est placé sur une plaque chauffante pendant 30 à 40 minutes (à partir de l'ébullition). Puis, lorsque l'échantillon est refroidi, 2 mL de soude 5 N sont ajoutés et le volume est complété à 50 mL.

III.2.10.2.b Dosage des phosphates par la méthode à l'acide ascorbique

Les orthophosphates sont mesurés par la méthode de dosage à l'acide ascorbique (réf. 4500-P E ; APHA, 1992). Les ions phosphates se combinent avec le molybdate d'ammonium en milieu acide pour former un complexe, le phosphomolybdate d'ammonium (Sawyer et McCarty, 1978) :



Le molybdate (Mo) du complexe est réduit par l'acide ascorbique et produit une couleur bleue, dont l'absorbance est proportionnelle à la quantité de phosphore présent. L'excès de molybdate d'ammonium n'est pas réduit et donc n'interfère pas.

L'échantillon de 10 mL est placé dans une cuve de spectrophotométrie puis 1,6 mL du réactif est ajouté. Après 10 minutes de temps de contact mais avant 25 minutes, l'absorbance est mesurée à 880 nm. Tous les résultats sont exprimés en milligrammes de P-PO₄ par litre. La limite de détection est de l'ordre de 50 à 10 µg P L⁻¹ suivant que le trajet optique est de 0,9 ou 5 cm. La différence entre la teneur en phosphates totaux et orthophosphates avant la digestion permet de connaître la concentration en polyphosphates dans l'échantillon.

III.2.11 **Dosage des phosphates dans le biofilm**

La teneur en phosphate du biofilm est déterminée par chromatographie anionique, sur des échantillons hydrolysés avec un chromatographe DX 300 (Dionex) équipé d'une précolonne (réf. AG9-HC ; Dionex) et d'une colonne analytique (réf. AS9HC ; Dionex) de 4 mm, ainsi qu'un supprimeur (utilisé en mode chimique) et d'un détecteur de conductivité.

Une élution isocratique est effectuée avec 5 mM de bicarbonate et 12 mM de carbonate. Un réacteur post-colonne (autosupprimeur) est utilisé pour limiter le bruit de fond en supprimant les ions Na⁺. La détection est réalisée par conductimétrie. Les limites de détection et de sensibilité sont estimées à 10 µg P L⁻¹ soit 5 ng cm⁻² de biofilm.

III.2.12 **Dosage du chlore et de la monochloramine**

Le dosage du chlore libre et des chloramines est réalisé par la méthode colorimétrique à la N, N-diéthylène-1,4-diamine (DPD) (APHA, 1998).

Pour le dosage du chlore, 5 mL d'échantillon sont placés dans un tube à spectrophotométrie, puis 250 µL de tampon phosphate (pH 6,5) et 250 µL de DPD sont ajoutés. La mesure colorimétrique est alors réalisée à 515 nm. Pour le dosage de la monochloramine, quelques milligrammes de cristaux d'iodure de potassium sont ajoutés et l'absorbance à 515 nm est mesurée dans les deux minutes suivantes. La concentration en chlore est déduite d'une courbe d'étalonnage préalablement établie. La teneur en monochloramine est obtenue par différence entre la teneur en chlore après et celle avant l'ajout de cristaux de KI.

La teneur en monochloramine obtenue en mg Cl₂ eq L⁻¹ est alors convertie en mg L⁻¹ de NH₂Cl. La précision et limite de détection de la méthode sont de 10 µg Cl₂L⁻¹ et 20 µg L⁻¹ respectivement.

III.2.13 Demande en chlore

La demande en chlore est effectuée par dosage du résiduel de désinfectant après différents temps de contact entre le chlore et la solution testée (APHA, 1998). Une bouteille de 250 mL en verre brun traitée pour la demande en chlore est remplie au 2/3 soit avec la solution testée (eau de distribution, eau contenant un ajout de phosphate, etc.) soit avec une eau témoin (eau déionisée, eau de distribution). Le chlore ou la monochloramine sont ajoutés à T=0 afin d'obtenir la concentration désirée. A des périodes de temps fixes, des prélèvements sont effectués en duplicata et le résiduel de désinfectant est dosé. Afin d'effectuer les prélèvements, toutes les bouteilles sont ouvertes autant de fois (entre 3 et 5 fois selon les essais).

Le temps de résidence hydraulique dans les réacteurs RototorqueTM est fixé vers 2h. La consommation (mg Cl₂ L⁻¹) après deux heures de temps de contact est considérée comme équivalente à la demande en chlore de l'eau au cours de son séjour dans un réacteur.

III.2.14 Calcul de la droite de dilution théorique

La droite de dilution théorique correspond au comportement d'une particule inerte injectée dans le réacteur. Il existe une équation générale qui permet de calculer l'évolution de la concentration théorique d'un élément au cours du temps dans un réacteur PropellaTM. Cette équation prend en compte le phénomène de lessivage induit par l'hydraulique du système, et considère que l'eau d'alimentation a une concentration nulle pour la particule étudiée:

$$C_t = \frac{1}{\exp(D.t)} C_{t_i}$$

C_t : concentration dans le réacteur au temps t.
 C_{t_i} : concentration dans le réacteur après injection.
 D : taux de dilution (débit/volume) (0,042 h⁻¹).
 t : temps (h).

En traçant l'évolution du logarithme du rapport de la concentration au temps t sur la concentration au temps t_i en fonction du temps, on obtient une droite de pente égale à -D. Si les courbes expérimentales se superposent à cette droite, cela signifie que seul le phénomène de

lessivage influence la concentration de l'élément. Si les courbes expérimentales sont au-dessous de la droite théorique de lessivage, cela signifie que d'autres phénomènes tels que la lyse, la prédation, la sédimentation s'ajoutent au lessivage et éliminent les particules. Si au contraire, les courbes expérimentales se situent au-dessus de la droite théorique de lessivage, cela signifie qu'il y a augmentation des densités par multiplication bactérienne et/ou décrochage du biofilm.

Chapitre IV Effet des Phosphates sur la Physiologie des Bactéries Libres et Fixées

IV.1	<u>INTRODUCTION</u>	99
IV.2	<u>EFFET DES PHOSPHATES SUR LA CROISSANCE ET LA CULTIVABILITE DES BACTERIES LIBRES</u>	100
	IV.2.1 Protocole	100
	IV.2.2 Suivi des conditions expérimentales	101
	IV.2.3 Résultats	101
IV.3	<u>BIOFILM RESPONSES TO AGEING AND TO A HIGH PHOSPHATE LOAD IN A PILOT DRINKING WATER SYSTEM</u>	103
IV.4	<u>EFFECT OF ADDING PHOSPHATE TO DRINKING WATER ON BACTERIAL GROWTH IN SLIGHTLY AND HIGHLY CORRODED PIPES</u>	124
IV.5	<u>DISCUSSION</u>	131

IV.1 Introduction

Parmi les produits employés pour limiter la corrosion des canalisations d'eau potable, les plus répandus sont ceux à base de phosphates (Snoeyink et Wagner, 1996). Toutefois, en tant que nutriments bactériens, les phosphates sont suspectés de pouvoir induire une recroissance bactérienne. Quelques études ont en effet montré que la cultivabilité et parfois la croissance des bactéries libres pouvaient être limitées par les faibles teneurs en phosphates dans les eaux potables (Miettinen *et al.*, 1997 ; Sathasivan *et al.*, 1997 ; Sathasivan et Ohgaki, 1999). Leur application en tant que traitement anticorrosion est donc souvent effectuée avec, en parallèle, un suivi microbiologique. Les études menées sur les biofilms -source principale de bactéries en réseau (van der Wende, 1989)- ont en général été réalisées en présence de corrosion et ont conduit à des conclusions diverses. En effet, suivant les études, les phosphates appliqués peuvent engendrer une augmentation des densités de bactéries fixées (Abernathy et Camper, 1998 ; Rompré *et al.*, 2000), voire une augmentation des densités de bactéries libres cultivables dans les eaux (Lyons *et al.*, 1995) ou à l'inverse, une diminution des biofilms associés à la corrosion (LeChevallier *et al.*, 1993 ; Abernathy et Camper, 1998).

Ces résultats contradictoires portent sur l'effet global des phosphates sur la bactériologie, combinant la réaction des phosphates avec la corrosion, les changements engendrés dans le biofilm et les changements de résiduel de désinfectants (LeChevallier *et al.*, 1993 ; Abernathy et Camper, 1998 ; Volk *et al.*, 1998 ; Rompré *et al.*, 2000). LeChevallier *et al.* (1993), Abernathy et Camper (1998) et Rompré *et al.* (2000) suggèrent que la quantité de biofilm est directement liée à la quantité de produits de corrosion sur les parois. De plus, lorsque la quantité de dépôts de corrosion est réduite par l'ajout de phosphates, la limitation de ces dépôts consommateurs de désinfectants entraînerait un meilleur maintien du résiduel, et une amélioration consécutive de la qualité microbiologique des eaux (Geldreich, 1996 ; Vasconcelos *et al.*, 1996).

Dans les quelques études où seule la réponse physiologique des bactéries était étudiée, les concentrations en phosphates appliquées étaient largement inférieures aux doses usuelles lors de traitements anti-corrosion (Miettinen *et al.*, 1997 ; Sathasivan *et al.*, 1997 ; Sathasivan et Ohgaki, 1999). Cependant, les phosphates pourraient directement influencer la physiologie bactérienne : éventuellement ils pourraient induire une croissance bactérienne en cas de carence en phosphates dans les eaux mais également ils pourraient inhiber ou limiter la croissance des bactéries, comme cela est démontré dans le domaine agroalimentaire (Vareltzis *et al.*, 1997).

Dans ce contexte, les essais entrepris ici ont eu pour objet (i) d'évaluer si les phosphates appliqués à des concentrations comparables à celles des traitements anticorrosion peuvent

conduire à une croissance bactérienne ou modifier l'activité des bactéries libres et fixées et (ii) évaluer, dans quelles mesures, la corrosion influence le signal bactériologique mesuré.

Dans un premier temps, des essais effectués à Nancy visaient à mettre en évidence l'effet des phosphates sur la croissance et la cultivabilité des bactéries libres en fonction de la dose appliquée, en absence de corrosion

Puis, des essais ont été réalisés à Montréal afin de déterminer l'effet des phosphates sur la croissance, la cultivabilité et l'activité des bactéries fixées, en absence de corrosion. Ces résultats ont fait l'objet d'une publication intitulée « Biofilm responses to ageing and to a high phosphate load in a pilot drinking water system » soumise à la revue *Water Research*.

Enfin, l'effet des phosphates sur la croissance des bactéries en présence de corrosion a été étudié lors d'essais à Nancy et publié sous le titre « Effect of adding phosphate to drinking water on bacterial growth in slightly and highly corroded pipes » parue dans la revue *Water Research* (Vol. 35 ; n°4, pp. 1100-1105). Le matériel et les méthodes utilisés sont détaillés dans le chapitre III et les résultats bruts sont présentés en annexe (Tableaux IX.1 à IX.35).

IV.2 Effet des phosphates sur la croissance et la cultivabilité des bactéries libres

Les travaux présentés dans ce paragraphe ont été effectués afin d'étudier l'effet des phosphates sur l'évolution des populations autochtones libres présentes dans une eau potable en terme de croissance et cultivabilité bactérienne.

IV.2.1 Protocole

Dix litres d'eau de réseau provenant de l'usine Edouard Imbeaux de Vandœuvre-lès-Nancy ont été prélevés au robinet, déchlorés par ajout de thiosulfate de sodium et filtrés sur 0,8 µm afin de limiter la présence des protozoaires (cf. Chapitre III). À ce stade (T=0), les concentrations en bactéries cultivables et en bactéries totales par marquage au DAPI sont estimées. L'eau est répartie dans des bouteilles stériles en verre brun, traitées pour limiter les traces de phosphate et de carbone.

Des ajouts de phosphates sous forme d'acide phosphorique sont effectués dans les bouteilles à raison de :

- 0,3, 16, 33 ou 333 µg P/L (Condition A ; n = deux essais)
- 0, 5, 25, 50 ou 500 µg P/L (Condition B ; n = deux essais)

Pendant, 8 à 9 jours, les concentrations en bactéries cultivables sur gélose R2A (BHA) sont déterminées ainsi que les concentrations totales de bactéries par marquage au DAPI (CDT) (cf. Chapitre III).

IV.2.2 Suivi des conditions expérimentales

Pendant toute la durée des essais, le pH, la teneur en carbone organique dissous (COD), la teneur en nitrate et la teneur en phosphates ont été suivis par des prélèvements simultanés à ceux réalisés pour les analyses bactériologiques. Les résultats sont présentés dans les tableaux IV.1 pour la condition A et IV.2 pour la condition B, sous la forme des moyennes de toutes les mesures effectuées au cours des n essais.

Tableau IV.1 : Caractéristiques des eaux utilisées aux cours des essais en conditions statiques, condition A (n=2) (* : Carbone organique dissous)

Paramètres	Unités	Teneur théorique en phosphates ajoutés ($\mu\text{g P-PO}_4 \text{ L}^{-1}$)				
		0	3	17	33	333
pH		7,70±0,04	7,72±0,05	7,65±0,08	7,71±0,05	7,67±0,06
COD*	mg C L ⁻¹	1,78±0,10	1,75±0,11	1,78±0,10	1,78±0,11	1,79±0,09
Nitrates	mg N L ⁻¹	1,53±0,01	1,52±0,01	1,46±0,09	1,47±0,08	1,41±0,14
Phosphates	$\mu\text{g P L}^{-1}$	<10	<10	<10	18±8	296 ±26

Tableau IV.2 : Caractéristiques des eaux utilisées aux cours des essais en conditions statiques, condition B. (* : Carbone organique dissous)

Paramètres	Unités	Teneur théorique en phosphates ajoutés ($\mu\text{g P-PO}_4 \text{ L}^{-1}$)				
		0	5	25	50	500
pH		7,39±0,68	7,63±0,07	7,68±0,07	7,63±0,10	7,58±0,08
COD*	mg C L ⁻¹	1,62±0,04	1,60±0,06	1,61±0,04	1,63±0,06	1,59±0,08
Nitrates	mg N L ⁻¹	1,27±0,02	1,25±0,01	1,26±0,00	1,25±0,01	1,25±0,02
Phosphates	$\mu\text{g P L}^{-1}$	<10	<10	12±8	25±13	428±78

Au cours des essais en conditions A ou B, le ratio C/P (COD *versus* phosphates totaux) a varié de >178 à 6 et de >162 à 3,7 respectivement. Le pH moyen était de 7,7 et 7,6 et la teneur moyenne en nitrates de 1,48 et 1,26, respectivement au cours des essais en conditions A et B.

IV.2.3 Résultats

Les bactéries autochtones de l'eau ont été suivies sur gélose R2A (dénombrements des bactéries hétérotrophes aérobies ou BHA) afin d'évaluer l'effet des phosphates sur la

cultivabilité. Les dénombrements au DAPI (comptes directs totaux ou CDT) ont permis de connaître l'effet des phosphates sur la croissance des bactéries libres.

Que ce soit dans les essais en condition A ou ceux en condition B (Figure IV.1), l'effet de la dose en phosphates est peu marqué. Les différences observées en fonction de la dose de phosphates ajoutée ne sont pas statistiquement significatives ($p > 0,05$). Après 8 à 9 jours de phosphatation, les CDT et les BHA ne présentent pas de variations significatives suivant la dose de phosphates ajoutés. Quelle que soit la dose de phosphates appliquée, les pourcentages de bactéries totales cultivables restent stables vers 10% au cours de l'essai A et vers 3% au cours de l'essai B.

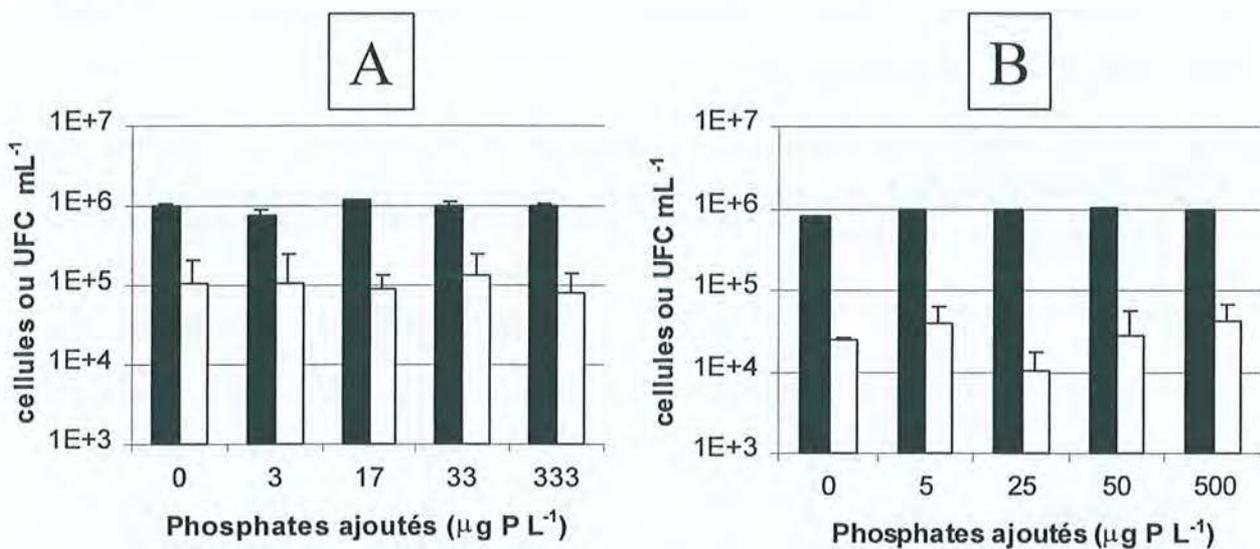


Figure IV.1 : Effets de différentes doses de phosphates sur les CDT (noir) et les BHA (Blanc) après 8 à 9 jours de phosphatation à 22°C. A : Essais en condition A ($1 \cdot 10^5$ cellules mL^{-1} et $6 \cdot 10^0$ UFC mL^{-1} à T=0) (n=2) ; B : Essais en condition B ($5 \cdot 10^5$ cellules mL^{-1} et $2 \cdot 10^1$ UFC mL^{-1} à T=0) (n=2). Les barres d'erreur représentent les écarts-types sur les mesures.

(CDT : Nombres de cellules marquées au DAPI)

(BHA : nombres bactéries cultivables exprimés en unités formant colonies (UFC à 7 jours, 22°C))

Les bactéries se multiplient dès les premiers jours, comme cela est représenté Figure IV.2 par les moyennes globales, effectuées à chaque point d'échantillonnage. Les dénombrements au DAPI, toutes concentrations de phosphates confondues, augmentent de 1 log entre T=0 et T= 9 jours lors des essais en condition A et également de l'ordre de 1 log entre T=0 et T= 8 jours lors de la condition B. Les nombres de bactéries cultivables augmente dans l'ensemble des situations entre la mesure à T= 0 jours et T= 8-9 jours, de l'ordre de plus de 2 log pendant l'essai A et de plus de 3 log pendant l'essai B log. Le pourcentage de bactéries cultivables augmente donc, passant de <0,05% à T=0 à plus de 10% et plus de 3 % après 8 à 9 jours de suivi, dans les essais en conditions A ou B respectivement.

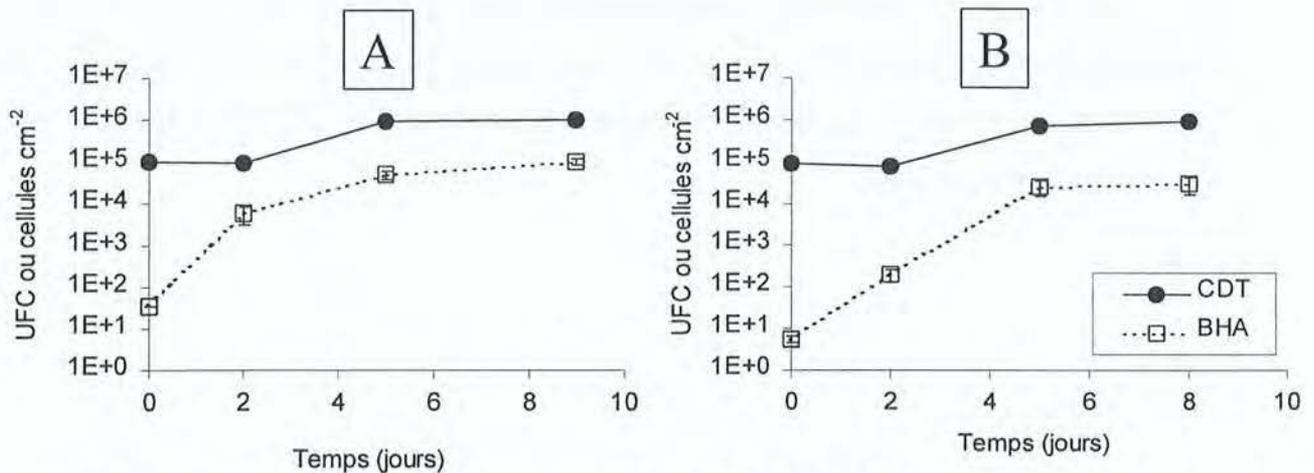


Figure IV.2 : Évolution pendant 9 jours des moyennes de CDT et des BHA, dans de l'eau de distribution placée à 22°C, toutes concentrations en phosphates ajoutés confondues A : Essai en condition A ; B : Essais en condition B. ($n = 2$ essais et 5 concentrations pour chaque condition A et B). Les barres d'erreur représentent les écarts-types sur les mesures.

(CDT : Nombres de cellules marquées au DAPI)

(BHA : nombres de bactéries cultivables exprimés en unités formant colonies (UFC à 7 jours sur R2A, 22°C))

Ces essais en conditions statiques n'ont pas permis de mettre en évidence de croissance bactérienne consécutivement aux ajouts de phosphates. En moyenne, sur l'ensemble des points de mesures (tous échantillonnages confondus), l'augmentation du pourcentage de cellules cultivables de l'ordre de 30% dans les flacons traités aux phosphates (toutes doses confondues) par rapport aux témoins (sans ajout de phosphates) n'est pas statistiquement significative. De plus, aucune tendance en fonction de la dose n'a été observée. Dans les conditions testées, les phosphates n'ont pas favorisé la croissance des cellules ni leur cultivabilité.

IV.3 Biofilm responses to ageing and to a high phosphate load in a pilot drinking water system.

Les essais réalisés à Montréal et présentés dans ce paragraphe, visaient à confirmer les résultats obtenus avec les eaux de Nancy, en étudiant l'effet des phosphates dans des conditions expérimentales différentes (eau utilisée, paramètres hydrauliques, choix des phosphates, choix des populations) et déterminer si l'effet des phosphates sur la physiologie des bactéries est similaire que les bactéries soient libres ou fixées.

Par rapport aux essais effectués à Nancy sur les bactéries libres, en conditions statiques, avec des solutions d'acide phosphorique ultrapures, ces essais réalisés à Montréal ont été

effectués (i) avec des bactéries fixées à des parois non corrodées (ii) une eau de distribution ayant un pH et une teneur en carbone organique total plus élevés que l'eau testée à Nancy, (iii) dans des conditions hydrauliques dynamiques simulant celles d'un réseau de distribution (iv) avec des phosphates (un mélange ortho-phosphate/polyphosphate) tels que ceux utilisés dans des programmes de lutte anti-corrosion. Les travaux réalisés à Montréal ont été soumis à la revue *Water Research*, sous le titre « Biofilm Responses to Ageing and to a High Phosphate Load in a Pilot Drinking Water System ».

**Biofilm Responses to Ageing and
to a High Phosphate Load in a
Pilot Drinking Water System**

Batté Magali*, **, Koudjonou Boniface⁽¹⁾, Laurent Patrick*, Mathieu Laurence**,
Coallier Josée*, Prévost Michèle*

* *NSERC Industrial Chair on Drinking Water, École Polytechnique de Montréal, CP
6079, Succ Centre Ville, Montréal (Qc) H3C 3A7 Canada.*

** *Laboratoire d'Hydroclimatologie, Santé Environnementale de l'EPHE -INSERM
U420, 9 avenue de la Forêt de Haye, Faculté de médecine, BP184, 54 505 Vandoeuvre-lès-
Nancy, France.*

⁽¹⁾corresponding author.

Tel: 1-514-340-4711, ext. 3733

FAX: 1-514-340-5918

Email: boniface.koudjonou@courriel.polymtl.ca

Abstract – The effects of ageing and of the high phosphate load of water have been evaluated on drinking water biofilms developed on a polycarbonate substratum. The biofilms were in a pseudo-equilibrium state for the evaluation. Phosphate was added at a rate greatly in excess of the stoichiometric nutrient requirement of the bacteria, at such concentrations as would be applied in a drinking water distribution system in a corrosion control program.

A multi-parameter approach was followed for monitoring: heterotrophic plate counts (HPCs), total direct counts (TDCs) and potential exoproteolytic activity (PEPA) were the methods used to characterise and monitor changes in bacterial biofilm. The carbohydrate, amino acid and phosphate contents of biofilms were analysed to characterise and monitor the biochemical composition of biofilm.

Phosphate treatment led to a twofold increase in the phosphate content of the biofilm (0.30 versus 0.15 $\mu\text{g P cm}^{-2}$), but did not affect other biological or chemical parameters.

Bacterial densities and carbohydrate content varied in the biofilm with ageing. Bacterial densities increased by roughly 1 log with the 3 methods, HPC, TDC and PEPA, and the carbohydrate content also increased by a factor of 5 between the 7th and the 15th week.

KEYWORDS: Biofilm, drinking water, phosphate, carbohydrates, amino acids, PEPA

1. Introduction

Drinking water distribution systems (DWDSs) are complex ecosystems in which maintaining microbiological quality is a major challenge. In most DWDSs, the density of suspended culturable bacteria increases between the plant and the consumer's tap as a function of disinfectant decay, substrate uptake and the presence of corrosion deposits (Kerneis *et al.*, 1995; Desjardins *et al.*, 1997; Prévost *et al.*, 1998; Power and Nagy, 1999). The development of bacterial biofilm is of great relevance to water quality, since the bacteria of biofilm directly influence bacterial density in the bulk phase through detachment (van der Wende, 1989).

It is suspected that using phosphate as an anticorrosion treatment may stimulate bacterial growth, since phosphorus is a major bacterial nutrient, as are carbon and nitrogen. Bacteria incorporate phosphorus from the bulk phase, assimilate it to the cytosol through transport systems (Rosenberg, 1987) and metabolise it as bio-molecules (DNA, phospholipids, polyphosphates, ATP, etc.). Polyphosphates, synthesised by most of the bacteria, have many physiological functions, such as chelating cations, storing phosphorus and buffering (Kornberg and Fraley, 2000). In particular, they induce the *rpoS* regulon, which is a central element in stationary-phase adaptation, leading to a resistance to oxidative stress by H₂O₂ (Shiba *et al.*, 1997).

The bacterial constitutive system of phosphate transport through membranes (called Pit, for phosphate inorganic transport) is non-efficient when the phosphate concentration in the water is lower than 5 µg P L⁻¹ (Rosenberg, 1987; Torriani-Gorini, 1994). Under this threshold concentration, bacteria induce other phosphate transport systems, such as the Pst (phosphate-specific transport) system (Lugtenberg, 1987; Webb and Cox, 1994). Therefore, bacterial survival, and by extension biofilm growth, might be easier when the phosphate concentration in the water is higher than 5 µg P L⁻¹. When phosphate concentrations are over this threshold, bacteria might save energy by limiting the syntheses of phosphate-specific transport systems and storing phosphate, as suggested by Kornberg and Fraley (2000).

In this context, typical phosphate additions for corrosion control, which range from 1 to 5 mg P L⁻¹, greatly exceed the nutritional requirement of bacteria and may have an effect on bacterial physiology (enhancing storage, enhancing disinfectant resistance, etc.). Indeed, previous observations have shown that phosphate addition:

- may promote bacterial growth in some waters with very low phosphorus content (Miettinen *et al.*, 1997; Sathasivan *et al.*, 1997),
- may have no measurable impact on bacterial biomass in carbon-limited waters (Lyons *et al.*, 1995; Batté *et al.*, 1999; Batté *et al.*, 2000, Appenzeller *et al.*, 2001),

- or may limit biofilm through its action on corrosion deposits (Abernathy and Camper, 1998; Rompré *et al.*, 2000).

These apparently contradictory results about the effect of phosphate on drinking water bacteriology may be due to differences in water quality, in particular the C/N/P nutrient ratio. The different conclusions may also reflect the various biomass measurement techniques used (culture on various agar media, total direct counts with orange acridine or DAPI, Most Probable Number), and may be a result of the scale of testing (laboratory, pilot or full-scale), population characteristics (biofilm of various ages or suspended populations, species of bacteria and protozoa in presence) and synergistic effects of disinfectant combined with the impact of the water matrix. In most studies, several parameters are tested simultaneously, making the determination of a causative factor difficult (particularly in studies in which investigations on corrosion deposits, disinfectants and nutrient variations are combined).

The main objective of this study is to evaluate the physiological responses of bacteria to a phosphate-based treatment. More specifically, the experimental program was set up to estimate the impact of phosphate-based corrosion inhibitors on:

- the density of fixed bacteria as measured by HPC, TDC and PEPA,
- the composition of biofilm through measurements of phosphate, carbohydrate and amino acid contents, and
- the effect of the age of the biofilm, which may interfere with responses.

Experiments were conducted in a controlled environment, using bench-scale systems, in order to limit the number of variable parameters.

2. Materials and methods

Annular reactors

Annular reactors (Characklis and Marshall, 1990) are bench-scale systems which to a large degree reproduce conditions observed in a drinking water system, and facilitate adjustment of operational parameters (pH, temperature, disinfectant, etc.). The annular reactors used in this study (Figure 1-A) are composed of an internal drum and an external cylinder made of polycarbonate. The internal surface of the external cylinder is equipped with 12 polycarbonate slides for biofilm sampling. During the experiments, the mean hydraulic residence time was set to 2 hours by controlling the inlet flow rate. The rotational speed was set to 40 rpm in order to induce a shear stress similar to that of water flowing at 0.6 m s^{-1} through a 6-inch (15.24-cm) diameter pipe.

Organic matter concentration of feed water

The annular reactors were supplied with enriched City of Montreal tap water, which is produced from the St. Lawrence River (Table 1). Water was stored for 20 hours in a 200-L tank to allow enough time for the chlorine residual to decay. The residual was monitored using the DPD method (APHA, 1998), and was found to be under the detection limit. The organic content of the tap water ranged from 1.9 to 2.4 mg C L⁻¹ of TOC and 0.2 to 0.5 mg C L⁻¹ of BDOC. In order to enhance bacterial colonisation in the reactors, the dechlorinated tap water was enriched with a solution containing a mixture of bio-available organic components, as proposed by Camper (1995). The sterilised carbon stock solution contained a total concentration of 20 mg C L⁻¹, obtained with ethyl alcohol at 94%, propionaldehyde, parahydroxybenzoic acid, benzoic acid and acetate, added at equimolar-carbon concentrations. The stock solution was prepared weekly and autoclaved at 121°C for 20 minutes.

Table 1: Physico-chemical characteristics of tap water (Montréal, Canada).

Parameter	Units	Mean (min-max) for 2000	n
Temperature	°C	11 (1-23)	223
Turbidity	UTN	0.23 (0.08-1.26)	334
Alkalinity	mg CaCO ₃ -eq L ⁻¹	83 (76-87)	53
Total hardness	mg CaCO ₃ -eq L ⁻¹	117 (109-125)	53
Oxygen demand	mg KMnO ₄ L ⁻¹	1.0 (0.6-1.6)	47
Dissolved organic carbon	mg C L ⁻¹	2.42 (2.00-3.51)	232
pH		7.84 (7.58-8.21)	331
Total Iron	mg Fe L ⁻¹	0.018 (0.005-0.046)	24
Chlorides	mg L ⁻¹	21 (18-22)	53
Conductivity	µS cm ⁻¹	290 (270-310)	365

A continuous-flow dilution was performed in a mixing bottle supplied with 32 mL/min of de-chlorinated tap water and 0.3 mL/min of carbon stock solution, and the de-chlorinated tap water sent to the inlet of the pilots contained an additional 250 µg C L⁻¹ (approximately) of bio-available carbon.

Phosphate solution

The phosphate solution was prepared by diluting a commercial corrosion inhibitor solution (AquaMag, Kjell Inc, Canada) containing 2/3 polyphosphate and 1/3 orthophosphate (w/w of phosphorus) in autoclaved deionised water. The solution was stored in a brown glass bottle and renewed weekly. Storage and dilution did not affect the 2/3 polyphosphate ratio in the solution, as shown by orthophosphate and polyphosphate analyses over a period of more than 2 weeks on a batch assay (data not shown).

Biofilm sampling and conditioning prior to analysis

The polycarbonate slides colonised by biofilm were sampled from the annular reactors through openings on the top of each slide which were hermetically plugged during the experiment. The slides were placed in multi-vessel slide-holders designed to accommodate two slides (Figure 1-B). Ten identical vessels defined identical biofilm surfaces (1.23 cm^2) on each slide. Such a system allows simultaneous measurements.

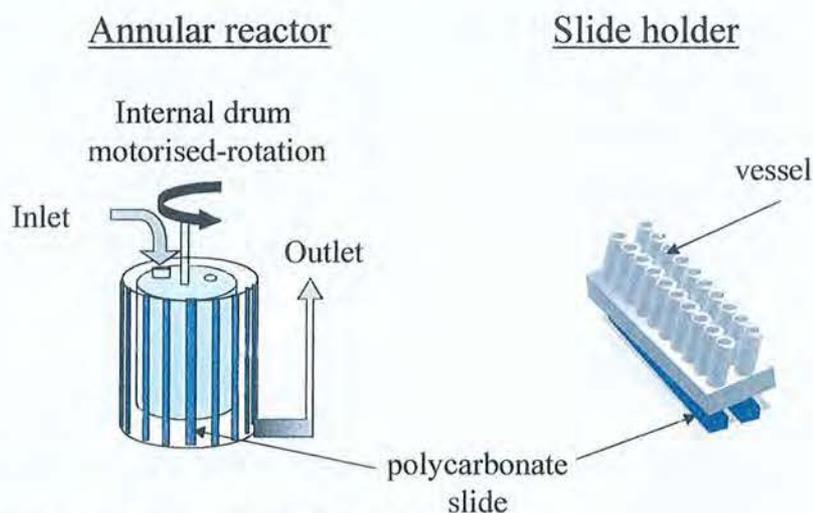


Figure 1: (A) Annular reactor, (B) Polycarbonate slide sampling system.

Six different methods were used to characterise the biofilm: i) cultivation (HPC), ii) total direct count (TDC), iii) potential exoproteolytic activity (PEPA), iv) phosphate concentration, v) carbohydrate concentration, and vi) amino acid concentration in the biofilm. PEPA estimation was performed directly on the biofilm attached to the slide. For the TDC and HPC measurements, the biofilm was suspended by sonication (2W, 2 minutes) (Ref. P-04714-10, 70-watts Ultrasonic Processor, Cole Palmer, Canada) in tap water sterilised through $0.22\mu\text{m}$ filtration. Sonication parameters (power and time of exposure) were optimised in order to reach the maximal TDC and HPC counts (data not shown).

Biofilm exopolymers are principally composed of a carbohydrate skeleton (polysaccharides) and proteins (Sutherland, 1977; Nielsen *et al.*, 1997). Since exopolymers are complex structures, they were hydrolysed so that they could be studied through their sub-units (mono/disaccharides and amino acids). For the hydrolysis, one slide sampled each annular reactor and was cut into pieces. Hydrolysis took place (0.24 M HCl , at 100°C for 3 hours) under a nitrogen headspace, as suggested by Koudjonou *et al.* (1997). Aliquots of this hydrolysed sample were prepared to analyse amino acid, carbohydrate and phosphate contents. Samples were stored at $6 \pm 2^\circ\text{C}$ and analyses were performed within 12 hours for amino acids and carbohydrates, and within 72 hours for phosphate.

Heterotrophic plate counts (HPCs)

HPC was used as the culture reference method. HPCs were performed on R2A agar plate (ref.1826-17-1, Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA) incubated for 7 days at 22 ± 2 °C, and the results were expressed as CFU per cm^2 (APHA, 1998).

Potential exoproteolytic activity (PEPA)

PEPA is a method for estimating the activity of the biomass, by means of which the potential for cellular reactivity toward proteic organic matter is evaluated. PEPA was performed directly on the biofilm samples, as proposed by Laurent and Servais (1995). Water was collected just prior to the point of carbon enrichment and passed through a 0.22- μm filter. The 1.23- cm^2 colonised surface delimited by one vessel of the multi-vessel sampling system (Figure 1-B) was incubated in the presence of this sterile tap water to which was added 1 mM of L-Leucine- β -Naphthylamide (LL β N) (ref. L-0376, Sigma-Aldrich). Bacterial hydrolysis of LL β N produced β -Naphthylamine (β N) the fluorescence of which was measured at a 410-nm excitation and a 340-nm emission wavelength (spectrofluorimeter RF-1501, Shimadzu). The increase in fluorescence was plotted versus time, giving a slope equal to the β -naphthylamine production rate ($\text{nmol min}^{-1} \text{cm}^{-2}$). Three vessels of the slide-holder (Figure 1-B) provided triplicate measurements for the analysis.

Total direct counts (TDCs)

The total number of bacteria was determined by DAPI staining, as proposed by Saby *et al.* (1997). Duplicate samples were taken from two different vessels of the multi-vessel system, and the results were expressed as cells per cm^2 .

Amino acids

Hydrolysed amino acids were derivatised by o-phthaldialdehyde and analysed by HPCL, using a NovaPak C18 separation column (Waters) (Dossier-Berne *et al.*, 1994). Fluorescence was detected by an excitation at 350 nm and an emission of a 418-nm wavelength (fluorescence detector 470, Waters). Duplicates of direct samples were made.

The detection limit was measured and found to be between 0.012 and 0.029 nmol cm^{-2} for the 16 amino acids analysed.

Carbohydrates

Prior to analysis of carbohydrates, hydrolysed samples were filtered through a Dionex OnGuard-Ag cartridge to remove chloride.

Analysis adapted from Gremm and Kaplan (1997) was performed by HPLC with an anion exchange column (CarboPac PA-10, Dionex) under an isocratic elution with an 18-mM NaOH solution, freshly made up every 1-2 days and stored under a blanket of helium. A

pulsed amperometric detector (PAD) was used for detection. Detection limit was estimated to be between 0.001 and 0.019 nmol cm⁻². Direct samples and sampled diluted in a 1:5 ratio in deionised water were measured in duplicate.

Phosphate measurements

The concentration of phosphate in liquid phase was obtained by colorimetry, and measurements were taken on the day of sampling. Polyphosphates were hydrolysed to orthophosphate by a persulphate digestion method (APHA, 1998) prior to analysis. Orthophosphate concentrations were determined by the ascorbic acid method with a detection limit of approximately 10 µg P L⁻¹ (APHA, 1992). The absorbance was measured at 880 nm on a spectrophotometer (MiltonRoy, Spectronic 1001plus, New York, USA). All results were expressed as milligrams of P-PO₄ per litre.

Phosphate concentration in biofilm was analysed by HPLC. The ionic chromatographic method, consisting of an isocratic elution with a 5-mM bicarbonate solution and a 12-mM carbonate solution, was the one recommended by Dionex for an AS9HC analytical column. The detection limit was 10 µg P L⁻¹.

Experimental set-up

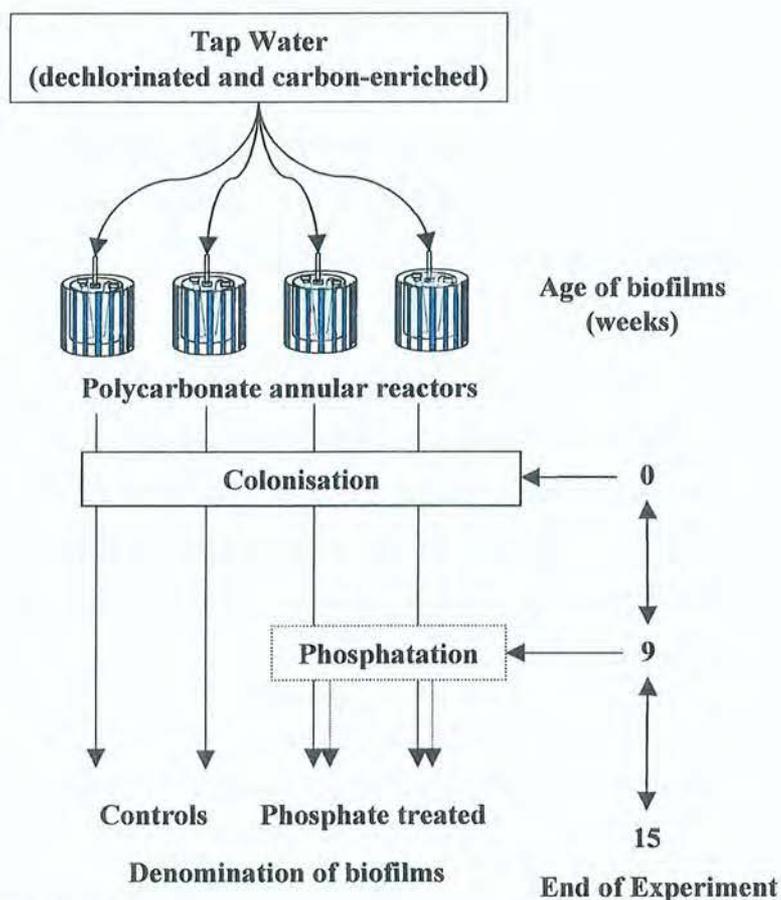


Figure 2: Experimental set-up.

Figure 2 summarises the experimental plan. Four polycarbonate annular reactors were used to study the biofilms, which were sampled every 2 weeks. The reactors were seeded with dechlorinated carbon-enriched tap water for 9 weeks. Then, two reactors (referred to as phosphate treated biofilms) were supplied with phosphates at the dosage rate of 0.5 mg P L^{-1} for the next 6 weeks. The other two reactors were used as non-phosphate-exposed controls

3. Results

Monitoring of reactor operation

During the experiment, the flow rate was measured daily at the reactor influents, while temperature, rotor speed and total organic carbon (TOC) were measured weekly, and HPC and TDC every 2 weeks. Once the phosphate had been applied, its concentration at the outlet of the reactors was monitored weekly. Results of these measurements are summarised in Table 2, and show that the quality of the enriched tap water was stable.

Table 2: Operational conditions and averaged characteristics of the feed water.

Parameter	Average value \pm SD	n	Units
HRT	1.99 ± 0.05	77	h^{-1}
Total organic carbon	2.6 ± 0.3	13	mg-C L^{-1}
Phosphate	<d.l.	30	mg-P L^{-1}
pH	7.5 ± 0.2	8	
Temperature	20.2 ± 1.7	47	$^{\circ}\text{C}$
HPC	$(6.7 \pm 2.3) \times 10^4$	24	CFU mL^{-1}
TDC	$(1.1 \pm 0.3) \times 10^6$	24	Cells mL^{-1}

n = number of measurements

dl: detection limit

Effect of ageing and phosphate treatment on biofilm densities

The biofilms studied here are in the range of biofilms developed in distribution systems, with roughly 10^6 to 10^7 cells cm^{-2} and 10^5 to 10^6 CFU cm^{-2} (Figure 3). During the sampling period from the 5th to the 15th week of colonisation, bacterial densities increase, regardless of the measurement technique used, by roughly 0.1 log per cm^{-2} and per week of colonisation. TDC counts increased by 0.10 log cm^{-2} week⁻¹ from T=5 weeks to T=15 weeks. PEPA estimations and HPC counts also increased during the same sampling period by 0.13 log cm^{-2} week⁻¹ and 0.10 log cm^{-2} week⁻¹ respectively. As expected, the actual value of bacterial density varied considerably as a function of the technique used (HPC, PEPA, TDC). The highest bacterial densities were obtained by TDC with a mean of all measurements on controls of $7.1 (\pm 0.4) \text{ log cm}^{-2}$. PEPA estimation may be converted into numbers of bacteria using factors as suggested by Laurent and Servais (1995). They have noted a linear relationship between the rate of βN produced and bacterial biomass, regardless of the origin of the mixed biofilm, and suggest a value of 6.57 to convert the rate of βN produced into a

bacterial biomass. With such a conversion of PEPA estimation to bacterial number, the lowest bacterial densities were obtained using HPC with a mean value of $5.4 (\pm 0.4) \log \text{cm}^{-2}$.

Whereas ageing clearly affects biofilm densities, differences of evolution in the bacterial density of biofilm between the control and the phosphate treated biofilms were non-significant (T-test ; $p > 0,05$) regardless of the method used.

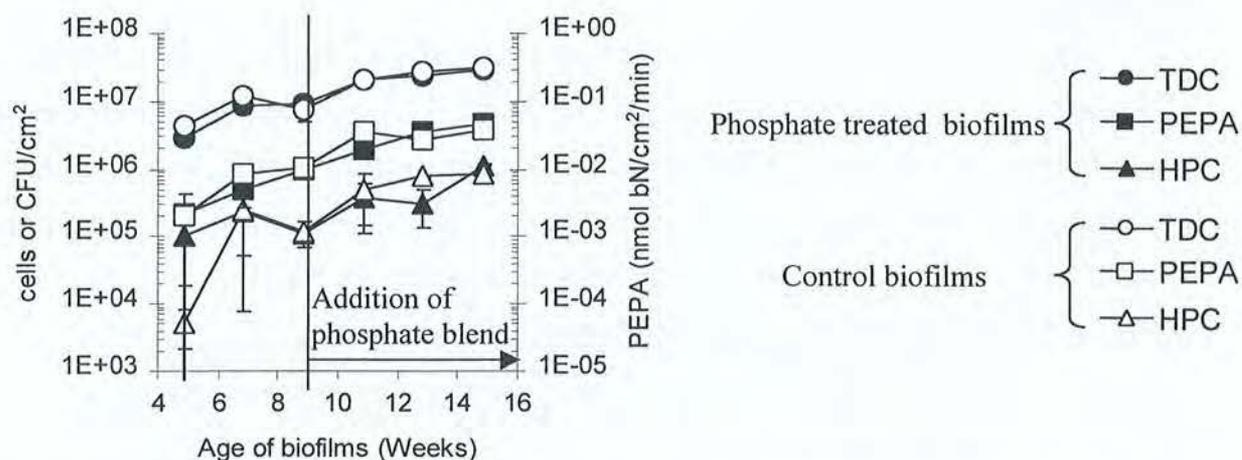


Figure 3: Impact of phosphate on TDC (total direct counts with DAPI staining), HPC (heterotrophic plate counts on left Y axis) and PEPA (potential exoproteolytic activity on right Y axis). Each point is the mean of values from duplicate reactors and duplicate samples.

Effects of ageing and phosphate treatment on the chemical composition of biofilm

Results on the chemical composition (carbohydrates, amino acids and total phosphate) of the biofilms developed in the control and phosphate treated reactors are presented in Table 3, and shown dotted on Figures 4 and 5.

Following 6 weeks of phosphate exposure, a two-fold increase in phosphate content was measured in the phosphate treated biofilms ($n = 2$) as compared to the controls ($n = 2$) (0.33 versus $0.16 \mu\text{g P cm}^{-2}$) (Table 3).

Amino acid content

Total amino acid contents are presented Table 3. In neither the controls nor the phosphate treated reactors does the age of the biofilm induce any change in total amino acid content, as the values remain almost constant over time. There was no significant variation in the total concentration of amino acids due to phosphate addition between the controls and the phosphate treated biofilms (T-test, $p = 0,17$).

In expressing content per cell as counted by TDC from weeks 9 to 15, there was less amino acid in the older biofilms (Table 4), which means that phosphate treatment had no impact on amino acid content as expressed by the number of TDC cells.

Table 3: Concentration of total carbohydrates, total amino acids and phosphate in 9-week-old and 15-week-old biofilms.

Age of biofilms (weeks)	9		15	
Denomination of Biofilm	Controls (n=2)	Phosphate treated (n=2)	Control (n=2)	Phosphate treated (n=2)
Treatment	None	None	None	PO ₄ addition
Bacterial density (Cells cm ⁻²)	9.25 10 ⁶	5.43 10 ⁶	2.84 10 ⁷	3.21 10 ⁷
Carbohydrates (nmol cm ⁻²)	3.6 ± 0.1	4.3 ± 0.1	15.4 ± 3.1	15.6 ± 0.9
Carbohydrates (ng-C cm ⁻²)	242±9	265±8	1069±211	1089±65
Amino acids (nmol cm ⁻²)	1.22±0.05	1.08± 0.06	1.25 ± 0.02	1.15 ± 0.02
Amino acids (ng-C cm ⁻²)	49±2	42±2	54±1	51±1
Phosphates (µg P cm ⁻²)	ND	ND	0.16 ± 0.02	0.33 ± 0.00

ND: No data

The occurrence of individual amino acids was also studied. Figure 4 shows the amino acid concentrations over time in the control and the phosphate treated reactors.

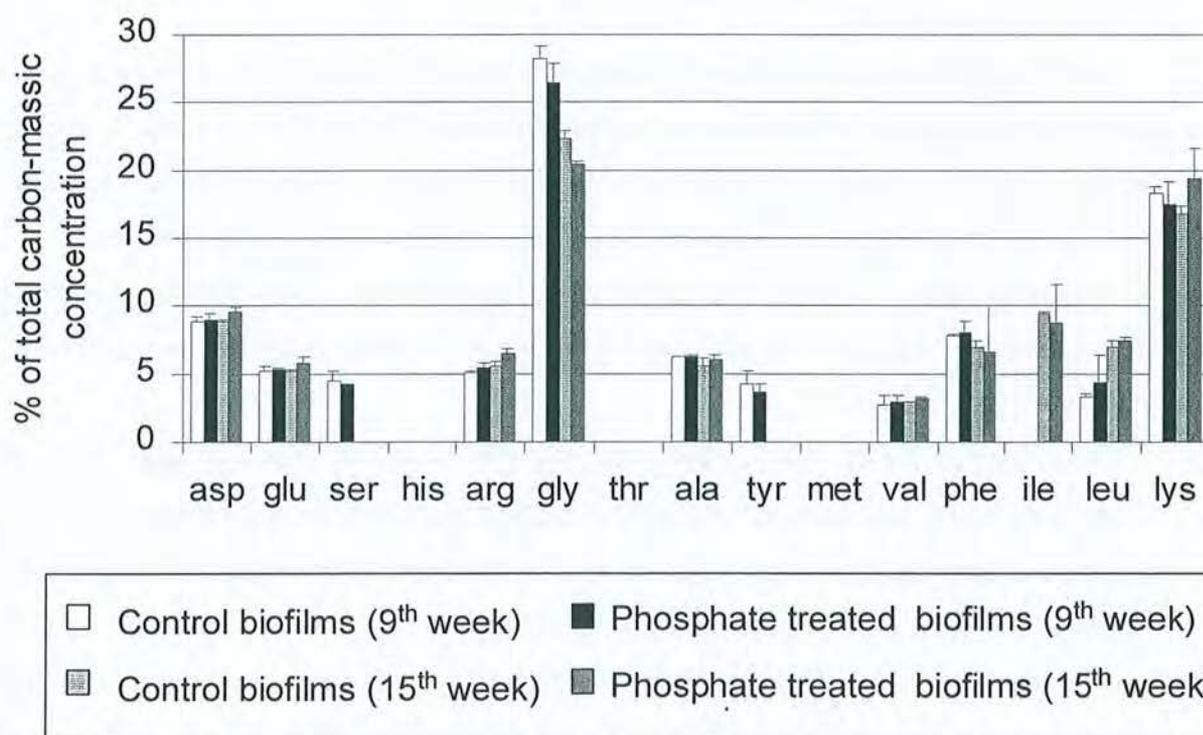


Figure 4: Relative percents of the various amino acids in control biofilms 9 weeks old (white) and 15 weeks old (grey), and in phosphate treated biofilm prior to phosphate treatment (9 weeks old – black) and following phosphate treatment (15 weeks old – dashed line). Expressed as % of total massic concentration on a carbon basis

In all the biofilms, after 9 and 15 weeks of colonisation, the most representative amino acids were glycine, lysine, asparagine and alanine. A slight decrease in glycine concentration occurred in both the control and phosphate treated biofilms between weeks 9 and 15. However, glycine was still the main amino acid in all the biofilms studied. Isoleucine and leucine content was enhanced between weeks 9 and 15, but never accounted for more than 8% of the total molar amino acid concentration. Other amino acids were not affected by ageing.

Carbohydrates in biofilm

Table 3 summarises the carbohydrate content of the test biofilms. Nine-week-old biofilms presented an average of 3.6 ± 0.1 to 4.0 ± 0.1 nmol cm⁻² of total carbohydrate content. Six weeks later, the carbohydrate content had increased to 15.4 ± 3.1 nmol cm⁻² in the controls and to 15.6 ± 0.9 nmol cm⁻² in the phosphate treated biofilms, which means that there was no significant variation in the total concentration of carbohydrates following phosphate addition (T-test, p=0,9).

Ageing did have a major impact on the amount of carbohydrate per unit of surface area. An approximately fivefold increase in carbohydrate concentration was noted between weeks 9 and 15. Figure 5 shows the concentration of individual carbohydrates over time for phosphate treated and control biofilms.

Carbohydrate content expressed in terms of carbon content can also be expressed as a function of the number of bacterial cells obtained with TDC, PEPA or HPC. In expressing content per cell as counted by TDC the same week of the chemical analysis (i.e. week 9 or week 15), no clear change in carbohydrate content per cell was observed (Table 4).

No major change in individual carbohydrate composition occurred with phosphatation, compared to the shift in individual carbohydrate concentrations observed previously as a function of ageing (Figure 5).

Glucose remained the main carbohydrate present throughout the experiment, representing 27.4% to 40.5% of total carbohydrate concentration in the controls and 33.6% to 40.1% in the phosphate treated biofilms after 9 and 15 weeks of colonisation respectively. Mannose and xylose (which could not be separated during analysis) represented a significant part of the total carbohydrate in the biofilms. However, their relative percentages were clearly reduced subsequent to ageing in the phosphate treated and control biofilms. This was also noted for minor carbohydrates like 2-deoxy-D-galactose, glucosamine HCl and sucrose. The relative contribution of fructose was reduced to an undetectable level.

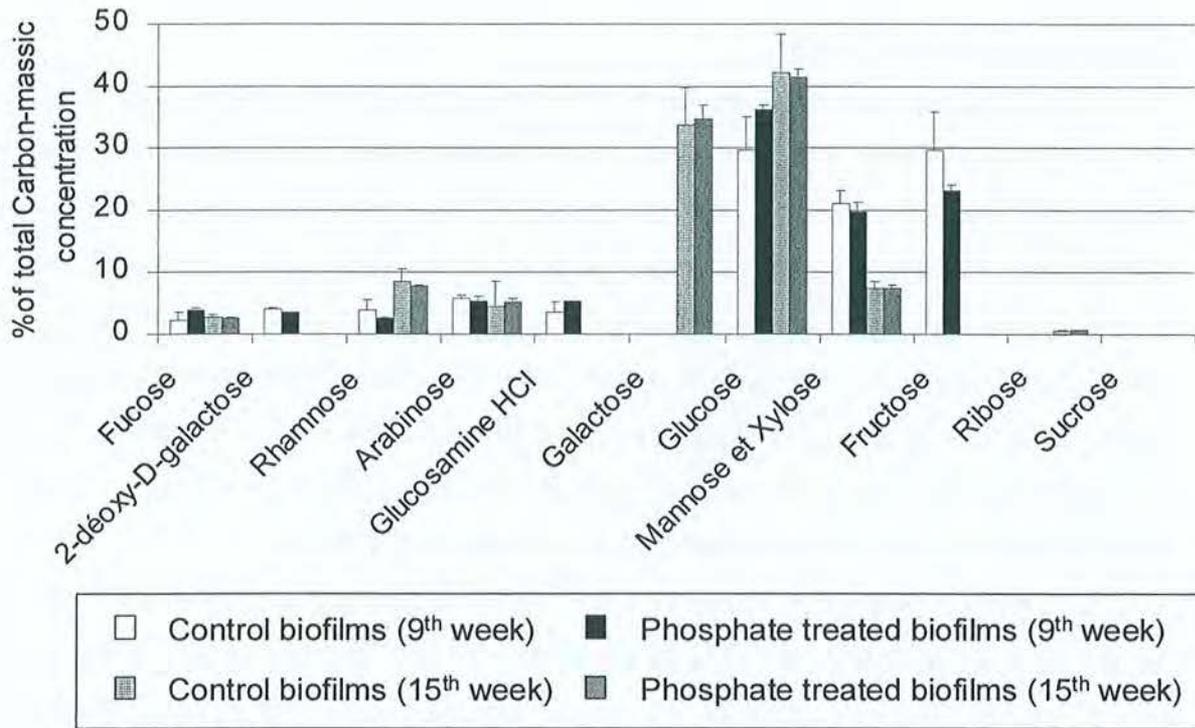


Figure 5: Relative percents of the various carbohydrates in control biofilms (9 weeks old: white and 15 weeks old: grey), and in phosphate treated biofilm prior to phosphate treatment (9 weeks old – black) and following phosphate treatment (15 weeks old – dashed line). Expressed as % of total massic concentration on a carbon basis

In contrast, a tremendous increase in galactose was noted from the 9th to the 15th week. The contribution of galactose to the total molar concentration reached more than 30% in 15-week-old biofilms, and that of rhamnose increased more than twofold between the 9th (<4%) and the 15th week (8-10%)

4. Discussion

Blended phosphates are corrosion inhibitors frequently used to limit corrosion in DWDSs. Orthophosphates, and possibly polyphosphates, are bacterial nutrients and may stimulate the growth of fixed and suspended bacteria. Recent experiences suggest that corrosion control using phosphate based inhibitors contributes increasing microbial quality and enhancing compliance records (LeChevallier *et al.*, 1996; Olson, 1996). However, this positive impact may be the result of better maintenance of chlorine residual and the limitation of corrosion deposits.

The physiological response of biofilm bacteria to a phosphate treatment is evaluated through bacterial density and activity measurements (TDC, HPC, PEPA) and through the assessment of biofilm chemical composition (phosphate, carbohydrates and amino acids).

Global characteristics of biofilm

The biofilms were developed on annular reactors supplied with enriched City of Montreal tap water. Those biofilms are in the range of biofilms developed in distribution systems, with roughly 10^6 to 10^7 cells cm^{-2} and 10^5 to 10^6 CFU cm^{-2} . The greater proportion of carbohydrates in biofilms than of amino acids is in accordance with Dott and Schoenen (1985), Vandevivere and Kirchman (1993) and Koudjonou *et al.* (1997 and 1998). The main amino acids, as noted in other studies carried out on water distribution systems, were glycine, Lysine, aspartic acid, alanine (Koudjonou *et al.*, 1997 and 1998; Crissot-Laruade *et al.*, 1999). The main carbohydrates in our biofilms were glucose, galactose and mannose as reported by Koudjonou *et al.* (1997 and 1998) and Crissot-Laruade *et al.* (1999).

Considering a bacterial biomass of 20×10^{-15} g-C cell ($20 \text{ fg-C cell}^{-1}$) (Servais *et al.*, 1991; Laurent and Servais, 1995), carbohydrates are supposed to be mainly extra-cellular, since they would represent 127% to 226% of the cellular mass depending on biofilm, which greatly exceeds values reported in literature of 3.4% to 16,6% (Gottschalk, 1986; Poindexter and Leadbetter, 1989; Maier *et al.*, 2000). This is also confirmed by the composition of exopolymers as a percentage of carbohydrates, which is close to that observed for exopolymers by Sandford (1979) and Hejzlar and Chudoba (1986), and also close to that of the suspended and 0.45- μm -filtrated biofilm observed by Crissot-Laruade *et al.* (1999). By contrast, it is quite different from the composition of isolated cells, as noted by Cowie and Hedges (1992).

Effect of ageing on biofilm

Ageing was observed to have a major impact on the density and composition of biofilm. Ageing leads to a bacterial density increase, regardless of the measurement technique used, of roughly 1 log.

Ageing also affects carbohydrates; however, it does not affect amino acids, as already noticed by Dott and Schöenen (1985). Zhang *et al.* (1998), who worked with a chemostat to form biofilms, also noted that ageing induces an increase in the total carbohydrate concentration.

Since bacterial densities increase with ageing, the carbohydrate content per cell was evaluated to determine how bacterial biomass synthesis changes. The mass of the carbohydrate matrix surrounding one TDC cell, for example, as expressed through its carbon

content, does not increase with ageing, suggesting a constant synthesis of carbohydrates (Table 4). Now, as total amino acid content is not influenced by ageing, the carbohydrate/amino acid ratio (carbon-based massic concentration) increased from 3 after 9 weeks of colonisation to 20 after 15 weeks (Table 4). The carbohydrate/amino acid ratio and the carbohydrate/protein ratio are usually observed to range from 2 to 30, increasing with the age of the biofilm (Dott and Schoenen; 1985; Vandevivere and Kirchman, 1993; Koudjonou *et al.* 1998).

Table 4: Bacterial contents of amino acids, carbohydrates and phosphate.

Type of Biofilm	Controls (n=2)		Phosphate treated (n=2)	
	9	15	9	15
Age of biofilms (weeks)				
Treatment	None		None	PO ₄ addition
Carbohydrates (fg-C cell ⁻¹)	27.5 ± 3.0	38.0 ± 10.2	38.9 ± 14.4	34.7 ± 6.5
Amino acids (pg-C cell ⁻¹)	5.1	2.1 ± 0.2	6.5 ± 1.9	1.8 ± 0.5
Phosphates (fg-P cell ⁻¹)	ND	5.6 ±	ND	10.3
Carbohydrates/Amino acids				
Massic ratio	4.8	19	5.9	20
Molar ratio	3,0	12,3	3,7	13,6

ND: No data

Evolution of the carbohydrate/amino acid ratio with ageing is observed in most of the studies and suggests that there are changes in biofilm with ageing other than a massic increase.

Biofilm spectra also change with ageing, with a reduction in some carbohydrates (Fructose, 2-deoxy-D-galactose, glucosamine HCl) and amino acids (serine or tyrosine), and an increase in others (Galactose, rhamnose, andribose for carbohydrates, and leucine and isoleucine for amino acids).

The changes in the main carbohydrates in biofilm with ageing may reflect an adaptation of bacterial synthesis to the bacterial biofilm, which is thicker.

Effect of phosphate on biofilm

The testing conditions were chosen to reflect the carbon-limiting nutrient situation, which is the situation most commonly found in drinking water distribution systems (Servais *et al.*, 1992).

In our experiments, the background phosphate concentration was lower than the detection limit of 10 µg L⁻¹. With 200-µg BDOC L⁻¹ in tap water, the C/P ratio was low (C/P ≈ 20) in comparison with the stoichiometric nutritional ratio of 100 for bacterial growth. This suggests

that the water source was probably carbon-limited. The bacterial densities were not affected by the phosphate treatment, suggesting that phosphate concentration was not limiting. However, even in a carbon-limiting environment, phosphorus may have an effect on bacterial physiology. At least for *E. coli*, there is an energetic advantage to living in an environment where inorganic phosphorus concentration is higher than $5 \mu\text{g P L}^{-1}$, since, in such an environment, bacteria use only constitutive systems (Rosenberg, 1987; Torriani-Gorini, 1994). The chemical parameters (carbohydrates and amino acids) were not modified by phosphate treatment, suggesting that bacterial physiology was not influenced by phosphorus.

Indeed, phosphate-induced growth was only observed in some very particular waters, as suggested by the authors, with extremely low phosphorus content (Miettinen *et al.*, 1997; Sathasivan *et al.*, 1997). In those particular cases, tremendous growth was observed with phosphate addition as low as $1 \mu\text{g P L}^{-1}$.

There was an accumulation of phosphorus in phosphate treated biofilm. However, the phosphate content of both the control and the phosphate treated biofilms was considerably larger than can be explained by interstitial water and bacterial content. An estimation of the biofilm water content (data not shown) indicates that the phosphate added during the water phase represents less than 5 percent of the phosphate that accumulated in the phosphate treated biofilms. The possible accumulation routes are intracellular storage and incorporation on the exopolymers.

If phosphate accumulation was intracellular, with a bacterial biomass of 40 fg of dry matter per cell, phosphate participation in biomass would range from 14 to 26%, which is unlikely for tap water biofilm bacteria. Therefore, phosphorus is supposed to be mainly subject to extra-cellular accumulation. Moreover, phosphate accumulation in biofilm was the only measured parameter that changed subsequent to phosphate treatment, suggesting an equilibrium phenomenon between water and biofilm. Exopolymers are rather polyanionic, and therefore they are able to entrap organic matter (Costerton *et al.*, 1995), which in turn may entrap anions like phosphate. The techniques used here do not allow discrimination among these hypotheses.

5. Conclusions

Biofilm age influences bacterial densities and carbohydrate concentrations, even when pseudo-equilibrium is reached. Several experiments conducted on biofilm model systems limit the experimental period to a few weeks. Our results suggest that significant differences in biofilm density and composition continue to occur over 15 weeks.

The application of a phosphate blend for corrosion control produced a twofold accumulation of phosphates in the biofilm. Phosphate may be incorporated by the cells, and, more probably, may be entrapped in the biofilm matrix.

Phosphate treatment did not influence bacterial densities, whatever the measurement method used.

Phosphate addition had no impact on the amino acid or carbohydrate concentrations in biofilms, which are elemental components of proteins and polysaccharides in the biofilm matrix and in cells.

6. Acknowledgments

This research was supported by the partners of the NSERC (Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada) Industrial Chair on Drinking Water; namely, the City of Montreal, the City of Laval, Triax, Vivendi Water-John Meunier-U.S. Filter. The authors would like to thank Jacinthe Maily and Julie Philibert of the NSERC Industrial Chair on Drinking Water for their valuable assistance.

7. References

- Abernathy C.G. and Camper A.K. (1998) The effect of phosphorus based corrosion inhibitors and low disinfectant residuals on distribution biofilms. In *Proceedings of the Water Quality Technology Conferences: San Diego (Ca), 1-4 November*, Am. Water Works Assoc.
- APHA (American Public Health Association). 1998. *Standard methods for the examination of water and wastewater*, Washington D. C..
- Appenzeller B. M. R., M. Batté, L. Mathieu, J.-C. Block, V. Lahoussine, J. Cavard and D. Gatel (2001) Effect of adding phosphate to drinking water on bacterial growth in slightly and highly corroded pipes. *Wat. Res.* 35(4), 248-253.
- Batté M., Koudjonou B., Prévost M., Block J.-C., Hartemann P. and Mathieu L. (1999) Approaches to evaluate impact of corrosion inhibition with polyphosphate on disinfection of a drinking water biofilm. *Conferences on biofilm systems: New York, 17-20 October 1999*, IAWQ/IWA. Conference 48.
- Batté M., Koudjonou B., Laurent P., Coallier J. and Prévost M. (2000) Does phosphate-based anticorrosion treatment enhance biofilm resistance to disinfection? In *Proceedings of the Water Quality Technology Conference: Salt Lake City (Uh), 5-9 November*, Am. Water Works Assoc.
- Camper A.K. (1995) Factors influencing biofilm regrowth in drinking water distribution systems. *PhD Thesis. Montana State University – Bozeman (USA)*. 178p.
- Characklis W.G. and Marshall K.C. (Eds) (1990) *Biofilms*. John Wiley and Sons: Toronto. 796p.
- Costerton J. W., Lewandowski Z., Caldwell D. E., Korber D. R. and Lappin-Scott H. M. (1995) Microbial biofilms. *Annu. Rev. Microbiol.* 49, 711-745.
- Crissot-Laruade M., Merlet N. and Legube B. (1999) Biofilm formation in distribution systems supplied with oligotrophic water: the case of an hydropathic establishment. *J. Eur. Hydrol.* 30(2): 201-219 (in French).

- Dossier Berne F., Panais B., Merlet N., Cauchi B. and Legube B. (1994) Total amino acid analysis in natural and drinking waters. *Env. Technol.* 15(10), 901-916.
- Dott W., and Schoenen D. (1985) Qualitative and quantitative determination of bacterial populations in an aquatic environment. 7. Development of bacterial growth on raw materials exposed to potable water. *Zentralbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg.* 180(5-6), 436-447. (in German)
- Gottschalk G. (Ed) (1986) Bacterial metabolism. Springer-Verlag: New York. 359 p.
- Gremm, T. J.; and Kaplan L. A. (1997) Dissolved carbohydrates in streamwater determined by HPLC and pulsed amperometric detection. *Limnol. Oceanogr.* 42(2), 385-393.
- Kerneis A., Nakache F., Deguin A. and Feinberg M. (1995) The effect of water residence time on the biological quality in a distribution network. *Wat. Res.* 29(7), 1719-1727.
- Koudjonou K. B., Prévost M. and Lafrance P. (1997) Assessing of the impact of chlorination on the composition of a drinking water biofilm. In *Proceedings of the Water Quality Technology Conferences: Denver, 9-12 November*. Am. Water Works Assoc.
- Laurent P. and Servais P. (1995) Fixed bacterial biomass estimated by potential exoproteolytic activity. *Can. J. Microbiol.* 41(8), 749-752.
- LeChevallier M.W., Shaw N., Smith D.B. (1996) Full-scale studies of factors related to coliform regrowth in drinking water. *Appl. Environ. Microbiol.* 62(7), 2201-2211.
- Lugtenberg B. (1987) The *pho* regulon in *Escherichia coli*. In *Phosphate metabolism and cellular regulations in microorganisms*. Torriani-Gorini A., F. G. Rothman, S. Silver, A Wright, E. Yagil (Eds). pp 1-11. American Society for Microbiology: Washington D. C.
- Lyons J. L., Pontes J. and Karalekas P. (1995) Optimizing corrosion control for lead and copper using phosphoric acid and sodium hydroxide. *Proceedings of the Water Quality Technology Conferences: New Orleans, 12-16 November*. Am. Water. Works Assoc.
- Maier R.M., Pepper I.L. and Gerba C.P. (Eds) (2000) Environmental microbiology. Academic Press. 585p.
- Miettinen I.T., Vartiainen T. and Martikainen P.J. (1997) Phosphorus and bacterial growth in drinking water. *Appl. Environ. Microbiol.* 63(8), 3242-3245.
- Neu T.R. and Lawrence J.R. (1997) Development and structure of microbial biofilms in river water studied by confocal laser scanning microscopy. *FEMS Microbiol. Ecol.* 24, 11-25.
- Nielsen P H, Jahn A. and Palmgren R. (1997) Conceptual model for production and composition of exopolymers in biofilms. *Wat. Sci. Technol.* 36(1), 11-21.
- Olson S.C. (1996) Phosphate based corrosion inhibitors effects on distribution systems regrowth. In *Proceeding of the national conference on intergrating corrosion control and other water quality goals* : Boston (Ma), 19- 21 May, New England Water Works Assoc.
- Poindexter J.S. and Leadbetter E.R. (Eds) (1989) Bacteria in nature. Volume 3. Structure, physiology and genetic adaptability. Plenum Press: New York. 391p.
- Power K. N. and Nagy L. A. (1999) Relationship between bacterial regrowth and some physical and chemical parameters within Sydney's drinking water distribution system. *Wat. Res.* 33(3), 741-750.
- Prévost M., Rompré A., Coallier J., Servais P., Laurent P., Clément B. and Lafrance. P. (1998) Suspended bacterial biomass and activity in full-scale drinking water distribution systems: impact of water treatment. *Wat. Res.* 32(5), 1393-1406.
- Rompré A., Prévost M., Coallier J., Brisebois P., Lavoie J. and Lafrance P. (1999) Impacts of implementing a corrosion control strategy on biofilm growth. In *Proceedings of the Conferences on Biofilm Systems: New York, 17-20 October IAWQ/IWA*. Conference 48.

- Rosenberg H. (1987) Phosphate transport in prokaryotes. In *Ion transport in prokaryotes*. p 205-248. Rosen B. P., Silver S. (Eds). Academic Press, Inc: New York.
- Saby S., Sibille I., Mathieu L., Paquin J.L. and Block J.C. (1997). Influence of water chlorination on the counting of bacteria with DAPI (4'-6-diamidino-2-phenylindole). *Appl. Environ. Microbiol.* 63(4), 1564-1569.
- Sathasivan A., Ohgaki S., Yamamoto K. and Kamiko N. (1997) Role of inorganic phosphorus in controlling regrowth in water distribution system. *Wat. Sci. Tech.* 35(8), 37-44.
- Servais P., Billen P., Ventresque C. and Bablon G. (1991) Microbial activity in GAC filters at the Choisy-le-Roy treatment plant, *J. Am. Water Works Assoc.* 83(2), 62-68.
- Servais P., Billen G., Laurent P., Levi Y. and Randon G. (1992) Studies of BDOC and bacterial dynamics in the Northern Parisian suburbs. *Rev. Sci. Eau.* 5, 69-89. (in French).
- Shiba T., Tsutsumi K., Yano H., Ihara Y., Kameda A., Tanaka K., Takahashi H., Munekata M., Rao N. N. and Kornberg A. (1997) Inorganic polyphosphate and the induction of *rpoS* expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94(21), 11210-11215.
- Sutherland I.W. (1977) Bacterial exopolysaccharides – their nature and production. In *Surface carbohydrate of the prokaryote cell*. pp 27-96. Sutherland I.W.(Ed). Academic Press : London, England.
- Torriani-Gorini A. (1994) The Pho regulon of *Escherichia coli*. In *Phosphate in microorganisms: Cellular and Molecular Biology*. pp 1-4. Torriani-Gorini A., Yagil E., Silver S. (Eds). ASM Press: Washington, D. C.
- Van der Wende, E., Characklis W.G. and Smith D.B.(1989) Biofilms and bacterial drinking water quality. *Wat. Res.* 23(10), 1313-1322.
- Vandevivere P. and Kirchman D.L. (1993) Attachment stimulates exopolysaccharides synthesis by a bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* 59(10) : 3280-3286.
- Webb D. C. and Cox G. B. (1994) Proposed mechanism for phosphate translocation by the Phosphate Specific Transport (Pst) system and role of Pst system in phosphate regulation. In *Phosphate in microorganisms: Cellular and Molecular Biology*. pp 37-42. Torriani-Gorini A., E. Yagil, S. Silver (Eds). ASM Press: Wahington, D. C.
- Zhang X., Bishop P.L. and Kupferle M.J. (1998) Measurement of polysaccharides and proteins in biofilm extracellular polymers. *Wat. Sci. Technol.* 37(4-5), 345-348.

IV.4 Effect of adding phosphate to drinking water on bacterial growth in slightly and highly corroded pipes.

Les essais présentés dans les sections précédentes n'ont pas permis de mettre en évidence de changement dans la physiologie des bactéries libres ou fixées en termes de cultivabilité et croissance bactérienne, malgré diverses expériences réalisées avec des eaux, des solutions de phosphates et des conditions hydrodynamiques différentes. De plus, au cours des essais réalisés à Montréal en conditions dynamiques, les phosphates n'ont pas eu d'effet sur les synthèses bactériennes en termes d'hydrates de carbone et d'acides aminés. Les essais sur les bactéries fixées en absence de corrosion ont cependant permis de mettre en évidence des teneurs en phosphates supérieures dans les biofilms traités aux phosphates par rapport aux témoins.

Afin de vérifier dans quelles mesures la présence de corrosion peut influencer les résultats, des essais ont été réalisés à Nancy, en conditions dynamiques, en présence de biofilms développés sur des parois plus ou moins corrodées, avec une solution d'acide phosphorique ultrapure. Au cours de ces essais, les bactéries libres ont été suivies par des mesures de cultivabilité et de dénombrements totaux effectués sur les eaux en entrée et en sortie des réacteurs alimentés en continu. Ces essais sont présentés dans la section suivante sous la forme d'une publication parue dans la revue *Water Research* (Vol. 35 ; n°4, pp. 1100-1105) sous le titre « Effect of adding phosphate to drinking water on bacterial growth in slightly and highly corroded pipes. »



PERGAMON

www.elsevier.com/locate/watres

Wat. Res. Vol. 35, No. 4, pp. 1100–1105, 2001
© 2001 Elsevier Science Ltd. All rights reserved
Printed in Great Britain
0043-1354/01/\$ - see front matter

PII: S0043-1354(00)00337-7

RESEARCH NOTE

EFFECT OF ADDING PHOSPHATE TO DRINKING WATER ON BACTERIAL GROWTH IN SLIGHTLY AND HIGHLY CORRODED PIPES

B. M. R. APPENZELLER¹, M. BATTE², L. MATHIEU², J. C. BLOCK^{1*},
V. LAHOSSINE³, J. CAVARD⁴, D. GATEL^{5M}

¹LCPE, UMR Université-CNRS 7564, Faculté de Pharmacie, Pôle de l'eau, 15 avenue du Charmois, 54500 Vandoeuvre, France; ²SERES, Faculté de Médecine, av. de la Forêt de Haye, 54500 Vandoeuvre, France; ³AESN, 51 rue Salvadore Allende, 92027 Nanterre, France; ⁴SEDIF, 14 rue saint Benoît, 75006 Paris, France and ⁵GE, 32 place ronde, 92982 Paris-La Defense, France

(First received 28 January 2000; accepted in revised form 5 June 2000)

Abstract—The effect of phosphate addition in drinking water was tested under static conditions as batch tests and under dynamic conditions using continuously fed reactors. Phosphate supplements in batch tests from 0.1 to 2 mg P-PO₄L⁻¹ did not show any relationship between bacterial growth and phosphate concentration. Dynamic tests in slightly corroded reactor (stainless steel) treated at 1 mg P-PO₄L⁻¹ showed only a moderate improvement in the growth of microorganisms. On the contrary, phosphate treatment applied to the highly corroded reactor (unlined cast iron) led to an immediate, drastic drop in iron oxide release and bacterial production. Phosphate uptake by the reactor wall was less than 14% with the stainless-steel reactor and 70–90% with the corroded cast iron reactor. Moreover, about 5% of the phosphate associated to corroded iron pipe walls was released for 20 days after the end of treatment.
© 2001 Elsevier Science Ltd. All rights reserved

Key words—bacterial growth, phosphate, drinking water, distribution systems, corrosion

INTRODUCTION

Phosphorus is a key element of bacterial cells (around 1% of the dry weight), where it is part of biopolymers (DNA, RNA, phospholipids, ATP, phosphoryl groups of signal molecules), or accumulated into the cytosol as inorganic polyphosphates (Hardoyo *et al.*, 1994; Kulaev, 1979). Bacteria constantly tend to maintain a high intracellular concentration of inorganic phosphates of around 10 mM (Rao *et al.*, 1994; Wanner, 1994). They therefore combine several specific uptake systems for efficiently trapping low concentrations of inorganic and organic phosphates from their aquatic environment (Torriani-Gorini, 1994).

Phosphate has been reported to be the factor limiting bacterial growth in certain drinking waters (Miettinen *et al.*, 1997; Sathasivan *et al.*, 1997). The risks associated with phosphate-based anticorrosion treatment of distribution systems for lead and iron oxide control have been therefore recently questioned and the potential negative effect of adding phosphate to drinking water has been highlighted. Few reports have shown that the addition of phosphate leads to a

significant increase in heterotrophic bacterial plate counts in water (Miettinen *et al.*, 1997; Sathasivan *et al.*, 1997), or to concomitant legionellosis outbreaks among consumers (Crespi and Ferra, 1997). In contrast, Lohmann *et al.* (1997) and Batte *et al.* (1999) did not observe any effect of phosphate addition on heterotrophic plate counts, and other authors (Clement and Sandwig, 1996; LeChevallier *et al.*, 1993; Olson, 1996; Rosenzweig, 1997; Smith *et al.*, 1989) reported decreases in the occurrence of coliforms and/or heterotrophic plate counts after treatment of corroded distribution systems. These apparently contradictory results may be due to differences in the environmental situations tested: the presence or absence of corroded surfaces (laboratory tests in glass flasks versus distribution system corroded pipes), the total concentration and bioavailability of phosphate, which can be modified by humic substances (De Hann *et al.*, 1990; Francko and Health, 1979) and the affinity of indigenous bacterial species for phosphate, etc.

This study was therefore carried out to differentiate between some of the parameters governing the impact of adding phosphate to drinking water on bacterial growth. Operating tests were run under static conditions in laboratory flasks and under dynamic conditions in continuously fed, highly corroded (cast iron) and slightly corroded (stainless

*Author to whom all correspondence should be addressed.
Tel.: + 33-383-59-62-56; fax: + 33-383-59-62-60; e-mail: block@pharma.u-nancy.fr

steel) reactors (Propella reactors). The assays were carried out by adding phosphoric acid (up to 5 mg P-PO₄ L⁻¹) to drinking water having their indigenous bacterial populations.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial counting

The total number of bacteria was determined by DAPI staining. Aliquots of sample (pure or diluted, 9 mL) were placed in sterilized glass tubes containing 1 mL of DAPI (0.5 µg mL⁻¹) (Sigma no. D9542) and 1 mL of Triton X-100 (0.1%) (Prolabo no. 28817295) (all reagents were filter sterilized through cellulose nitrate filters; pore size, 0.2 µm). The tubes were mixed for 30 s and left to stand for 10 min. The samples were then filtered through black polycarbonate filters (DMF no. 111156; pore size, 0.2 µm). The filters were rinsed twice with bacterium-free distilled water, dried in hot air, hydrated with a drop of buffered glycerin (Diagnostics Pasteur no. 74921), and covered with a coverslip. The filters were examined under UV light (excitation filter BP330-385, barrier filter BA420) with an epifluorescence microscope (Olympus BX60) and an oil immersion objective (Uplan-FI 100 × oil immersion universal objective). The bacteria in 30 fields per slide were counted and the results expressed as number of cells per milliliter.

The viable bacteria were determined by their ability to grow on R₂A agar medium (Difco, Ref. 1826-17-1). Diluted or undiluted water samples were filtered through cellulose-acetate filters (Millipore no. HAWG 047S1; pore size, 0.45 µm). The filters were placed on agar and incubated for 7 days at 22 ± 2°C. Colonies were then counted and the results expressed as colony forming units per milliliter (CFU 7d mL⁻¹).

Chemical analysis

Phosphate concentration was measured using the stannous chloride spectrophotometric method (Standard methods, 1998). Samples of 5 mL were diluted to 100 mL with ultra pure water. 1 mL glycerol/SnCl₂ solution and 4 mL ammonium molybdate were added. The samples were mixed, left to stand for 10 min and the absorbance was measured at 690 nm against a blank without phosphate (spectrophotometer ATI UNICAM-UV/visible Software V3.01). Results are expressed as mg P-PO₄ L⁻¹.

Total iron was measured by atomic absorption (Standard methods, 1998). The results are expressed as mg Fe L⁻¹.

Dissolved organic carbon (DOC) was measured with OI corporation analyser (Model 700 TOC) calibrated with a potassium phthalate solution (Merck, Ref. 4874). Inorganic carbon was removed using 5% phosphoric acid (Merck, Ref. 100573) and nitrogen bubbling. Organic carbon was then oxidized to CO₂ with sodium persulphate and the resulting CO₂ was measured by infra red absorbance. Results are expressed as mg C L⁻¹.

Anions in water (SO₄²⁻, NO₃⁻, Cl⁻) were measured using ionic chromatography method (Standard methods, 1998). Results are expressed as mg L⁻¹.

Batch tests

The batch bacterial growth tests were carried out in 1 L glass flasks closed by a screw cap. Six flasks were filled up to 1 L with tap water and supplemented with a H₃PO₄ solution to obtain final concentrations of 0, 0.1, 0.3, 0.5, 1.0 or 2.0 mg P-PO₄ L⁻¹. The flasks were then placed under gentle shaking in the dark at 25 ± 0.5°C. Total and cultivable bacteria in each flask were measured once a day. Three types of water (W1, W2 and W3) were tested (Table 1). W1 was a ground water treated only with chlorine. W2 and W3 were surface water samples subjected to aluminium coagulation-flocculation, sand filtration, ozone, activated carbon filtration, pH adjustment with lime and final chlorination. The characteristics of the surface and ground water used in the batch tests are given in Table 1.

Dynamic tests in Propella™ reactors

The laboratory reactors Propella™ (Fig. 1) were made of a 100 mm diameter water distribution pipe, 500 mm long made of unlined cast iron or stainless steel (ref.: 361L). The water velocity was controlled with a marine propeller which pushed the water through an inner cylinder, giving a flow parallel to the pipe wall. The water velocity was 0.2 m s⁻¹. The propella™ reactors were continuously supplied with tap water dechlorinated through an activated carbon filter and filtered through a 2 µm pore size filter at 120 mL h⁻¹ (hydraulic residence time of 24 ± 2 h). The reactors were supplied with a 50 mg P-PO₄ L⁻¹ phosphoric acid solution to give an initial concentration of 1 or 5 mg P-PO₄ L⁻¹. The characteristic of the tap water used in all the dynamic experiments are given in Table 2.

RESULTS

Bacterial growth tests were performed under batch conditions on three types of drinking water which differed in their origin (ground water W1, or surface waters W2 and W3) and some of their chemical and biological characteristics (the treated surface water being the richest in dissolved organic carbon and heterotrophic bacteria) (Table 1). The phosphate concentrations were below the limit of sensitivity of the method in all cases (< 17 µg P-PO₄ L⁻¹).

A typical bacterial growth was observed in W1-W3 samples with or without added phosphate, with lag phase of 1 to 2 days, and exponential growth between days 2 and 4 (data not shown). The higher numbers of bacteria (total cells counted by microscopy after DAPI staining, and CFU counted on agar) were not related to phosphate addition, and

Table 1. Chemical and bacteriological characteristics of the three types of water used in batch tests

Parameters	W1 (Mexy)	W2 (Nancy)	W3 (Nancy)
DOC (mg L ⁻¹)	0.52	1.19	1.85
SO ₄ ²⁻ (mg L ⁻¹)	22.1	30.5	39.2
NO ₃ ⁻ (mg L ⁻¹)	27.1	3.7	4.6
PO ₄ ³⁻ (µg P L ⁻¹)	<17	<17	<17
Cl ⁻ (mg L ⁻¹)	13.6	15.6	18.1
Total suspended bacteria (cells mL ⁻¹)	1.38 × 10 ⁴	1.86 × 10 ⁵	6.78 × 10 ⁴
Cultivable suspended bacteria (CFU 7d mL ⁻¹)	2.5 × 10 ¹	1.25 × 10 ³	2.2 × 10 ³

there was no dose-effect relationship between added phosphate and bacterial counts (Fig. 2).

The dynamic tests were run for 50 to 100 days with continuously fed Propella reactors simulating drinking water circulating in water pipes and allowing biofilm to accumulate on pipe walls. Bacterial growth occurred without phosphate addition both in the stainless-steel reactor (i.e. with very few corroded spots) and in the highly corroded cast iron reactor. However, the bacterial production, calculated as the difference in the bacterial concentration at the outlet and the inlet, was about 10 times higher in corroded cast iron Propella (2×10^6 cells mL⁻¹) than in the stainless steel one (1.8×10^5 cells mL⁻¹) (Fig. 3). A

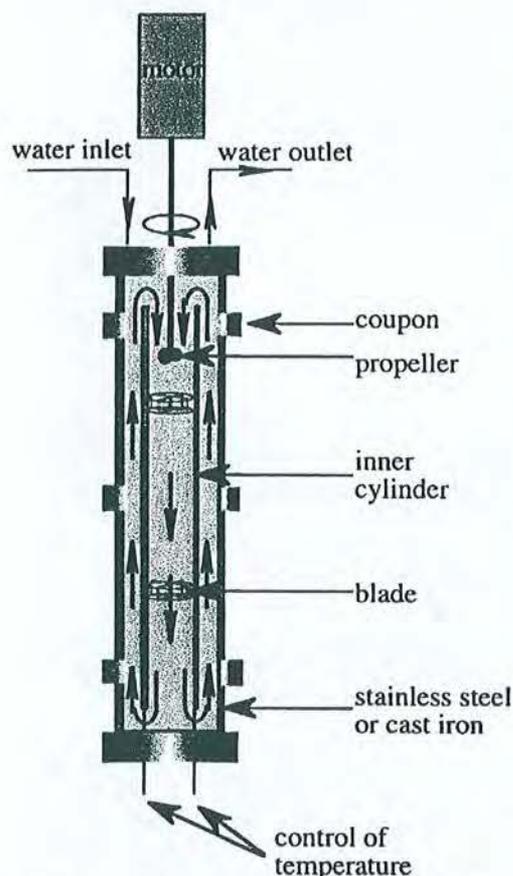


Fig. 1. Schematic representation of a Propella™ reactor (scale drawing 1/7).

3-day continuous injection of phosphate ($1 \text{ mg P-PO}_4 \text{ L}^{-1}$) produced only a very slight increase in bacterial cell concentration (from 5.8 to 8.5×10^5 cells mL⁻¹ after three days) in stainless-steel reactors. This was yet not more significant than the variations observed during the 48 days prior to the treatment. The corroded cast iron reactor treated with phosphate behaved in a completely different way. The phosphate added continuously to the water caused an immediate, drastic drop in total iron (from 7.5 ± 2.3 to $2.2 \pm 0.26 \text{ mg L}^{-1}$), and bacteria counts whose concentration at the outlet of the reactor was lower than or equivalent to that of the inlet. In such conditions, bacterial production was negative (-3.8×10^4 cells mL⁻¹) (Fig. 3).

Surprisingly, stopping adding phosphate to the cast iron Propella reactor after 42 days led to an immediate but transient and unexplained peak of bacteria (upto 2×10^6 cells mL⁻¹) (data not shown) followed by a return 1 day later to the previous situation, i.e. a lower concentration of bacteria at the outlet of the reactor than at the inlet.

The consumption of phosphate in the stainless steel reactor (added concentration $1 \text{ mg P-PO}_4 \text{ L}^{-1}$) was relatively low (around 12%) (Fig. 4), while the corroded cast iron Propella consumed a large fraction of the added phosphate (88% for $1 \text{ mg P-PO}_4 \text{ L}^{-1}$ and 77% for $5 \text{ mg P-PO}_4 \text{ L}^{-1}$). However, the residual phosphate in the bulk water was always high enough to satisfy bacterial needs for growing on dissolved organic carbon. There was 230 mg phosphate accumulated in the cast iron Propella reactor after 1.5 months of treatment (1 or $5 \text{ mg P-PO}_4 \text{ L}^{-1}$). Part of this phosphate (10 mg P-PO_4 or 5% of the total) was released by continuous washout during the month after stopping anticorrosion treatment (Fig. 5).

DISCUSSION

The internal corrosion of distribution pipes is a major problem faced by utilities, as it results unaesthetic red water and the leaching of toxic metals like lead, decreases the hydraulic capacity of the distribution systems, gives an environment favouring bacterial growth, causes higher chlorine demand, and hence less effective disinfection of biofilm bacteria (Fraturet *et al.*, 1999;

Table 2. Characteristics of the tap water used during dynamic Propella™ reactor experiments

Parameters	<i>n</i>	Average	Lower value	Higher value
DOC (mg L ⁻¹)	68	1.41	0.96	1.97
SO ₄ ²⁻ (mg L ⁻¹)	4	31.5	28	39.2
NO ₃ ⁻ (mg L ⁻¹)	4	4.4	3.6	5.4
PO ₄ ³⁻ (μg P L ⁻¹)	—	—	<17	43
Cl ⁻ (mg L ⁻¹)	4	18.0	15.6	19.1
Total suspended bacteria (cells mL ⁻¹)	46	8.22×10^5	2.24×10^5	2.79×10^6
Cultivable suspended bacteria (CFU 7d mL ⁻¹)	12	4.62×10^4	4.00×10^3	7.00×10^5

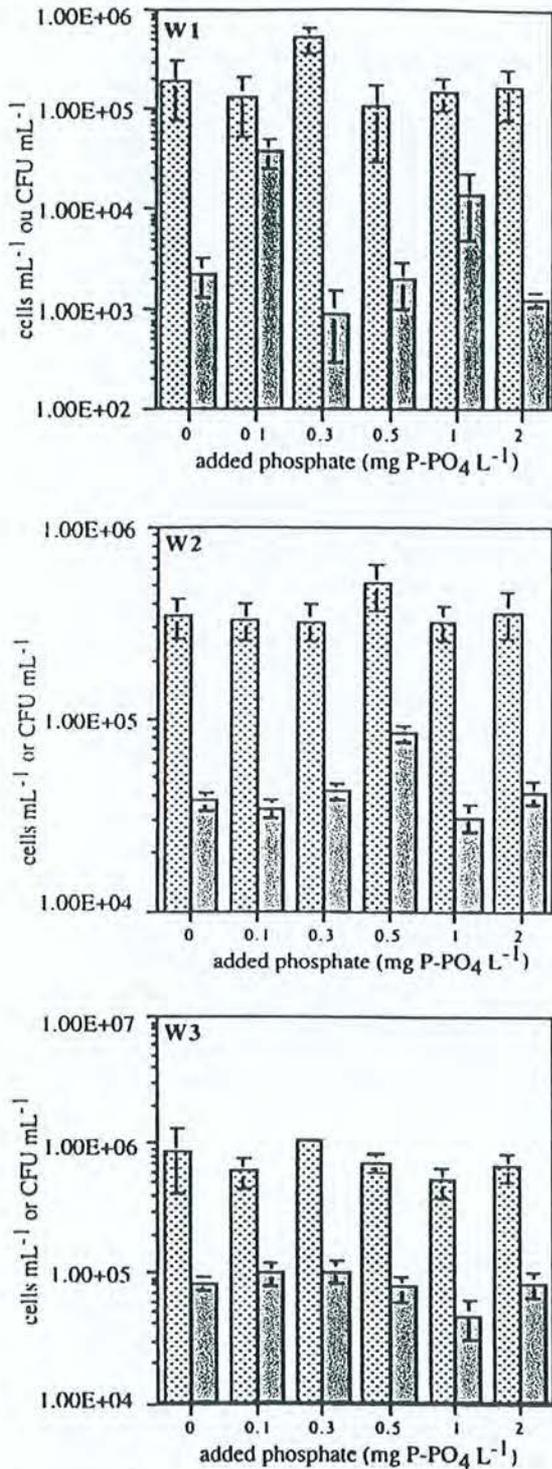


Fig. 2. Total bacteria (▨) and cultivable bacteria (▩) at the end of the exponential growth phase (about 100 hs) for three drinking waters W1, W2 and W3 complemented or not with phosphate.

Holt *et al.*, 1998; LeChevallier *et al.*, 1993; Rompre *et al.*, 1999).

Adding orthophosphate is one of the common processes used to reduce corrosion by-products in

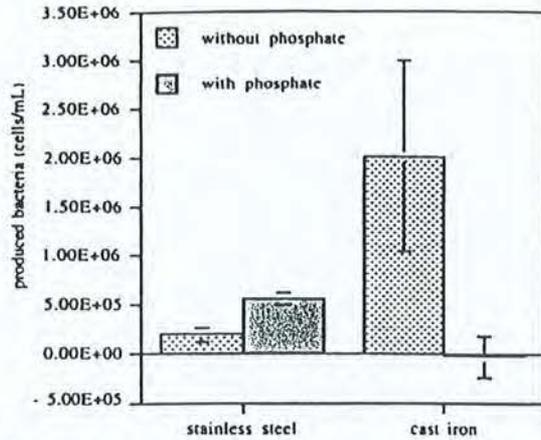


Fig. 3. Produced bacteria (=expressed as the difference between the outlet and the inlet of the reactor) in stainless-steel reactor and in corroded cast iron reactor with and without 1 mg P-PO₄ L⁻¹ addition (*n*= 4–10 according to the assays).

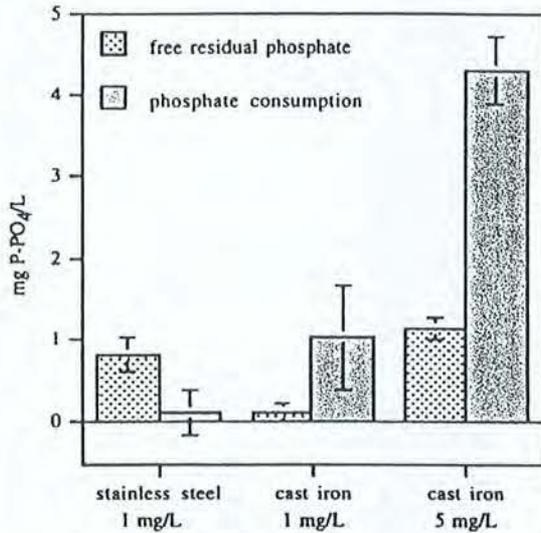


Fig. 4. Phosphate consumption and free residual phosphate in stainless steel and cast iron Propella reactor (the numbers on the x-axis indicate the level of P-PO₄ treatment).

drinking waters (i.e., iron oxides, lead) (Cordonnier and Barbier, 1994). The high affinity of phosphate anions for corroded surface metals leads to the formation of a stable phosphate-metal complex (Hiemstra and Van Riemsdijk, 1996; Persson *et al.*, 1996) which limits further corrosion. Such treatment also leads to an accumulation of phosphate on the surface of the pipes and keeps free phosphate in the bulk water below 5 mg P₂O₅ L⁻¹ (around 2.2 mg P L⁻¹), as required by EU drinking water standards. The negative effect of such more or less bioavailable phosphate was recently pointed out. In this study, the absence of dose-effect relationships in batch tests shows that phosphate in the water tested was not the factor limiting bacterial growth or cultivability. Indeed, the types of water tested by

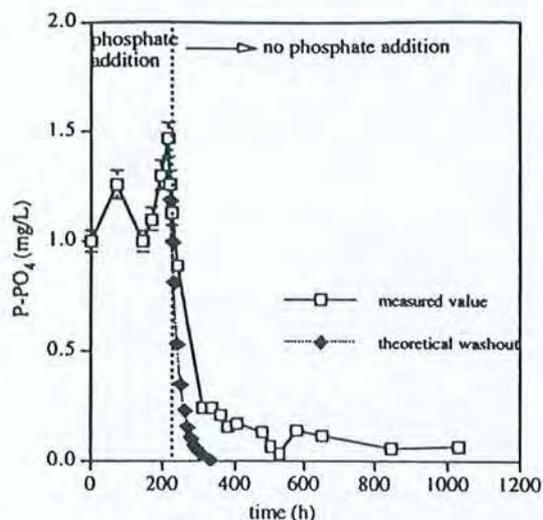


Fig. 5. Phosphate release from a corroded cast iron reactor after phosphate treatment stopping (the slope of the theoretical washout is calculated as the ratio: volume of the reactor, V to the flow rate, Q).

Miettinen *et al.* (1997) and Sathasivan *et al.* (1997) were to a certain extent very particular (i.e. with a relatively high C/P ratio and a low phosphorus content), and not representative of most drinking waters. Thus, in the case of suspicion of anticorrosion adverse effect, phosphate bioavailability testing, as suggested by Lehtola *et al.* (1999) and Sathasivan and Ohgaki (1999), is the only way to predict the biomass response.

The hypothesis that biofilms would benefit actively from adding phosphate was not observed in the slightly corroded stainless-steel pipes, as the changes in bacteria in the reactor were moderate. This situation is definitely very different in corroded pipes, as (i) iron corrosion reactions may promote bacterial growth (Caccavo *et al.*, 1997; LeChevallier *et al.*, 1993; Little *et al.*, 1999; Lovley, 1995), and (ii) phosphate treatment could modify the pipe surface reactivity and consequently limit bacterial colonization. This was expressed in the experiments by an immediate drop in the release of iron-oxide particles and in bacteria following the addition of phosphate. This is readily explained by the high affinity of phosphate for iron oxide (Hiemstra *et al.*, 1996; Persson *et al.*, 1996). The conservative character of treatment for more than 1.5 months after phosphate addition was stopped, also suggests a relatively stable iron-phosphate complex, even if there was a low release of phosphorus for several weeks.

CONCLUSION

The risk of bacterial bloom due to phosphate anticorrosion treatment appears to occur only in some specific water resources. The testing of phosphate bioavailability seems to be the best way to

estimate the response of biomass to adding phosphate.

Phosphate treatment of corroded networks has a positive effect. It not only reduces the release of iron oxide, it also limits the proliferation of heterotrophic bacteria in pipes by modifying the properties of the corrosion products.

The high phosphate consumption by iron oxide also implies that a defined phosphate level in tap water requires adding more phosphate during the processing of networks with corroded sections.

Acknowledgements—This work was carried out as part of a larger research programme (Biofilm V) coordinated by the Centre International de l'Eau de Nancy (NANCIE-France), and funded by the Compagnie Generale des Eaux (Paris-France), the Communaute Urbaine du Grand Nancy, the Syndicat des Eaux d'Ile de France (Paris-France), the Office National de l'Eau Potable (ONEP-Maroc), the Agence de l'Eau Seine-Normandie (Paris-France), and NANCIE.

REFERENCES

- Batte M., Koudjonou B., Prevost M., Hartemann Ph. and Mathieu L. (1999) Approaches to evaluate the impact of inhibition of corrosion with polyphosphates on disinfection of a drinking water biofilm. Abstract D39. *Proceedings of the Conference on Biofilm Systems*. IAWQ, New York.
- Caccavo Jr. F., Schamberger P. C., Keiding K. and Nielsen P. H. (1997) Role of hydrophobicity in adhesion of the dissimilatory Fe(III)-reducing bacterium *Shewanella alga* to amorphous Fe(III) oxide. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**(10), 3837–3843.
- Clement, J. and Sandwig, A. (1996) Experience with corrosion control. In *National Conference on Integrating Corrosion Control and Other Water Quality Goals*. Boston, MA.
- Cordonnier J. and Barbier J. P. (1994) Lead limitation in tap water: testing technical measures on site. *T. S. M.* **3**, 131–136 (In French).
- Crespi S. and Ferra J. (1997) Outbreak of legionellosis in a tourist complex in Lanzarote concomitant with a treatment of water system with megadoses of polyphosphates. *Wat. Sci. Tech.* **35**(11–12), 307–309.
- De Haan R., Jones I. and Salonen K. (1990) Abiotic interactions of iron and phosphate in humic lake water revealed by double-isotope labeling and gel filtration. *Limnol. Oceanogr.* **35**, 491–497.
- Francko D. A. and Health R. T. (1979) Functionally distinct classes of complex phosphorus compounds in lake water. *Limnol. Oceanogr.* **24**, 463–473.
- Frateur I., Deslouis C., Kiene L., Levi Y. and Tribollet B. (1999) Free chlorine consumption induced by cast iron corrosion in drinking water distribution systems. *Wat. Res.* **33**(8), 1781–1790.
- Hardoyo, Yamada K., Muramatsu A., Anbe Y., Kato J. and Ohtake H. (1994) Molecular genetics of polyphosphate accumulation in *Escherichia coli*. In *Phosphate in Microorganisms: Cellular and Molecular Biology*, eds A. Torriani-Gorini, E. Yagil and S. Silver, pp. 209–214. ASM Press, Washington, DC.
- Hiemstra T. and Van Riemsdijk W. H. (1996) A surface structural approach to ion adsorption: the charge distribution (CD) model. *J. Colloid Interface Sci.* **179**, 488–508.
- Holt D. M., Gauthier V., Merlet N. and Block J. C. (1998) Importance of disinfectant demand of materials for

- maintaining residuals in drinking water distribution systems. *Water Supply* 16, 181–191.
- Kulaev I. S. (ed.) (1979) *The Biochemistry of Inorganic Polyphosphates*, 255pp. John Wiley and Sons, Chichester.
- LeChevallier M. W., Cheryl C. D., Lee R. G. and Gibbon D. L. (1993) Examining the relationship between iron corrosion and the disinfection of biofilm bacteria. *J. Am. Wat. Wks Assoc.* 85, 111–123.
- Lehtola M., Miettinen I. T., Vartiainen T. and Martikainen P. J. (1999) A new sensitive bioassay for determination of microbially available phosphorus in water. *Appl. Environ. Microbiol.* 65(5), 2032–2034.
- Little B. J., Ray R. I., Jones-Meehan J., Lee C. C. and Mansfield F. (1999) Spatial relationships between marine bacteria and localized corrosion on polymer coated steel. *Biofouling*. 13(4), 301–321.
- Lohmann R., DeMarco J., Hartman D. J., Metz D. H., Suzurikawa J. H., Harms L. and Pierson G. (1997) Pilot study to determine secondary water quality impacts of corrosion inhibitors. In *Proceedings of the Water Quality Technology Conference*, 9–12 November 1997. American Water Works Association, Denver.
- Lovley D. R. (1995) Microbial reduction of iron, manganese, and other metals. *Adv. Agron.* 54, 175–231.
- Miettinen I. T., Vartiainen T. and Martikainen P. J. (1997) Phosphorus and bacterial growth in drinking water. *Appl. Environ. Microbiol.* 63(8), 3242–3245.
- Olson S. C. (1996) Phosphate based corrosion inhibitor effects on distribution system regrowth. In *National Conference on Integrating Corrosion Control and Other Water Quality Goals*. Boston, MA.
- Persson P., Nilsson N. and Sjoberg S. (1996) Structure and bonding of orthophosphate ions at the iron oxide-aqueous interface. *J. Colloid Interface Sci.* 177, 263–275.
- Rao N. N., Kar A., Roberts M. F., Yashphe J. and Torriani-Gorini A. (1994) Phosphate, phosphorylated metabolites, and the Pho regulon of *Escherichia coli*. In *Phosphate in Microorganisms: Cellular and Molecular Biology*, eds A. Torriani-Gorini, E. Yagil and S. Silver, pp. 22–29. ASM Press, Washington.
- Rompert A., Prevost M., Coallier J., Brisebois P., Lavoie J. and Lafrance P. (1999) Impacts of implementing a corrosion control strategy on biofilm growth. Abstract D48, *Proceedings of the Conference on Biofilm Systems*. IAWQ, New York.
- Rosenzweig W. D. (1997) *Influence of phosphate corrosion-control compounds on bacterial growth*. EPA CR-811613-01-0. USEPA, Cincinnati, Ohio.
- Sathasivan A. and Ohgaki S. (1999) Application of new bacterial regrowth potential method for water distribution system—a clear evidence of phosphorus limitation. *Wat. Res.* 33(1), 137–144.
- Sathasivan A., Ohgaki S., Yamamoto K. and Kamiko N. (1997) Role of inorganic phosphorus in controlling regrowth in water distribution systems. *Wat. Sci. Tech.* 35(8), 37–44.
- Smith D. B., Hess A. F. and Opheim D. (1989) Control of distribution system coliform regrowth. *Proceedings 1989 AWWA-WQTC*. San Diego, CA.
- Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (1998) 20th edition, American Public Health Association, American Water Works Association/Water Environment Federation, Washington DC, USA.
- Torriani-Gorini A. (1994) The Pho regulon of *Escherichia coli*. In *Phosphate in Microorganisms: Cellular and Molecular Biology*, eds A. Torriani-Gorini, E. Yagil and S. Silver, pp. 1–4. ASM Press, Washington, DC.
- Wanner B. L. (1994) Multiple controls of *Escherichia coli* Pho regulon by the Pi sensor PhoR, the catabolite regulatory sensor CreC, and acetyl phosphate. In *Phosphate in Microorganisms: Cellular and Molecular Biology*, eds A. Torriani-Gorini, E. Yagil and S. Silver, pp. 22–29. ASM Press, Washington.

IV.5 Discussion

Les essais présentés ici visaient à déterminer si les phosphates engendrent des changements physiologiques ou une croissance des bactéries libres et fixées, et à apprécier les effets de la corrosion sur ce signal microbiologique.

Dans un premier temps, des essais en conditions statiques et dynamiques ont permis d'évaluer l'effet des phosphates sur les populations fixées et libres en limitant les interactions possibles avec la corrosion. Les eaux de réseau utilisées étaient limitées en carbone, ce qui est le cas le plus fréquent en eau potable (Servais *et al.*, 1992). Dans tous les essais, les eaux contenaient moins de phosphates que ce qu'il est possible de doser ($10 \mu\text{g L}^{-1}$) tandis qu'elles présentaient des teneurs en carbone organique biodégradable (CODB) de l'ordre de 200 à $500 \mu\text{g de C L}^{-1}$. Le ratio nutritionnel C/P théorique dans les eaux est donc bas (C/P <50-20) par rapport au ratio nutritionnel stochiométrique de 333 obtenu en considérant que :

- la formule générale pour les bactéries est $\text{C}_5\text{H}_7\text{O}_2\text{NP}_{0,03}$.
- 20% du carbone consommé pour les synthèses bactériennes et 80% pour la respiration, soit un rendement de 0,2 en carbone biodégradé.
- 100% du P est consommé pour les synthèses bactériennes soit un rendement en phosphore de 1. Cependant, des études sur différents types d'eaux (eaux usées, eau de pluie, etc.) ont montré que la biodisponibilité des phosphates n'est pas total, (Gerdes et Kunst, 1998 ; Ekolm et Krogerus, 1998).

Il a été montré que dès que le milieu environnant contient plus que $5 \mu\text{g P L}^{-1}$, *E. coli* réprime la synthèse de systèmes d'incorporation ayant une forte affinité vis-à-vis des phosphates (Rosenberg, 1987 ; Torriani-Gorini, 1994). Par analogie avec la physiologie de *E. coli*, l'enrichissement des eaux potables en phosphates modifie l'environnement des bactéries qui, de pauvre (voire carencé) devient riche en phosphates et pourrait conduire à des changements dans les états physiologiques des bactéries en eau potable.

Cependant, au cours des essais en conditions statiques et dynamiques en absence de corrosion, si de tels changements ont eu lieu, l'ajout de phosphates n'a cependant pas engendré une croissance bactérienne comme estimée par l'AEP ou les CDT. En effet, bien que les essais à Nancy et à Montréal ont été réalisés (i) avec différentes eaux contenant moins de $10 \mu\text{g P L}^{-1}$ initialement et diverses teneurs en carbone organique, (ii) dans différentes conditions hydrauliques, (iii) en utilisant différentes solutions de phosphates, aucune des situations testées n'a mis en évidence de croissance bactérienne.

Cependant, par des ajouts de phosphates dans des eaux de lacs meso-eutrophes, Toolan *et al* (1991) ont montré que des bactéries peuvent ne pas présenter de croissance et augmenter leur activité (ici, leur taux d'incorporation de thymidine tritiée). Des mesures réalisées sur la composition chimique du biofilm, au cours des essais en conditions dynamiques en absence de corrosion, mettent en évidence que l'ajout de phosphates n'a pas engendré pas d'augmentation des activités de synthèses, ni de changement dans types de molécules synthétisées (polysaccharides et protéines). Ainsi, en situation où le carbone est le nutriment limitant et la teneur naturelle des eaux en phosphates est faible, l'ajout de phosphates, aux doses requises pour des traitements anti-corrosion, n'a pas eu d'influence sur la physiologie des bactéries, n'engendrant ni des phénomènes de croissance des populations mesurées par CDT et AEP, ni d'augmentations notables de la cultivabilité sur gélose R₂A.

Seule une accumulation plus importante de phosphates a été observée dans les biofilms traités aux phosphates. Cependant, aussi bien dans les biofilms témoins que dans ceux traités aux phosphates, les teneurs en phosphates observés dans les biofilms au cours des essais est probablement supérieure à ce que les cellules bactériennes peuvent contenir (Kulaev, 1979 ; Hardoyo, 1994) et en conséquence, il est suggéré une accumulation des phosphates dans la matrice extracellulaire.

Finalement, des essais en présence de corrosion ont été réalisés pour déterminer comment la corrosion influence les résultats bactériologiques. Les essais ont mis en évidence que les densités de bactéries libres en sortie des réacteurs sont plus élevées lorsque les parois sont fortement corrodées, suggérant que la corrosion favorise la croissance des bactéries (LeChevallier *et al.*, 1993 ; Little *et al.*, 1999 ; Lovley, 1995). De plus, en présence de corrosion importante, l'ajout de phosphates conduit à une diminution des bactéries produites, ainsi qu'une diminution du fer dissous en sortie des réacteurs. Puisque van der Wende (1989) suggère que les bactéries fixées sont la source principale de contamination des eaux, dans nos essais, il peut donc être supposé que la densités bactériennes supérieures en sortie du réacteur fortement corrodé qu'en sortie du réacteur peu corrodé corresponde à l'existence d'un biofilm plus développé dans ce réacteur, comme cela est reporté dans la littérature (Abernathy et Camper, 1998 ; Rompré *et al.*, 2000). Ceci est corroboré par le fait que les essais en présence de peu de corrosion sont comparables à ceux obtenus sur les bactéries libres et fixées, en absence de corrosion (pas d'effet notable sur les densités bactériennes).

Dans tous les cas, les seules variations dans les dénombrements bactériens ont été observées lorsque des parois fortement corrodées ont été traitées par ajout de phosphates. Ceci

suggère un effet indirect des phosphates sur la bactériologie, *via* l'effet des phosphates sur la corrosion. Il est peu probable qu'il s'agisse d'une réponse physiologique directe des bactéries. Il faut cependant remarquer que les résultats obtenus sont dépendants des caractéristiques des eaux utilisées ainsi que des conditions expérimentales choisies. Aussi, il reste envisageable que dans des eaux différentes et/ou dans d'autres conditions expérimentales, l'ajout de phosphates puissent éventuellement influencer directement la réponse bactériologique.

Bien que les phosphates soient présents en faibles concentrations dans les eaux potables utilisées, leur accumulation dans le biofilm est importante. Ceci suggère que le biofilm peut limiter les effets d'une éventuelle carence de l'eau potable en phosphates, engendrant des conditions favorables à la survie des bactéries. De plus, le doublement des teneurs en phosphates dans les biofilms en présence d'un traitement aux phosphates met en évidence une augmentation des « réserves » de phosphates disponibles dans les biofilms et pourrait éventuellement limiter la vitesse de diffusion des désinfectants dans le biofilm.

Ainsi, l'efficacité de désinfection des biofilms pourraient être modifiée par la présence d'un traitement à base de phosphates, (ii) du fait de la plus grande disponibilité des phosphates dans les biofilms lesquels sont utiles aux inductions génétiques (Kulaev *et al.*, 1994 et 1999 ; Rao et Kornberg, 1996 ; Shiba *et al.*, 1997) ou (ii) du fait de changements dans les capacités de diffusion des désinfectants dans les biofilms suite à la fixation des phosphates dans les biofilms.

CHAPITRE V Effet des Phosphates sur la Désinfection à la Monochloramine

V.1	<u>INTRODUCTION</u>	135
V.2	<u>RESULTATS</u>	135
V.2.1	Protocole expérimental.....	135
V.2.2	Conditions expérimentales	137
V.2.3	Résiduels de désinfectant	138
V.2.4	Efficacité de désinfection de la monochloramine	139
V.2.5	Effet d'un ajout de phosphates sur la monochloramination des populations fixées.....	142
V.2.6	Effet de la monochloramination sur la composition chimique des biofilms	142
V.3	<u>DISCUSSION</u>	149
V.3.1	Influence de la monochloramination sur les biofilms	149
V.3.2	Influence de la phosphatation sur la désinfection avec la monochloramine	151

V.1 Introduction

Le chapitre précédent a montré que l'ajout de phosphates dans les eaux potables ne modifie pas les populations autochtones : en absence de corrosion, aucune différence n'a été notée entre les témoins et les populations traitées aux phosphates, que ce soit en termes de cultivabilité, de densités ou, dans le cas spécifique des populations fixées, de synthèses d'hydrates de carbone et d'acides aminés. Cependant, les biofilms traités aux phosphates ont fixé deux fois plus de phosphates que les témoins.

La littérature signale que les phosphates peuvent influencer indirectement la désinfection, du fait que les phosphates peuvent réduire ou limiter le développement et la réactivité des dépôts de corrosion lesquels sont consommateurs de désinfectant (LeChevallier *et al.*, 1988 ; Geldreich, 1996 ; Vasconcelos *et al.*, 1996). Cependant, plusieurs auteurs mettent en évidence chez *E. coli*, le rôle des phosphates dans les mécanismes d'induction génétique (Kulaev, 1994 ; Rao et Kornberg, 1996 ; Shiba *et al.*, 1997 ; Kulaev *et al.*, 1999). En conséquence, l'ajout de phosphates pourrait avoir un effet sur la désinfection des bactéries ne dépendant pas de sa réaction avec la corrosion.

Dans ce contexte, des essais ont été entrepris sur des biofilms afin d'évaluer la réponse des biofilms à la monochloramination, en présence ou non de phosphates et en absence de corrosion. La monochloramine a été choisie comme désinfectant en raison de sa mise en œuvre de plus en plus courante dans les réseaux d'eau potable en Amérique du Nord. Ces essais ont pour objectifs (i) de déterminer si les phosphates modifient l'efficacité de désinfection de la monochloramine, (ii) d'apprécier si la réponse des biofilms traités aux phosphates à la désinfection varie suivant la dose de monochloramine et (iii) d'estimer si des modifications biochimiques en terme d'hydrates de carbone et d'acides aminés peuvent être engendrées dans le biofilm suite à l'application combinée des phosphates et de la monochloramine.

Le matériel et les méthodes utilisés sont détaillés dans le chapitre III. Les références bibliographiques utilisées sont regroupées dans le chapitre VIII. Les résultats bruts sont présentés en annexe dans les tableaux IX.36 à IX.47.

V.2 Résultats

V.2.1 Protocole expérimental

Lors d'une première phase de 9 semaines (Figure V.1), quatre réacteurs annulaires ont été colonisés par la flore présente dans l'eau du réseau de Montréal. Puis, pendant 6 semaines

(phase de pré-phosphatation), deux des réacteurs ont été alimentés en parallèle et en continu avec une solution de phosphate commerciale contenant 35% d'orthophosphates et 65% de polyphosphates (cf. Chapitre III), injectée directement au niveau du réacteur à un débit de $0,3 \text{ mL min}^{-1}$ afin d'obtenir une concentration finale en phosphates totaux de $0,5 \text{ mg P-PO}_4 \text{ L}^{-1}$. Les deux autres réacteurs ont servi de témoin et ont permis de déterminer que les phosphates n'entraînaient pas de modification des biofilms. Ces résultats sont présentés dans le Chapitre III.

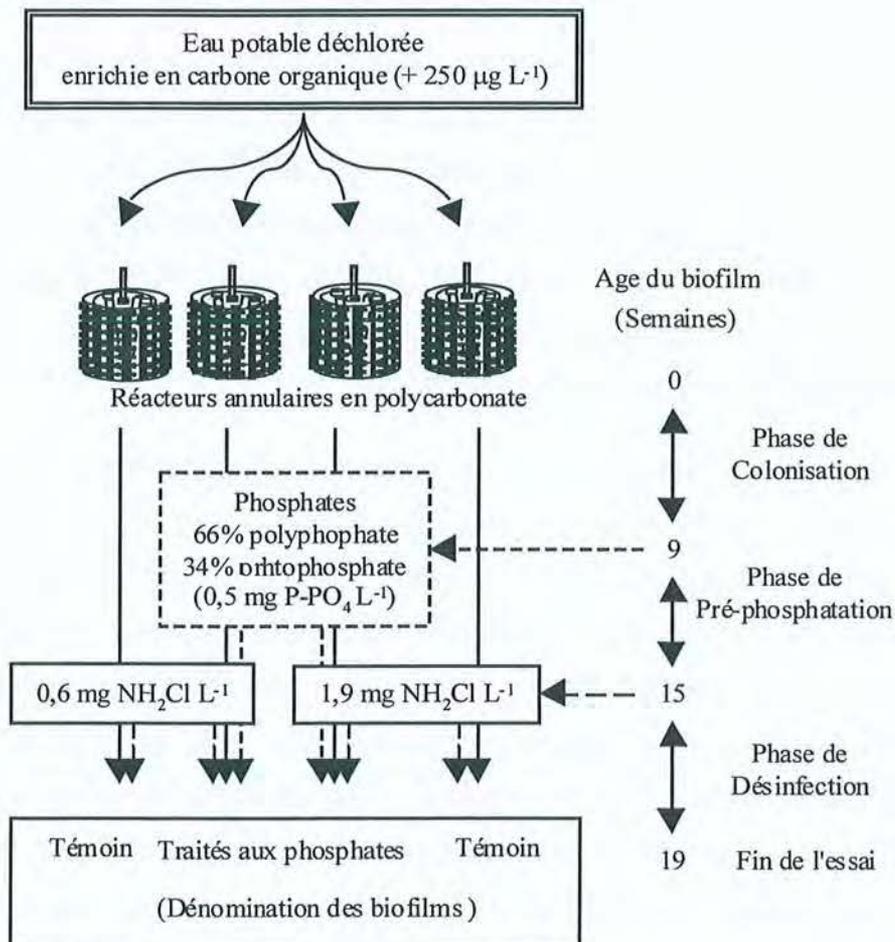


Figure V.1 : Schéma du protocole expérimental.

Pendant les 4 semaines suivantes, le traitement aux phosphates de deux des biofilms a été poursuivi et les quatre biofilms ont été désinfectés avec de la monochloramine (Phase de désinfection) appliquée à deux doses :

- $0,6 \text{ mg NH}_2\text{Cl L}^{-1}$ sur un témoin et un réacteur traité aux phosphates
- $1,9 \text{ mg NH}_2\text{Cl L}^{-1}$ sur un témoin et un réacteur traité aux phosphates

Afin de faciliter la compréhension, les biofilms qui sont soumis à la phosphatation sont dénommés biofilms traités aux phosphates et les biofilms non soumis à la phosphatation sont dénommés biofilms témoins, quelle que soit la phase considérée.

Des dénombrements totaux de bactéries (CDT) et de bactéries cultivables (BHA) ont été réalisées par des mesures en duplicata et l'activité exoprotéolytique potentielle du biofilm (AEP) a été évaluée par des mesures en triplicata (cf. Chapitre III). La composition des biofilms en termes de phosphates, d'hydrates de carbone et d'acides aminés a également été estimée et ces analyses ont été effectuées à la fin de la période de chloramination, en duplicata (cf. Chapitre III).

V.2.2 Conditions expérimentales

Les caractéristiques générales de l'eau de distribution utilisée sont présentées dans le tableau V.1

Tableau V.1: Caractéristiques physico-chimiques de l'eau potable (Montréal, Canada).

Paramètres	Unités	Moyenne (min-max) pour 2000	n
Température	°C	11 (1-23)	223
Turbidité	NTU	0.23 (0.08-1.26)	334
Alcalinité	mg CaCO ₃ -eq L ⁻¹	83 (76-87)	53
Dureté totale	mg CaCO ₃ -eq L ⁻¹	117 (109-125)	53
Demande en O ₂	mg KMnO ₄ L ⁻¹	1.0 (0.6-1.6)	47
Carbone organique dissous	mg C L ⁻¹	2.42 (2.00-3.51)	232
pH	-	7.84 (7.58-8.21)	331
Chlorure	mg L ⁻¹	21 (18-22)	53
Conductivité	µS cm ⁻¹	290 (270-310)	365

Source : Ville de Montréal

Pour contrôler les conditions expérimentales, des échantillonnages ont été effectués régulièrement, tous les 1 à 7 jours suivant les paramètres. Le temps de résidence hydraulique de l'eau dans les réacteurs a été fixé à environ 2 heures (Tableau V.2) en contrôlant le débit en entrée à $6,5 \pm 0,1$ mL min⁻¹. La vitesse de rotation du rotor a été fixée à 40 tour min⁻¹ afin de simuler une force de cisaillement similaire à celle provoquée par un écoulement d'eau de $0,6$ m s⁻¹ dans une canalisation ayant un diamètre de 6 pouces (15,24 cm).

La température, le pH et la concentration en carbone organique total (COT) sont analysés toutes les une à deux semaines. Les concentrations bactériennes (dénombrements totaux et des bactéries cultivables) en entrée des réacteurs sont estimées par des prélèvements tous les 15

jours et leurs moyennes sont présentées dans le tableau V.2. La population totale en entrée des réacteurs contenait de l'ordre de 9,2% des bactéries cultivables.

Tableau V.2 : Suivis des conditions expérimentales (COT = carbone organique total ; TRH = temps de résidence hydraulique). LD : Limite de détection

Paramètres	Unités	Moyenne pour 2000	n
Résidence Bac Tampon	h	21,4 ± 1,8	90
Température dans le bac tampon	°C	20,2 ± 1,1	47
Température de l'eau en sortie des réacteurs	°C	22,6 ± 1,2	47
pH de l'eau en sortie des réacteurs	-	7,53 ± 0,14	10
COT en entrée des réacteurs	mg C L ⁻¹	2,7 ± 0,2	15
Phosphates	µg P L ⁻¹	<LD	10
Bactéries cultivables en entrée des réacteurs	UFC mL ⁻¹	9,98 10 ⁴ ± 6,54 10 ⁴	9
Bactéries totales en entrée des réacteurs	cellules mL ⁻¹	1,09 10 ⁶ ± 0,30 10 ⁶	9
Vitesse du rotor	tour min ⁻¹	40,3 ± 0,8	36
TRH	h	1,98 ± 0,06	86

V.2.3 Résiduels de désinfectant

Quelle que soit la dose de monochloramine appliquée, le résiduel de désinfectant a présenté un comportement similaire dans les réacteurs témoins et traités aux phosphates (Figure V.2). Dès le début de la chloramination, le résiduel a atteint 1,6 mg NH₂Cl L⁻¹ dans les réacteurs où 1,9 mg NH₂Cl L⁻¹ était appliqué, puis s'est maintenu tout au long de la phase de désinfection autour de cette valeur. Suite aux premiers jours d'application de 0,4 mg NH₂Cl L⁻¹, étant donné que le résiduel en sortie des réacteurs était très faible, la dose de monochloramine appliquée a été augmentée à 0,6 mg NH₂Cl L⁻¹. Dès l'augmentation de la dose appliquée, le résiduel a atteint 0,4 mg NH₂Cl L⁻¹, puis n'a pas présenté de variations sensibles. La demande en monochloramine de l'eau après deux heures a été estimée à 0,2 mg NH₂Cl L⁻¹ pour une application de monochloramine de 0,8 mg NH₂Cl L⁻¹ et à 0,4 mg NH₂Cl L⁻¹ pour une application de monochloramine à 1,9 mg NH₂Cl L⁻¹.

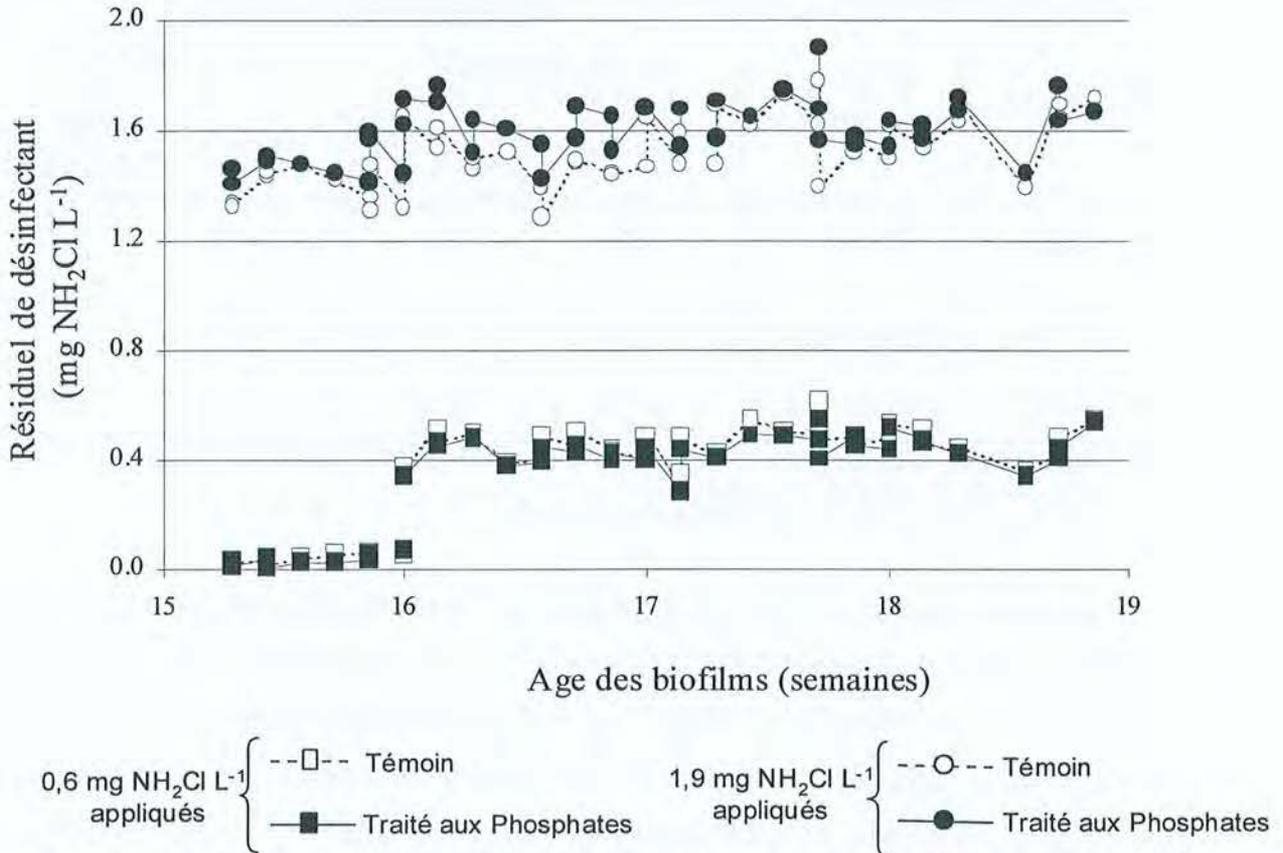


Figure V.2 : Résiduels de monochloramine en sortie des réacteurs témoins (symboles vides) et des réacteurs traités aux phosphates (symboles pleins), pour deux doses de monochloramine appliquées (0,6 ou 1,9 mg L⁻¹).

V.2.4 Efficacité de désinfection de la monochloramine

L'efficacité de désinfection de la monochloramine sur les biofilms a été évaluée à partir du suivi des densités bactériennes dans les biofilms témoins. Avant la désinfection, tous les biofilms contenaient des densités similaires de bactéries cultivables, de l'ordre de $0,8$ à $1,2 \times 10^6$ UFC cm⁻² et l'AEP était similaire pour l'ensemble des biofilms, vers 4×10^{-4} nmol βN cm⁻² min⁻¹. Après 1 mois de désinfection, quelle que soit la dose de monochloramine, les BHA et l'AEP dans les biofilms témoins atteignent de 6 UFC cm⁻² et 10^{-3} nmol βN cm⁻² min⁻¹, soit des abattement respectifs de 5,3 log et 1,7 log (Figure V.3).

Cependant, les taux initiaux de décroissance des bactéries cultivables et de l'AEP induits par application de $1,9$ mg NH₂Cl L⁻¹ sont deux fois plus élevés à ceux induit par application de $0,6$ mg NH₂Cl L⁻¹, que ce soit en comparant les témoins ou en comparant les biofilms traités aux phosphates (Tableau V.3).

Tableau V.3 : Taux initiaux de décroissance des densités bactériennes dans les biofilms traités ou non aux phosphates, lors de la première semaine d'application de la monochloramine (log/jour) (n=2)

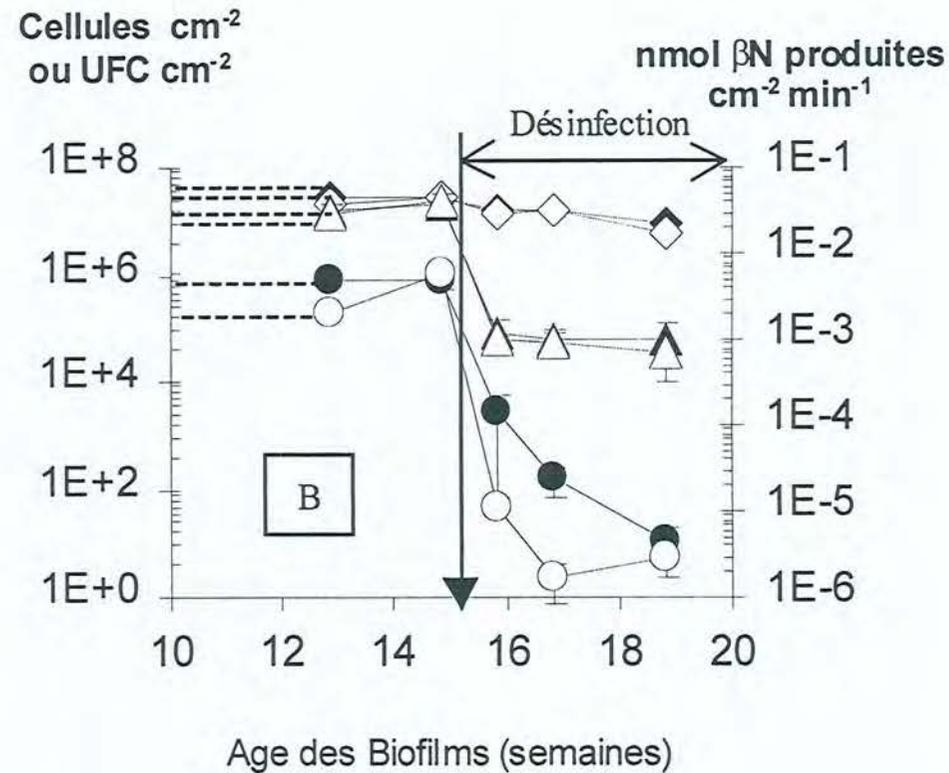
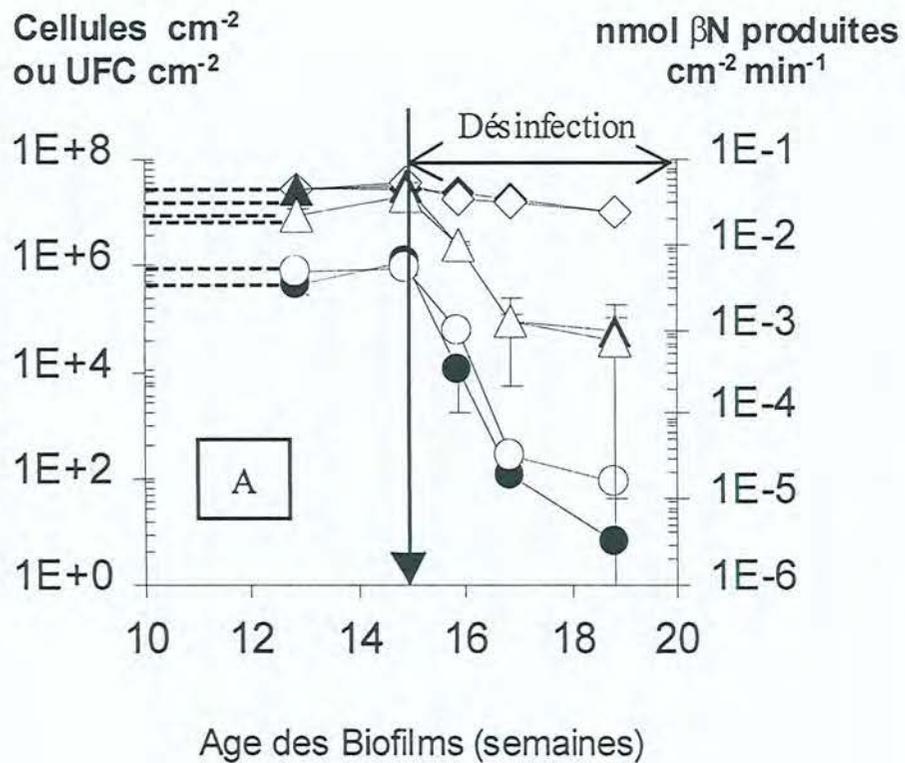
Paramètres	Unités des paramètres	Monochloramine appliquée à			
		0,6 mg NH ₂ Cl L ⁻¹		1,9 mg NH ₂ Cl L ⁻¹	
		Témoin	Traité aux phosphates	Témoin	Traité aux phosphates
BHA	UFC cm ⁻²	-0,29	-0,17	-0,62	-0,35
AEP	nmol βN cm ⁻²	-0,10	-0,09	-0,23	-0,21
CDT	Cellules cm ⁻²	-0,01	-0,03	-0,05	-0,03

BHA : Bactéries hétérotrophes aérobies cultivables sur R2A à 22°C pendant 7 jours

AEP : Activité exoprotéolytique potentielle

CDT : Comptes directs totaux par marquage au DAPI).

Les abattements des CDT sont plus faibles que ceux observés avec les mesures de BHA et d'AEP (Figure V.3). Avant la désinfection, les CDT de l'ensemble des biofilms atteignent de 2,7 à 3,7×10⁷ cellules cm⁻². Après 1 mois de désinfection, quelle que soit la dose de monochloramine appliquée, l'ensemble des biofilms présente des CDT de 6 à 10 ×10⁶ cellules cm⁻², soit un abattement des dénombrements totaux de l'ordre de 0,5 log,. Par ailleurs, les taux initiaux de décroissance des CDT, engendrés par la désinfection, sont identiques et très faibles quelle que soit la dose de monochloramine appliquée (Tableau V.3).



Biofilms Traités aux Phosphates

- ◆ CDT
- BHA
- ▲ AEP

Biofilms Témoins

- ◇ CDT
- BHA
- △ AEP

Figure V.3 : Effet de la désinfection à la monochloramine sur des biofilms témoins et traités aux phosphates mesuré par culture sur gélose (BHA), par estimation de l'activité exoprotéolytique (AEP) et par dénombrement total de bactéries par marquage au DAPI (CDT).

A : $0,6 \text{ mg NH}_2\text{Cl L}^{-1}$ appliqué.

B : $1,9 \text{ mg NH}_2\text{Cl L}^{-1}$ appliqué.

V.2.5 Effet d'un ajout de phosphates sur la monochloramination des populations fixées

Lors la monochloramination, les réponses des populations fixées, témoins et traitées aux phosphates, ont été estimées par des mesures de CDT, de BHA et d'AEP.

En termes de CDT et d'AEP, les phosphates n'ont pas eu d'effet mesurable sur l'efficacité de la désinfection (Figure V.3). Par ailleurs, les CDT des biofilms traités aux phosphates et des biofilms témoins (non traités aux phosphates) ont présenté des taux initiaux de décroissance similaires et très faibles. Concernant l'AEP, pour une dose de désinfectant donnée, les taux de décroissance durant la première semaine de monochloramination sont identiques que les biofilms soient ou non traités aux phosphates (Tableau V.3).

En terme de BHA, avant la désinfection, tous les biofilms contenaient des densités de bactéries cultivables similaires, de l'ordre de 0,8 à $1,2 \times 10^6$ UFC cm^{-2} . Après 1 mois de monochloramination, les biofilms traités aux phosphates présentent des densités de 82 ± 14 et 11 ± 9 UFC cm^{-2} respectivement, et les biofilms témoins correspondant $6,1 \pm 0,0$ et $5,5 \pm 0,9$ UFC cm^{-2} (Figure V.3). Ainsi, l'abattement des BHA est de 1,2 à 0,4 log plus important dans les biofilms témoins que dans les biofilms traités aux phosphates, soit de 13 à 2 fois plus accentué. La différence entre biofilms témoins et traités aux phosphates la plus marquée est observée pour une désinfection par application de $0,6 \text{ mg NH}_2\text{Cl L}^{-1}$. Dans tous les cas, durant la première semaine de monochloramination, les BHA diminuent de l'ordre de deux fois plus vite dans les biofilms témoins que dans les biofilms traités aux phosphates, quelle que soit la dose de désinfectant appliquée (Tableau. V.3).

Au cours de la monochloramination, le traitement aux phosphates permet le maintien d'une cultivabilité deux fois plus importante des bactéries des biofilms. Toutefois, le traitement aux phosphates n'a pas d'effet mesurable sur les dénombrements de CDT et d'AEP.

V.2.6 Effet de la monochloramination sur la composition chimique des biofilms

Afin de déterminer les effets de la monochloramine sur la composition chimique des biofilms, des mesures de teneurs en phosphates, d'hydrates de carbone et d'acides aminés ont été effectuées sur les biofilms avant la désinfection et après 1 mois de chloramination.

Les concentrations en hydrates de carbone totaux, acides aminés totaux et phosphates présentent des différences entre les biofilms exposés à diverses conditions expérimentales

(Tableau V.4). L'effet de la chloramination sur chacun de ces composants sera décrit à partir des biofilms témoins et comparé à l'effet de la chloramination sur les biofilms traités aux phosphates.

Teneurs en phosphates. Les biofilms témoins contenaient de l'ordre de 0,18-0,15 $\mu\text{g P cm}^{-2}$ avant la chloramination. Après un mois de monochloramination, ils contiennent 0,07-0,08 $\mu\text{g P cm}^{-2}$, soit approximativement la moitié de leur teneur initiale, quelle que soit la dose de désinfectant appliquée (Tableau V.4). De même, les biofilms traités aux phosphates présentent des diminutions de leur teneur en phosphates après 1 mois de chloramination. Cependant, suite à la désinfection, le biofilm traité aux phosphates et désinfecté par 0,6 mg $\text{NH}_2\text{Cl L}^{-1}$ a perdu peu de phosphates (environ un quart de sa teneur initiale) par rapport aux autres biofilms. En conséquence, après un mois de désinfection, il contient 3,6 fois plus de phosphates que le biofilm témoin désinfecté à la même dose et 2 fois plus de phosphates que le biofilm traité aux phosphates désinfecté par application de 1,9 $\text{NH}_2\text{Cl L}^{-1}$. Le biofilm traité aux phosphates et désinfecté par application de 1,9 mg $\text{NH}_2\text{Cl L}^{-1}$ contient plus de phosphates (1,6 fois plus) que son témoin. Cependant, avant la désinfection, ce biofilm traité aux phosphates contenait 2 fois plus de phosphates que le témoin. Aussi, la monochloramination tend à réduire la différence entre les teneurs en phosphates dans ces deux biofilms.

Teneurs totales en hydrates de carbone (HC) et acides aminés (AA). Quelle que soit la dose de monochloramine appliquée, la désinfection engendre une perte de $\approx 70\%$ des HC et de 50% des AA, dans les biofilms témoins. Dans les biofilms traités aux phosphates, les pertes en HC et AA engendrés par la désinfection sont légèrement plus faibles. Les pertes en HC sont de l'ordre de $\approx 60\%$ dans les biofilms traités aux phosphates, quelle que soit la dose de monochloramine appliquée. Le traitement aux phosphates limite surtout les pertes en AA dans le biofilm traité aux phosphates et désinfecté avec 0,6 mg L^{-1} . Dans ce cas, le biofilm a subi des pertes en AA deux fois plus faibles que celles notées pour le témoin désinfecté à 0,6 mg L^{-1} . Lorsque la désinfection appliquée est 1,9 mg L^{-1} , les pertes en AA dans le biofilm traité aux phosphates (46%) et dans le biofilm témoin (51%) sont proches.

Tableau V.4 : Teneurs en phosphates, hydrates de carbone totaux et acides aminés totaux dans les biofilms traités aux phosphates et témoins, avant et après désinfection. Pertes engendrées par 28 jours de désinfection à la monochloramine et pourcentage d'abattement par rapport aux teneurs avant désinfection.

		Unités	Dose de désinfectant appliquée			
			0,6 mg NH ₂ Cl L ⁻¹		1,9 mg NH ₂ Cl L ⁻¹	
			Témoin	Traité aux phosphates	Témoin	Traité aux phosphates
Phosphates	Avant désinfection	μg P cm ⁻²	0,18	0,33	0,15	0,33
	Après désinfection	μg P cm ⁻²	0,07	0,25	0,08	0,12
	Pertes	μg P cm ⁻²	0,11	0,08	0,07	0,21
	% de perte	%	61	24	49	62
Hydrates de carbone	Avant désinfection	nmol cm ⁻²	17,6	16,3	13,3	15,0
	Après désinfection	nmol cm ⁻²	4,77±0,01	6,85±0,04	4,19±0,02	5,65±0,02
	Pertes	nmol cm ⁻²	12,83	9,45	9,11	9,35
	% de perte	%	72	58	69	62
Acides Aminés	Avant désinfection	nmol cm ⁻²	1,27	1,14	1,24	1,17
	Après désinfection	nmol cm ⁻²	0,63±0,01	0,87±0,00	0,61±0,01	0,65±0,03
	Pertes	nmol cm ⁻²	0,64	0,27	0,63	0,52
	% de perte	%	50	24	51	44

Évolution du ratio HC/AA. En conséquence des variations respectives sur les teneurs en acides aminés et en hydrates de carbone dans biofilms témoins suite à un mois de monochloramination, les ratios HC/AA diminuent de 13,9-10,7 initialement, à 7,6-6,7, soit une diminution de 45 ou 32% suite à l'application de 0,6 ou 1,9 mg $\text{NH}_2\text{Cl L}^{-1}$ respectivement (Tableau V.5). Les ratios HC/AA des biofilms traités aux phosphates (8,2 et 8,7 après la monochloramination) tendent à être supérieurs à ceux des témoins. Cependant, dans tous les cas, les abattements sont proches, que les biofilms soient témoins (45 et 38%) ou traités aux phosphates (43 et 32%),

Tableau V.5 : Ratio des concentrations molaires en hydrates de carbone (HC) par rapport aux acides aminés (AA). Evolution des ratios des biofilms témoins et traités aux phosphates, avant et après exposition pendant 1 mois à la monochloramine par application de 0,6 ou 1,9 mg $\text{NH}_2\text{Cl L}^{-1}$ en entrée des réacteurs.

Ratios HC/AA	0,6 mg L^{-1}		1,9 mg L^{-1}	
	Témoin	Traité aux phosphates	Témoin	Traité aux phosphates
Avant désinfection	13,9	14,3	10,7	12,8
Après désinfection	7,6	8,2	6,7	8,7
Abattement (% de perte)	-45%	-43%	-38%	-32%

Contributions relatives des divers hydrates de carbone. La chloramination engendre des changements statistiquement très significatifs ($p < 0,01$) dans les contributions relatives des hydrates de carbone (Figure V.3). Seul le groupement Mannose+Xylose (co-élués) ne présente pas de changement statistiquement significatif suite à la chloramination. Le glucose qui représentait de l'ordre de 40% des moles totales d'hydrates de carbone avant la désinfection représente entre 50 et 60% du total après 1 mois de chloramination. Le groupement galactose+glucosamine-HCl (co-élués), qui représentait 30% du total avant la chloramination (exclusivement par le galactose) représente de l'ordre de 10% dans les biofilms désinfectés. La co-élution ne nous a pas permis de discriminer les deux sucres. Cependant, des mesures antérieures (pendant la phase de désinfection), au cours desquelles l'élution a permis de séparer la glucosamine et le galactose, ont mis en évidence que la glucosamine est de l'ordre de 15 à 20 fois moins concentrée que le galactose dans les biofilms désinfectés. Les biofilms traités aux phosphates et désinfectés ne présentent pas de changements statistiquement significatifs dans les proportions des divers hydrates de carbone, par rapport aux proportions observées dans les biofilms témoins désinfectés.

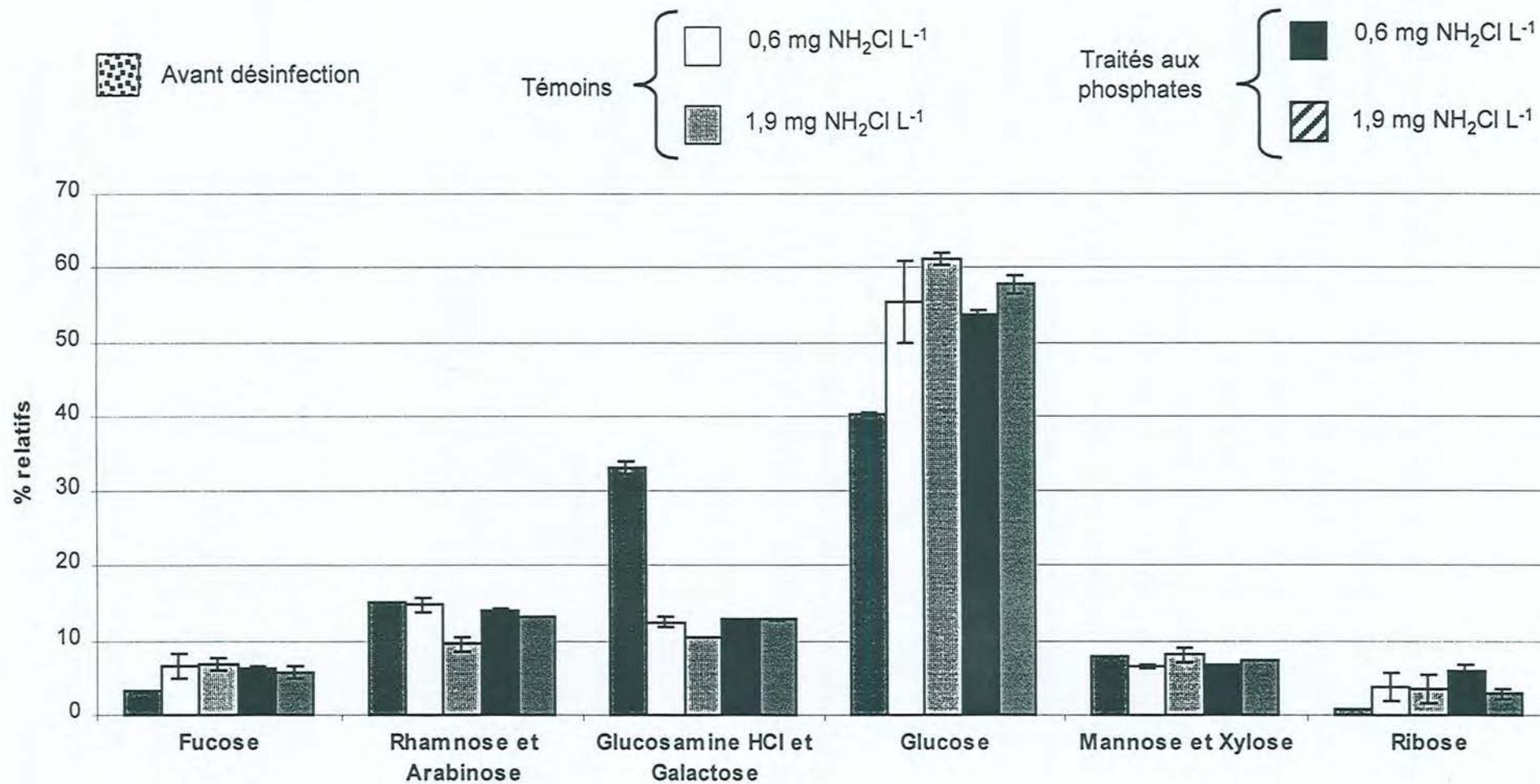


Figure V.3 : Pourcentages relatifs en hydrates de carbone suite à la monochloramination par application de 0,6 ou 1,9 mg $\text{NH}_2\text{Cl L}^{-1}$, sur des biofilms témoins ou traités aux phosphates.

Contributions relatives des divers acides aminés. En terme d'acides aminés (Figure V.4), la chloramination a engendré des augmentations statistiquement très significatives des proportions de la glycine, de la sérine et de l'isoleucine ($p < 0,01$) ainsi que des diminutions statistiquement très significatives des contributions de l'arginine, l'alanine, la valine, la leucine et de la lysine ($p < 0,01$) et des diminutions statistiquement significative de la phénylalanine ($p < 0,05$). Seules, les contributions de l'asparagine et de la glutamine n'ont pas statistiquement varié ($p > 0,05$). Les biofilms témoins présentent des compositions identiques malgré des doses de monochloramine appliquées différentes. Les proportions des divers acides aminés dans les biofilms traités aux phosphates et désinfectés ne présentent pas de différence significative par rapport à celles des biofilms témoins désinfectés.

En récapitulatif,

- Dans les biofilms témoins, quelle que soit la dose appliquée, la chloramination engendre des diminutions dans les teneurs en phosphates, hydrates de carbone et acides aminés et modifient les contributions des différents hydrates de carbone et acides aminés.
- Les changements engendrés par la chloramination dans les proportions des divers acides aminés et hydrates de carbone sont identiques dans les biofilms témoins et traités aux phosphates.
- Les ratios HC/aa diminuent de près de la moitié consécutivement à la chloramination quelle que soit la dose de monochloramine et que les phosphates soient ou non appliqués. L'abattement des teneurs en hydrates de carbone est donc systématiquement plus important que celui des acides aminés.
- Plus particulièrement lors de la monochloramination à la dose la plus faible, l'ajout de phosphates a possiblement limité les pertes en phosphates, en hydrates de carbone, et en en acides aminés dans les biofilms.

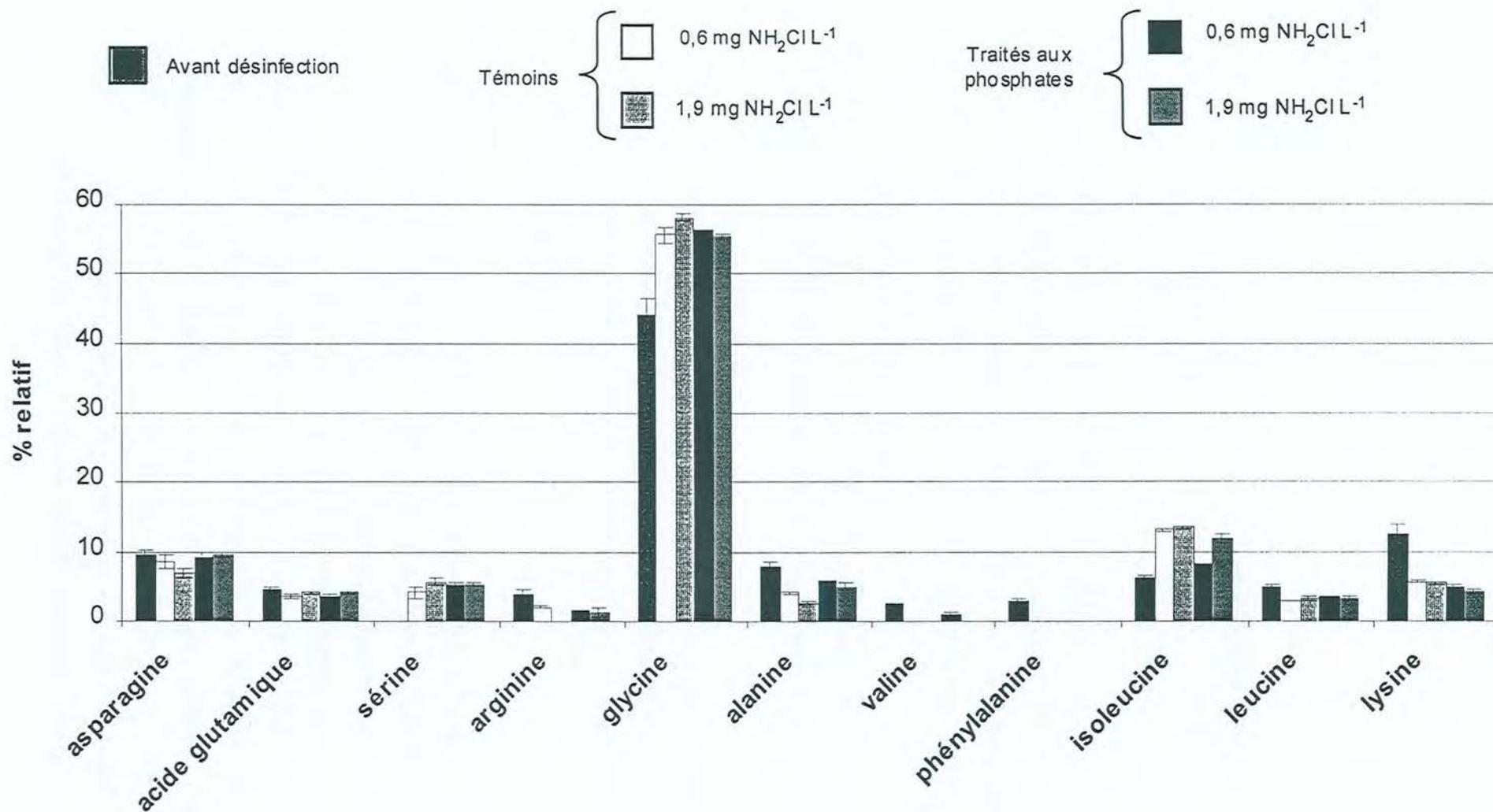


Figure V.4 : Effet de la désinfection à la monochloramine par application de 0,6 ou 1,9 mg NH₂Cl L⁻¹, sur des biofilms témoins ou traités aux phosphates, exprimé par les pourcentages relatifs des différents acides aminés

V.3 Discussion

Les désinfectants les plus employés lors de la phase de post-désinfection dans les usines de traitement d'eau sont le chlore et la monochloramine du fait de leur efficacité satisfaisante et de leur rémanence relativement importante (Kirmeyer *et al.*, 1993). La monochloramine est un désinfectant moins efficace que le chlore au niveau de l'eau (Berman *et al.*, 1988 ; Mathieu *et al.*, 1992), mais elle peut être plus efficace au niveau des biofilms, notamment en présence de corrosion (Berman *et al.*, 1988 ; LeChevallier *et al.*, 1988 et 1990). Parce qu'elle est moins réactive que le chlore, elle pénétrerait mieux au sein des biofilms (LeChevallier *et al.*, 1988 et 1990).

L'ajout de phosphates pourrait faciliter la désinfection des biofilms en diminuant la carence nutritive des bactéries qui pourraient alors devenir plus sensibles à la désinfection (Olson et Stewart, 1992) ou en séquestrant les métaux essentiels aux enzymes bactériennes (Vareltzis *et al.*, 1997). LeChevallier *et al.* (1988) suggèrent également que l'ajout de phosphates améliore la qualité bactériologique de l'eau desservie, du fait d'un maintien plus important du résiduel de désinfectant résultant de la limitation de la corrosion, consommatrice en désinfectant.

À l'inverse, l'ajout de phosphates pourrait limiter la diffusion du désinfectant de l'eau vers le biofilm, en formant un dépôt. Il pourrait aussi permettre aux bactéries de mettre en place des systèmes génétiques de défense tels que ceux mis en place pendant la phase stationnaire (*rpoS*), puisque le système *rpoS* peut être induit uniquement chez des bactéries possédant des réserves en phosphates (Rao et Kornberg, 1996 ; Shiba *et al.*, 1997).

Les travaux présentés ici ont visés à (i) évaluer l'effet de la monochloramination sur les biofilms en termes de densités bactériennes et de composition chimique et (ii) déterminer l'effet d'un traitement aux phosphates sur la monochloramination des biofilms.

V.3.1 Influence de la monochloramination sur les biofilms

La chloramination des biofilms a conduit à des abattements des densités bactériennes et des teneurs totales en acides aminés et en hydrates de carbone. Plus la dose de monochloramine est importante et plus les abattements de densités bactériennes sont importants. Les teneurs en acides aminés, hydrates de carbone et phosphates sont affectées de la même façon, quelle que soit la dose de monochloramine appliquée.

L'estimation de l'abattement des densités bactériennes dépend de l'outil de mesure utilisé. L'abattement des CDT est faible par rapport aux abattements observés avec les BHA

ou sur l'AEP. Les différences entre les abattements sur les BHA et les CDT sont de l'ordre de grandeur des différences rapportées par Stewart et Olson (1994). Ces auteurs observent qu'un traitement à la chloramine qui engendre un abattement de 3 log sur les BHA produit un abattement de 0,2 log des CDT.

Le DAPI permet le marquage des cellules, principalement en se fixant au niveau de l'ADN (Kapuscinski et Szer, 1979 ; Barcellona et Gratton, 1990). La monochloramine semble avoir peu ou pas d'effet sur les sites de fixation du DAPI au niveau de l'ADN (Saby *et al.*, 1997). Le DAPI s'intercalant entre les deux brins d'ADN (Barcellona et Gratton, 1990) au niveau des régions contenant 2 à 3 groupements de bases A-T (Kapuscinski et Szer, 1979), le marquage est donc théoriquement possible tant que la structure de la double hélice d'ADN et des paires de bases A-T sont suffisamment conservées. La monochloramine conduit principalement à des coupures des brins d'ADN plutôt que des substitutions (Ingols *et al.*, 1958; Shih et Lederberg, 1976; Jacangelo et Olivieri, 1985; Suzuki *et al.*, 1998, Shibata *et al.*, 1999). Possiblement, ce mode d'action de la monochloramine sur l'ADN affecte peu le marquage au DAPI.

La monochloramine a engendré des changements dans la composition chimique des biofilms. Suite à chloramination, les teneurs en hydrates de carbone et en acides aminés dans les biofilms ont fortement diminué, ce qui confirme les observations de Koudjonou *et al.* (1998a et 1998b). Par ailleurs, suite à la chloramination, certains acides aminés (glycine, sérine et isoleucine) et certains sucres (fucose, glucose, ribose) contribuent davantage aux teneurs totales. À l'inverse, d'autres acides aminés (arginine, alanine, valine, phénylalanine, leucine et lysine) et un sucre (galactose) y contribuent moins. Ces changements pourraient être la conséquence (i) de modifications dans les activités de synthèse des bactéries consécutivement à la désinfection (Koudjonou *et al.*, 1997 et 1998 ; Saby, 1999) et/ou (ii) des différentes réactivités des divers hydrates de carbone et acides aminés avec la monochloramine (Jacangelo et Olivieri, 1985).

La monochloramine est en théorie susceptible de réduire davantage la teneur en acides aminés totaux que celle hydrates de carbone totaux, puisque (i) les hydrates de carbone sont peu réactifs avec le chlore et la monochloramine (LeChevallier *et al.*, 1988 ; Baum et Morris, 1978 ; Jacangelo et Olivieri, 1985) et que (ii) la plupart des acides aminés présentent une forte demande en monochloramine (Jacangelo et Olivieri, 1985). Or, la diminution du ratio HC/AA suite à la chloramination indique au contraire une diminution plus importante des teneurs en hydrates de carbone que de celles en acides aminés dans les biofilms témoins chloraminés. Ainsi, l'évolution du ratio HC/AA à l'opposé des attentes initiales et les changements dans les

contributions des divers acides aminés au total des acides aminés pourrait refléter des changements dans les synthèses consécutivement à la chloramination en faveur des protéines et au détriment des exopolysaccharides. Des études ont montré que la désinfection au chlore engendre des changements dans la physiologie bactérienne (Leyval *et al.*, 1984 ; Saby, 1999). Grâce à des récepteurs, tels que le glutathion qui permet à *E. coli* la mise en place de défense contre la monochloramine (Chesney *et al.*, 1996 ; Yajima *et al.*, 1999), les cellules sont capables de détecter la présence du bactéricide et de synthétiser des systèmes de défense appropriés.

Cependant, les différents hydrates de carbone et acides aminés ne présentent les mêmes réactivités avec la monochloramine (Ingols *et al.*, 1953 ; Yoon et Jersen, 1995), ce qui pourrait également induire des changements dans leurs contributions relatives. Par exemple, les acides aminés sont en général très réactifs avec la monochloramine et engendrent une consommation >80% de la monochloramine en 3 heures pour un ratio molaire acide aminé/NH₂Cl de 5/1 (Jacangelo et Olivieri, 1985). Seule, la glycine réagit très peu et ne consomme que 6% de la monochloramine, en 3h. La glycine étant moins réactive avec la monochloramine que les autres acides aminés, cela pourrait expliquer partiellement la plus grande contribution de la glycine au total des acides aminés observée dans notre étude.

V.3.2 Influence de la phosphatation sur la désinfection avec la monochloramine

La comparaison de biofilms témoins et traités au phosphates pendant la monochloramination a été effectuée afin de (i) déterminer si l'efficacité de désinfection de la monochloramine était modifiée par un traitement des biofilms par des phosphates, (ii) apprécier si la désinfection appliquée sur des biofilms traités aux phosphates était différente suivant la dose de monochloramine et (iii) estimer si des modifications biochimiques du biofilm peuvent être engendrées par les traitements de l'eau avec des phosphates et de la monochloramine.

L'effet principal de la phosphatation sur la réponse des biofilms à la chloramination est de limiter l'abattement des BHA dans les biofilms. L'efficacité de désinfection de la monochloramine est influencée par sa diffusion dans le biofilm (Huang *et al.*, 1995). Les phosphates pourraient donc avoir limité la diffusion de la monochloramine dans les biofilms soit en se fixant sur les biofilms (par leurs propriétés filmogènes) soit en engendrant des teneurs en exopolymères plus importantes dans les biofilms traités.

Des essais complémentaires, non présentés ici, visant à vérifier si les phosphates s'adsorbaient aux biofilms ont mis en évidence que l'adsorption des phosphates n'est pas le seul phénomène en cause ; l'adsorption maximale observée ($0,036 \mu\text{g P cm}^{-2}$) ne représente que 24% des phosphates totaux fixés dans les biofilms témoins (avant la désinfection). Les propriétés filmogènes des phosphates ne sont donc pas les seuls paramètres à considérer pour comprendre les mécanismes de fixation des phosphates dans le biofilm. La présence d'hydrates de carbone et d'acides aminés en quantités légèrement supérieures dans les biofilms traités aux phosphates pourrait suggérer une plus grande quantité d'exopolymères dans ces biofilms par rapport aux témoins. La plus grande quantité d'exopolymères pourrait engendrer un plus grand maintien de la cultivabilité des bactéries (Leyval *et al.*, 1984).

Les changements dans l'efficacité de désinfection induits par les phosphates pourraient également être la conséquence des changements physiologiques chez les bactéries traitées aux phosphates, conduisant à un meilleur maintien de leur cultivabilité puisque (i) la littérature indique l'existence de mécanismes de résistance à la monochloramine chez les bactéries mettant en jeu les phosphates et que (ii) des tendances présentées ci-dessous suggèrent que les bactéries pourraient percevoir les changements de teneur en phosphates dans les eaux.

Physiologiquement, les bactéries sont capables d'accumuler des phosphates sous forme de réserves. Ces réserves sous forme de granules de polyphosphates intracellulaires sont davantage présentes à proximité de l'ADN (Kulaev, 1994 ; Kulaev *et al.*, 1999). Kulaev *et al.* (1994 et 1999) suggèrent qu'elles jouent un rôle de régulateur des mécanismes génétiques, dont fait partie la résistance à la désinfection. De plus, ces réserves sont effectivement nécessaires à la mise en place des mécanismes induits par la phase stationnaire (Rao et Kornberg, 1996 ; Shiba *et al.*, 1997), lesquels induisent une résistance croisée à la désinfection (Saby, 1999).

Dans nos essais, plusieurs paramètres suggèrent que les bactéries sont réceptives vis-à-vis des phosphates et que les phosphates sont utiles aux bactéries :

Le suivi des teneurs en polyphosphates en sortie des réacteurs suggère leur hydrolyse sous forme d'orthophosphates en présence de biofilms (voir annexe IX.1 (Tableau IX.27) et annexe IX.2 (tableaux IX.45 à IX.47)). Une corrélation a été observée entre l'activité exoprotéolytique du biofilm et la teneur en orthophosphate par rapport aux phosphates totaux, en sortie des réacteurs au cours de deux séries d'expériences :

$$\% \text{ orthophosphate} = 5,6 \log \text{ AEP} + 66 \quad (r^2=0,70)$$

$$\% \text{ orthophosphate} = 6,74 \log \text{ AEP} + 59 \quad (r^2=0,69)$$

Un test complémentaire (non détaillé ici) a été réalisé sur un réacteur RotoTorque™ colonisé depuis plus de 1 an par un biofilm. Tandis que 36% des phosphates injectés étaient initialement formés de polyphosphates, après 24 h de temps de contact, moins de 1% des phosphates demeuraient sous cette forme, le reste (99%) étant sous forme orthophosphates. Tandis que dans les mêmes conditions mais en absence de biofilm –dans un RotoTorque™ remis en service après un nettoyage mécanique des parois - aucune hydrolyse des polyphosphates n'a été mise en évidence.

Si l'accumulation de phosphates dans les biofilms traités aux phosphates permet un maintien prolongé de la cultivabilité par rapport aux bactéries des biofilms témoins, l'abattement des concentrations de phosphates plus importantes dans le biofilm traité aux phosphates et désinfectés à 1,9 mg NH₂Cl L⁻¹ (par rapport au témoin désinfectés à 1,9 mg NH₂Cl L⁻¹) suggère que l'effet des phosphates sur la cultivabilité est transitoire, jusqu'à épuisement des « surplus » de phosphates.

En récapitulatif, dans les conditions testées,

- Les phosphates affectent peu la monochloramination des biofilms, puisque
 - (i) la seule différence entre la flore bactérienne fixée, traitée aux phosphates et celle témoin est uniquement un maintien deux fois plus important de la cultivabilité, effet possiblement transitoire
 - (ii) la composition chimique des biofilms est proche en termes d'acides aminés et d'hydrates de carbone quelles que soient les conditions auxquelles ils sont exposés.
 - (iii) les teneurs en phosphates sont plus élevées dans les biofilms traités que dans les témoins. Cependant, l'abattement de ces teneurs est plus important dans le biofilm traités que dans celui témoin avec la dose de monochloramine appliquée la plus élevée.
- Les bactéries hydrolysent les polyphosphates, sans toutefois montrer une utilisation des phosphates puisque les concentrations en phosphates totaux dans les eaux en sortie sont identiques à celle attendues en théorie. Les phosphates sont probablement fixées en partie seulement dans les exopolymères ou aux parois, mais l'adsorption n'est probablement pas le seul phénomène.
- L'évolution du ratio HC/AA des biofilms suggèrent un changement des synthèses bactériennes au profit des protéines.

Chapitre VI Effet des Phosphates sur la Composition des Populations

VI.1	<u>INTRODUCTION</u>	155
VI.2	<u>EFFET DE L'AJOUT DE PHOSPHATES EN CONDITIONS STATIQUES SUR UNE SOUS-POPULATION DE COLIFORMES CULTIVABLES</u>	156
	VI.2.1 Essais préliminaires : Choix des souches de coliformes	156
	VI.2.2 Influence de la concentration en phosphates de l'eau de distribution sur la survie de <i>Citrobacter freundii</i> et <i>Escherichia coli</i> en conditions statiques	159
VI.3	<u>EFFET DE L'AJOUT DE PHOSPHATES EN CONDITIONS DYNAMIQUES SUR L'IMPLANTATION D'UNE SOUS-POPULATION DE COLIFORMES CULTIVABLES INJECTÉE MASSIVEMENT</u>	163
	VI.3.1 Protocole	163
	VI.3.2 Caractéristiques des eaux	164
	VI.3.3 Résultats	165
VI.4	<u>INFLUENCE OF PHOSPHATE AND DISINFECTION ON THE PHYLOGENIC COMPOSITION OF DRINKING WATER BIOFILMS AS MEASURED BY IN SITU HYBRIDIZATION (FISH)</u>	167
VI.5	<u>DISCUSSION</u>	190

VI.1 Introduction

Au cours des précédents chapitres, il est apparu que les phosphates n'influencent ni la croissance des bactéries du biofilm, ni leurs synthèses d'hydrates de carbone et d'acides aminés. Cependant, Reilly et Kippin (1983) indiquent qu'une microflore diversifiée ne peut et ne doit pas être considérée comme réagissant massivement à un changement de qualité des eaux. La dynamique des populations est un phénomène qui régule les équilibres intraspécifiques (au sein d'une espèce) et interspécifique (entre les espèces), en fonction des pressions de l'environnement. Dans l'écosystème eau potable, l'ajout de phosphates change l'environnement ce qui pourrait modifier ces équilibres.

Cependant, il est difficile d'étudier la composition des populations bactériennes en eau potable en terme d'espèces. D'une part, la majorité de la population n'est pas cultivable (Kalmbach *et al.*, 1997a et b ; Staley et Konopka, 1985 ; Block *et al.*, 1993 ; Manz *et al.*, 1993). Par ailleurs, même avec des techniques sans étape de culture telles que la PCR, la diversité des espèces présentes rend l'étude fastidieuse et surtout la quantification des bactéries est difficilement réalisable. L'appartenance des bactéries à des groupes phylogénétiques ou physiologiques bien définis permet cependant d'aborder la composition taxonomique des populations. Une méthode récente, l'hybridation *in situ* avec des sondes fluorescentes (FISH) permet de définir les grandes classes ou sous-classes bactériennes présentes dans les échantillons. La composition phylogénétique est l'un des meilleurs outils permettant d'approfondir la composition des populations de manière objective et répétée et ainsi d'aborder la dynamique des populations. Les dénombrements bactériens par FISH ne nécessitant pas de mise en culture des bactéries avant la détection, ils évitent les biais de sélection des techniques de culture.

La dynamique des populations au sein du biofilm est déterminée par la compétition entre différents groupes d'organismes pour les substrats et l'espace (Morgenroth et Wilderer, 2000). En tant qu'écosystème, le biofilm est sensible aux pressions sélectives de l'environnement (quantité des nutriments, nature du nutriment limitant, température, taux de corrosion des canalisations, désinfectants etc.) qui vont influencer sur la dynamique de ces populations. À titre d'exemple, les populations bactériennes de type « coliformes » sont plus fréquemment détectées lorsque la température de l'eau dépasse 15°C ou si le résiduel en désinfectant se maintient difficilement (cul-de-sac) (LeChevallier, 1997). Cependant, aucun facteur et aucune combinaison de facteurs ne permettent de garantir une occurrence de coliformes. Les coliformes ont également été détectés dans des tubercules de corrosion laissant présager d'un rôle possible de certains biofilms dans l'occurrence des coliformes (LeChevallier *et al.*, 1987).

Les travaux présentés ici visent à déterminer dans quelles mesures la composition des populations peut être modifiée par un traitement aux phosphates. Pour cela, les premiers travaux ont cherché à définir l'effet des phosphates sur la composition des populations. Puis les effets des phosphates ont été comparés aux effets d'autres paramètres (désinfection, fixation des populations) sur la composition des populations.

Dans un premier temps, les coliformes ont été perçus comme un groupe témoin ayant des spécificités physiologiques potentiellement différentes de celle de la population autochtone des eaux. Aussi, l'effet des phosphates sur des sous-populations de coliformes a été étudié en conditions statiques. Puis en conditions dynamiques, l'influence de la gélose de culture utilisée a été discutée avant de définir l'effet des phosphates sur une sous-population inoculée de *Citrobacter freundii*. Enfin, les effets des phosphates, des désinfectants et de la fixation des bactéries sur la composition des populations en eau potable ont été étudiés par FISH. Ces derniers travaux ont fait l'objet d'une publication soumise à la revue *Applied and Environmental Microbiology*.

VI.2 Effet de l'ajout de phosphates en conditions statiques sur une sous-population de coliformes cultivables

L'utilisation des coliformes comme sous-population témoin a été envisagée parce que :

- les coliformes peuvent être rencontrés dans les eaux potables,
- ils peuvent éventuellement s'implanter dans le biofilm dépendamment des conditions environnementales,
- Ils sont des indicateurs de qualités tant qu'ils ne se multiplient pas dans le réseau de distribution.

Les coliformes ont été considérés comme une sous-population bactérienne permettant d'étudier les effets des phosphates sur la composition des populations. De nombreuses méthodes de culture peuvent être utilisées pour leur détection et donnent une réponse rapide.

VI.2.1 Essais préliminaires : Choix des souches de coliformes

Afin de choisir deux espèces de coliformes parmi la dizaine d'espèces isolées des eaux par le L.H.R.S.P. (Laboratoire d'Hygiène et de Recherche en Santé Publique) à Nancy, une recherche dans la littérature a été réalisée afin de déterminer les espèces les plus fréquentes dans les eaux potables (O'Neill et Parry, 1997). Quatre espèces ont ainsi été sélectionnées : *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli* et *Klebsiella pneumoniae*. Puis,

pour ne suivre que 2 espèces dans les essais, un test préliminaire de cultivabilité sur 8 jours a été effectué avec de l'eau de distribution stérilisée par autoclavage, prélevée au L.H.R.S.P. et enrichie en phosphates et en acides aminés.

VI.2.1.1 Protocole

Dix litres d'eau de distribution sont filtrés sur filtre en polycarbonate ayant une porosité 0,8 µm, et un diamètre de 47 mm (Costar, réf. 111159). L'eau est répartie dans 4 flacons en verre brun puis stérilisée par autoclavage (15 min, 121°C).

Les *inocula* de *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli* et *Klebsiella pneumoniae* ont été préparés comme décrit dans le chapitre III. Le nombre de bactéries dans les *inocula* est déterminé par marquage au DAPI. Les flacons sontensemencés à raison de 10^3 coliformes mL⁻¹ en concentration finale. Les échantillons sont agités à l'aide d'un agitateur magnétique pendant 15 min afin d'homogénéiser les suspensions.

Les différents flacons sont enrichis afin d'avoir des teneurs finales théoriques de 50 µg P PO₄ L⁻¹ (cf. § 4.4) en phosphates ajoutés et 60 µg C L⁻¹ (cf § 4.5) en acides aminés ajoutés.

Les flacons sont ensuite placés à incuber à 22 (±2)°C sans agitation. Six prélèvements répartis sur 8 jours sont réalisés. Avant chaque prélèvement, les flacons sont agités à l'aide d'un agitateur magnétique pendant 15 min, afin d'homogénéiser la suspension. Des dénombrements totaux au DAPI, de bactéries cultivables (UFC) sur une gélose non sélective (R2A) et sur une gélose spécifique des coliformes (TTC-tergitol) sont réalisés. Des mesures de COT, pH, phosphates et nitrates sont également effectués à T₀ et à T₈.

VI.2.1.2 Résultats

L'eau enrichie a été caractérisée vis-à-vis des teneurs en P et C (Tableau VI.1). Le rapport C/P du milieu est de l'ordre de 17. Ainsi, la teneur en P est nettement excédentaire et environ 20 fois supérieure au besoin théorique estimé par un C/P de 333 en considérant :

- une formule générale pour les bactéries de C₅H₇O₂NP_{0,03}.
- une consommation de 20% du carbone pour les synthèses bactériennes et 80% pour la respiration, soit un rendement en carbone de 0,2.
- une consommation de 100% du P pour les synthèses bactériennes soit un rendement en phosphore de 1.

Tableau VI.1 : Caractéristiques physico-chimiques de l'eau initiale (avant enrichissement en carbone et phosphates) et en fin d'expérience (n=1).

	Unités	E. coli	C. freundii	E. cloacae	K. pneumoniae
pH initial			7.65		
COT initial	mg C L ⁻¹		1,77±0.01		
Phosphate initial	µg P-PO ₄ L ⁻¹		36		
Phosphate final	µg P-PO ₄ L ⁻¹	290	258	274	290

Les 4 souches de coliformes, placées dans des conditions identiques, dans de l'eau de distribution stérilisée, montrent des comportements différents (Figure VI.1).

Citrobacter freundii se maintient lors des 2 premiers jours avec une légère tendance à une perte de cultivabilité de 0,5 log en 2 jours. Puis, il s'adapte et le nombre de bactéries cultivables augmente de plus de 2 log entre T=2 jours et T=8 jours.

La cultivabilité de *Enterobacter cloacae* diminue sensiblement lors des 2 premiers jours, perdant 2 log en 2 jours. Cependant, la souche se maintient par la suite vers 10 bactéries mL⁻¹.

Klebsiella pneumoniae présente un comportement proche de celui de *Enterobacter cloacae*, mais avec une perte de cultivabilité plus importante qui atteint près de 3 log en 2 jours. *Klebsiella pneumoniae* atteint la limite de détection (1 bactérie/100 mL) après 8 jours de suivi.

Enfin, *Escherichia coli* subit la plus forte diminution de cultivabilité et atteint la limite de détection dès le deuxième jour, soit une perte de cultivabilité de plus de 4 log en 2 jours.

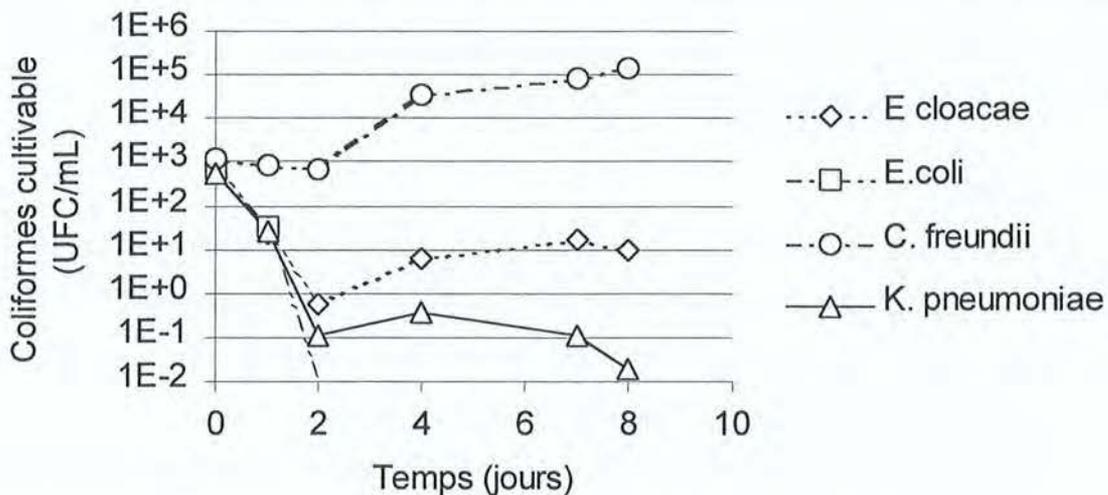


Figure VI.1 : Survie des coliformes pendant 8 jours dans de l'eau de distribution stérilisée enrichie avec des acides aminés et des phosphates. Bactéries cultivables sur un milieu spécifique des coliformes contenant du TTC-Tergitol, après incubation pendant 24h à 37°C. Limite de détection 10²/mL.

VI.2.1.3 Discussion préliminaire sur le choix des souches

Les quatre souches testées présentent un comportement différent. Seul *Citrobacter freundii* se multiplie dans les conditions expérimentales choisies. La cultivabilité des trois autres espèces diminue de manière importante dès les premiers jours.

Par ailleurs, les observations reportées dans la littérature soulignent que ces espèces de coliformes ne sont pas rencontrées avec la même fréquence dans les échantillons d'eau de distribution, selon l'origine de l'eau (van der Kooij, 1997). Notamment, van der Kooij montre que *Citrobacter freundii* est l'espèce la plus fréquente dans les eaux potables d'origine souterraine.

Klebsiella pneumoniae et *Escherichia coli* présentent des cinétiques de survie courte, ce qui limite leur utilisation pour tester l'effet des phosphates. Cependant, *Escherichia coli* est une espèce régulièrement isolée aussi bien dans les eaux potables d'origine souterraine que superficielle. Par ailleurs, la plupart des travaux reportés dans la littérature sur les phosphates ont été entrepris avec cette espèce.

Finalement, pour la suite des essais, deux souches ont été sélectionnées : d'une part *Citrobacter freundii* pour sa très forte survie dans l'essai préliminaire et d'autre part *Escherichia coli* pour sa survie au contraire très faible, dans les conditions testées et pour bénéficier des données scientifiques publiées concernant cette espèce.

VI.2.2 Influence de la concentration en phosphates de l'eau de distribution sur la survie de *Citrobacter freundii* et *Escherichia coli* en conditions statiques

Les essais présentés ici ont pour but de déterminer (i) si une augmentation de la concentration en phosphates dans l'eau potable pouvait favoriser la survie des coliformes, (ii) si les phosphates peuvent avoir un effet-dose sur la survie des coliformes.

VI.2.2.1 Protocole

Pour chacun des essais, le même protocole a été suivi.

Quinze litres d'eau de distribution sont filtrés sur filtre de porosité 0,8 µm afin de limiter les protozoaires, prédateurs des bactéries.

L'eau est placée dans une bonbonne de 20 litres (Nalgène, réf. 2321-0050) et du thiosulfate de sodium stérilisé par filtration sur 0,22 µm est ajouté stochiométriquement pour neutraliser le chlore présent.

Après 15 min d'agitation à l'aide d'un barreau magnétique, l'eau est répartie dans des flacons en verre brun, à raison de 2 litres par flacon. Les bactéries cultivables sur géloses R2A et TTC-Tergitol, les teneurs en phosphate et en carbone (COT) sont mesurés avant l'inoculation en *Citrobacter freundii* ou en *Escherichia coli* et l'enrichissement en phosphate.

La suspension initiale en *Citrobacter freundii* ou *Escherichia coli* est préparée comme décrit dans le Chapitre III (Matériel et Méthodes). Les coliformes présents dans cette suspension sont dénombrés par un marquage au DAPI et l'eau de distribution est inoculée de manière à obtenir de l'ordre de 10^3 coliformes mL^{-1} en concentration finale.

Les flacons sont ensuite enrichis en phosphates avec des concentrations théoriques de

- 0, 3, 17, 33 et 333 $\mu\text{g P-PO}_4 \text{L}^{-1}$ en présence de *Citrobacter freundii*
- 0, 5, 25, 50 et 500 $\mu\text{g P-PO}_4 \text{L}^{-1}$ en présence de *Escherichia coli*

Les flacons préparés ainsi sont incubés à $22 (\pm 2)^\circ\text{C}$, sans agitation. Cinq prélèvements répartis sur 8 à 9 jours sont réalisés. Des dénombrements des bactéries par marquage au DAPI, des bactéries cultivables sur une gélose non spécifique (R2A) et sur une gélose sélective (TTC-tergitol) ainsi que des mesures de COT, pH, phosphate et nitrate sont réalisées sur ces prélèvements. Les expériences en présence de *Citrobacter freundii* ou *Escherichia coli* ont été renouvelées 2 fois, les cinétiques obtenues présentaient des tendances similaires.

VI.2.2.2 Caractéristiques des eaux

Au cours des essais en présence de *Citrobacter freundii* et de *Escherichia coli*, la teneur initiale en phosphate est inférieure à la limite de détection de $3 \mu\text{g P L}^{-1}$ (Tableau VI.2). Par ailleurs, ces essais ont été réalisés en présence des populations autochtones des eaux. Les eaux utilisées contenaient de l'ordre de 10^5 cellules bactériennes mL^{-1} . De plus, pendant les essais en présence de *Citrobacter freundii*, les eaux utilisées contenaient environ 40 UFC mL^{-1} sur gélose R2A, tandis que dans les essais en présence de *Escherichia coli*, les eaux contenaient environ 5 UFC mL^{-1} sur gélose R2A.

Après ensemencement avec *Citrobacter freundii*, les échantillons contiennent $4,59 \cdot 10^2$ *C. freundii* cultivables mL^{-1} et $1,99 \cdot 10^3$ *C. freundii* cultivables mL^{-1} sur gélose au TTC-Tergitol, et on dénombre $7,39 \cdot 10^2$ UFC mL^{-1} et $1,85 \cdot 10^3$ UFC mL^{-1} sur gélose R2A, respectivement dans les essais n°1 et n°2.

Après ensemencement avec *Escherichia coli*, les eaux contenaient $7 \cdot 10^2$ *E. coli* cultivables mL^{-1} et $1,4 \cdot 10^3$ *E. coli* cultivables mL^{-1} sur gélose TTC-tergitol, tandis que sur gélose R2A $8,73 \cdot 10^2$ UFC mL^{-1} et $1,18 \cdot 10^3$ UFC mL^{-1} étaient dénombrés, respectivement dans les essais n°1 et n°2.

Tableau VI.2 : Caractéristiques physico-chimiques et microbiologiques des eaux utilisées pour les 2 types d'essais (les nombres entre parenthèses indiquent les limites de l'intervalle de confiance à 95% ou les écarts-types).

	Avec <i>Citrobacter freundii</i>		Avec <i>Escherichia coli</i>	
	Essai n°1	Essai n°2	Essai n°1	Essai n°2
pH (n=1)	7,57 ± 0,01	7,90 ± 0,01	7,37 ± 0,01	7,70 ± 0,01
COT (n=3) mg C L ⁻¹	1,78 ± 0,08	2,00 ± 0,05	1,52 ± 0,08	1,61 ± 0,05
Nitrates (n=1) mg N-NO ₃ L ⁻¹	1,24	1,83	1,64	1,31
Phosphates (n=1) µg P-PO ₄ L ⁻¹	<3	<3	<3	<3
Nombre total de bactéries Cellules mL ⁻¹ (Avant ajout de coliformes) (n=1)	5,44×10 ⁴ (± 1,65×10 ⁴)	6,46×10 ⁴ (±2,61×10 ⁴)	1,10×10 ⁵ (± 0,26×10 ⁵)	8,90×10 ⁴ (±1,57×10 ⁴)
Bactéries cultivables sur R2A (7j, 22 °C) (UFC mL ⁻¹) (Avant ajout de coliformes) (n=1)	32 (19-42)	39 (27-54)	8 (2-15)	3 (1 - 8)
Bactéries cultivables sur gélose R2A (7j, 22 °C) (UFC mL ⁻¹) (Après ajout de coliformes) (n=1)	7,39×10 ² (5,8×10 ² - 9,3×10 ²)	1,85×10 ³ (1×10 ³ - 2,9×10 ³)	8,73 ×10 ² (6,6×10 ² - 1,05×10 ³)	1,18×10 ² (5×10 ² -2×10 ³)
Bactéries cultivables sur gélose TTC-tergitol (24h, 37 °C) (UFC mL ⁻¹) (Après ajout de coliformes) (n=1)	4,59×10 ² (3,1×10 ² -6×10 ²)	1,99×10 ³ (1×10 ³ - 2,9×10 ³)	7×10 ² (1×10 ² -1,4×10 ³)	1,4×10 ³ (1,3×10 ³ - 1,4×10 ³)

VI.2.2.3 Résultats

Les résultats bruts sont présentés en annexes dans les tableaux IX.47 à IX.52.

La cultivabilité de *Citrobacter freundii* et de *Escherichia coli* sur une gélose spécifique (TTC-Tergitol) est altérée en eau de distribution, que ce soit en présence ou non de phosphates ajoutés : le nombre de bactéries cultivables diminue tout au long de l'essai, toutes concentrations en phosphates confondues, (Figure VI.2). La dose de phosphates ajoutée influence la survie de *Citrobacter freundii* et de *Escherichia coli*. Dès l'ajout de quelques microgrammes de phosphates (de l'ordre de 3 µg P-PO₄ L⁻¹), la cultivabilité de *Citrobacter freundii* après 9 jours de suivi est 3 fois plus importante que celle du témoin lors de l'expérience 2 (Figure VI.3).

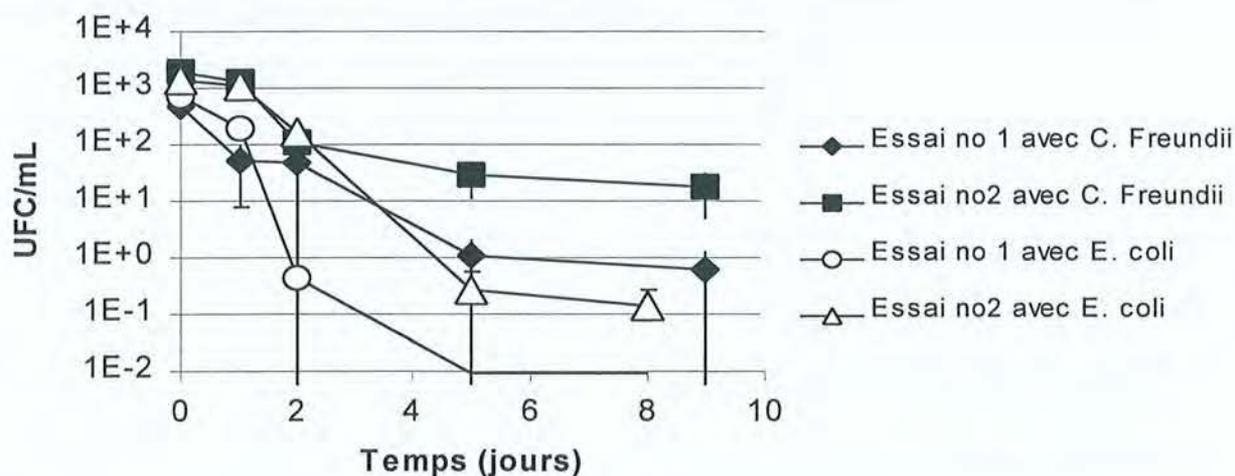


Figure VI.2 : Évolution des bactéries cultivables pendant les expériences en présence de *Citrobacter freundii* et *Escherichia coli*, en conditions statiques à 22°C dans de l'eau de distribution, toutes teneurs en phosphates ajoutés confondues. Mesure sur gélose TTC-Tergitol, à 37°C pendant 24h.

Lorsqu'une dose théorique de phosphates de 333 $\mu\text{g P-PO}_4 \text{L}^{-1}$ est ajoutée, la survie est de 7 à 260 fois plus importante (0,6 log à 2,4 log de différence après 9 jours entre le témoin et le flacon enrichi à 333 $\mu\text{gP/L}$). Cependant il n'existe pas une tendance linéaire d'augmentation de la cultivabilité de *Citrobacter freundii* en fonction de la dose de phosphate ajoutée.

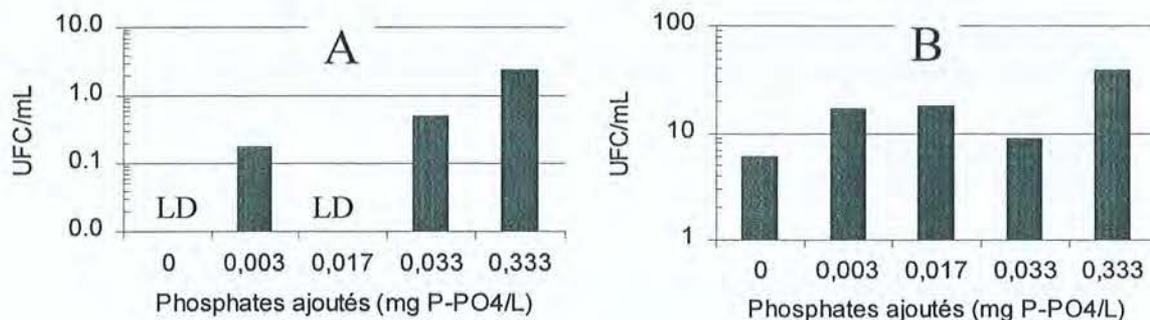


Figure VI.3 : Teneur en *Citrobacter freundii* cultivables après 9 jours à 22°C dans de l'eau de distribution, en fonction de la dose de phosphate ajoutée. A : Expérience n°1 ; B : Expérience n°2. (LD : inférieur à la limite de détection).

Lors de l'essai n°1, la survie de *Escherichia coli* a été affectée rapidement et au 5^{ème} jour de suivi, la limite de détection des coliformes était atteinte quelle que soit la dose de phosphates appliquée. Cependant, la dose de phosphates ajoutée influence la survie de *Escherichia coli*, dès l'ajout de quelques microgrammes de phosphates (5 $\mu\text{g P-PO}_4 \text{L}^{-1}$), la cultivabilité de cette souche après 2 jours de cinétique est 18 fois plus importante (Figure VI.4, graphe A).

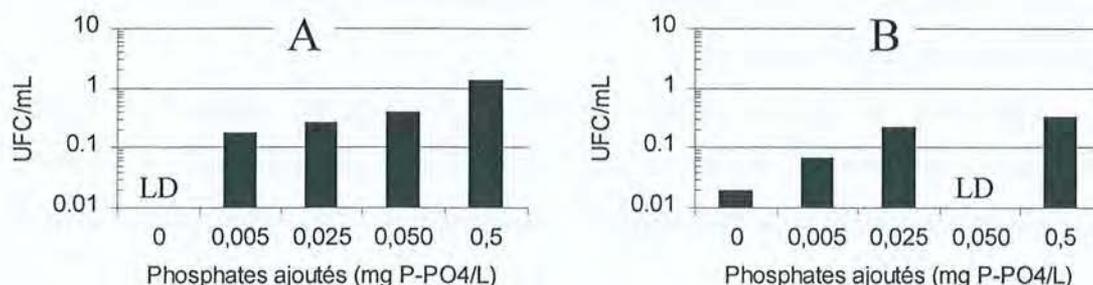


Figure VI.4 : *Escherichia coli* cultivable après 2 jours (Essai n°1 : A) ou 8 jours (Essai n°2 : B) à 22°C, dans de l'eau de distribution, en fonction de la dose de phosphate ajoutée (Concentration initiale inférieure à la limite de détection). (LD : inférieur à la Limite de détection).

Au cours de l'essai n°2, la survie de *Escherichia coli* a été plus prolongée et après 8 jours de suivi, la cultivabilité était 4 fois supérieure lorsque 5 µg P-PO₄ L⁻¹ étaient ajoutés. Dans l'échantillon d'eau enrichie en phosphate à 500 µg P-PO₄ L⁻¹, les concentrations en *Escherichia coli* cultivables après 2 jours (essai n°1) ou 8 jours de cinétique (essai n°2) sont supérieures de 2,1 et 1,2 log respectivement, par rapport à la survie des *E. coli* dans l'échantillon d'eau non enrichie.

Précédemment, les mesures globales de populations n'ont pas montré d'effet des phosphates sur les populations en absence de désinfectants et de corrosion. Ici, le suivi de sous-population particulière a mis en évidence un effet des phosphates sur le maintien de la cultivabilité de ces populations.

VI.3 Effet de l'ajout de phosphates en conditions dynamique sur l'implantation d'une sous-population de coliformes cultivables injectée massivement

Les essais précédents ont montré que les phosphates peuvent favoriser la survie des coliformes en conditions statiques. Dans les essais suivants, le comportement des coliformes libres, en présence d'un biofilm et dans des conditions dynamiques a été testé. Les coliformes ont été suivies en sortie de pilotes par des mesures de cultivabilité sur des géloses spécifiques. Ces essais visent à déterminer si l'ajout de phosphates peut faciliter la survie des coliformes en conditions dynamiques ou même conduire à leur implantation dans l'écosystème.

VI.3.1 Protocole

Les essais ont été réalisés à partir de l'eau de réseau de Montréal (Chapitre III) sur des pilotes de type RotoTorqueTM (Chapitre III). Afin de tester l'effet des phosphates sur l'évolution des concentrations en coliformes, les quatre pilotes RotoTorqueTM sont colonisés pendant 63 jours par les bactéries autochtones des eaux, puis deux des pilotes sont traités avec des

phosphates jusqu'à la fin des essais. Les coliformes sont injectés dans les 4 pilotes, 28 jours après le début de la phosphatation.

L'inoculum est préparé comme décrit au Chapitre III (matériel et méthodes). Vingt millilitres à environ 10^9 Bactéries mL^{-1} (dénombrées par marquage au DAPI) servent à ensemercer chaque réacteur RotoTorque™, pour atteindre de l'ordre de 10^7 coliformes mL^{-1} en concentration finale.

Les pilotes sont laissés arbitrairement pendant 1 heure sans alimentation afin de permettre une répartition homogène des coliformes dans les réacteurs. Puis, l'alimentation est remise en fonction et un échantillon (T=0) est prélevé au niveau de la sortie. Le suivi de l'évolution des concentrations en coliformes en sortie des pilotes est effectué pendant 5 jours.

Avant et après l'ajout de coliformes, des prélèvements en entrée et en sortie des pilotes sont effectués et des dénombrements de bactéries par marquage au DAPI, de bactéries cultivables ainsi que des mesures de COT, pH et phosphates sont réalisés sur ces prélèvements.

VI.3.2 Caractéristiques des eaux

Le suivi des coliformes est effectué sur deux géloses sélectives (mEndo et mT7). Les caractéristiques des eaux utilisées sont reportées dans le tableau VI.2.

Les écarts de concentrations (en entrée comme en sortie) entre les réacteurs témoins et traités aux phosphates sont faibles et attribuables à l'erreur sur la mesure. Globalement, ces eaux de pH 7,5 contenait près de $2,5 \text{ mg C L}^{-1}$ (COT) et moins de $10 \mu\text{g P L}^{-1}$ avant l'ajout de phosphates. La teneur en phosphates en sortie des pilotes traités aux phosphates est de $0,53 \text{ g P L}^{-1}$. L'injection de *Citrobacter freundii* engendre une forte augmentation initiale du nombre de bactéries libres, les eaux contenant de l'ordre de 10^6 cellules mL^{-1} initialement et l'ajout de coliformes représentant 10^7 coliformes cultivables mL^{-1} .

Tableau VI.2 : Caractéristiques physico-chimiques et microbiologiques des eaux utilisées au cours de l'expérience n°2 d'injection de *Citrobacter freundii* dans des pilotes RotoTorque™ en phase de traitement avec des phosphates. n= nombre de campagne d'échantillonnage. (nombre entre parenthèse = écart-type).

Paramètres	Unités	Témoins	Phosphates
pH entrée(n=2)	-	7,53 (±0,05)	7,53 (±0,05)
PH sortie (n=2)	-	7,53 (±0,03)	7,54 (±0,03)
COT entrées (n=2)	mg C L ⁻¹	2,61 (±0,06)	2,55 (±0,03)
COT sorties (n=2)	mg C L ⁻¹	2,50 (±0,07)	2,42 (±0,11)
Nitrates	mg N-NO ₃ L ⁻¹	ND	ND
Phosphates entrée (n=1)	µg P-PO ₄ L ⁻¹	<10	<10
Phosphates sortie(n=1)	µg P-PO ₄ L ⁻¹	<10	0,53 (±0,01)
Nombre total de bactéries au DAPI (Avant ajout de coliformes)			
Entrées (n=1)	Cellules mL ⁻¹	1.00 (± 0.03) 10 ⁶	9.15 (±0.88) 10 ⁵
Sorties (n=1)		7.31(±0.24) 10 ⁵	8.82 (±0.71) 10 ⁵
Bactéries cultivables sur R2A (Avant ajout de coliformes)			
Entrées (n=1)	UFC mL ⁻¹	4.05 (±2.26) 10 ⁴	4.55 (±0.35) 10 ⁴
Sorties (n=1)		3.18 (±0.88) 10 ⁴	2.65 (±0.35) 10 ⁴
Bactéries cultivables sur gélose R2A (Après ajout de coliformes) (n=1)	UFC mL ⁻¹	ND	ND
Bactéries cultivables sur gélose mT7 (Après ajout de coliformes) (n=1)			
Entrée	UFC mL ⁻¹	<1/100mL	<1/100mL
Sortie		9.12 (±2.36) 10 ⁶	1.13 (±0.06) 10 ⁷

ND : non déterminé

VI.3.3 Résultats

VI.3.3.1 Comparaison de deux géloses pour la récupération de *Citrobacter freundii*

Deux géloses, mT7 et mEndo, ont été utilisées pour comparer le taux de récupération de coliformes. La gélose mT7 est supposée favoriser la récupération de bactéries stressées tandis que mEndo est une gélose classiquement utilisée en Amérique du Nord, pour la récupération des coliformes (LeChevallier et McFeters, 1985 ; LeChevallier *et al.*, 1996). Les concentrations en coliformes cultivables sur les deux géloses en sortie des pilotes évoluent selon la tendance présentée Figure IV.5. Au cours de l'essai présenté ici, dans l'ensemble des réacteurs, les coliformes ont été injectés à des concentrations de 2×10^7 coliformes mL⁻¹, telles qu'estimées par marquage au DAPI. Par la suite, l'évolution des dénombrements bactériens sur mEndo et mT7 est biphasique. Les concentrations diminuent régulièrement pendant les 20 premières heures, plus vite que si les bactéries subissaient uniquement un lessivage. Les coliformes cultivables atteignent de l'ordre de $19 (\pm 9)$ UFC mL⁻¹ sur gélose mT7 et $3 (\pm 1)$ UF mL⁻¹ sur gélose mEndo. La gélose mT7 permet de détecter environ 6 fois plus de *Citrobacter freundii* 20 heures après l'injection des coliformes dans les réacteurs. Puis, les concentrations en coliformes cultivables diminuent plus lentement, moins vite que si les bactéries subissaient uniquement un lessivage. À

T=40 heures, les densités de coliformes détectées par les géloses mT7 et mEndo sont équivalentes, atteignant 3 (±2) UFC/10mL. À T=115 heures, les concentrations en coliformes cultivables sont inférieures aux limites de détection (1 coliformes cultivable/100mL) quelle que soit la gélose utilisée.

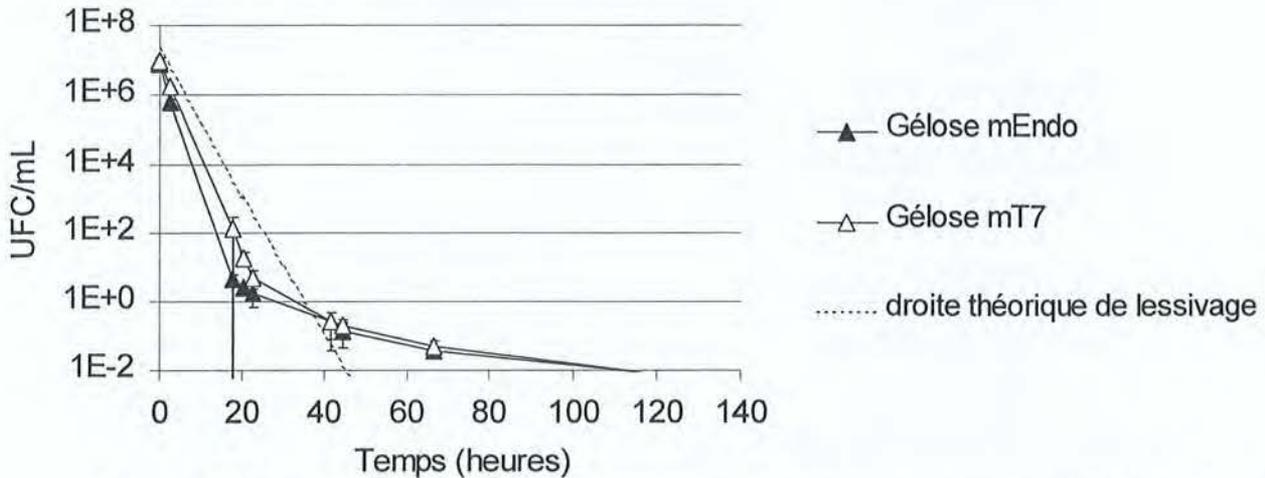


Figure VI.5 : Évolution en fonction du temps des concentrations moyennes en *Citrobacter freundii* Cultivables sur gélose mT7 (ronds vides) ou mEndo (ronds pleins) en sortie des pilotes.

La gélose mT7 présente parfois des dénombrements supérieurs à ceux sur mEndo sans que cela n'engendre une différence statistique entre les deux méthodes de dénombrements; À partir de l'ensemble des mesures effectuées (n=76), il apparaît que les deux géloses donnent des résultats statistiquement équivalents (p=0,62). La corrélation entre les résultats, passant par zéro, présente une pente proche de 1 :

$$UFC_{mEndo} = 0,94 UFC_{mT7} \quad r^2 = 0,98$$

VI.3.3.2 Suivi de *Citrobacter freundii* en sortie de pilotes traités ou non aux phosphates

L'effet du traitement aux phosphates sur l'évolution des densités de *Citrobacter freundii* cultivables en sortie des pilotes est présenté uniquement avec la gélose mT7 (Figure IV.7). Les tendances observées avec la gélose mEndo sont similaires. La présence de phosphates en concentration plus importante dans l'eau n'engendre pas de différence significative (p=0,3) entre les réacteurs témoins et traités aux phosphates, en terme de concentrations en *Citrobacter freundii* cultivables dans l'eau en sortie.

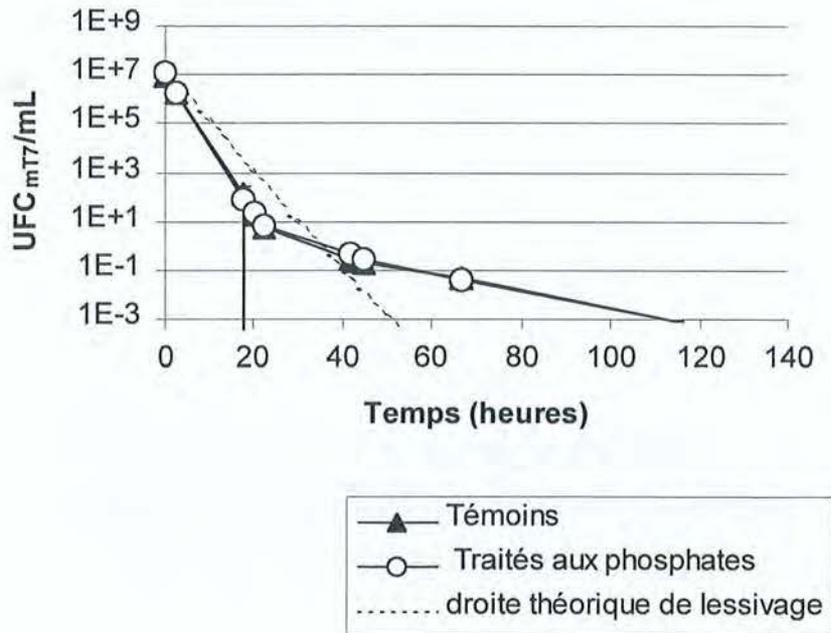


Figure VI.6 : Évolution en fonction du temps des concentrations moyennes en *Citrobacter freundii* Cultivables sur gélose mT7 en sortie des pilotes témoins et des pilotes traités aux phosphates.

VI.4 Influence of phosphate and disinfection on the phylogenic composition of drinking water biofilms as measured by in situ hybridization (FISH)

Les essais précédents ont présenté les effets des phosphates dans les eaux potables sur la survie de coliformes utilisés comme sous-population. Cependant, ces essais ont nécessité l'injection des coliformes dans les eaux potables. Ici, les travaux présentés ont été réalisés directement sur les populations autochtones des eaux potables. La méthode FISH a été employée afin d'étudier les effets des phosphates sur la composition taxonomique des populations.

Ce chapitre est présenté sous la forme d'une publication qui a été soumise à la revue *Applied and Environmental Microbiology* sous le titre « Influence of phosphate and disinfection on the phylogenic composition of biofilm measured by in situ hybridization (FISH) »

**Influence of phosphate and disinfection on the
phylogenic composition of drinking water biofilms as
measured by in situ hybridization (FISH)**

M. Batté*, **, L. Mathieu**⁽¹⁾, M. Prévost*

** NSERC Industrial Chair on Drinking Water, École Polytechnique de
Montréal, CP 6079, Succ Centre Ville, Montréal (Qc) H3C 3A7 Canada.*

*** Laboratoire d'Hydroclimatologie, Santé Environnementale de l'EPHE
-INSERM U420, 9 avenue de la Forêt de Haye, Faculté de médecine, BP184,
54 505 Vandoeuvre-lès-Nancy, France.*

⁽¹⁾corresponding author.

Tel: 0-11-33-383-592-763

Email: lmathieu@medecine.u-nancy.fr

ABSTRACT

Drinking water biofilms were studied with fluorescent in situ hybridization in order to evaluate biofilm changes with aging and during disinfection or phosphation treatments. Biofilm presents a steady-state composition from 50 days to 113 days of colonization. About 60% of the total direct counts with DAPI were also detected with EUB338, and among those cells 16-25% were targeted with BET42a, <2% to 20% with ALF1b and <2% with GAM42a. Phosphate treatment induces a significant enhancement of the proportion of *γ-Proteobacteria* detected with the GAM42a probe, a group which contains bacteria of concern to health. Disinfections with monochloramine for 1 month or chlorine for 3 days induce a large reduction in EUB338-hybridizing bacteria detected with ALF1b, BET42a and GAM42a. They reach together less than 20% of the EUB-hybridized cells. Chlorination for 7 days induces a reverse shift, with most of the EUB-hybridized cells detected with those 3 probes (>80%). The suspended population was mainly composed of *β-Proteobacteria* before and after contact with the biofilm. This might suggest that the composition of the suspended population was not influenced by passage through the bioreactor with a 2-hour contact time.

1-INTRODUCTION

Maintaining the quality of drinking water, from the treatment plant to the consumer's tap, is a major challenge achieved by limiting nutrient or by adding disinfectants such as chlorine or monochloramine to the water to control bacterial growth in the distribution system (31, 32, 33, 37, 45, 57). The chemical quality of drinking water may also be maintained by limiting corrosion through the addition of phosphate (1, 2, 26, 34, 35, 48, 59). However, phosphate addition can influence the growth of bacteria given the low concentration of phosphate in drinking waters (generally less than $20\mu\text{g P L}^{-1}$) and the fact that inorganic phosphate is an essential nutrient for bacteria (39, 50).

To study bacterial growth, most of the studies, carried out on either fixed or suspended bacterial populations, have involved the use of global methods, such as culturability or total direct counts. However, bacteriological quality in drinking water is dependent on the species found in those populations. For example, it may be more expected to limit opportunistic pathogens than environmental bacteria, which are not related to public health. A few studies based on cultivation techniques have looked at the composition of suspended populations in

drinking water, and even fewer have studied biofilm composition (8, 47, 44). Unfortunately, since most of the bacteria are not culturable in drinking water (27), about 1% of the total population of bacteria may be characterized that way. Furthermore, agar culture introduces a selection bias in favor of the α - and γ -*Proteobacteria* phylogenetic groups to the detriment of β -*Proteobacteria* (60), even though these latter bacteria form the major part of the drinking water population (28). Therefore, the results and conclusions may be influenced by the choice of the method used to study bacterial populations.

The main objective of this study is to investigate the impact of phosphates, chlorine and chloramine on the phylogenetic composition of fixed bacteria and their effect on suspended bacterial populations in a model drinking water system. The underlying hypothesis is that small but significant enhancements of some phylogenetic components of the population may have a significant impact on water quality and compliance.

Fluorescent in situ hybridization (FISH) has been evaluated here to detect shifts in bacterial drinking water populations. FISH is a method used to target specific phylogenetic bacterial groups and to estimate their relative distribution (3). The method does not involve cultivation, thus avoiding the selection bias (60), and usually targets some specific region of ribosomal RNA (rRNA). These molecules, present in large quantities in bacteria (20), contain synthetic information on the identity of the bacteria, in terms of class, family or species.

2-MATERIALS AND METHODS

Feed water enrichment with a carbon solution

Tap water for the City of Montreal is produced from St Lawrence River water (Table 1). This tap water was used to supply the pilot following a 20-hour storage to deplete the chlorine residual.

Biodegradable dissolved organic carbon (BDOC) ranged from 0.2 to 0.3 mg C L⁻¹. In order to enhance bacterial colonization in the reactors, the dechlorinated tap water was enriched with a solution containing the mixture of bioavailable organic components that are not reactive to chlorine (9).

The sterilized stock solution contained a total carbon concentration of 20 mg C L⁻¹, obtained with ethyl alcohol at 94%; and propionaldehyde, parahydroxybenzoic acid, benzoic acid and acetate, added at equimolar carbon concentrations. The stock solution was prepared weekly with ultrapure water (Ref. MilliQ-UV plus, Millipore) and autoclaved at 121°C for 20 minutes. A continuous-flow dilution was made up in a mixing bottle supplied with 32 mL min⁻¹

of dechlorinated tap water and 0.3 mL min^{-1} of carbon stock solution. The dechlorinated tap water sent to the inlet of the pilots contained an additional approximately $250 \mu\text{g C L}^{-1}$ of bioavailable carbon.

Table 1: Physico-chemical characteristics of the drinking water used (Montreal, Canada).

Parameters	Mean (min-max)	Units	n
Temperature	11 (1-23)	°C	223
Turbidity	0.23 (0.08-1.26)	UTN	334
Alkalinity	83 (76-87)	mg $\text{CaCO}_3\text{-eq L}^{-1}$	53
Total hardness	117 (109-125)	mg $\text{CaCO}_3\text{-eq L}^{-1}$	53
Oxygen demand	1.0 (0.6-1.6)	mg $\text{KMnO}_4\text{ L}^{-1}$	47
Dissolved organic carbon	2.42 (2.00-3.51)	mg C L^{-1}	232
pH	7.84 (7.58-8.21)	-	331
Total Iron	0.018 (0.005-0.046)	mg Fe L^{-1}	24
Chlorides	21 (18-22)	mg L^{-1}	53
Conductivity	290 (270-310)	$\mu\text{S cm}^{-1}$	365

n: number of measurements

Phosphate solution

The phosphate solution was prepared in autoclaved ultrapure water, by diluting a commercial product (AquaMag ($\text{Na}_{56}\text{H}_3\text{P}_{57}\text{O}_{147}$), Kjell Inc, Canada) containing 2/3 polyphosphate and 1/3 orthophosphate (w/w of phosphorus). The solution containing 11 mgP L^{-1} was stored in a brown glass bottle and renewed weekly. Storage and dilution did not affect the 2/3 polyphosphate ratio in the solution, as tested with a phosphate solution through orthophosphate and polyphosphate analysis over a period of more than 2 weeks (data not shown). A continuous-flow dilution was made up directly in the annular reactor fed with 32 mL min^{-1} of dechlorinated, carbon-enriched water and 0.3 mL min^{-1} of phosphate stock solution. The effluent water contained an additional approximately 0.5 mg P L^{-1} of total phosphate.

Phosphate measurements

The concentration of phosphate in liquid phase was obtained by colorimetry, and measurements were taken on the day of sampling. Polyphosphates were hydrolyzed to orthophosphate by the persulphate digestion method (APHA, 1998) prior to analysis. Orthophosphate concentrations were determined by the ascorbic acid method with a detection limit of approximately $50 \mu\text{g P L}^{-1}$ with a light path of 1.9 cm (APHA, 1998). Absorbency was measured at 880 nm on a spectrophotometer (MiltonRoy, Spectronic 1001plus, New York, USA). All results were expressed as milligrams of P-PO_4 per liter.

Chlorine and monochloramine solutions

The chlorine solutions were prepared in ultrapure water, from a commercial solution of bleach. The monochloramine solution used was prepared continuously by an equimolar Cl_2/N reaction (mass ratio of 5/1), mixing chlorine and ammonium chloride solutions for 30 minutes. Monochloramine formation was controlled and the mixture was injected at 0.3 mL min^{-1} directly into the reactors. Residuals were measured at the reactor outlets. Chlorine and monochloramine were dosed by the DPD colorimetric method (4). The detection limit of monochloramine is approximately $0.01 \text{ mg Cl}_2 \text{ L}^{-1}$. Absorbance was measured at 515 nm on a spectrophotometer (MiltonRoy, Spectronic 1001plus, Rochester, New York, USA).

Biofilm sampling and conditioning prior to analysis

A polycarbonate slide colonized by biofilm was sampled from a reactor and placed in a multivessel slide-holder designed to accommodate two slides (6). For each slide, ten identical vessels delimiting identical biofilm surfaces (1.2 cm^2) allowed simultaneous measurements to be performed.

Three methods were used to characterize the biofilm: i) cultivation (HPC), ii) total direct count (TDC), and iii) fluorescent in situ hybridization (FISH). The biofilm was suspended by sonication (2W, 2 minutes) (ultrasonic processor, Cole Palmer, Canada) in $0.2\text{-}\mu\text{m}$ -filtrated tap water. Sonication parameters (power and time of exposure) were optimized in order to reach the maximal TDC and HPC (data not shown).

Heterotrophic plate counts (HPCs)

HPC (CFU per cm^2) were performed on R2A agar plates (ref. 1826-17-1, Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA), which were incubated for 7 days at $22 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$.

Total Direct Counts (TDCs)

The total number of bacteria (cells cm^{-2}) was determined by DAPI staining, as proposed by Saby *et al.* (49), with the modification that the reagent triton x100 was not used. Duplicate samples were taken from two different vessels of the multivessel system, and counts were performed on an epifluorescence microscope (ref. BX60; Olympus) equipped with a x100 objective and a set of filters for DAPI (Ref. U-MWU, Olympus: Dichroic Mirror 400 nm, BandPass 330-385 nm and Barrier 420 nm).

FISH Procedure

By targeting rRNAs with oligonucleotidic probes labeled with a fluorochrome, bacteria can be detected even if they are not culturable. Cells are fixed in order to limit the biochemical reactions in the cells. In many cases, the fixed cells are permeable to short oligonucleotidic probes (3, 21). However, a preventive permeabilization is generally carried out with ethanol, methanol, enzymes, etc. (15, 7).

The hybridization conditions must be well defined in order to permit good hybridization with the target without matching errors. These conditions are established by adding products to the hybridization solution: formamide, NaCl, SDS and tris-HCl. The conditions for matching are fixed by the concentration of formamide in the sample (42). Formamide generates the same phenomena as temperature, by permitting the linearization of the RNA strand and the formation of double strands between the probe and the target region of the rRNA (42). NaCl reduces the electrostatic repulsions between target and probe (56). SDS limits the non-specific fixation of the probes and thus limits the background. Tris-HCl is also added in order to control the pH of the solution.

The universal bacterial probe EUB338 (5'-GCT GCC TCC CGT AGG AGT-3') was used to estimate the density of cells detected by FISH (3). To assess the phylogenetic composition of biofilm, FISH probes were applied to target three groups — α -, β - and γ -*Proteobacteria* — each with a specific probe (36):

- ALF1b (5'-CGT TCG YTC TGA GCC AG-3') for α -*Proteobacteria*
- BET42a (5'-GCC TTC CCA CTT CGT TT-3') for β -*Proteobacteria*,
- GAM42a (5'-GCC TTC CCA CAT CGT TT-3') for γ -*Proteobacteria*.

All probes were labeled with CY3 dye (Interactiva, Ulm, Germany. <http://www.interactiva.de/>).

Since probes BET42a and GAM42a differed only in one base pair, hybridization was performed with an unlabeled competitor, as described by Manz *et al.* (36); unlabeled probe BET42a (5ng/ μ L) was added for hybridizations with probe GAM42a, and unlabeled probe GAM42a (5ng/ μ L) was added for hybridization with probe BET42a.

Biofilm detached from the slides by sonication was collected by filtration onto a white polycarbonate membrane and fixed with paraformaldehyde at 4% (w/w) in PBS (pH 7.2) for 30 minutes at 4°C. The sample was rinsed with PBS, air-dried and stored at -20°C pending the hybridization procedure. Prior to hybridization, the filter was dehydrated with 200 μ L ethanol (50, 80 and 94° for 3 minutes each) in order to permeabilize the cellular membrane.

Hybridization was performed as suggested by Kalmbach (27). The hybridized filter was stained with DAPI (1 mL of a 0.05 $\mu\text{g mL}^{-1}$ DAPI solution) for 10 min, rinsed with autoclaved ultrapure water (Ref. MilliQ-UV plus, Millipore), air-dried and then mounted on a slide with an antifading solution (Citifluor AF1, Citifluor Ltd., London, UK). Cells were visualized by epifluorescence microscopy (BX60, Olympus) with green light for CY3 staining (ref. U-MWG, Olympus: Dichroic Mirror 570 nm, BandPass 510-550 nm and Barrier 590 nm) or UV light for DAPI staining (Ref. U-MWU, Olympus: Dichroic Mirror 400 nm, BandPass 330-385 nm and Barrier 420 nm).

Experimental set-up

Biofilm was settled on the surfaces of annular reactors. Annular reactors (11) are bench-scale systems, which, to a large degree, reproduce conditions observed in a drinking water system and facilitate the adjustment of operational parameters (pH, temperature, disinfectant, etc.). The annular reactors used in this study are composed of an internal drum and an external cylinder made of polycarbonate. The internal surface of the external cylinder is equipped with 12 polycarbonate slides to permit biofilm sampling. The internal drum can rotate within various speed ranges, inducing water circulation, creating a shear stress similar to that observed in pipes at the internal surface of the external cylinder. The mean hydraulic residence time was set to 2 hours by controlling the inlet flow rate. The rotational speed was set to 40 rpm in order to induce a shear stress similar to that of water flowing at 0.6 m s^{-1} through a 6-inch (15.24-cm) diameter pipe.

The reactors were supplied with carbon enriched, dechlorinated City of Montreal drinking water, to allow colonization for 49 to 113 days depending on the experiment. During periods of colonization, the evolution of the phylogenetic composition of the biofilm was monitored by sampling bi-weekly. To assess the impact of treatments on biofilm composition, four experiments (A, B, C and D) were performed (Table 2). Three treatments were tested: phosphate addition, chlorination and chloramination.

Table 2: Description of treatments.

Experiment	Age at T=0*	Treatment	Applied Dosage	Duration of treatment
A	63 days	Phosphate exposure	0.5 mg P-PO ₄ L ⁻¹	6 weeks
B	49 days	Chlorination	0.75 mg Cl ₂ L ⁻¹	1 week
C	113 days	Chlorination	1 mg Cl ₂ L ⁻¹	1 week
D	102 days	Monochloramination	0.6 or 1.9 mg NH ₂ Cl L ⁻¹	4 weeks

* Age of biofilm at the beginning of treatment

The effect of the age of the biofilm composition during disinfection was evaluated for the chlorine treatment. The impact of disinfectant dosage on biofilm composition was evaluated for

monochloramine treatment. To assess the impact of biofilm on drinking water composition, water at the inlet and outlet of the reactors was also sampled during colonization, phosphate and monochloramination treatments.

3-RESULTS

Evolution of the phylogenetic composition of tested biofilm

During experiments B, C and D, while colonization was taking place, the evolutions of biofilms from 61 to 102 days old (EXP. B), 42 to 56 days old (EXP. C) and 34 to 104 days old (EXP. D) were evaluated (Table 3). Less than 3% of TDC ($2.4\% \pm 1.3\%$) were culturable on R₂A agar, whereas 58-76% of TDC were detected with EUB338, meaning that the FISH probes allowed detection of 24 times more cells than cultivation (58% versus 2.4% of TDC). The biofilms detected with EUB338 contained few *γ-Proteobacteria* detected with GAM42a (<2%) and 16 to 25% of the *β-Proteobacteria* detected with BET42a. The populations of bacteria belonging to the *α-Proteobacteria* group presented a particular behavior during experiment B, in that they represented fewer than 2% of the global population, but reached 13 to 19% in experiments C and D.

Table 3: Composition of biofilms with TDC, HPC and in situ hybridization measurements during colonization.

	Exp. B	Exp. C	Exp. D
Age of biofilm (days)	42-56	61-113	34-104
Number of samples	5	5	6
TDC (Cells cm ⁻²)	$5.3 \cdot 10^6 (\pm 1.8 \cdot 10^6)$	$2.3 \cdot 10^7 (\pm 1.2 \cdot 10^7)$	$1.6 \cdot 10^7 (\pm 1.0 \cdot 10^7)$
HPC (CFU cm ⁻²)	ND	$3.6 \cdot 10^5 (\pm 1.3 \cdot 10^5)$	$3.8 \cdot 10^5 (\pm 3.9 \cdot 10^5)$
In Situ Hybridization*			
% EUB338/TDC	76 (± 4.2)	65 (± 6.1)	58 (± 5.6)
% ALF1b/ TDC	2 (± 1.2)	13 (± 4.5)	16 (± 6.4)
% BET42a/ TDC	22 (± 1.7)	25 (± 3.2)	19 (± 5.3)
% GAM42a/ TDC	0.4 (± 0.1)	1.1 (± 0.2)	1.8 (± 0.9)

*Expressed as percentages of TDC counts.

Effect of phosphates on the phylogenetic composition of a biofilm

Duplicates of 63-day-old biofilms were treated with 0.5 mg P L^{-1} over a 6-week period and sampled after 2, 4 and 6 weeks of treatment. Two other biofilms of the same age were monitored as controls over the 6-week period (Figure 1).

The TDC counts were around $2.5 \times 10^7 \text{ cells cm}^{-2}$ and there were no differences of TDC counts between the control and the phosphate-treated biofilms following the addition of the phosphate. Culturable bacteria accounted for fewer than 3% of the bacteria in the biofilms, whether in the presence of phosphate or not.

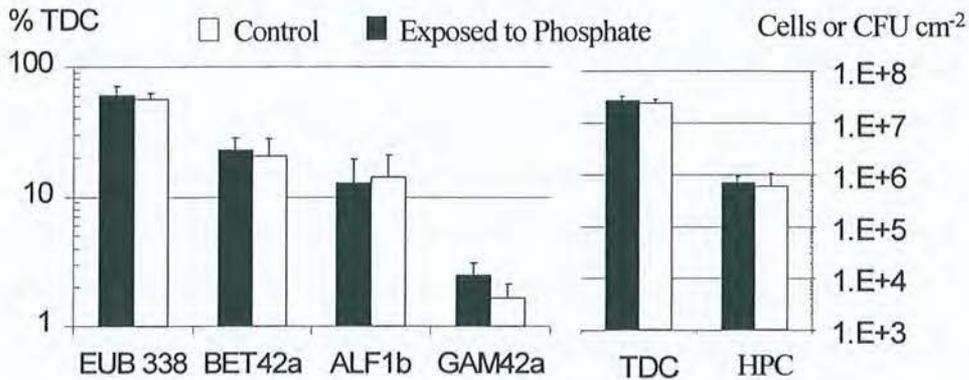


Figure 1: Effect of phosphate treatment. Composition and densities of biofilms grown on polycarbonate substratum. Measurement by FISH expressed as % hybridized cells/TDC. Black: biofilms exposed to phosphate (n=2). White: controls (n=2). Means of 3 sampling during the six weeks of phosphate treatment GAM42a difference between control and phosphate-treated biofilms is statistically significant ($p < 0.01$).

The addition of phosphate neither enhanced nor reduced global population detection by FISH with EUB338 ($p=0.81$). TDCs targeted by EUB338 were around 60% with or without phosphate treatment. Most of the subpopulations were similar prior to and following the start of phosphate addition ($p > 0.05$). The exception was the γ -*Proteobacteria* subpopulation which was significantly enhanced following phosphate treatment ($p=0.0006$). However, the biofilm is still dominated by other bacteria (β , α -*Proteobacteria* and non-identified bacteria), which represent 95% of the bacteria targeted by EUB338.

Effect of chlorine on the phylogenetic composition of a biofilm

Chlorination was performed continuously on a 49-day-old biofilm, by the application of $0.75 \text{ mg Cl}_2 \text{ L}^{-1}$ (experiment B) and on a 113-day-old biofilm by the application of $1 \text{ mg Cl}_2 \text{ L}^{-1}$ (experiment C).

TDC and EUB338 counts were dramatically reduced in the 49-day-old biofilm (Table 4). During the experiment B, after 1 week of disinfection, the TDC had dropped by an order of 2 log. Since, only 0.9% ($\pm 0.01\%$) of these TDC-cells could be detected with EUB338, it was not possible to determine the composition of the biofilm at T=1 week of disinfection.

After three days of chlorination, it was only possible to hybridize 4.6% ($\pm 0.1\%$) of the TDC-cells with EUB338. However, an attempt was made to monitor the composition of this population in terms of groups α -, β - and γ -*Proteobacteria*. However small the actual numbers become after chlorination, it was perceived that the examination of these results was still of value. The perception is founded on the fact that the detected bacteria are indicative of the viable population even more so than the very low numbers of detected HPCs. Because of the small proportion of the population labeled by the various probes in terms of TDC, the percentage contributions are expressed relative to the number of cells hybridized with EUB338 by considering this number as the maximum that could be achieved by a subpopulation (Table 4). Among the bacteria labeled with EUB338, 16% were identified as belonging to α -, β - and γ -*Proteobacteria*, whereas 84% of the EUB338-detected bacteria could not be labeled successfully.

Table 4: Evolution of biofilm composition during chlorination, measured by TDC, HPC and in situ hybridization.

	0.75 mg Cl ₂ L ⁻¹ applied on a 49-day-old biofilm			1 mg Cl ₂ L ⁻¹ applied on an 113-day-old biofilm		
	Before treatment	3 days of chlorination	7 days of chlorination	Before treatment	3 days of chlorination	7 days of chlorination
<i>TDC cells cm⁻²</i>	7.6 (± 0.1) 10 ⁶	2.0 (± 0.001) 10 ⁵	5.2 (± 1.5) 10 ⁴	3.0 (± 0.7) 10 ⁷	9.9 (± 1.3) 10 ⁵	1.7 (± 0.3) 10 ⁵
<i>HPC CFU cm⁻²</i>	ND	ND	ND	6.5 (± 0.04) 10 ⁵	1.7 (± 0.2) 10 ⁴	5.5 (± 3.3) 10 ²
FISH						
%EUB338/TDC ¹	76.5 ± 4.0	4.6 ± 0.1	0.9 ± 0.01	72 ± 13	23 ± 8.5	16 ± 7.5
%ALF1b/EUB338 ²	1.0 ± 0.3	6	TLTC	21.4 ± 3.1	7	41
%BET42a/EUB338 ²	36.7 ± 2.7	7	TLTC	30.0 ± 3.8	6	8
%GAM42a/EUB338 ²	0.5 ± 0.1	3	TLTC	2.0 ± 1.1	5	30
Total/EUB338^{2,3}	38	16		53	18	79

ND: No data TLTC: Too low to count

¹Expressed as percentages of TDC counts.

²Expressed as percentages of EUB338 counts.

³Total=ALF1b+BET42a+GAM42a counts

During experiment C, when chlorination was applied on an older biofilm (113 days), a significant decrease in FISH detection, but not as marked as formerly describe, was observed. It is unclear why a slightly higher dosage of chlorine would favorably affect the ability of the probe to label bacterial rRNA, rather suggesting an effect of aging. After 3 days of chlorination, even with a stronger dosage, the older biofilm (Exp. C) contained a proportion of EUB338 detected cells (23.3% ($\pm 8.5\%$)) that is 5 times greater than the younger biofilm (Exp. B). Chlorination of the older biofilm did in fact generate a reduction in TDC in the order of 2 log in 7 days, but 16% ($\pm 7.5\%$) of these cells were still detectable with EUB338.

Interestingly, although the age of the biofilm and the proportions of cells detected by EUB338 are different in the two experiments, there are similarities in the compositions of the biofilms after three days of chlorination (Table 4). The 3-day chlorinated biofilms present (i) a gradual decrease in TDC counts, (ii) a decrease in EUB338 counts, (iii) a decrease in EUB338 cells targeted by ALF1b, BET42a and GAM42a. Among the bacteria detected with EUB338, 16 to 18% were EUB338 cells, labeled with ALF1b or BET42a or GAM42. This means that the proportion of cells identified as belonging to ($\alpha+\beta+\gamma$)-*Proteobacteria* decreased by up to 20% of EUB338-detected cells, after 3 days of chlorination.

The opposite trend is observed after 1 week of disinfection of the older biofilm. Then, the cells labeled with ALF1b, BET42a or GAM42a represent 79% of the cells labeled with EUB338.

A single control reactor was operated during the two chlorination experiments to assess the variability of the biofilm composition over the period of testing. The EUB338 counts were stable around $\sim 75\%$ of TDC, as were the counts with BET42a and GAM42a, at around $\sim 25\%$ and $\sim 0.5\%$ of EUB-detected cells respectively. A increase in α -*Proteobacteria* was noted from 0.6% ($\pm 0.1\%$) at T=49 days to 4.3% ($\pm 0.1\%$) of TDC at t=56 days.

Effect of monochloramine on the phylogenetic composition of a biofilm

Chloramination, applied continuously on 112-day-old biofilms at rates of 0.6 or 1.9 mg $\text{NH}_2\text{Cl L}^{-1}$ generated gradual decreases in both the TDC and EUB338 counts (Table 5 and 6).

Regardless of the chloramine dosage applied, TDC decreased progressively by one log over a one-month period, whereas EUB338 counts progressively declined from 58-66% to less than 12% of TDC. The culturable cells (HPC) were much more sensitive to chloramine dosage, as shown by the drastic decrease in HPC of 2 to 5 log, one week after the onset of chloramination at 0.6 or 1.9 mg $\text{NH}_2\text{Cl /L}$ respectively.

The β -*Proteobacteria* group proportion dropped drastically following the onset of chloramination. This drop was 6 times greater when 1.9 mg $\text{NH}_2\text{Cl L}^{-1}$ was applied, reaching 3.3% ($\pm 0.2\%$), compared to the 18.3% ($\pm 4.3\%$) of EUB-detected cells also detected with BET42a when 0.6mg/L are applied. After 14 to 28 days of treatment, β -*Proteobacteria* still decreased with 0.6 mg $\text{NH}_2\text{Cl L}^{-1}$ applied reaching 3% ($\pm 0.2\%$) after 28 days, whereas β -*Proteobacteria* increased to reach 21% ($\pm 7.7\%$) in biofilms treated for 28 days with 1.9 mg $\text{NH}_2\text{Cl L}^{-1}$. The α -*Proteobacteria* maintained their proportion for 1 week after the onset but then also diminished. The proportion of γ -*Proteobacteria* increased after 2 weeks of chloramination, but also diminished after 4 weeks.

Table 5: Evolution of biofilm composition during monochloramination with 0.6 mg NH₂Cl L⁻¹ applied, measured by TDC, HPC and in situ hybridization.

	Before treatment	7 days of NH ₂ Cl treatment	14 days of NH ₂ Cl treatment	28 days of NH ₂ Cl treatment
TDC $\times 10^7$ cells cm ⁻²	2.7 (±0.01)	2.3 (± 0.4)	1.8 (±0.0 4)	1.0 (±0.03)
HPC CFU cm⁻²	1.2(±0.5)×10 ⁶	1.1(±0.9)×10 ⁴	1.1 (±0.1)×10 ²	6.1 (± 1.0)
FISH EUB338/TDC ¹	58 (±7)	49 (±11.2)	23 (±1.9)	12 (±6.6)
%ALF1b/EUB338 ²	18 (±2.1)	22 (±11.8)	16 (±0.2)	6 (±0.4)
%BET42a/EUB338 ²	38 (±4.4)	18 (±4.3)	9 (±12)	3 (±0.2)
%GAM42a/EUB338 ²	2.7 (±1.0)	1.7 (±1.8)	6.1 (±1.9)	0.3 (±0.2)
Total/EUB338 ^{2,3}	57	42	31	9

¹Expressed as percentages of TDC counts.

²Expressed as percentages of EUB338 counts.

³Total=ALF1b+BET42a+GAM42a counts

Table 6: Evolution of biofilm composition during monochloramination with 1.9 mg NH₂Cl L⁻¹ applied, measured by TDC, HPC and in situ hybridization.

	Before treatment	7 days of NH ₂ Cl treatment	14 days of NH ₂ Cl treatment	28 days of NH ₂ Cl treatment
TDC $\times 10^7$ cells cm ⁻²	3.0 (± 0.1)	1.4 (±0.1)	1.5 (± 0.3)	0.63 (± 0.13)
HPC CFU cm⁻²	1.1(±0.01)×10 ⁶	4.9(±0.9)×10 ¹	2.4 (± 1.7)	5.5 (± 0.9)
FISH %EUB338/TDC ¹	66 (± 8.9)	43 (±14.3)	10 (±1.0)	7 (±0.03)
%ALF1b/EUB338 ²	14 (±2.2)	28 (±1.4)	10±7.4	5±3.8
%BET42a/EUB338 ²	31 (±2.5)	3.3 (±0.2)	17±15	21±7.7
%GAM42a/EUB338	1.3 (±0.7)	1.9 (±1.42)	7.9±0.9	2.3±1.5
Total/EUB338 ^{2,3}	46.2	33	34	23

¹Expressed as percentages of TDC counts.

²Expressed as percentages of EUB338 counts.

³Total=ALF1b+BET42a+GAM42a counts

The impact of chloramination on the biofilm included (i) gradual steady decreases of TDC and EUB338-detected cells, (ii) drastic HPC decreases which are dosage-sensitive, and (iii) major decreases in labeling by FISH probes whether targeting general sites (EUB338) or specific ones (ALF1b, BET42a and GAM42a).

As a consequence of the differing evolution of the various bacterial groups, most of the diminution in EUB338 counts occurs after 15 days of monochloramination.

Composition of the suspended population

The surface/volume ratio of the annular reactors is very large compared to that found in a drinking water pipe with an equivalent diameter. Thanks to this large surface/volume ratio, annular reactors permit a maximizing effect of the biofilm on the suspended population. Furthermore, the hydraulic residence time is sufficiently short to limit the multiplication of bacteria in suspension.

During the colonization period of experiment D, the suspended population was monitored in order to determine its composition in terms of α -, β - and γ -*Proteobacteria* (Figure 2). In those conditions, there was no significant difference in the phylogenetic composition of the suspended population between the inlet and the outlet of the reactor. In our study, the bacterial population entering the reactors contained about 80% β -*Proteobacteria*, while the γ - and α -*Proteobacteria* represented $\leq 2\%$ of the total cells. This suspended population was thus largely dominated by one subpopulation, which was not the case in the biofilm.

The suspended population was less diversified than that of the biofilm, suggesting a less selective environment in the biofilm than in water.

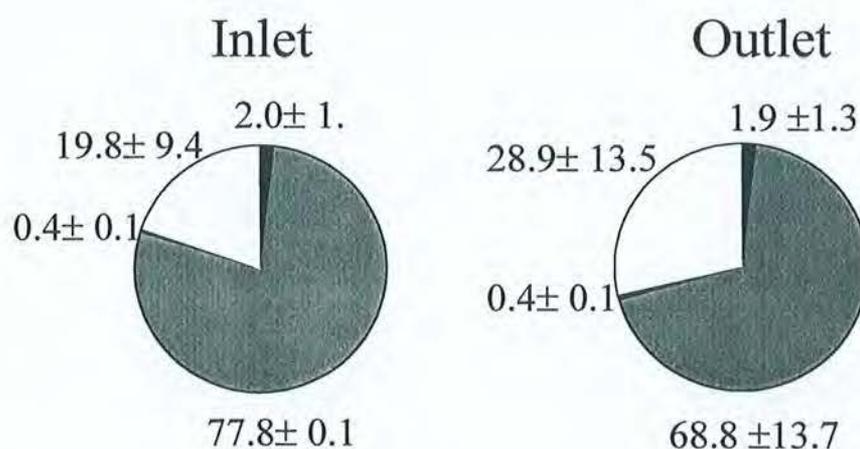


Figure 2: Evolution of suspended population between inlet and outlet of reactors expressed as % hybridized cells/hybridized cells with EUB338. Hybridization with ALF1b (Grey); BET42a (dashed); GAM42a (black) and non identified cells detected with EUB338 (white)

4-DISCUSSION

Evolution of the phylogenetic characteristics of the biofilm composition with ageing

During experiments B, C and D, it was noted that the composition of biofilms developed in untreated drinking water does not evolve quickly, at least not within the time frame of our experiments (<140 days). Moreover, during experiments B, C and D, the β -*Proteobacteria*

constitute the largest labeled fraction of TDC, whereas γ -*Proteobacteria* were in a minority, which is in good agreement with results of Kalmbach *et al.* (28, 27). However, some differences were noted in the proportions of bacterial groups, as illustrated by the greater contribution of α -*Proteobacteria* in some experiments. Kalmbach *et al.* (28) noted that α -*Proteobacteria* may or may not form a major part of populations, ranging from <5% of TDC in biofilm grown in groundwater to 40% of TDC in biofilm grown in drinking water from a DWDS supplied with groundwater (aerated, subjected to sand filtration and not chlorinated). This might indicate that, in our case, changes in the water matrix might have caused the difference in proportions.

Effect of phosphates on the composition of a biofilm

Phosphate addition is a common treatment applied to control corrosion in drinking water distribution systems (5, 48). Since phosphates constitute nutrients for the maintenance and growth of bacteria, as do carbon and nitrogen, it has been suggested that the application of phosphates may amplify the regrowth of bacteria in a distribution system. Some studies have shown that the addition of phosphates leads to an increase in culturable bacteria in batch experiments using drinking water (39, 51) or may allow growth in a microbiologically stable ultrapure water, even stable with an acetate supply (50). However, in most drinking waters where carbon is a limiting nutrient for bacterial growth, the addition of phosphates does not induce relevant changes in the suspended bacterial densities caused by regrowth (34, 12, 5). Our data are in accordance with these results, as the bacterial concentrations measured either with TDC or HPC do not increase significantly following phosphate addition. Besides, this use of corrosion inhibitors has been shown to reduce biofilm through its action on corrosion (2, 48).

More than to measure the quantitative effect of phosphate treatment on the fixed bacteria, the study was undertaken in order to evaluate the qualitative effect of phosphate treatment on biofilm. Through this novel approach using FISH probes, it has been noted that phosphate treatment modifies the bacterial composition of biofilm. The proportion of γ -*Proteobacteria* is significantly enhanced by phosphate exposure. Since this subpopulation constitutes a minor part of the total population, the detection of this increase may not be possible when global measurement techniques (HPC or TDC) are used. The γ -*Proteobacteria* subclass contains several frank pathogens such as *Salmonella sp.*, *Escherichia sp.* or *Legionella sp.*. The outbreak of Legionellosis described by Crespi and Ferrà (13) in a building following a phosphate treatment might confirm the observation reported here.

Effect of chlorine on the composition of a biofilm

Some mechanisms of chlorine disinfection are well documented. Chlorine has a greater effect on cultivability than on respiratory activity, transmembrane potential and the rate of RNA renewal (61). During our experiments, chlorination of the biofilm induces significant decreases in the TDC, culturable HPCs and number of cells in biofilms detected with FISH probes. There is a suspicion that chlorine may induced an underestimation of bacterial numerations. Particularly, TDC may be underestimated because of a lost of fluorescence intensity that would not reflect a bacterial lysis (49). Jacangelo *et al.* (25) noted that a dosage of chlorine, as applied in our experiment, does not induce a cellular lysis. The rate of decrease was slower in the older biofilm than in the younger biofilm. As suggested by LeChevallier *et al.* (31), the resistance to disinfection is greater for older biofilm. Dott and Schoenen (18) and Batté *et al.* (6) have noted that the age of biofilm enhanced the its exopolymer content, which could partly explain the resistance enhancement with ageing, limiting the access of disinfectants to the bacteria.

Studies on the cellular targets of chlorine clearly show that nucleotides are among the most reactive cellular components (16, 24, 17). The reactivity of nucleotides may explain the sharp decrease in hybridized bacteria with the EUB338 probe following chlorination (a 3- to 85-fold decrease in the proportion of TDC cells labeled with EUB338, depending on the age of the biofilm and chlorination duration). Moreover, chlorine induces intracellular material leakage (22). It can be argued, however, that bacteria depleted in rRNA to the point where hybridization is not sufficient to be detected, might be in fact render bacteria moribund, or at least leave them with a limited regrowth potential.

The effect of chlorine on the number of FISH-detected cells in biofilm depends on the age of the biofilm and on the duration of exposure to chlorine. The proportion of bacteria hybridizing with EUB338 in a 113-day-old biofilm disinfected by 1 mg $\text{CL}_2 \text{ L}^{-1}$ is higher than that observed for a 49-day-old biofilm disinfected by 0.75 mg $\text{CL}_2 \text{ L}^{-1}$, which is in agreement with the fact that an older biofilm is more resistant (31). This difference is observed in numbers and in speed-rates of declines. In both cases, applying a chlorination on a biofilm for a short period (3 days in our assays) leads to a low labeled fraction (20%) of the bacteria belonging to subclasses α -, β - and γ -*Proteobacteria*. *Proteobacteria* are most of the Gram-negative bacteria found in a drinking water distribution system (47, 44). Consequently, these results agree with those carried out on suspended heterotrophic populations disinfected with chlorine for a short time (a few minutes and up to 48 h) where the majority of the chlorine-resistant population is composed of Gram-positive, and few Gram-negative bacteria (46, 44). It has been suggested that sporulating Gram-

positive bacteria are more resistant than Gram-negative bacteria to chlorine disinfection at dosage lower than $10\text{mg Cl}_2\text{L}^{-1}$ (applied for <60 minutes)(46, 40).

By contrast, when the duration of chlorination extends over a week (experiment C with the application of $1\text{ mg Cl}_2\text{ L}^{-1}$), 79% of the bacterial biofilm still detectable with EUB338 probe was composed of $\alpha+\beta+\gamma$ -*Proteobacteria*. Changes in the population composition as studied by FISH suggest that the different bacterial subpopulation densities decrease following different speed rates. Our results might remind the disappearance of Gram-positive bacteria observed by Dott (19) who applied a when chlorination that lasts for several days. This shift in biofilm composition is also in agreement with observations made by Norton and LeChevallier (44), who noted that the culturable part of biofilm is mainly composed of Gram-negative bacteria after 8 weeks of continuous chlorination.

The predominance of *Proteobacteria*, and especially β -*Proteobacteria*, in young biofilms (29) and in long-term chlorinated biofilms suggests that the *Proteobacteria* may compete better when the overall bacterial densities are reduced or controlled by disinfection. Disinfection also continuously reduced the Proteobacterial densities as the overall population, however this density reduction is slower.

Effect of monochloramine on the composition of a biofilm

The mechanisms of bacterial inactivation by monochloramine are not as well documented as those by chlorine. The weak decline in TDC compared to the noticeable decline in HPC densities observed during experiment D (around $>5\text{ log}$ and $<1\text{ log}$ respectively) are in accordance with earlier observations reported in the literature by Stewart *et al.* (54) (around 3-4 log and 0.2-0.4 log respectively after 1-2 hours of disinfection with $4\text{mg Cl}_2\text{-eq/L}$) or Morin and Camper (41) (around 2 log and 0,3 log respectively, after 46 days of disinfection with $1\text{mg monochloramine/L}$). However, the HPC decline reaches 5 log after 28 days, which is greater than the 2.4 log decrease observed by Morin and Camper (41) in a biofilm grown on a similar experimental system over a 46-day long monochloramine treatment. The shift as performed during our experiment from a non-disinfected to a disinfected feedwater may have a greater effect on the biofilm population than the direct development of a biofilm in a disinfected environment, as performed by Morin and Camper (41).

The reactivity of monochloramine with most organic molecules (nucleic acids, nucleotides, nucleosides, purine and pyrimidine bases, ribose, amino acids, etc.) is not as strong as that of chlorine (24). FISH method is concerned by the fact that monochloramine has been observed to break down genetic macromolecules (23, 24, 55, 53) rather than to chemically react with nucleotides or nucleosides (24). However, monochloramine does not induce a leakage of nucleic

acid and other intracellular UV-absorbing components (25). It can be argued that the chloraminated population labeled by FISH probes is thus likely to contain non-viable bacteria, since several broken-down macromolecules may still be labeled. This was observed for DAPI which still stains DNA after chloramination (49). However, detection of killed cells with FISH is supposed to decrease over time, since rRNA degradation starts within 3 days after cellular death (58, 38). Therefore, it is likely that the labeled population is the population that resists to disinfection, since the exposure to monochloramine lasted 28 days.

The population evolves over time when exposed to chloramines. Among the EUB-hybridized cells, the proportions of bacteria belonging to the subclasses α , β and γ evolve according to different trends. It cannot be excluded that some variations in counts may reflect the difficulties of reading such low counts, but they may also reflect competition among bacteria for their new environment. These differences in trends may be due to varying levels of resistance in these phylogenetic groups. Such differences in resistance have been observed between the sporulating Gram-positive, non-sporulating Gram-positive and Gram-negative bacteria (46) and have been attributed to differences in cell-wall composition (46). However, all subpopulations are submitted to a reduction in densities, some subpopulations decrease faster than others. The population labeled by EUB338 showed a clear reduction in the proportion of bacteria belonging to the *Proteobacteria* subclasses, to the benefit of other, non-targeted bacteria. The proportion of β -*Proteobacteria* to EUB338 counts decreased all over time. Given that this population is the one that predominates in untreated biofilm, monochloramine disinfection seems to constitute adverse ecological conditions for this subpopulation. Indeed, the absence of treatment would favor β -*Proteobacteria*.

Our results with chlorine and monochloramine disinfection suggest that, over the course of a long period of exposure, the resistance of *Proteobacteria* to disinfection is enhanced by chlorine and hindered by monochloramine. Since the *Proteobacteria* are Gram-negative, our results are in accordance with observations reported in the literature about the opposition between Gram-positive and Gram-negative dominance of populations following chlorination or chloramination. Most authors have noted that chlorination leads to the dominance of Gram-negative in populations, whereas monochloramine leads to Gram-positive dominance in populations (44, 8).

Composition of the suspended population

The composition of the suspended population did not reflect the composition of the biofilm in the reactors. During the experiment, the detachment from biofilm induced by its low growth

rate ($\mu=0.001 \text{ h}^{-1}$ compared to 0.038 to 0.16h^{-1} as reported by Servais *et al.* (52) may not allow changes to occur in suspended populations.

Very few studies have focused on the differences in composition found in fixed and suspended bacterial populations (44, 14). Our results point out that fixed and suspended population are two distinct population with two distinct composition This trend is in accordance the observations of Norton and LeChevallier (44) who studied the composition of fixed and suspended heterotrophic populations in model systems. Norton and LeChevallier (44) suggest that the differences between suspended and fixed populations may be induced by i) the bacterial attachment capabilities of species, and ii) environmentally selective pressures. In oligotrophic environments, bacteria which have a relative high growth rate under low concentrations of organic substrates dominate the population (30). However, Camper *et al.* (10) have observed that the initial slow growth conditions applied to a subpopulation during its chemostat cultivation is a major parameter allowing settlement of these bacteria in mixed biofilms. It could also be argued that a species that grows quickly in the suspended population may not be prone to attachment and growth in biofilm, as observed by Murgel *et al.* (43). A hypothesis is that the biofilm population may contain more slow growers than the suspended population, leading to different population compositions.

5-ACKNOWLEDGMENTS

This research was supported by the partners of the NSERC (Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada) Industrial Chair on Drinking Water; namely, the City of Montreal, the City of Laval, Triax, Vivendi Water-John Meunier-U.S. Filter.

The authors would like to thank Dr C. Greer of the NRC-BRI, Dr B. K. Koudjonou, Dr P. Laurent, Dr J. Coallier and M. Rivard of the NSERC Industrial Chair on Drinking Water and J. Douki for their advices and valuable assistance.

6-REFERENCES

1. **Abernathy C.G. et A.K. Camper. 1997.** Interactions between pipe materials, disinfectants, corrosion inhibitors, organics and distribution biofilms. In *Water Quality Technology Conference - American Water Works Association: Denver - November 9th-12th*.
2. **Abernathy C.G. and A.K. Camper. 1998.** The effect of phosphorus based corrosion inhibitors and low disinfectant residuals on distribution biofilms. In *Water Quality Technology Conference - American Water Works Association: San Diego - November 1st – 4th*.
3. **Amann R.I., B.J. Binder, R.J. Olsen, S.W. Chisholm, R. Devereux and D.A. Stahl. 1990.** Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 1919-1925.

4. **APHA (American Public Health Association). 1998.** *Standard methods for the examination of water and wastewater*, Washington D.C.
5. **Appenzeller B. M. R, M. Batté , L. Mathieu, J.-C. Block, V. Lahoussine, J. Cavard and D. Gatel. 2001** Effect of adding phosphate to drinking water on bacterial growth in slightly and highly corroded pipes. *Wat. Res.* **35(4)**: 248-253.
6. **Batté M, B. Koudjonou, P. Laurent, L. Mathieu, J. Coallier and M. Prévost. 2001.** Biofilm responses to ageing and to a high phosphate load in a pilot drinking water system. *Wat. Res.* Submitted.
7. **Bidnenko E., C. Mercier, J. Tremblay, P. Taillez and S. Kulakauskas. 1998.** Estimation of the state of the bacterial cell wall by fluorescent *in situ* hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 3059-3062.
8. **Briganti, L.A. and S.C. Wacker. 1995.** *Fatty Acid Profiling of environmental bacteria for drinking water utilities*. AWWARF (Ed). AWWARF-AWWA: Denver. 89p.
9. **Camper A.K. 1995.** Factors influencing biofilm regrowth in drinking water distribution systems. *PhD Thesis. Montana State University –Bozeman.* 178p.
10. **Camper A.C., W.I. Jones and J.T. Hayes. 1996.** Effect of growth conditions and substratum composition on the persistence of coliforms in mixed-population biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* **62(11)**: 4014-4018.
11. **Characklis W.G. and K.C. Marshall (Eds). 1990.** *Biofilms*. John Wiley and sons Inc.: New York 796p.
12. **Cohen Y.K., C.G. Abernathy and A.K. Camper. 1999.** Polyphosphates – the solution to distribution system low residuals, biofilm and pipe corrosion. *Water Quality Technology Conference - American Water Works Association: Denver - October 31th - November 3rd*.
13. **Crespi S. et J. Ferrá. 1997.** Outbreak of Legionellosis in a tourist complex in Lanzarote concomitant with a treatment of water system with megadoses of polyphosphates. *Wat. Sci. Technol.* **35(11-12)**: 307-309.
14. **Crump. B.C., E.V. Armbrust and J.A. Baross. 1999.** Phylogenetic analysis of particle-attached and free-living bacterial communities in the Columbia River, its estuary and the adjacent coastal ocean. *Appl. Environ. Microbiol.* **65(7)**: 3192-3204.
15. **DeLong E.F. 1993.** Chapter 33. Single-cell identification using fluorescently labeled ribosomal RNA-specific probes. *In Handbook of Methods in Aquatic Microbial Ecology*. pp. 285-294. Kemp P.F., B.F. Sherr, E.B. Sherr and J.J. Cole (Eds). Lewis: Boca Raton.
16. **Dennis W.H., V.P. Olivieri and C.W. Kruse. 1979.** The reaction of nucleotides with aqueous hypochlorous acid. *Wat. Res.* **13**: 357-362.
17. **Doré M. 1989.** *Chimie des oxydants et Traitement des eaux*. Technique et Documentation, Lavoisier: Paris. 505p.
18. **Dott W. and Schoenen D. 1985.** Qualitative and quantitative determination of bacterial populations in an aquatic environment. 7. Development of bacterial growth on raw materials exposed to potable water. *Zentralbl. Bakteriologie. Mikrobiologie. Hygiene.* **180(5-6)**: 436-447. (in German).
19. **Dott W. 1983.** Qualitative and quantitative determination of bacterial populations in aquatic habitats. 6. Communication: bacterial regrowth and drinking water. *Zbl. Bakt. Hyg.* **78(3)**: 263-279. (in German).
20. **Fegatella F., J. Lim, S. Kjelleberg and R. Cavicchioli. 1998.** Implications of rRNA Operon Copy Number and Ribosome Content in the Marine Oligotrophic Ultramicrobacterium *Sphingomonas* sp. Strain RB2256. *Appl. Environ. Microbiol.* **64(11)**: 4433-4438.

21. **Giovannoni S.J., E.F. DeLong, G.J. Olsen and N.R. Pace. 1988.** Phylogenetic group-specific oligonucleotide probes for identification of single microbial cells. *J. Bacteriol.* **170**: 720-726.
22. **Haas C.N. and R.S. Englebrecht. 1980.** Physiological alterations of vegetative microorganisms resulting from chlorination. *J.WCPF* **52**: 1976-1989.
23. **Ingols R.S. 1958.** The effect of monochloramine and chromate on bacterial chromosomes. *Public Health Works.* **86**: 105-106.
24. **Jacangelo J.G. and V. P. Olivieri. 1985.** Aspect of the mode of action of monochloramine. In *Water chlorination, chemistry, environmental impact and health effects*. Davis W.P., S. Katz, M.H. Roberts and V.A. Jacobs (Eds). p.575-586. Lewis: Chelsea (Mi).
25. **Jacangelo J.G., V.P. Olivieri and K. Kawata. 1991.** Investigating the mechanism of inactivation of *Escherichia coli* B by monochloramine. *J. Am. Water Works Assoc.* **5**: 80-87.
26. **Jones D.A. 1996.** Principles and prevention of corrosion. Prentice-Hall: Upper Saddle River: New Jersey. 572 p.
27. **Kalmbach S. 1998.** Polyphasic characterization of the microbial population of drinking water biofilms. *PhD Thesis. University of Berlin - Berlin (Germany)*. 125p.
28. **Kalmbach S., W. Manz and U. Szewzyk. 1997.** Isolation of new bacterial species from drinking water biofilms and proof of their *in situ* dominance with highly specific 16S rRNA probes. *Appl. Environ. Microbiol.* **63** : 4164-4170.
29. **Kalmbach S., W. Manz, B. Bendinger and U. Szewzyk. 2000.** *In situ* probing reveals *Aquabacterium commune* as a widespread and highly abundant bacterial species in drinking water biofilms. *Wat. Res.* **34(2)**: 575-581.
30. **Kuznetsov S.I., G.A. Dubinina and N.A. Lapteva. 1979.** Biology of oligotrophic bacteria. *Ann. Rev. Microbiol.* **33**: 377-387.
31. **LeChevallier M.W., C.D. Cawthon and R.G. Lee. 1988.** Factors promoting survival of bacteria in chlorinated water supplies. *Appl. Environ. Microbiol.* **54(3)**: 649-654.
32. **LeChevallier M.W., C.D. Lowry and R.G. Lee. 1990.** Disinfecting biofilms in a model distribution system. *J. Am. Water Works Assoc.* **82(7)**: 87-99.
33. **LeChevallier M.W., W. Schulz and R.G. Lee. 1991.** Bacterial nutrients in drinking water. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 857-862.
34. **Lyons J. L., J. Pontes and P. Karalekas. 1995.** Optimizing corrosion control for lead and copper using phosphoric acid and sodium hydroxide. *Proceedings of the Water Quality Technology Conferences - American Water Works Association: New Orleans. November 12th - 16th.*
35. **Lytle D.A., M.R. Schock and T.J. Sorg. 1996.** Controlling lead corrosion in the drinking water of a building by orthophosphate and silicate treatment. *J. New Eng. Water Works Assoc.* **110**: 202-209.
36. **Manz W., R. Amann, W. Ludwig, M. Wagner and K.H. Schleifer. 1992.** Phylogenetic oligonucleotide probes for the major subclasses of *Proteobacteria*: problems and solutions. *Syst. Appl. Microbiol.* **15**: 593-600.
37. **Mathieu L., J.L. Paquin, J.C. Block, G. Randon, J. Maillard and D. Reasoner. 1992.** Paramètres gouvernant la prolifération bactérienne dans les réseaux de distribution d'eau. *Rev. Sci. Eau.* **5**: 91-112.

38. **McKillip J.L., L.-A. Jaykus and M. Drake. 1998.** rRNA stability in heat-killed and UV-irradiated enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* O157:H7. *Appl. Environ. Microbiol.* **64(11)**: 4264-4268.
39. **Miettinen I.T., T. Vartiainen and P.J. Martikainen. 1997.** Phosphorus and bacterial growth in drinking water. *Appl. Environ. Microbiol.* **63(8)**: 3242-3245.
40. **Mir J. J. Morato and F. Ribas. 1997.** Resistance to chlorine of freshwater bacterial strains. *J. Appl. Microbiol.* **82**: 7-18.
41. **Morin P. and A.K. Camper. 1997.** Attachment and fate of carbon fines in simulated distribution system biofilms. *Wat. Res.* **31(3)**: 399-411.
42. **Moter A. and U.B. Göbel. 2000.** Fluorescent in situ hybridization (FISH) for direct visualization of microorganisms. *J. Microbiol. Meth.* **41**: 85-112.
43. **Murgel G.A., L.W. Lion, C. Acheson, M.L. Shuler, D. Emerson and W.C. Ghiorse. 1991.** Experimental apparatus for selection of adherent microorganisms under stringent growth conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 1987-1996.
44. **Norton C.D. and M.W. LeChevallier. 2000.** A pilot study of bacteriological population changes through potable water treatment and distribution. *Appl. Environ. Microbiol.* **66(1)**: 268-276.
45. **Prévost M., A. Rompré, J. Coallier, P. Servais, P. Laurent, B. Clément and P. Lafrance. 1998.** Suspended bacterial biomass and activity in full-scale drinking water distribution systems: impact of water treatment. *Wat. Res.* **32(5)**: 1393-1406.
46. **Ridgway H.F. and B.H. Olson. 1982.** Chlorine resistance patterns of bacteria from two drinking water distribution systems. *Appl. Environ. Microbiol.* **44(4)**: 972-987.
47. **Rompré A., M. Prévost, J. Coallier and P. Servais. 1998.** Chapter 4. Impact of reducing biodegradable organic matter on fixed and suspended biomass in distribution systems. In *Microbial Impact of Biological Filtration*. p57-120 LeChevallier M.W., C. D. Norton, A. Camper, P. Morin, B. Ellis, W. Jones, A. Rompré, M. Prévost, J. Coallier, P. Servais, D. Holt, A. Delanoue and J. Colbourne (Eds). AWWARF-AWWA: Denver. 177p.
48. **Rompré A., M. Prévost, J. Coallier, P. Brisebois and J. Lavoie. 2000.** Impacts of implementing a corrosion control strategy on biofilm growth. *Wat. Sci. Technol.* **41(4-5)**: 287-294.
49. **Saby S., Sibille I., Mathieu L., Paquin J.L. and Block J.C. 1997.** Influence of water chlorination on the counting of bacteria with DAPI (4'-6-diamidino-2-phenylindole). *Appl. Environ. Microbiol.* **63(4)**: 1564-1569.
50. **Sathasivan A., Ohgaki S., K. Yamamoto and N. Kamiko. 1997.** Role of inorganic phosphorus in controlling regrowth in water distribution system. *Wat. Sci. Tech.* **35(8)**: 37-44.
51. **Sathasivan A. and Ohgaki S. 1999.** Application of new bacterial regrowth potential method for water distribution system – a clear evidence of phosphorus limitation. *Wat. Res.* **33 (1)**: 137-144.
52. **Servais P., G. Billen, C. Ventresque and G.P. Bablon. 1991.** Microbial activity in GAC filters at the Choisy-le-Roy treatment plant. *J. Am. Water Works Assoc.* **83(2)**: 62-68.
53. **Shibata H, Y. Sakamoto Y, M. Oka M and Y. Kono Y. 1999.** Natural antioxidant, chlorogenic acid, protects against DNA breakage caused by monochloramine. *Biosci Biotechnol Biochem.* **63(7)**: 1295-1297.
54. **Stewart P.S., T. Griebe, R. Srinivasan, C.-I. Chen, F.P. Yu, D. DeBeer and G.A. McFeters. 1994.** Comparison of respiratory activity and culturability during

- monochloramine disinfection of binary population biofilms. *App. Environ. Microbiol.* **60(5)**: 1690-1692.
55. **Suzuki H., K. Seto, M. Mori, M. Suzuki, S. Miura and H. Ishii. 1998.** Monochloramine induced DNA fragmentation in gastric cell line MKN45. *Am J Physiol.* **275(4)**: G712-G718.
56. **Swiger R.R. and J.D. Tucker. 1996.** Fluorescent in situ hybridization: a brief review. *Environ. Molec. Mutagen.* **27**: 245-254.
57. **Van der Kooij D. 1992.** Assimilable organic carbon as an indicator of bacterial regrowth. *J. Am. Water Works Assoc.* **84**: 57-65.
58. **Van der Vliet G.M., P. Schepers, R.A. Schukkink, B. van Gemen and P.R. Klatser. 1994.** Assessment of mycobacterial viability by RNA amplification. *Antimicrob. Agents Chemother.* **38(9)**: 1959-1965.
59. **Vik E.A., R.A. Ryder, I. Wagner and J.F. Ferguson. 1996.** Mitigation of corrosion effects. Chapter 8. In *Internal corrosion of water distribution systems*. p. 389-443. AWWARF and DVGW-TZW (Eds). AWWARF: Denver.
60. **Wagner M., R. Amann, H. Lemmer and K.-H. Schleifer. 1993.** Probing activated sludge with oligonucleotides specific for *Proteobacteria*: inadequacy of culture-dependent methods for describing microbial community structure. *Appl. Environ. Microbiol.* **59(5)**: 1520-1525
61. **Yu F.P. and G.A. McFeters. 1994.** Physiological responses of bacteria in biofilms to disinfection, *Appl. Environ. Microbiol.* **60(7)**: 2462-2466.
62. **Zavarzin G.A., E. Stackebrandt and R. G. Murray. 1991.** A correlation of phylogenetic diversity in the *Proteobacteria* with the influences of ecological forces. *Can. J. Microbiol.* **37**: 1-6.

VI.5 Discussion

Les études présentées dans ce chapitre ont pour objectifs de définir comment certains paramètres, les phosphates en particulier, modifient la composition de la population du biofilm et quelles sont les différences entre la composition des biofilms et de la flore bactérienne libre.

Les coliformes ont été utilisés comme sous-population témoin. van der Kooij (1997) a observé que *Citrobacter freundii* est l'espèce la plus fréquente dans les eaux potables d'origine souterraine. O'Neill et Parry (1997) suggèrent que *Citrobacter freundii* peut s'implanter dans les biofilms, tandis que *Escherichia coli* ne s'y planterait pas. Pourtant, dans les essais menés ici en conditions dynamiques, le lessivage de *Citrobacter freundii* en sortie des pilotes présente des tendances similaires à ce qui a été reporté ailleurs, lors d'injection massive de *Escherichia coli* dans des montages pilotes (Fass *et al.*, 1996 ; Parent *et al.*, 1996 ; Sibille, 1997). De plus, bien que dans les essais en conditions statiques, la cultivabilité des coliformes a été influencée par la phosphatation, en conditions dynamiques, les phosphates n'ont pas permis de maintenir *Citrobacter freundii* plus longtemps dans les réacteurs traités par rapport aux réacteurs témoins. Les essais reportés ici suggèrent que le comportement des coliformes en présence de phosphates dépend des conditions environnementales et des souches exposées.

Reilly et Kippin (1983) et Rice *et al.* (1991) indiquent que les coliformes et l'ensemble des bactéries hétérotrophes ne se comportent pas de façon similaire. Il est notable qu'au cours de nos essais, tandis que les bactéries cultivables sur R2A représentaient 10^4 UFC/mL, les coliformes ne dépassent pas 50 UFC/mL sur gélose sélective (TTC-Tergitol), soit plus de 3 log de différence entre les dénombrements de bactéries cultivables sur gélose R2A et ceux de coliformes sur gélose TTC-tergitol. Or, lors de tests en conditions statiques, la cultivabilité de la population libre totale (BHA) ne présentait aucune différence significative engendrée par l'ajout de phosphates (Voir Chapitre I). Toutefois, les deux espèces de coliformes (*Citrobacter freundii* et *Escherichia coli*) utilisées ici ont présenté un maintien de leur cultivabilité plus important en présence de phosphates. Le fort écart entre ces deux ensembles bactériens (BHA et coliformes) suggère qu'il est peu probable de détecter l'évolution d'une sous-population restreinte en étudiant l'ensemble de la population ce qui est confirmé par les essais. Cependant, la forte sélectivité de la gélose au TTC-tergitol entraîne, davantage que la gélose R2A, une sous-estimation des teneurs en coliformes. En effet, pour une même culture, il y a jusqu'à 5 fois moins de coliformes dénombrés sur gélose TTC-tergitol que R2A (résultats non reportés).

Concernant la composition des populations autochtones, quelques études ont été menées *via* les populations cultivables (Rompré *et al.*, 1998 ; Norton and LeChevallier, 2000). La

méthode FISH, en permettant de dénombrer les bactéries sans passer par la culture permet d'éviter les biais de sélection engendrés par cette dernière (Kalmbach *et al.*, 1997).

Les études menées ici avec la méthode FISH montrent que lors de la désinfection, certaines sous-populations décroissent plus vite que d'autres. Elles montrent également que, bien que les phosphates en conditions dynamiques n'ont pas d'effet sur la population générale (mesure par culture sur gélose R2A, par dénombrements au DAPI), ils engendrent une augmentation statistiquement significative de la sous-classe γ des Protéobactéries. Cette sous-population contient de nombreuses bactéries d'intérêt sanitaire qui, potentiellement, peuvent être rencontrées dans les eaux potables. Les modifications de la population en faveur de cette sous-classe peuvent donc engendrer une dégradation de la qualité des eaux. À ce titre, Crespi et Ferra (1997) ont mis en évidence un lien possible entre la survenue d'une légionellose et un traitement massif du système d'eau d'un immeuble avec des polyphosphates. Cependant, si dans un réseau, les phosphates ajoutés limitent la corrosion et des densités de bactéries associées (Abernathy et Camper, 1998), cela devrait tendre à améliorer la qualité des eaux, malgré le changement des populations en faveur des γ -Protéobactéries. De plus, bien que le biofilm est une source principale de bactéries dans les réseaux d'eau potable (Van der Wende *et al.*, 1989), nos essais ont montré que la composition du biofilm ne reflète pas directement la composition de la population libre. Aussi une contamination du biofilm ne se reflètera pas toujours dans la phase eau. Il est en effet admis que les coliformes peuvent survivre dans les biofilms (Le Chevallier *et al.*, 1987 ; LeChevallier, 1990) mais ne contaminer que transitoirement les eaux (LeChevallier, 1990), notamment en été lorsque les eaux dépassent 15°C (Fransolet *et al.*, 1985).

En conclusion, le biofilm étant un écosystème, la modification d'un paramètre (par ajout de phosphates, désinfection, etc.) a engendré des changements dans la composition taxonomique des populations, en fonction des niches écologiques disponibles. Suivant les capacités des groupes bactériens, qui sont définies par leurs caractéristiques génétiques, certaines seront favorisées par la modification de l'environnement et d'autres seront défavorisées. Ces changements ne sont cependant pas détectés par les mesures globales.

Chapitre VII Conclusions Générales

La préservation de la qualité de l'eau au cours de son transport dans les réseaux de distribution d'eau potable est une préoccupation majeure en terme de santé publique. Dès sa production, l'eau est additionnée de désinfectant et dans certains cas de produits anticorrosion, afin de limiter son altération pendant son transit dans le réseau et de préserver la qualité de l'eau traitée. Cependant, les phosphates ajoutés pour limiter la corrosion ont été suspectés d'engendrer des phénomènes de recroissance bactérienne, conduisant à une éventuelle détérioration microbiologique de l'eau.

Dans ce mémoire, les travaux ont porté sur l'évaluation de l'impact des phosphates sur la qualité microbiologique des eaux distribuées et ont consisté en particulier à définir les effets des phosphates sur :

- (i) les densités de bactéries libres ou fixées sur les parois des canalisations,
- (ii) la composition des communautés bactériennes libre et fixée,
- (iii) les synthèses bactériennes d'acides aminés et d'hydrates de carbone dans les biofilms,
- (iv) l'efficacité de la désinfection par la monochloramine sur les biofilms, en réseau.

Dans des eaux potables, telles que testées, où le carbone est l'élément nutritif limitant, en absence de corrosion, l'ajout de phosphate ne stimule pas, de façon mesurable, la croissance des bactéries libres ou fixées autochtones des eaux. Les phosphates peuvent influencer la cultivabilité des coliformes, comme observé ici, en condition statique uniquement, suggérant un effet important des conditions environnementales. Le suivi de la composition des biofilms par la méthode FISH (Fluorescent *in situ* hybridization) a mis en évidence que les phosphates influencent peu la composition taxonomique des biofilms. Les phosphates entraînent une augmentation statistiquement significative de la proportion de bactéries de la sous-classe γ -Protéobactéries au sein de la population fixée. Cependant, cette sous-classe bactérienne qui contient la plupart des coliformes, est peu représentée dans les biofilms. Les biofilms étudiés étaient davantage composés de β -Protéobactéries et dans une moindre mesure par des α -Protéobactéries, ce qui corrobore des résultats reportées dans la littérature. À ce sujet, les travaux ont mis en évidence que la population fixée est plus diversifiée en terme taxonomique que la population libre, laquelle est presque exclusivement composé de β -Protéobactéries.

En présence de parois de canalisation fortement corrodées, l'ajout de phosphates peut améliorer la qualité bactériologique des eaux, possiblement en limitant la croissance des bactéries du biofilm, lequel est la source principale des bactéries retrouvées dans l'eau de distribution.

L'analyse chimique des biofilms n'a montré aucun effet des phosphates sur leurs teneurs en hydrates de carbones et en acides aminés, celles-ci variant principalement en fonction de l'âge des biofilms. Toutefois, le traitement aux phosphates augmente notablement la quantité de phosphates fixés dans les biofilms, en partie par adsorption au niveau des exopolymères et des parois.

Les analyses des hydrates de carbone ont montré que le glucose et, suivant l'âge des biofilms, le galactose et le fructose constituent les monosaccharides majoritaires dans les biofilms d'eau potable étudiés. Les analyses des acides aminés ont mis en évidence que la glycine et la lysine sont majoritaires dans ces biofilms. Ces données confirment des données antérieures rapportées dans la littérature.

En absence de phosphates, la désinfection à la monochloramine entraîne une diminution de plus de la moitié des teneurs en hydrates de carbone et acides aminés dans les biofilms. De plus, une telle désinfection modifie les fractions relatives des divers hydrates de carbone et acides aminés dosés, possiblement du fait de leur réactivité variable et du fait de changements dans les synthèses bactériennes en faveur des protéines et au détriment des polysaccharides.

Lorsque les biofilms traités aux phosphates sont exposés à une eau contenant de la monochloramine, les teneurs en hydrates de carbone et en acides aminés sont moindrement affectés par la désinfection, plus particulièrement à faible dose de monochloramine.

L'accumulation préalable de phosphates dans les biofilms, ainsi que la poursuite du traitement aux phosphates pendant la désinfection, n'ont pas eu d'effet sur les dénombrements bactériens totaux évalués en termes de compte direct totaux (CDT) et d'activité exoprotéolytique potentielle (AEP). Cependant, au cours de la monochloramination, les biofilms traités aux phosphates ont présenté des abattements des populations de bactéries cultivables deux fois plus faibles que ceux dans les populations témoins. De plus, il existe une corrélation entre l'hydrolyse des polyphosphates ajoutés en orthophosphates avec l'activité exoprotéolytique potentielle des bactéries, suggérant une réactivité des bactéries à l'ajout de phosphates.

Le maintien plus important de la cultivabilité dans les biofilms traités aux phosphates pourrait avoir été provoqué (i) par une diminution de la diffusion de la monochloramine dans le biofilm par la formation de dépôts de phosphates, (ii) par des teneurs plus importantes en exopolymères dans les biofilms traités aux phosphates, limitant également la diffusion de la monochloramine et/ou (iii) par une augmentation de la résistance des bactéries.

D'un point de vue taxonomique, les différents désinfectants testés engendrent des changements majeurs dans la composition taxonomique des biofilms. Ces changements sont différents en fonction du temps de désinfection et du type de désinfectant. En effet, la monochloramination des biofilms pendant 1 mois engendre une diminution progressive de la proportion des Protéobactéries dans les biofilms. Une chloration de 7 jours engendre en premier lieu une diminution temporaire de la proportion des Protéobactéries, après 3 jours de désinfection. Par la suite, les Protéobactéries représentent la majorité (80%) de la population chlorée étudiée.

Finalement, parmi les traitements étudiés ici, la désinfection engendre des modifications beaucoup plus marquées que celles engendrées par les phosphates, que ce soit en termes de composition taxonomique des populations ou de composition chimique des biofilms.

En réseau de distribution, les risques de recroissance provoquée par un effet des phosphates sur la physiologie des bactéries sont faibles. Les phosphates peuvent éventuellement favoriser la survie de bactéries telles que les coliformes ou les γ -Protéobactéries. Cependant, ces changements dans les populations sont mineurs par rapport aux changements de composition des biofilms par application de désinfectants et même par rapport aux différences de composition des populations libres et fixées. Le choix du désinfectant employé semble davantage primordial, étant donné que celui-ci va définir quelle population dans le biofilm sera la plus active et donc la plus susceptible de présenter une recroissance. De plus, dans un réseau de distribution corrodé, l'application de phosphates peut diminuer la corrosion, engendrer des diminutions de sites de fixation des bactéries et éventuellement limiter ainsi le développement du biofilm.

Cependant, la littérature rapporte des cas – sans doute extrêmes - où l'application de phosphates a conduit à des augmentations des dépôts de corrosion et des densités bactériennes associées. Il est donc essentiel de contrôler la qualité bactériologique des eaux pendant un traitement aux phosphates, pour s'assurer du bon fonctionnement du traitement.

Chapitre VIII Références Bibliographiques

- Abernathy C.G. et A.K. Camper. 1997. Interactions between pipe materials, disinfectants, corrosion inhibitors, organics and distribution biofilms. In *Water Quality Technology Conference – American Water Works Association* : Denver. 9-12 novembre.
- Abernathy C.G. et A.K. Camper. 1998. The effect of phosphorus based corrosion inhibitors and low disinfectant residuals on distribution biofilms. In *Water Quality Technology Conference - American Water Works Association* : San Diego. 1-4 novembre.
- Adler J. 1976. The sensing of chemicals by bacteria. *Sci. Am.* **234** : 40-47.
- Albrich J.M., C.A. McCarthy et J.K. Hurst. 1981. Biological reactivity of hypochlorous acid: implications for microbicidal mechanisms of leukocyte myeloperoxidase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **78(1)** : 210-4.
- Agbekodo M.K. et B. Legube. 1995. Distribution du CODB d'une eau de surface ayant subi deux types de traitements différents. *Environ. Technol.* **16** : 657-666.
- Alfreider A., J. Perenthaler, R. Amann, B. Sattler, F.-O. Glockner, A. Wille et R. Psenner. 1996. Community analysis of the bacterial assemblages in the winter cover and pelagic layers of a high mountain lake by in situ hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* **62 (6)** : 2138-2144.
- Alouini Z., M. Clément et R. Seux. 1986. Évolution des acides α -aminés sous l'action du chlore dans les eaux de piscine. *T.S.M-Eau.* **2** : 105-109.
- Alouini Z. et R. Seux. 1987. Cinétiques et mécanismes de l'action oxydative de l'hypochlorite sur les acides α -aminés lors de la désinfection des eaux. *Wat. Res.* **21(3)** : 335-343.
- Amann R.I., W. Ludwig et K.-H. Schleifer. 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* **59(1)** : 143-169.
- Amann R.I., B.J. Binder, R.J. Olsen, S.W. Chisholm, R. Devereux et D.A. Stahl. 1990a. Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Appl. Environ. Microbiol.* **56** : 1919-1925.
- Amann R.I., L. Krumholz et D.A. Stahl. 1990b. Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for the determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology. *J. Bacteriol.* **172** : 762-770.
- Amblard C., G. Bourdier, J.F. Carrias, N. Maurin et C. Quiblier. 1996. Évolution saisonnière de la structure des communautés microbiennes dans un réservoir d'eau potable. *Wat. Res.* **30** : 613-624
- APHA (American Public Health Association). 1998. *Standard methods for the examination of water and wastewater*, Washington D.C.
- Appenzeller B. M. R, M. Batté, L. Mathieu, J.-C. Block, V. Lahoussine, J. Cavard et D. Gatel. 2001 Effect of adding phosphate to drinking waters on bacterial growth in slightly and highly corroded pipes. *Wat. Res.* **35(4)** : 248-253.
- Armitage J.P. 1992. Bacterial motility and chemotaxis. *Sci. Progress.* **76** : 451-477.
- Armitage J.P. 1999. Bacterial tactic responses. *Adv. Microb. Physiol.* **41** : 229-289.
- Armon R., J. Starosvetzky, T. Arbel et M. Green. 1997. Survival of *Legionella pneumophila* and *Salmonella typhimurium* in biofilm systems. *Wat. Sci. Technol.* **35(11-12)** : 293-300.
- Astier F. 1996. Caractérisation et contrôle de la flaveur moisie d'une eau de distribution publique. Thèse de doctorat : Université Henri Poincaré-Nancy I, Nancy, France.
- Atlas R.M. et R. Bartha, 1993. *Microbial ecology: fundamentals and application*. The Benjamin/Cumming publishing company : RedWood City. 583 p.

- Awasthi S, U. Pandya, S.S. Singhal, J.T. Lin, V. Thivyanathan, W. E. Seifert, Y.C. Awasthi et G.A. Ansari. 2000. Curcumin-glutathione interactions and the role of human glutathione S-transferase P1-1. *Chem Biol Interact.* 128(1) : 19-38.
- Bachofen R. et A. Schenk. 1998. Quorum sensing autoinducers : do they play a role in natural microbial habitats? *Microbiol. Res.* 153 : 61-63.
- Bade K., W. Manz et U. Szewzyk. 2000. Behavior of sulfate reducing bacteria under oligotrophic conditions and oxygen stress in particle-free systems related to drinking water. *FEMS Microbiol. Ecol.* 332 : 215-223.
- Barbault R. 1990. *Écologie générale – Structure et fonctionnement de la biosphère.* Masson : Paris. 269 p.
- Barcellona M.L. et E. Gratton. 1990. The fluorescence properties of a DNA probe. *Eur. Biophys.* 17 : 315-323.
- Baribeau H. 1995. Évolutions des oxydants et des sous-produits d'oxydation dans les réseaux de distribution d'eau potable de Ville de Laval. Thèse de doctorat : École Polytechnique de Montréal, Montréal, Canada. 444p.
- Barrette W.C., D.M. Hannum, W.D. Wheeler et J.K. Hurst. 1989. General mechanism for the bacterial toxicity of hypochlorous acid: abolition of ATP production. *Biochem.* 28 : 9172-9178.
- Baudry J.-P. (Ed). 1984. *Traitement des eaux.* Le Griffon d'Argile : Sainte-Foy (Qc), Canada. 231p.
- Bauer K., P. Van der Ley, R. Benz et J. Tommassen. 1988. The *pho*-controlled outer membrane protein PhoE does not contain specific binding sites for phosphate or polyphosphates. *J. Biol. Chem.* 263 : 13046-13053.
- Baum B. et J.C. Morris. 1978. Model organic compounds as precursors of chloroform production in the chlorination of water supplies. 175th National Meeting of the American Chemistry Society, Division of environmental chemistry : Anaheim. ENVR-47. pp 144-146. 12-17 mars.
- Benoufella F., A. Gaid et A. Laplanche. 1990. Étude de la chloration d'acides aminés aliphatiques, produits réactionnels et mécanismes. *J. Fr. Hydrol.* 21(1) :41-52.
- Berman D., Rice E.W. et J.C. Hoff. 1988. Inactivation of particle-associated coliforms by chlorine and monochloramine. *Appl. Environ. Microbiol.* 54(2) : 507-512.
- Berg H.C. et R.A. Anderson. 1973. Bacteria swim by rotating their flagellar filaments. *Nature* 245(19) : 380-382.
- Bidnenko E., C. Mercier, J. Tremblay, P. Tailliez et S. Kulakauskas. 1998. Estimation of the state of the bacterial cell wall by fluorescent *in situ* hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* 64 : 3059-3062.
- Bierer T.I. et M.L. Trehy. 1983. Chapitre 5. Dihaloacetonitrile in chlorinated waters. In *Water chlorination : environmental impact and health effects.* 4(1) : 41-52. Jolley R.L., W.A.A. Bruds, J.A. Cotruvo, R.B. Cumming, J.S. Mattice et V.A. Jacobs (Eds). Ann Arbor Science : Ann Arbor.
- Billen G. 1991. 7-Protein degradation in aquatic environments. In *Microbial Enzymes in Aquatic environments.* Chrost R.J. (Ed). pp. 123-143. Springer-Verlag : Berlin.
- Block J.-C. 1982. Mécanismes d'inactivation des micro-organismes par les oxydants. *Techn. Sci. Méth. Eau.* 11 : 521-524.
- Block J.-C., K. Haudidier, J.-L. Paquin, J. Miazga et Y. Lévi. 1993. Biofilm accumulation in drinking water distribution systems. *Biofouling.* 6 : 333-343.
- Block J.-C., I. Sibille, D. Gatel, D.J. Reasoner, B. Lykins et R.M. Clark. 1997. Biodiversity in drinking water distribution system: a review. In *The Microbial quality of Water.* D.W. Sutcliffe (Ed).. IWSA – FBE : Londres. pp 64-70. 12-13 décembre.
- Boffardi B.P. 1991. The chemistry of polyphosphate. *Advances in water analysis and treatment. Part II - American Water Works Association* : Orlando. pp. 1293-1304. 10-14 Novembre.
- Boffardi B.P. 1993. The chemistry of polyphosphate. *Material Performance.* 32(8) : 50-53.
- Boireau A., M. Benezet-Toulze, G. Randon et J. Cavard. 1997. Limitation de la solubilisation du plomb par ajout de produit filmogène. Transposition d'une étude sur pilote à un réseau réel. *TSM l'Eau.* 5 : 63-72.

- Bouwer E.J. et P.B. Crowe. 1988.** Biological processes in drinking water treatment. *J. Am. Water Works Assoc.* **80(9)** : 86-93
- Briganti L.A. et S.C. Wacker. 1995.** *Fatty Acid Profiling of environmental bacteria for drinking water utilities.* AWWARF (Ed). AWWARF-AWWA : Denver.89p.
- Brown M.L., H.C. Aldrich et J.J. Gauthier. 1995.** Relationship between glycocalyx and povidone-iodine resistance in *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* **61** : 187-193.
- Brown M.R.W. et P. Gilbert. 1993.** Sensitivity of biofilm to antimicrobial agents. *J. Appl. Bacteriol. Sympos. Suppl.* **74** : 87S-97S.
- Brown B.J. et L.G. Leff. 1996.** Comparison of fatty acid methyl ester analysis with the use of API 20^E and NFT strips for identification of aquatic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **62(6)** : 2183-2185.
- Brunet R.C. et K. B. Astin. 1998.** Variation in phosphorus flux during a hydrological season: the river Adour. *Wat. Res.* **32(3)** : 547-558.
- Bryan B.A., R.J. Linhardt et L. Daniels. 1986.** Variations in composition and yield of exopolysaccharides produced by *Klebsiella pneumoniae* strain K32 and *Acinetobacter calcoaceticus* BD4. *Appl. Environ. Microbiol.* **51(6)** : 1304-1308.
- Bryers J.D. 1987.** Biologically active surfaces: processes governing the formation and the persistence of biofilms. *Biotechnol. Prog.* **3(2)** : 57-68.
- Bryers J.D. et W.G. Characklis. 1982.** Processes governing primary biofilm formation. *Biotechnol. Bioeng.* **24** : 2451-2476.
- Brzoska P., H. Schweizer, M. Argast et W. Boos. 1987.** Ugp-dependent transport system for sn-glycero 3-phosphate of *Escherichia coli*. In *Phosphate metabolism and cellular regulation in microorganisms.* pp.170-177. Torriani-Gorini A., F.G. Rothman, S. Silver, A. Wright et E. Yagil (Eds). ASM Press : Wahington D.C.
- Brzoska P., M. Rimmele, K. Brzostek et W. Boos. 1994.** The Ugp paradox: the phenomenon that glycerol-3-phosphate exclusively transported by *Escherichia coli* Ugp system, can serve as a source of phosphate but not as a sole source of carbon is due to trans inhibition of Ugp-mediated transport by phosphate. In *Phosphate in microorganisms: cellular and molecular biology.* pp.30-36 Torriani-Gorini A., E. Yagil et S. Silver (Eds.). ASM press : Washington D.C.
- Buffle J., R.R. De Vitre, D. Perret et G.G. Leppard. 1989.** Physico-chemical characteristics of a colloidal iron phosphate species formed at the oxic-anoxic interface of a eutrophic lake. *Geochim. Cosmochim. Acta.* **53** : 399-408.
- Busscher H.J. et A.H. Weerkamp. 1987.** Specific and non-specific interactions in bacterial adhesion to solid substrata. *FEMS Microbiol. Rev.* **46** : 165-173.
- Butterfield P.W., B.D. Ellis, A.K. Camper et W.L. Jones. 1997.** Evaluation of growth kinetics of model drinking water system biofilm cells utilizing humic substances as the primary carbon source. In *Water Quality Technology Conference - American Water Works Association* : Denver. 9-12 novembre.
- Camper A.K. 1995.** Factors influencing biofilm regrowth in drinking water distribution systems. Thèse de doctorat : Montana State University, Bozeman, Etats-Unis. 178p.
- Camper A.K., L. Goodrum et W. Jones. 1997.** Comparison of chlorine and monochloramine for the control of biofilm in model distribution system biofilms. In *Water Quality Technology Conference - American Water Works Association* : Denver. 9-12 novembre.
- Camper A. K., P.M. Huck, W.B. Anderson, P. Butterfield, B. Ellis et W. Jones. 1998.** Constituents of biodegradable organic matter that support biofilm development. In *Water Quality Technology Conference - American Water Works Association* : San Diego. 1-4 novembre.
- Chan R., J.S. Lam et J.W. Costerton. 1984.** Influence of culture conditions on expression of the mucoid mode of growth of *Pseudomonas aeruginosa*. *J.Clin. Microbiol.* **19** : 8-16.

- Characklis W.G. 1981.** Bioengineering report. Fouling biofilm development: a process analysis. *Biotech. Bioengeer.* **23** : 1923-1960.
- Characklis W.G. et K.C. Marshall (Eds). 1990.** Biofilms. John Wiley and sons : New York. 796p.
- Charlton J. 1999.** Mechanisms of biofilm penetration and removal. In *Water Quality Technology Conference - American Water Works Association* : Tampa. : 31 Octobre-3 novembre.
- Chen C.I., T. Griebe et W.G. Characklis. 1993.** Biocide action of monochloramine on biofilm systems of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biofouling.* **7** : 1-17.
- Chen G., S.V. Kagwade, G.E. French, T.E. Ford, R. Mitchell et C.R. Clayton. 1996.** Metal ion and exopolymer interaction: a surface analytical study. *Corrosion.* **52(12)** : 891-899.
- Chen X. et P.S. Stewart. 1996.** Chlorine penetration into artificial biofilm is limited by a reaction-diffusion interaction. *Environ. Sci. Technol.* **30** :2078-2083.
- Chesney J.A., J.W. Eaton et J.R. Mahoney. 1996.** Bacterial glutathione defense against chlorine compounds. *J. Bacteriol.* **178(7)** : 2131-2135.
- Cochran W.L., S.-J. Suh, G.A. McFeters et P.S. Stewart. 2000.** Role of RpoS and AlgT in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm resistance to hydrogen peroxide and monochloramine. *J. Appl. Microbiol.* **88** : 546-553.
- Cohen Y.K., C.G. Abernathy et A.K. Camper. 1999.** Polyphosphates – The solution to distribution system low residuals, biofilm and pipe corrosion. In *Water Quality Technology Conference - American Water Works Association* : Tampa. 31 Octobre-3 novembre.
- Cordonnier J. 1997.** Protection des réseaux de distribution par les inhibiteurs de corrosion. Choix et Optimisation. *TSM l'Eau* **5** : 75-82.
- Costerton J.W. 1999.** Chapter 5 – The role of bacterial exopolysaccharides in nature and disease. *J. Induc. Microbiol. Biotech.* **22** : 551-563.
- Costerton J.W., R.T. Irvin et K.J. Cheng. 1981.** The bacterial glycocalyx in nature and disease. *Ann. Rev. Microbiol.* **35** : 299-324.
- Costerton J.W., Z. Lewandowski, D.E. Caldwell, D.R. Korber et H.M. Lappin-scott. 1995.** Microbial biofilms. *Annu. Rev. Microbiol.* **49** : 711-745.
- Cowie G.L. et J.I. Hedges . 1992.** Sources and reactivities of amino acids in a coastal marine environment. *Limnol. Oceanogr.* **37(4)** : 703-724.
- Crane A., P. Kovacic et E.D. Kovacic. 1980.** Volatile halocarbon production from the chlorination of marine algal byproducts, including D-mannitol. *Environ. Sci. Technol.* **14(11)** : 1371-1374.
- Crespi S. et J. Ferrà. 1997.** Outbreak of Legionellosis in a tourist complex in Lanzarote concomitant with a treatment of water system with megadoses of polyphosphates. *Wat. Sci. Technol.* **35(11-12)** : 307-309.
- Crissot-Laruade M. 1999.** Évolution de la qualité de l'eau dans les réseaux de distribution d'eaux thermales: formation des biofilms et impact des désinfectants. Thèse de doctorat : Université de Poitiers, Poitiers, France. 182p.
- Crissot-Laurade M., N. Merlet et B. Legube. 1999.** Biofilm formation in distribution systems supplied with oligotrophic water: the case of an hydropathic establishment. *J. Eur. Hydrol.* **30(2)** : 201-219.
- Croué J.-P. 1987.** Contribution à l'étude de l'oxydation par le chlore et l'ozone d'acides fulviques naturels extraits d'eaux de surface. Thèse de doctorat : Université de Poitiers, Poitiers, France. 139 p.
- Croué J.P., B. Martin-Mousset, E. Lefebvre, A. Deguin et B. Legube. 1997.** Impact des traitements de potabilisation sur le CODB et la distribution des substances humiques et non humiques de la matière organique naturelle. *Rev. Sci. Eau.* **10(1)** : 63-81.
- Crump. B.C., E.V. Armbrust et J.A. Baross. 1999.** Phylogenetic analysis of particle-attached and free-living bacterial communities in the Columbia river, its estuary and the adjacent coastal ocean. *Appl. Environ. Microbiol.* **65(7)** : 3192-3204.

- Davis B.D., S.M. Luger et P.C. Tai. 1986. Role of ribosome degradation in the death of starved *Escherichia coli* cells. *J. Bacteriol.* **166** : 439-445.
- Davies D.G., M.R. Parsek, J.P. Pearson, B.H. Iglewski, J.W. Costerton et E.P. Greenberg. 1998. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science*. **280** (10 avril 1998) : 295-298.
- Davies D.G., A.M. Chakrabarty et G.G. Geesey. 1993. Exopolysaccharide production in biofilms: substratum activation of alginate gene expression by *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**(4) : 1181-1186.
- De beer D., P. Stoodley, F. Roe et Z. Lewandowski. 1994. Effects of biofilm structures on oxygen distribution and mass transport. *Biotech. Bioeng.* **43** : 1131-1138.
- Decho A.W. et G.R. Lopez. 1993. Exopolymer microenvironments of microbial flora: multiple and interactive effects on trophic relationships. *Limnol. Oceanogr.* **38**(8) : 1633-1645.
- de Kievit T.R., R. Gillis, S. Marx, C. Brown et B.H. Iglewski. 2001. Quorum-sensing genes in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: their role and expression patterns. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**(4) : 1865-1873.
- De Laat J., N. Merlet et M. Doré. 1982. Chloration de composés organiques : demande en chlore et réactivité vis-à-vis de la formation des trihalométhanes, incidence de l'azote ammoniacal. *Wat. Res.* **16** : 1437-1450.
- DeLong E.F. 1993. Chapter 33. Single-cell identification using fluorescently labeled, ribosomal RNA-specific probes. In *Handbook methods in Aquatic Microbial Ecology*. pp. 285-294. Kemp P.F., B.F. Sherr, E.B. Sherr, J.J. Cole (Eds). Lewis : Boca Raton.
- Dennis W.H., V.P. Olivieri et C.W. Krusé. 1979. The reaction of nucleotides with aqueous hypochlorous acid. *Wat. Res.* **13** : 357-362.
- Desjardins R., L. Jutras et M. Prévost. 1997. Évolution de la qualité de l'eau dans le réseau de distribution de la ville de Montréal. *Rev. Sci. Eau.* **2** : 167-184.
- Deslouis C., I. Frateur, B. Tribollet, L. Kiene et Y. Lévi. 1998. Corrosion et demande en chlore dans un système de distribution d'eau de fonte. In *Journées internationales de l'eau (JIE)-ESIP* : Poitiers. Conférence 66. 23-25 septembre.
- Dice J. 1985. Denver's seven decades of experience of chloramination. *J. Am. Water Works Assoc.* **77** : 34-37.
- Donlan R.M. et W.O. Pipes. 1988. Selected drinking water characteristics and attached microbial population density. *J. Am. Water Works Assoc.* **80** : 70-76.
- Doré M. 1989. Chimie des oxydants et traitements des eaux. Technique de documentation Lavoisier. 505p.
- Dossier-Berne F. 1994. Analyse des acides aminés dans les eaux - développement et applications : incidence sur la consommation en chlore et la teneur en matière organique biodégradable des eaux potables. Étude du mécanisme d'ozonation des peptides. Thèse de doctorat : Poitiers, Poitiers, France. 180 p.
- Dossier-Berne F., B. Panais, N. Merlet, B. Cauchi et B. Legube. 1994. Analyse des acides aminés dissous totaux dans les eaux à potabiliser en cours de traitements. *Environ. Technol.* **15** : 901-916.
- Dott W. 1983. Qualitative and quantitative determination of bacterial populations in aquatic habitats. 6. Communication: bacterial regrowth and drinking water. *Zbl. Bakt. Hyg.* **78**(3) : 263-279. (en allemand).
- Dott W. et D. Schoenen. 1985. Qualitative and quantitative determination of bacterial populations in an aquatic environment. 7. Development of bacterial growth on raw materials exposed to potable water. *Zentralbl. Bakteriologie. Mikrobiol. Hyg.* **180**(5-6) : 436-447. (en allemand).
- Dukan S. et D. Touati. 1996. Hypochlorous acid stress in *Escherichia coli*: resistance, DNA damage, and comparison with hydrogen peroxide stress. *J. Bacteriol.* **178** : 6145-6150.
- Ekhholm P. et K. Krogerus. 1998. Bioavailability of phosphorus in purified municipal wastewaters. *Wat. Res.* **32**(2) : 343-351.
- El Morer A. 1992. Contribution à l'étude cinétique de la chloration des acides aminés libres et combinés. Thèse doctorat : Université de Tétouan, Tétouan, Maroc.

- EPA. 1999. EPA guidance manual: Alternative Disinfectants and Oxidants. **Avril**.
- Fass S., M.L. Dincher, D.J. Reasoner, D. Gatel et J.-C. Block. 1996. Fate of *Escherichia coli* experimentally injected in a drinking water distribution pilot system. *Wat. Res.* **30(9)** : 2215-2221.
- Fegatella F., J. Lim, S. Kjelleberg et R. Cavicchioli. 1998. Implications of rRNA Operon Copy Number and Ribosome Content in the Marine Oligotrophic Ultramicrobacterium *Sphingomonas* sp. Strain RB2256. *Appl. Environ. Microbiol.* **64 (11)**: 4433-4438.
- Flemming H.-C. 1995. Sorption sites in biofilms. *Wat. Sci. Technol.* **32(8)** : 27-33.
- Francko D.A. et R.T. Health. 1979. Fonctionnaly distinct classes of complex phosphorus compounds in lake water. *Limnol. Oceanogr.* **24(3)** : 463-473.
- Francko D.A. et R.T. Health. 1983. Chapter 24 – Abiotic uptake and photodependent release of phosphate from high-molecular-weight humic-iron complexes in bog lakes. In *Aquatic and terrestrial humic materials*. Christman R.F. et E.T. Gjessing (Eds). Ann Arbor Science : Ann Arbor. 538 p.
- Fransolet G., G. Villiers et W.J. Masschelein. 1985. Influence of temperature on bacterial development in waters. *Oz. Sci. Engin.* **7(3)** : 205-207.
- Frateur I., C. Deslouis, I. Kiene, Y. Levi et B. Tribollet. 1999. Free chlorine consumption induced by cast iron corrosion in drinking water distribution systems. *Wat. Res.* **33(8)** : 1797-1790.
- Frolund B., P.A. Suci, S. Langille, R.M. Weiner et G.G. Geesey. 1996. Influence of protein conditioning films on binding of a bacterial polysaccharide adhesin from *Hyphomonas* MHS-3. *Biofouling.* **10** : 17-30.
- Garnerone A., M. Rumeau et M. Renaud. 1982. Détermination du coefficient de transfert global d'un agent antiseptique à travers une membrane hydrophobe. *Rev. Sci. Eau.* **1(1)** : 31-39.
- Gauthier K., M. Prévost, J. Mailly et A. Rompré. 1996. Impact de la teneur en acides aminés sur la stabilité microbiologique de l'eau potable : essais en réacteurs annulaires. In *Natural organic matter, workshop* : Poitiers. 18-19 septembre.
- Gauthier V. 1998. Les particules dans les réseaux d'eau potable : caractérisation et impact sur la qualité de l'eau distribuée. Thèse de Doctorat : Université Henri Poincaré-Nancy I, Nancy, France. 189p.
- Geldreich E.E. (Ed). 1996. *Microbial quality of water supply in distribution systems*. CRC press : Boca raton. 504 p.
- Gerdes P. et S. Kunst. 1998. Bioavailability of phosphorus as a tool for efficient P reduction schemes. *Wat. Sci. Tech.* **37(3)** : 241-247.
- Gerke J. et R. Hermann. 1992. Adsorption of orthophosphate to humic-Fe-complexes and to amorphous Fe-oxide. *Z. Pflanzenernaehr. Bodenkd.* **155** : 233-236.
- Giovannoni S.J., E.F. Delong, G.J. Olsen et N.R. Pace. 1988. Phylogenetic group-specific oligonucleotide probes for identification of single microbial cells. *J. Bacteriol.* **170** : 720-726.
- Glöckner F.-O., R. Amann, A. Alfreider, J. Pernthaler, R. Psenner, K. Trebesius et K.-H. Schleifer. 1996. An *in situ* hybridization protocol for detection and identification of planktonic bacteria. *Syst. Appl. Microbiol.* **19** : 403-406
- Gottschalk G. (Ed). 1986. Bacterial metabolism. Springer-Verlag : New York. 359 p.
- Gould J.P., J.T. Richards et M.G. Miles. 1984a. The kinetics and primary products of uracil chlorination. *Wat. Res.* **18(2)** : 205-212.
- Gould J.P., J.T. Richards et M.G. Miles. 1984b. The formation of stable organic chloramines during the aqueous chlorination of cytosine and 5-methylcytosine. *Wat. Res.* **18(8)** : 991-999.
- Grayman W.M., L.A. Rossman et E.E. Geldreich. 2000. Chapter 9 – Water quality In *water distribution systems handbook*. pp.9-9.24. Mays L.W. (Ed) McGraw-Hill : New York.
- Greenberg E.P. 1997. Quorum sensing in gram-negative bacteria. *ASM News.* **63(7)** : 371-376.

- Gremm T.J. et L.A. Kaplan. 1998.** Dissolved carbohydrate concentration, composition, and bioavailability to microbial heterotrophs in stream water. *Acta hydrochim. Hydrobiol.* **26(3)** : 167-171.
- Gremm, T. J. et L.A. Kaplan. 1997.** Dissolved carbohydrates in streamwater determined by HPLC and pulsed amperometric detection. *Limnol. Oceanogr.* **42(2)** : 385-393.
- Griebe T., C.I. Chen, R. Srinivasan et P.S. Stewart. 1994.** Chapter 9 – Analysis of biofilm disinfection by monochloramine and free chlorine. In *Biofouling and biocorrosion in industrial water systems*. pp. 151-161. Geesey G.G., Z. Lewandowski et H.-C. Flemming (Eds) CRC press : Boca Raton. 297 pages.
- Haas C.N. et R.S. Engelbrecht. 1980.** Physiological alterations of vegetative microorganisms resulting from chlorination. *J. WPCF.* **52(72)** : 1976-1989.
- Hahn M.W. et M.G. Höfle. 2000.** Flagellate predation on a bacterial model community : Interplay of size-selective grazing, specific bacterial cell size, and bacterial community composition. *Appl. Environ. Microbiol.* **65 (11)** : 4863-4872.
- Hardoyo, K. Yamada, A. Muramatsu, Y. Anbe, J. Kato et H. Ohtabe. 1994.** Molecular genetics of polyphosphate accumulation in *Escherichia coli*. In *Phosphate in microorganisms : cellular and molecular biology*. pp. 209-215. Torriani-Gorini A., E. Yagil, S. Silver (Eds.). ASM press : Washington D.C.
- Harold F.M. 1966.** Inorganic polyphosphates in biology : structure, metabolism, and function. *Bacteriol. Rev.* **30** : 772-785.
- Hejzlar J. et J. Chudoba. 1986.** Microbial polymers in the aquatic environment. I : Production by activated sludge microorganisms under different conditions. *Wat. Res.* **20(10)** : 1209-1216.
- Herrington C.S. 1998.** Densitified...In situ hybridisation. *J.Clin. Pathol.* **51** : 8 – 13.
- Herson D.S., B. McGonigle, M.A. Payer et K.H. Baker. 1987.** Attachment as a factor in the protection of *Enterobacter cloacae* from chlorination. *Appl. Environ. Microbiol.* **53(5)** : 1178-1180.
- Horan N.J. et C.R. Eccles. 1986.** Purification and characterization of extracellular polysaccharide from activated sludges. *Wat. Res.* **20** : 1427-1432.
- Horth H. 1989.** Identification of mutagens in drinking water. *Aqua.* **38** : 80-100.
- Holt D.M., V. Gauthier, N. Merlet et J.-C. Block. 1998.** Importance of disinfectant demand of materials for maintaining residuals in drinking water distribution systems. *Wat. Supply.* **16(3/4)** : 181-191.
- Huang C.H., F.P. Yu, G.A. McFeters et P.S. Stewart. 1995.** Nonuniform spatial patterns of respiratory activity within biofilms during disinfection. *Appl. Environ. Microbiol.* **61(6)** : 2252-2256.
- Hureiki L. 1993.** Étude de la chloration et de l'ozonation d'acides aminés libres et combinés en milieu aqueux dilué. *Thèse de doctorat* : Université de Poitiers, Poitiers, France. 141 p.
- Ingols R.S., H.A. Wyckoff, T.W. Kethley, H.W. Hodgden, E.L. Fincher, J.C. Hildebrand et J.E. Mandel. 1953.** Bactericidal studies of chlorine. *Indus. Engin. Chem.* **45(5)** : 996-1000.
- Ingols R.S. 1958.** The effect of monochloramine and chromate on bacterial chromosomes. *Public Health Works.* **86** : 105-106.
- Jacangelo J.P. et V.P. Olivieri. 1985.** Aspects of the mode of action of monochloramine. In *Water chlorination: Chemistry, Environmental impact and Health effect.* **5** : 575-586. Jolley R.L., W.A. Brungs, R.B. Cumming, et V.A. Jacobs (Eds). Lewis : Chelsea (Mi).
- Jacangelo J.G., V.P. Olivieri et K. Kawata. 1987.** Mechanism of inactivation of microorganisms by combined chlorine. AWWA Res. Found. : Denver.
- Jacangelo J.G., V.P. Olivieri et K. Kawata. 1991.** Investigating the mechanism of inactivation of *Escherichia coli* B by monochloramine. *J. Am. Water Works Assoc.* **5** : 80-87.
- Jadas-Hécart A. 1989.** Contribution à l'étude de la demande en chlore à long terme d'eau eau potable. Modélisation et identification des précurseurs organiques. Thèse de Doctorat : Université de Poitiers, Poitiers, France. 152 p.

- Jahn A. et P.H. Nielsen. 1995.** Extraction of extracellular polymeric substances (EPS) from biofilms using a cation exchange resin. *Wat. Sci. Technol.* **32(8)** :157-164.
- Joret J.C., Y. Levi et Gilbert M. 1989.** The measurement of bioeliminable dissolved organic carbon (BDOC) : a tool in water treatment. *Wat. Supply.* **7** : 1-5.
- Jones D.A. 1996.** Principles and prevention of corrosion. Prentice-Hall : Upper Saddle River, New Jersey. 572 p.
- Kadner R.J., D.M. Shattuck-eidens et L.A. Weston. 1987.** Exogenous induction of the uhp sugar phosphate transport system. In *Phosphate metabolism and cellular regulation in microorganisms*. pp. 178-183. Torriani-Gorini A., F.G. Rothman, S. Silver, A. Wright et E. Yagil (Eds). ASM Washington D.C.
- Kadner R.J., M.D. Island, T.J. Merkel et C.A. Webber 1994.** Transmembrane control of the Uhp sugar-phosphate transport system: the sensation of Glu6P. In *Phosphate in microorganisms : cellular and molecular biology*. pp.78-84 Torriani-Gorini A., E. Yagil et S. Silver (Eds.). ASM press : Washington D.C.
- Kalmbach S., W. Manz et U. Szewzyk. 1997a.** Isolation of new bacterial species from drinking water biofilms and proof of their *in situ* dominance with highly specific 16S rRNA probes. *Appl. Environ. Microbiol.* **63** : 4164-4170.
- Kalmbach S., W. Manz et U. Szewzyk. 1997b.** Dynamics of biofilm formation in drinking water: phylogenetic affiliation and metabolic potential of single cells assessed by formazan reduction and *in situ* hybridization. *FEMS Microbiol. Ecol.* **22** : 265-279.
- Kalmbach S., 1998.** Polyphasic characterization of the microbial population of drinking water biofilms. Thèse de doctorat : Université de Berlin, Berlin, Allemagne. 125p.
- Kaplan L.A. et C. Volk, 1994.** The chemical composition of biodegradable dissolved organic carbon. In *Water Quality and Technology Conferences - American Water Works Association* : San Francisco. 6-10 novembre.
- Kapuscinski J. et W. Szer. 1979.** Interactions of 4',6-diamidino-2-phénylindole with polynucleotides. *Nucleic Acid Res.* **6** : 3519-3534.
- Kato J., A. Ito, T. Nikata et H. Ohtake. 1992.** Phosphate taxis in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **174(15)** : 5149-5151.
- Kato J., A. Y. Sakai, T. Nikata, A. Masduki et H. Ohtake. 1994.** Phosphate taxis and its regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. In *Phosphate in microorganisms: cellular and molecular biology*. p.315-317. Torriani-Gorini A., E. Yagil et S. Silver (Eds.). ASM press : Washington D.C.
- Kerneš A., F. Nakache , A. Deguin et M. Feinberg. 1995.** The effect of water residence time on the biological quality in a distribution network. *Wat. Res.* **29(7)** : 1719-1727.
- Kiéné L., W. Lu et Y. Lévi. 1996.** Relative importance of phenomena responsible for the chlorine consumption in drinking water distribution systems. *Wat. Sci. Technol.* **38(6)** : 219-227.
- Kinner N.E., R.W. Harvey, K. Blakeslee, G. Novarino et L.D. Meeker. 1998.** Size-selective predation on groundwater bacteria by nanoflagellates in an organic-contaminated aquifer. *Appl. Environ. Microbiol.* **64(2)** : 618-625.
- Kirmeyer G.J. et G.S. Logsdon. 1983.** Principles of internal corrosion and corrosion monitoring. *J. Am. Wat. Works. Ass.* **75** : 78-83.
- Kirmeyer G.J., G.W. Foust, G.L. Pierson, J.J. Simmler et M.W. LeChevallier (Eds). 1993.** *Optimizing chloramine treatment*. AWWA Res. Found. et Am. Water Works Assoc. : Denver.334 p.
- Kogure K., U. Simidu et N. Taga. 1984.** An improved direct viable count method for aquatic bacteria. *Arch. Hydrobiol.* **25** : 415-420.
- Kool J.L., J.C. Carpenter et B.S. Fields. 1999.** Effect of monochloramine disinfection of municipal drinking water on risk of nosocomial Legionnaires' disease. *The Lancet.* **353 (23 January)**: 272-277
- Korber D.R., A. Choi, G.M. Wolfaardt, S.C. Ingham et D.E. Caldwell. 1997.** Substratum topography influences susceptibility of *Salmonella enteridis* biofilms to sodium phosphate. *Appl. Environ. Microbiol.* **63(9)** : 3352-3358.

- Kornberg A. et C.D. Fraley. 2000. Inorganic polyphosphate: a molecule fossil come to life. *ASM News*. **66 (5)** : 275-280.
- Kornberg A. 1994. Inorganic polyphosphates: a molecular fossil come to life. In *Phosphate in microorganisms: cellular and molecular biology*. pp. 204-208. Torriani-Gorini A., E. Yagil et S. Silver (Eds.). ASM press : Washington D.C.
- Koudjonou B.K., Prévost M. et P. Lafrance. 1997. Assessing of the impact of chlorination on the composition of a drinking water biofilm. In *Water Quality Technology Conference - American Water Works Association* : Denver. 9-12 novembre
- Koudjonou B.K., Prévost M. et P. Lafrance. 1998a. Chlorine versus chloramine: impact on the composition of a drinking water biofilm. In *Water Quality Technology Conference*. American Water Works Association : San Diego. 1-4 novembre
- Koudjonou B.K., Prévost M. et P. Lafrance. 1998b. Impact du chlore et de la monochloramine sur la composition d'un biofilm d'eau potable. In *Journées Internationales de l'Eau (JIE) - ESIP* : Poitiers. 23-25 Septembre.
- Kulaev I.S. (Ed) 1979. The biochemistry of inorganic polyphosphate. John Wiley and sons : Chichester. 253 p.
- Kulaev I.S. 1994. Inorganic polyphosphate functions at various stages of cell evolution. *J. Biol. Phys.* **20** : 255-273.
- Kulaev I. et T. Kulakovskaya. 2000. Polyphosphate and phosphate pump. *Annu. Rev. Microbiol.* **54** : 709-734.
- Kulaev I., V. Vagabov et T. Kulakovskaya. 1999. Review : New aspects of inorganic polyphosphate metabolism and function. *J. Biosc. Bioeng.* **88(2)** : 111-129.
- Kuznetsov S.I., G.A. Dubinina et N.A. Lapteva. 1979. Biology of oligotrophic bacteria. *Ann. Rev. Microbiol.* **33**: 377-387.
- Lappin-Scott H.M. et J.W. Costerton. 1989. Bacterial biofilm and surface fouling. *Biofouling* **1** : 323-342.
- Lathe R. 1985. Synthetic oligonucleotide probes deduced from amino acid sequence data. Theoretical and practical consideration. *J. Mol. Biol.* **83** : 11-12.
- Laurent P. et P. Servais. 1995. Fixed bacterial biomass estimated by potential exoproteolytic activity. *Can. J. Microbiol.* **41(8)** : 749-752.
- Lawrence J.R., D.R. Korber, B.D. Hoyle, J.W. Costerton et D.E. Caldwell. 1991. Optical sectioning of microbial biofilms. *J. Bacteriol.* **173(20)** : 6558-6567.
- LeChevallier M.W. 1990. Coliform regrowth in drinking water: a review. *J. Am. Water Works Ass.* **82**: 74-86.
- LeChevallier M.W. 1997. Disinfection of biofilms in drinking water systems. In *Water Quality and Technology Conference - American Water Works Association* : Denver . 9-12 novembre.
- LeChevallier M.J. et G.A. McFeters. 1985. Enumerating injured coliforms in drinking water. *J. Am. Water Works Assoc.* **77(6)** : 81-87.
- LeChevallier M.W., T.M. Babcock et R.G. Lee. 1987. Examination and characterization of distribution system biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* **52(12)** : 2714-2724.
- LeChevallier M.W., C.D. Cawthon et R.G. Lee. 1988a. Inactivation of biofilm bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **54(10)** : 2492.
- LeChevallier M.W., C.D. Cawthon et R.G. Lee. 1988b. Factors promoting survival of bacteria in chlorinated water supplies. *Appl. Environ. Microbiol.* **54(3)** : 649-654.
- LeChevallier M.W., C.D. Lowry et R.G. Lee. 1990. Disinfecting biofilms in a model distribution system. *J. Am. Water Works Assoc.* **82(7)** : 87-99.
- LeChevallier M.W., W. Schulz et R.G. Lee. 1991. Bacterial nutrients in drinking water. *Appl. Environ. Microbiol.* **57** : 857-862.

- LeChevallier M.W., C.D. Lowry, R.G. Lee et D.L. Gibbon. 1993.** Examining the relationship between iron corrosion and the disinfection of biofilm bacteria. *J. Am. Water Works Assoc.* **85(7)** : 111-123.
- LeChevallier M.W., N.J. Welch et D.B. Smith. 1996.** Full-scale studies of factors related to coliform regrowth in drinking water. *Appl. Environ. Microbiol.* **62(7)** : 2201-2211.
- Leclerc H., J.L. Gaillard et M. Simonet (Eds). 1995.** *Microbiologie générale : la bactérie et le monde bactérien.* Doin : Vélizy.
- Le Cloirec-Renaud C. 1984.** Analyse et évolution de la micropollution organique azotée dans les stations d'eau potable : Effet de la déchloration sur les acides aminés. Thèse de doctorat : Université de Rennes, Rennes, France.
- Leenheer J.A.. 1981.** Comprehensive approach to preparative isolation and fractionation of dissolved organic carbon from natural waters and wastewaters. *Environ. Microbiol. Technol.* **15(5)** : 578-587.
- Legrand L. et P. Leroy (Eds). 1995.** Prévention de la corrosion et de l'entartrage dans les réseaux de distribution d'eau. CIFEC : Neuilly-sur-Seine. 355 p.
- Legube B., F. Xiong, J.P. Croué et M. Doré 1990.** Étude sur les acides fulviques extraits d'eaux superficielles françaises, extraction, caractérisation et réactivité au chlore. *Rev. Sci. Eau.* **3** : 399-424.
- Leis A., R.N. Lamb, B. Gong et R. P. Schneider. 2000.** Evidence for the contribution of humic substances to conditioning films from natural waters. *Biofouling* **15(1-3)** : 207-220.
- Lewandowski Z., P. Stoodley, S. Altobelli et E. Fukushima. 1994.** Hydrodynamics and kinetics in biofilm systems – recent advances and new problems. *Wat. Sci. Technol.* **29(10-11)** : 223-229.
- Leyval C., C. Arz, J.C. Block et M. Rizet. 1984.** *Escherichia coli* resistance to chlorine after successive chlorinations. *Environ. Technol. Letters.* **5** : 359-364.
- Lin S. et R.M. Carlson. 1984.** Susceptibility of environmentally important heterocycles to chemical disinfection: reactions with aqueous chlorine, chlorine dioxide, and chloramine. *Environ. Sci. Technol.* **18(10)** : 743-748.
- Little B.J., R.I. Ray, J. Jones-Meehan, C.C. Lee et F. Mansfield. 1999.** Spatial relationship between marine bacteria and localized corrosion on polymer coated steel. *Biofouling* **13(4)** : 301-321.
- Lisle J.T., S.C. Broadaway, A.M. Prescott, B.H. Pyle, C. Fricker et G.A. McFeters. 1998.** Effects of starvation on physiological activity and chlorination disinfection resistance in *Escherichia coli* O157 : H7. *Appl. Environ. Microbiol.* **64** : 4658-4662.
- Llobet-Brossa E., R. Rossello-Mora et R. Amann. 1998** Microbial community composition of wadden sea sediments as revealed by fluorescence in situ hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* **64 (7)** : 2691-2697.
- Lovley D.R. 1995.** Microbial reduction of iron, manganese, and other metals. *Adv. Agron.* **54** : 175-231.
- Lyons J.L., J. Pontes et P. Karalekas. 1995.** Optimizing corrosion control for lead and copper using phosphoric acid and sodium hydroxide. In *Water Quality Technology Conferences - American Water Works Association* : New Orleans. 12-16 novembre.
- Lytle D.A., M.R. Schock et T.J. Sorg. 1996.** Controlling lead corrosion in the drinking water of a building by orthophosphate and silicate treatment. *J. New Eng. Water Works Assoc.* **110** : 202-209.
- Madec C., B. Trebern, J. Courtoit-Coupez. 1985.** Comportement des acides aminés dissous du milieu marin après injection du chlore. *Wat. Res.* **19(9)** : 1171-1178.
- Maier S.K., S. Scherer et M.J. Loessner. 1999.** Long-chain polyphosphate causes cell lysis and inhibits *Bacillus cereus* septum formation, which is dependent on divalent cations. *Appl. Environ. Microbiol.* **65(9)** : 3942-3949.
- Maier R.M. (Ed) 2000.** *Environmental Microbiology.* Academic Press : San Diego. 585 p.
- Manz W., R. Amann, W. Ludwig, M. Wagner et K.H. Schleifer. 1992.** Phylogenetic oligonucleotide probes for the major subclasses of *Proteobacteria* : problems and solutions. *Syst. Appl. Microbiol.* **15** : 593-600.

- Manz W., U. Szewzyk, P. Ericsson, R. Amann, K.-H. Schleifer et T.-A. Stenström. 1993. *In situ* identification of bacteria in drinking water and adjoining biofilms by hybridization with 16S and 23S rRNA-directed fluorescent oligonucleotide probes. *Appl. Environ. Microbiol.* **59** : 2293-2298.
- Maris P. 1995. Modes of action of disinfectants. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* **14(1)** : 47-55.
- Martin G. 1987. 3. Phosphore. In *Point sur l'épuration et le traitement des effluents (eau air)*. 29 p. Lavoisier : Paris.
- Marshall K.C. 1985. Bacterial adhesion in oligotrophic habitats. *Microbiol. Sci.* **2** : 321-326.
- Marshall K.C., R. Stout et R. Mitchell. 1971. Mechanisms of the initial events in the sorption of marine bacteria to surfaces. *J. Gen. Microbiol.* **68** : 337-348.
- Marshall V.M., E.X. Cowie et R.S. Moreton. 1995. Analysis and production of two exopolysaccharides from *Lactococcus lactis* subsp. *Cremoris* LC330. *J. Dairy Res.* **62** : 621-628.
- Mathieu L., J.-L. Paquin, J.-C. Block, G. Randon, J. Maillard et D. Reasoner. 1992. Paramètres gouvernant la prolifération bactérienne dans les réseaux de distribution. *Rev. Sci. Eau.* **5** : 91-112.
- Matin, A. 1991. The molecular basis of carbon-starvation-induced general resistance in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **5** : 3-10.
- McEldowney S. et M. Fletcher. 1986. Effect of growth conditions and surface characteristics of aquatic bacteria on their attachment to solid surfaces. *J. Gen. Microbiol.* **132** : 513-523.
- McFeters G.A., F.P. Yu, B.H. Pyle et S.S. Philip. 1995. Physiological assessment of bacteria using fluorochromes. *J. Microbiol. Methods.* **21** : 1-13.
- McNeill L.S. et M. Edwards. 2000. Phosphate inhibitors and red water in stagnant iron pipes. *J. Environ. Eng. Décembre* : 1096-1102.
- McQuarrie D.A. et P.A. Rock (Eds). 1992. *Chimie générale*. DeBoeck-Wesmael : Bruxelles. 1083p.
- McKillip J.L., L.-A. Jaykus et M. Drake. 1998. rRNA stability in heat killed and UV-irradiated enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* O157:H7. *Appl. Environ. Microbiol.* **64** : 4264-4268.
- Merlet N., M. Prévost, Y. Merlet et J. Coallier. 1992. Enlèvement de la matière organique dans les filtres CAB. *Rev. Sci. Eau.* **5** : 143-164.
- Miettinen I.T., T. Vartiainen et P.J. Martikainen. 1997. Phosphorus and bacterial growth in drinking water. *Appl. Environ. Microbiol.* **63** : 3242-3245.
- Mir J., J. Morato et F. Ribas. 1997. Resistance to chlorine of freshwater bacterial strains. *J. Appl. Microbiol.* **82** : 7-18.
- Momba M.G.B., T.E. Cloete, S.N. Venter et R. Kfir. 1999. Examination of the behaviour of *Escherichia coli* in biofilms established in laboratory-scale units receiving chlorinated and chloraminated water. *Wat. Res.* **33(13)** : 2973-2940.
- Morgenroth E. et P.A. Wilderer. 2000. Influence of detachment mechanisms on competition in biofilms. *Wat. Res.* **34(2)** : 417-426.
- Morin P. et A.K. Camper. 1997. Attachment and fate of carbon fines in simulated distribution system biofilms. *Wat. Res.* **31(3)** : 399-411.
- Morin P., V. Gauthier, S. Saby et J.-C. Block. 1999. Bacterial resistance to chlorine through attachment to particles and pipe surfaces in drinking water distribution systems. p. 171-190. In *Biofilms in the aquatic environment*. C. W. Keevil, A. F. Godfree, D. M. Holt et C. S. Dow (Eds.). Royal Society of Chemistry : Cambridge.
- Morris J.C. et B. Baum. 1978. Precursors and mechanisms of haloform formation in the chlorination of water supplies. In *Water chlorination : environmental impact and health effects-Volume 2*. pp. 29-48. Jolley R.L., W.A. Brung et R.B. Cumming (Eds). Ann Arbor Science : Ann Arbor.

- Moter A. et U.B. Göbel. 2000. Fluorescence in situ hybridization (FISH) for direct visualization of microorganisms. *J. Microbiol. Meth.* **41** : 85-112.
- Mouchet P. et R. Pourriot. 1992. Pénétration et développement de microinvertébrés dans les réseaux de distribution d'eau potable. *T.S.M. l'eau*. **7-8** : 353-368.
- Mozes N. 1995. The ways we study interfacial phenomena of living cells. *Technique et Documentation*. 3-13.
- Murgel G.A., L.W. Lion, C. Acheson, M.L. Shuler, D. Emerson et W.C. Ghiorse. 1991. Experimental apparatus for selection of adherent microorganisms under stringent growth conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* **57** : 1987-1996.
- Murphy K.I., R. Zaloum et D. Fulford. 1975. Effect of chlorination practice on soluble organics. *Wat.Res.* **9** : 389-396.
- Neden D.G., R.J. Jones, J.R. Smith, J. G. Kirmeyer et G.W. Foust. 1992. Comparing chlorination and chloramination for controlling bacterial regrowth. *J. Am. Water Works Assoc.* **84(7)** : 80-88.
- Neidhardt F.C., J.L. Ingraham et M. Schaechter (Eds). 1994. *Physiologie de la cellule bactérienne, une approche moléculaire*. Masson : Paris. 487p.
- Neu T.R. et J.R. Lawrence. 1997. Development and structure of microbial biofilms in river water studied by confocal laser scanning microscopy. *FEMS Microbiol. Ecol.* **24** : 11-25.
- Nielsen P.H., A. Jahn et R. Palmgrem. 1997. Conceptual model for production and composition of exopolymers in biofilms. *Wat. Sci. Technol.* **36(1)** : 11-19.
- Niquette P., P. Servais et R. Savoir. 2000. Impacts of pipe materials on densities of fixed bacterial biomass in a drinking water distribution system. *Wat. Res.* **34(6)** : 1952-1956.
- Niquette P., P. Servais et R. Savoir. 2001. Bacterial dynamics in the drinking water distribution system of Brussels. *Wat. Res.* **35(3)** : 675-682.
- Noack M.G. et R.L. Doerr. 1978. Reactions of chlorine, chlorine dioxide and mixture thereof with humic acid: an interim report. In *Water chlorination: environmental impact and health effects*. **2** : 49-58. Jolley R.L. (Ed). Ann Arbor Science: Ann Arbor.
- Norton C. et M.W. LeChevallier. 2000. A pilot study of bacteriological population changes through potable water treatment and distribution. *Appl. Environ. Microbiol.* **66(1)** : 268-276.
- Obst U. 2000. Biochemische methoden zum nachweis mikrobieller parameter in trinkwasser. *Mitt. Lebensm. Hyg.* **91** : 74-92.
- Odell L.H. et C. Ireland. 1999. Rapid chloramine decay in Portland's distribution system. In *ACSE-WRPM. session 2E(2)* : Tempe
- Ohashi A., D.G. Viraj de Silva, B. Mobarry, J.A. Manem, D.A. Stahl et B.E. Rittman. 1998. Influence of substrate C/N ratio on the structure of multispecies biofilms consisting of nitrifiers and heterotrophes. *Wat. Sci. Technol.* **32(8)** : 75-84.
- Ohtake H., K. Takahashi, Y. Tsuzuki et K. Toda. 1985. Uptake and release of phosphatase by a pure culture of *Acinetobacter calcoaceticus*. *Wat. Res.* **19** : 1587-1594.
- Oliphant R.J. et M.R. Schock. 1996. Chapitre 6. Copper alloys and solders. pp 269-312. AWWARF et DVGW-technikonzentrum Wasser (Eds). AWWARF : Denver.
- Olson S.C. 1996. Phosphate based corrosion inhibitors effects on distribution systems regrowth. In *national conference on integrating corrosion control and other water quality goals - New England Water Works Assoc.* : Boston. 19-21 mai.
- O'Neill J.G. et O.T. Parry. 1997. Chapter 27- The operational significance of coliform species in treated water. *Special Pub. Royal. Soc.Chem.* **191** : 249-254.
- Pace M.L. 1988. Bacterial mortality and the fate of bacterial production. *Hydrologia*. **159** : 41-49.

- Parent A., S. Saby, M. Sardin, J.-C. Block et D. Gatel. 1996. Contribution of biofilms to the chlorine demand of drinking water distribution systems. In *Water Quality Technology Conference – American Water Works Association* : Boston - Novembre.
- Payment P., F. Gamache et G. Paquette. 1988. Microbiological and virological analysis of water from two filtration plants and their distribution systems. *Can. J. Microbiol.* **34** : 1304-1309.
- Pelmont J. (Ed.) 1993. *Bactéries et environnement : adaptations physiologiques*. Presses universitaires de Grenoble : Grenoble. 899p.
- Percical S.L., J.S. Knapp, D.S. Wales et R.G.J. Edyvean. 1999. The effect of turbulent flow and surface roughness on biofilm formation in drinking water. *J. Indus. Microbiol. Biotechnol.* **22** : 152-159.
- Pernthaler J., F.-O. Glöckner, S. Unterholzner, A. Alfreider, R. Psenner et R. Amann. 1998. Seasonal community and population dynamics of pelagic bacteria and archaea in a high mountain lake. *Appl. Environ. Microbiol.* **64(11)** : 4299-4306.
- Petry S., S. Furlan, M. J. Crepeau, J. Cerning et M. Desmazeaud. 2000. Factors affecting exocellular polysaccharide production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* grown in a chemically defined medium. *Appl. Environ. Microbiol.* **66(8)** : 3427-3431.
- Phillips C. J., Z. Smith, T. M. Embley et J. I. Prosser. 1999. Phylogenetic differences between particle-associated and planktonic ammonia-oxidizing bacteria of the β subdivision of the class *Proteobacteria* in the northwestern mediterranean sea. *Appl. Environ. Microbiol.* **65(2)** : 779-786.
- Piriou P., M. Jousset et Y. Lévi. 1998. Méthodes directes de mesures des biofilms en eau potable : une évaluation du risque de développement bactérien dans les systèmes de distribution. In *Journée Internationales de l'Eau (JIE) – ESIP* : Poitiers. Conférence n°22. septembre.
- Poindexter J.S. et E.R. Leadbetter (Eds). 1989. *Bacteria in nature. Volume 3. Structure, physiology and genetic adaptability*. Plenum Press : New York. 391p.
- Poulsen L.K., G. Ballard et D.A. Stahl. 1993. Use of rRNA fluorescence *in situ* hybridization for measuring the activity of single cells in young and established biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* **59** : 1354-1360.
- Power K. N. et L.A. Nagy. 1999. Relationship between bacterial regrowth and some physical and chemical parameters within Sydney's drinking water distribution system. *Wat. Res.* **33(3)** : 741-750.
- Preez M., R. Kfir et P. Coubrough. 1995. Investigation of injury of coliforms after chlorination. *Wat. Sci. Technol.* **31** : 115-118.
- Prescott L., J.P. Harley et D. Klein (Eds). 1995. *Microbiologie*. De Boeck université : Bruxelles. 1014p.
- Prévost M., Rompré A., J. Coallier, P. Servais, P. Laurent, B. Clément et P. Lafrance. 1998. Suspended bacterial biomass and activity in full-scale drinking water distribution systems: impact of water treatment. *Wat. Res.* **32(5)** : 1393-1406.
- Prigent-Combaret C., O. Vidal, C. Dorel et P. Lejeune. 1999. Abiotic surface sensing and biofilm-dependent regulation of gene expression in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **181(19)** : 5993-6002.
- Prütz W.A. 1998. Interaction of hypochlorous acid with pyrimidine nucleotides, and secondary reactions of chlorinated pyrimidines with GSH, NADH, and other substrates. *Arch. Biochem. Biophys.* **349 (1)** : 183-191.
- Rao N.N., A. Kar, M.F. Roberts, J. Yashphe et A. Torriani-Gorini. 1994. Phosphate, phosphorylated metabolites and the Pho regulon of *Escherichia coli*. In *Phosphate in microorganisms: cellular and molecular biology*. pp. 22-29. Torriani-Gorini A., E. Yagil et S. Silver (Eds.). ASM press : Washington D.C.
- Rao N.N. et A. Kornberg. 1996. Inorganic polyphosphate supports resistance and survival of stationary-phase *Escherichia coli*. **178(5)** : 1394-1400.
- Rashid M.H., N.N. Rao et A. Kornberg. 2000a. Inorganic polyphosphate is required for the motility of bacterial pathogens. *J. Bacteriol.* **182(1)** : 225-227.

- Rashid M.H., K. Rumbaugh, L. Passador, D.G. Davies, A.N. Hamood, B.H. Iglewski et A. Kornberg. 2000b. Polyphosphate kinase is essential for biofilm development, quorum sensing, and virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *PNAS*. **97(17)** : 9636-9641.
- Reilly J.K., J.S. Kippin. 1983. Relationship of bacterial counts with the turbidity and free chlorine in two distribution systems. *J. Am. Water Works Assoc.* **25(6)** : 309-312.
- Reynolds J.A. et M.J. Schlesinger. 1969. Alterations in the structure and function of *Escherichia coli* alkaline phosphatase due to Zn²⁺ binding. *Biochem.* **8** : 588-593.
- Ridgway H.F. et B. H. Olson. 1982. Chlorine resistance patterns of bacteria from two drinking water distribution systems. *Appl. Environ. Microbiol.* **44(4)** : 972-987.
- Rodriguez S., J. Pallares et A. Sanroman. 1996. Efecto de las condiciones operacionales en la produccion de polisacaridos. *Afinidad* **53(462)** : 112-116 (en espagnol).
- Rompré A., M. Prévost, J. Coallier et P. Servais. 1998. Chapter 4. Impact of reducing biodegradable organic matter on fixed and suspended biomass in distribution systems. In *Microbial Impact of Biological Filtration*. pp 57-120 LeChevallier M.W., C. D. Norton, A. Camper, P. Morin, B. Ellis, W. Jones, A. Rompré, M. Prévost, J. Coallier, P. Servais, D. Holt, A. Delanoue et J. Colbourne (Eds). AWWA Res. Found. et Am. Water Works Assoc. : Denver. Rapport n°90743.
- Rompré A., M. Prévost, J. Coallier, P. Brisebois et J. Lavoie. 2000. Impacts of implementing a corrosion control strategy on biofilm growth. *Wat. Sci. Technol.* **41(4-5)** : 287-294.
- Rosenberg H. 1987. Phosphate transport in prokaryotes. In *Ion transport in prokaryotes*. pp. 205-248. Rosen B.P. et S. Silver (Eds). Academic Press : New-York.
- Rosenbusch J.P. 1994. Phosphorin: a catalog of open questions. In *Phosphate in microorganisms: cellular and molecular biology*. pp. 329-334. Torriani-Gorini A., E. Yagil et S. Silver (Eds.). ASM press : Washington.
- Rusin P.A., J.B. Rose, C.N. Haas et C.P. Gerba. 1997. Risk Assessment of opportunistic bacterial pathogens in drinking water. *Rev. Environn. Contam. Toxicol.* **152** : 57-83.
- Saby S. 1999. Résistance à l'hypochlorite de sodium des bactéries dans les eaux potables. Thèse de doctorat : Université Henri Poincaré - Nancy I, Nancy, France. 115 p.
- Saby S., P. Leroy et J.C. Block. 1999. *Escherichia coli* resistance to chlorine and glutathione synthesis in response to oxygenation and starvation. *Appl. Environ. Microbiol.* **65(12)** : 5600-5604.
- Saby S., I. Sibille, L. Mathieu, J.-L. Paquin et J.-C. Block. 1997. Influence of water chlorination on the counting of bacteria with DAPI (4'-6-diamidino-2-phenylindole). *Appl. Environ. Microbiol.* **63(4)** : 1564-1569.
- Samrakandi M.M., C. Roques et G. Michel. 1997. Influence of trophic conditions on exopolysaccharide production: bacterial biofilm susceptibility to chlorine and monochloramine. *Can. J. Microbiol.* **43** : 751-758.
- Sandford P.A. 1979. Exocellular, microbial polysaccharides. *Adv Carbohydr Chem Biochem.* **36** : 265-313.
- Santegoeds C.M., T.G. Ferdelman, G. Muyzer et D. de Beer. 1998. Structural and functional dynamics of sulfate-reducing populations in bacterial biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* **64** : 3731-3739.
- Sathasivan A., S. Ohgaki, K. Yamamoto et N. Kamiko. 1997. Role of inorganic phosphorus in controlling regrowth in water distribution system. *Wat.Sci.Tech.* **35** : 37-44.
- Sathasivan A., S. Ohgaki et M. Otaki. 1998. Can phosphorus control be a feasible option to control regrowth in Tokyo drinking water system? In *Specialized Conference on drinking water distribution with or without disinfectant residual* - D.V.G.W. ; AWWA ; IWW : Mülheim an der Ruhr (Allemagne). 28-30 septembre.
- Sathasivan A., S. Ohgaki. 1999. Application of new bacterial regrowth potential method for water distribution system – A clear evidence of phosphorus limitation. *Wat. Res.* **33(1)** : 137-144.
- Sawyer C.N., P.L. McCarty (Eds). 1978. *Chemistry for environmental engineering*. 3^{ème} édition. McGraw Inc : New-York 532p.

- Sawyer L.K. et S.W. Hermanovicz. 1998. Detachment of biofilm bacteria due to variations in nutrient supply. *Wat. Sci. Technol.* 37(4-5) : 211-214.
- Schmitt J., D. Nivens, D. C. White et H.-C. Flemming. 1995. Changes of biofilm properties in response to sorbed substances - an FTIR-ATR study. *Wat. Sci. Technol.* 32(8) : 149-155.
- Schneider R.P. 1997. Bacterial adhesion to solid substrata coated with conditioning films derived from chemical fractions of natural waters. *J. Adhesion Sci. Technol.* 11(7) : 979-994.
- Schock M.R., I. Wagner et R.J. Oliphant. 1996. Chapter 4. Corrosion and solubility of lead in drinking water. In *Internal corrosion of water distribution systems*. pp. 131-230. AWWARF : Denver.
- Schönhuber W., B. Zarda, S. Eix, R. Rippka, M. Herdman, W. Ludwig et R. Amann. 1999. In situ identification of Cyanobacteria with horseradish peroxidase-labeled rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Appl. Environ. Microbiol.* 65(3) : 1259-1267.
- Schwartz T., S. Hoffmann et U. Obst. 1997. The influence of drinking water conditioning on the biofilm development within a drinking water distribution system. *Vom Wasser.* 89 : 125-138. (en allemand).
- Schwartz T., S. Hoffmann et U. Obst. 1998. Formation and bacterial composition of young, natural biofilms obtained from public bank-filtered drinking water systems. *Wat. Res.* 32 (9) : 2787-2797.
- Scully F.E., G.D. Howell, R. Kravitz, J.T. Jewell, V. Hahn et M. Speed. 1988. Proteins in natural waters and their relation to the formation of chlorinated organics during disinfection. *Environ. Sci. Technol.* 22 : 537-542.
- Servais P., G. Billen, C. Ventresque et G.P. Bablon. 1991. Microbial activity in GAC filters at the Choisy-le-Roy treatment plant. *J. Am. Water Works Assoc.* 83 : 62-68.
- Servais P., G. Billen, P. Laurent, Y. Levi et G. Randon. 1992. Studies of BDOC and bacterial dynamics in the Northern Parisian suburbs. *Rev. Sci. Eau.* 5 : 69-89.
- Servais P. P. Laurent et G. Randon. 1995. Comparison of the bacterial dynamics in various french distribution systems. *J. Water. SRT-Aqua.* 44 : 10-17.
- Shaw P.J. 1994. The effect of pH, dissolved humic substances, and ionic composition on the transfer of iron and phosphate to particulate size fractions in epilimnetic lake water. *Limnol. Oceanogr.* 39 : 1734-1743.
- Sherr E.B. 1988. Direct use of high molecular weight polysaccharide by heterotrophic flagellated. *Nature* 335 : 348-351.
- Shiba T., K. Tsutsumi, H. Yano, Y. Ihara, A. Kameda, K. Tanaka, H. Takahashi, M. Munekata, N. N. Rao et A. Kornberg. 1997. Inorganic polyphosphate and the induction of *rpoS* expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94 : 11210-11215.
- Shibata H, Y. Sakamoto Y, M. Oka M et Y. Kono Y. 1999. Natural antioxidant, chlorogenic acid, protects against DNA breakage caused by monochloramine. *Biosci Biotechnol Biochem.* 63(7) : 1295-1297.
- Sibille I. 1997. Stabilité biologique d'un réseau de distribution d'eau potable alimenté avec une eau nanofiltrée. Thèse de doctorat : Université Henri Poincaré-Nancy I, Nancy, France. 225p.
- Sibille I., T. Sime-Ngando, L. Mathieu et J.-C. Block. 1998. Protozoan bacterivory and *Escherichia coli* survival in drinking water distribution systems. *Appl. Environ. Microbiol.* 64(1) : 197-202.
- Singer P.C. et S.D. Chang. 1989. Correlations between trihalomethanes and total organic halides formed during water treatment. *J. Am. Water Works Assoc.* 81(8) : 61.
- Skadsen J. 1993. Nitrification in distribution systems. *J. Am. Water Works Assoc.* 85 : 95-103.
- Smith D.B., A.F. Hess et D. Opheim. 1989. Control of distribution system coliform regrowth. In *National Proceedings AWWA-WQTC* : San Diego.
- Snoeyink V.L. et I. Wagner. Chapitre 1. Principles of corrosion of water distribution systems. In *Internal corrosion of water distribution systems*. pp. 1-27. AWWARF et DVGW-techkonologiezentrum Wasser (Eds). AWWARF : Denver.

- Somers E.B., J.L. Schoeni et A.C. Wong. 1994. Effect of trisodium phosphate on biofilm and planktonic cells of *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium*. *Int. J. Food Microbiol.* **22(4)** : 269-276.
- Srinivasan R., P. S. Stewart, T. Griebe, C.-I. Chen et X. Xu. 1995. Biofilm parameters influencing biocide efficacy. *Biotechn. Bioeng.* **46** : 553-560.
- Stackebrandt E. 1998. The enormous diversity and biotechnological potential of naturally occurring bacteria. In *new Frontiers in screening for microbial biocatalysts*. pp. 37-47. Kieslich K., C.P. van der Beek, J.A.M. de Bont et W.J.J. van den Tweel (Eds). Elsevier Science B.V.
- Staley J.T. et A. Konopka. 1985. Measurement of *in situ* activities of nonphotosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats. *Annu. Rev. Microbiol.* **39** : 321-346.
- Stewart M.H. et B.H. Olson. 1992. Physiological studies of chloramine resistance developed by *Klebsiella pneumoniae* under low nutrient growth conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* **58(9)** : 2918-2927.
- Stewart P.S. 1993. A model of biofilm detachment. *Biotech. Bioeng.* **41(1)** : 111-117
- Stewart P.S., T. Griebe, R. Srinivasan, C.-I. Chen, F.P. Yu, D. DeBeer et G.A. McFeters. 1994. Comparison of respiratory activity and culturability during monochloramine disinfection of binary population biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* **60(5)** : 1690-1692.
- Stewart P.S., A.K. Camper, S.D. Handran, C.-T. Huang et M. Warnecke. 1997. Spatial distribution and coexistence of *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa* in biofilms. *Microb. Ecol.* **33** : 2-10.
- Stickler D.J., N.S. Morris, R.J.C. McLean et C. Fuqua. 1998. Biofilms on indwelling urethral catheters produce quorum-sensing signal molecule *in situ* and *in vitro*. *Appl. Environ. Microbiol.* **64(9)** : 3486-349.
- Stock J.B., A. Ninfa et A.M. Stock. 1989. Protein phosphorylation and regulation of adaptive responses in bacteria. *Microbiol. Rev.* **53** : 450-490.
- Stoodley P., I. Dodds et H.M. Lappin-Scott. 1999. Influence of hydrodynamics and nutrients on biofilm structure. *J. Appl. Microbiol., Symp. Suppl.* **85** : 19S-28S.
- Stryers L. (Ed). 1992. *La Biochimie*. Flammarion : Paris.
- Stumm W. et J.J. Morgan (eds). 1970. *Aquatic chemistry : An introduction emphasizing chemical equilibria in natural waters*. Wiley and Sons : New-York. 583 p.
- Suh I.S., H. Herbst, A. Schumoe et W.D. Deckwer. 1990. The molecular weight of xantan polysaccharide produced under oxygen limitation. *Biotechnol. Lett.* **12(3)** : 201-206.
- Sutherland I.W. 1977. Bacterial exopolysaccharides – their nature and production. In *Surface carbohydrate of the prokaryote cell*. pp 27-96. I.W Sutherland (Ed). Academic press : New York.
- Sutherland I.W. (Ed) 1990. *Biotechnology of microbial exopolysaccharides*. Cambridge University Press: Cambridge. 163p.
- Suzuki H., K. Seto, M. Mori, M. Suzuki, S. Miura et H. Ishi. 1998. Monochloramine induced DNA fragmentation in gastric cell line MKN45. *Am. J. Physiol.* **38(4)** : G712-G716.
- Swiger R.R., J.D. Tucker. 1996. Fluorescent *in situ* hybridization: a brief review. *Environ. Molec. Mutagen.* **27** : 245-254.
- Tatnall R. 1990. Case histories: Biocorrosion. In *Biofouling and Biocorrosion in industrial water systems*. pp 187-193. Flemming H.C., G.G. Geesey (Eds). Springer-Verlag : Berlin.
- Thøgersen J. et E. Dahi. 1996. Chlorine decay and bacterial inactivation kinetics in drinking water in the Tropical World. *J. Microbiol. Biotechnol.* **12** : 549-546
- Thurman E.M. 1985. Chapter 6. Aminoacids. In *Developments in biochemistry: organic geochemistry of natural waters*. Nihoff M. (Ed). pp. 151-180. W. Junk : Dordrecht.

- Toolan T., J.D. Wher et S. Findlay. 1991. Inorganic phosphorus stimulation of bacterioplankton production in a meso-eutrophic lake. *Appl. Environ. Microbiol.* **57(7)** : 2074-2078.
- Torriani-Gorini A. 1994. The Pho regulon of *Escherichia coli*. In *Phosphate in microorganisms: cellular and molecular biology*. pp. 1-4. Torriani-Gorini A., E. Yagil et S. Silver (Eds.). ASM press : Washington D.C.
- Torriani-Gorini A., E. Yagil et S. Silver (Eds). 1994. *Phosphate in microorganisms: cellular and molecular biology*. ASM Press : Washington D.C. 347 p.
- Valentine R.L., K. Ozekin et R.J. Vikesland. 1998. Chloramine decomposition in distribution system and model waters. AWWA Res. Found. et Am. Wat. Works Assoc. : Denver. 144 p.
- Van der Kooij D. 1992. Assimilable organic carbon as an indicator of bacterial regrowth. *J. Am. Water Works Assoc.* **84** : 57-65.
- Van der Kooij D. 1999. Potential for biofilm development in drinking water distribution systems. *J. Appl. Microbiol. Symp. Suppl.* **85** : 39S-44S.
- Van der Kooij D. et W.A.M. Hijnen. 1985. Regrowth of bacteria on assimilable organic carbon in drinking water. *J. Fr. Hydrol.* **16(3)** : 201-218.
- Van der Kooij D. et H.R. Veenendaal. 1993. Assessment of the biofilm formation potential of synthetic materials in contact with drinking water during distribution. In *Water Quality Technology Conference - American Water Works Association* : Miami. 1393-1407. 7-11 Novembre.
- Van der Vliet G.M., P. Schepers, R.A. Schukking, B. van Gemen et P.R. Klatser. 1994. Assessment of mycobacterial viability by RNA amplification. *Antimicrob. Agents Chemother.* **38(9)** : 1959-1965.
- Van der Wende, E., W.G. Characklis et D.B. Smith. 1989. Biofilms and bacterial drinking water quality. *Wat. Res.* **23(10)** : 1313-1322.
- Vandevivere P. et D.L. Kirchman. 1993. Attachment stimulates exopolysaccharide synthesis by a bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* **59(10)** : 3280-3286.
- Van Ommen Kloeke F. et G.G. Geesey. 1999. Localization and identification of populations of phosphatase-active bacterial cells associated with activated sludge flocs. *Microbiol. Ecol.* **38** : 201-214.
- Van Veen H.W., T. Abee, G.J.J. Kortstee, W.N. Konings et A.J.B. Zehnder. 1994. Phosphate inorganic transport (Pit) system in *Escherichia coli* and *Acinetobacter johnsonii*. In *Phosphate in microorganisms: cellular and molecular biology*. pp. 43-49. Torriani-Gorini A., E. Yagil et S. Silver (Eds.). ASM press : Washington D.C.
- Vareltzis K., N. Soultos, P. Koidis, J. Ambrosiadis et C. Genigeorgis. 1997. Antimicrobial effects of sodium tripolyphosphate against bacteria attached to the surface of chicken carcasses. *Lebensm.-Wiss. U.-Technol.* **30** : 665-669.
- Vasconcelos J.J., P.F. Boulos, W.M. Grayman, L. Kiene, O. Wable, P. Bismas, A. Bhari, L.A. Rossman, R.M. Clark et J.A. Goodrich. (Eds). 1996. *Characterization and modeling of chlorine decay in distribution systems*. AWWA Res. Found. et Am. Water Works Assoc. : Denver. Rapport n°90705. 402 p.
- Venkobachar C., L. Iyengar et A.V.S.P. Rao. 1977. Mechanisms of disinfection: effect of chlorine on cell membrane functions. *Wat. Res.* **11(8)** : 727-729.
- Vik E.A., R.A. Ryder, I. Wagner et J.F. Ferguson. 1996. Mitigation of corrosion effects. Chapter 8. In *Internal corrosion of water distribution systems*. pp. 389-443. AWWARF and DVGW-TZW (Eds). AWWARF: Denver.
- Vikesland P.J., K. Ozekin et R.L. Valentine. 1998. Effect of natural organic matter on monochloramine decomposition: pathway elucidation through the use of mass and redox balances. *Environ. Sci. Technol.* **32** : 1409-1416.
- Vikesland P.J., K. Ozekin et R.L. Valentine. 2001. Monochloramine decay in model and distribution system waters. *Wat. Res.* **35(7)** : 1766-1776.
- Volk C., E. Dundore, J. Scheirman et M. LeChevallier. 1998. What strategies for corrosion control. In *water quality and technology conference*. – American Water Works Association : San Diego. 1-4 novembre.

- Volkland H.-P., H. Harms, B. Müller, G. Repphun, O. Wanner et A.J.B. Zehnder. 2000. Bacterial phosphating of mild (unalloyed) steel. *Appl. Environ. Microbiol.* **65** (10) : 4389-4395.
- Wagner I. 1994. Influence des traitements de l'eau sur sa teneur en plomb. *J. Eur. Hydrol.* **25**(1) : 71-80.
- Wagner M., R. Amann, H. Lemmer et K.-H. Schleifer. 1993. Probing activated sludge with oligonucleotides specific for Proteobacteria: inadequacy of culture-dependent methods for describing microbial community structure. *Appl. Environ. Microbiol.* **59** : 1520-1525.
- Wai S.N., Y. Mizunoe, A. Takade, S.-I. Kawabata et S.-I. Yoshida. 1998. *Vibrio cholerae* O1 strain TSI-4 produces the exopolysaccharide materials that determine colony morphology, stress resistance, and biofilm formation. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**(10) : 3648-3655.
- Wanner B.L. 1994. Multiple controls of the *Escherichia coli* Pho regulon by the Pi sensor PhOR, the catabolite regulatory sensor CreC, and acetyl phosphate. In *Phosphate in microorganisms: cellular and molecular biology*. pp 13-21. Torriani-Gorini A., E. Yagil et S. Silver (Eds.). ASM press : Washington D.C.
- Webb D.C. et G.B. Cox. 1994. Proposed mechanism for phosphate translocation by the phosphate-specific transport (Pst) system and role of the Pst system in phosphate regulation. In *Phosphate in microorganisms: cellular and molecular biology*. pp. 37-42. Torriani-Gorini A., E. Yagil et S. Silver (Eds.). ASM press : Washington D.C..
- White G.C. 1992. *The handbook of chlorination and alternative disinfectants*. van Nostrand Reinhold : New York. 1308 p.
- Whiteley M., M. R. Parsek et E.P. Greenberg. 2000. Regulation of quorum sensing by RpoS in *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Environ. Microbiol.* **182**(15) : 4356-4360.
- Wolfaardt G.M., J.R. Lawrence, J.V. Headley, R.D. Robarts et D.E. Caldwell. 1994. Microbial exopolymers provide a mechanism for bioaccumulation of contaminants. *Microb. Ecol.* **24** : 279-291.
- Wolfe R.L., N.R. Ward et B.H. Olson. 1984. Inorganic chloramines as drinking water disinfectants: a review. *J. Am. Water Works Assoc.* **76**(5) : 74-88
- Wood H.G. et J.E. Clark 1988. Biological aspects of inorganic polyphosphates. *Annu. Rev. Biochem.* **57** : 235-260.
- Wu H., J. Kato, A. Kuroda, T. Ikeda, N. Takigushi et H. Ohtake. 2000. Identification and characterization of two chemotactic transducers for inorganic phosphate in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **182**(12) : 3400-3404.
- Xu K. D., P. S. Stewart, F. Xia, C.-T. Huang et G. A. McFeters. 1998. Spatial physiological heterogeneity in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm is determined by oxygen availability. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**(10) : 4035-4039.
- Yajima N., H. Hiraishi, N. Yamaguchi, M. Ishida, T. Shimada et A. Terano. 1999. Monochloramine-induced cytotoxicity to cultured rat gastric mucosal cells: role of glutathione and iron in protection and injury. *J. Lab. Clin. Med.* **134**(4) : 372-377.
- Yan R.-T. et P.C. Maloney. 1994. Finding the hole in UhpT : applications of molecular biology to a membrane carrier. In *Phosphate in microorganisms: cellular and molecular biology*. pp. 329-334. Torriani-Gorini A., E. Yagil et S. Silver (Eds.). ASM press : Washington D.C.
- Yoon J. et J.N. Jensen. 1995. Chlorine transfer from inorganic monochloramine to chlorinated wastewater. *Wat. Environ. Res.* **67**(5) : 842-847.
- Yu F.P. et G.A. McFeters. 1994. Physiological responses of bacteria in biofilms to disinfection. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**(7) : 2462-2466.
- Zarda B., D. Hahn, A. Chatzinotas, W. Schönhuber, A. Neef, R.I. Amann et J. Zeyer. 1997. Analysis of bacterial community structure in bulk soil by *in situ* hybridization. *Arch. Microbiol.* **168** : 185-192.
- Zavarzin G.A., E. Stackebrandt et R.G. Murray. 1991 A correlation of phylogenetic diversity in the *Proteobacteria* with the influences of ecological forces. *Can. J. Microbiol.* **37** : 1-6.
- Zavarzin G.A., T.N. Zhilina et V.V. Kevbrin. 1999. The alkaliphilic microbial community and its functional diversity. *Microbiol.* **68**(5) : 503-521.

Zhang T.C. et P.L. Bishop. 1994. Density, porosity, and pore structure of biofilms. *Wat. Res.* **28(11)** : 2267-2277.

Zhang T.C., Y.C. Fu et P.L. Bishop. 1994. Competition in biofilms. *Wat. Sci. Technol.* **29(10-11)** : 263-270.

Zhang X., Bishop P.L. et Kupferle M.J. 1998. Measurement of polysaccharides and proteins in biofilm extracellular polymers. *Wat. Sci. Technol.* **37(4-5)** : 345-348.

Chapitre IX Annexes

ANNEXE IX-1 : CHAPITRE IV	216
EXPÉRIENCE N°1 EN CONDITION A	216
Tableau IX.1 : Bactéries cultivables sur gélose R2A, après 7 jours d'incubation à 22(±2)°C (UFC m L ⁻¹),	216
Tableau IX.3 : pH à 20°C	216
Tableau IX.4 : COT (mg C L ⁻¹)	216
Tableau IX.5 : Teneur en nitrates mesurée (mg N-NO ₃ L ⁻¹)	216
Tableau IX.6 : Teneur en phosphates mesurée (µg P-PO ₄ L ⁻¹)	216
EXPÉRIENCE N°2 EN CONDITION A	217
Tableau IX.7 : Bactéries cultivables sur gélose R2A, après 7 jours d'incubation à 22 (± 2)°C (UFC m L ⁻¹)	217
Tableau IX.8 : Nombre total de bactéries dénombrées par marquage au DAPI (Cellules m L ⁻¹)	217
Tableau IX.9 : pH à 20°C	217
Tableau IX.10 : COT (mg C L ⁻¹)	217
Tableau IX.11 : Teneur en nitrates mesurée (mg N-NO ₃ L ⁻¹)	217
Tableau IX.12 : Teneur en phosphates mesurée (µg P-PO ₄ L ⁻¹)	217
EXPÉRIENCE N°1 EN CONDITION B	218
Tableau IX.13 : Bactéries cultivables sur gélose R2A, après 7 jours d'incubation à 22 (± 2)°C (UFC m L ⁻¹)	218
Tableau IX.14 : Nombre total de bactéries dénombrées par marquage au DAPI (Cellules m L ⁻¹)	218
Tableau IX.15 : pH à 20°C	218
Tableau IX.16 : COT (mg C L ⁻¹)	218
Tableau IX.17 : Teneur en nitrates mesurée (mg N-NO ₃ L ⁻¹)	218
Tableau IX.18 : Teneur en phosphates mesurée (µg P-PO ₄ L ⁻¹)	218
EXPÉRIENCE N°2 EN CONDITION B	219
Tableau IX.19 : Bactéries cultivables sur gélose R ₂ A, après 7 jours d'incubation à 22(±2)°C (UFC m L ⁻¹)	219
Tableau IX.20 : Nombre total de bactéries dénombrées par marquage au DAPI (Cellules mL ⁻¹)	219
Tableau IX.21 : pH à 20°C	219
Tableau IX.22 : COT (mg C L ⁻¹)	219
Tableau IX.23 : Teneur en nitrates mesurée (mg N-NO ₃ L ⁻¹)	219
Tableau IX.24 : Teneur en phosphates mesurée (µg P-PO ₄ L ⁻¹)	219
ESSAIS SUR LES PILOTES ROTOTORQUE™ : EFFET DES PHOSPHATES SUR LES BIOFILMS	
(APPLICATION DES PHOSPHATES À T=63 J.)	220
Tableau IX.25 : Bactéries cultivables sur gélose R2A (7 j à 22(±2)°C) dans les biofilms pendant la colonisation et de traitement aux phosphates	220
Tableau IX.27 : Activité exoprotéolytique potentielle dans les biofilms pendant la colonisation et de traitement aux phosphates	220
Tableau IX.28 : Teneur en hydrates de carbone dans les biofilms, pendant la colonisation à T=63 jours.	220
Tableau IX.29 : Hydrates de carbone pendant le traitement aux phosphates à T=104 jours,	221
Tableau IX.30 : Teneur en acides aminés dans les biofilms après hydrolyse, pendant la colonisation à T=63 jours	221
Tableau IX.31 : Teneur en acides aminés dans les biofilms après hydrolyse, pendant la phase de traitement aux phosphates à T=104 jours	221
Tableau IX.32 : Teneurs en carbone organique total pendant la colonisation et le traitement aux phosphates *	222
Tableau IX.33 : Suivi du pH pendant la colonisation et le traitement aux phosphates*	222
Tableau IX.34 : Suivi des phosphates (mg P L ⁻¹) pendant le traitement aux phosphates*	222
Tableau IX.35 : Suivi de la température(°C) pendant la colonisation et le traitement aux phosphates*	223
ANNEXE IX-2 : CHAPITRE V- EFFET DES PHOSPHATES ET DE LA CHLORAMINATION SUR LES BIOFILMS	224
Tableau IX.36 : Bactéries cultivables sur gélose R ₂ A (7 j à 22(±2)°C), pendant la chloramination (UFC cm ⁻²)	224
Tableau IX.37 : Dénombrements totaux de bactéries par marquage pendant la chloramination (cellules cm ⁻²)	224
Tableau IX.38 : Activité exoprotéolytique potentielle pendant la chloramination	224
Tableau IX.39 : Teneur en acides aminés dans les biofilms après hydrolyse à T=132 jours	224
Tableau IX.40 : Teneur dans les biofilms en hydrates de carbone après hydrolyse à T=132 jours	225
Tableau IX.41 : Suivi de la teneur en carbone organique total (mg C L ⁻¹) pendant la chloramination	225
Tableau IX.42 : Suivi des résiduels de monochloramine (mg NH ₂ Cl L ⁻¹)	225
Tableau IX.43 : Suivi du pH pendant la phase de chloramination	225
Tableau IX.44 : Suivi des phosphates (mg P L ⁻¹) pendant la chloramination	226
Tableau IX.45 : Suivi des % d'orthophosphates dans les réacteurs traités aux phosphates, exp. A	226
Tableau IX.46 : Activité exoprotéolytique potentiel dans les biofilms pendant la colonisation, exp. A	226

Tableau IX.47 : Suivi % d'orthophosphates dans les pilotes traités aux phosphates, exp. B.	226
ANNEXE IX-3 : CHAPITRE VI	227
ESSAI PRÉLIMINAIRE SUR 4 SOUCHES DE COLIFORMES	227
Tableau IX.48 : Coliformes cultivables sur gélose au TTC-tergitol (24h à 37(±1)°C)(UFC mL ⁻¹)	227
Tableau IX.49 : Nombre total de bactéries dénombrées par marquage au DAPI (cellules mL ⁻¹)	227
ESSAI CITROBACTER FREUNDII N°1 ET N°2	227
Tableau IX.50 : Essai n°1. <i>C. freundii</i> cultivables sur gélose au TTC-tergitol (24h à 37°C) (UFC mL ⁻¹)	227
Tableau IX.51 : Essai n°2. <i>C. freundii</i> cultivables sur gélose au TTC-tergitol (24h à 37°C) (UFC mL ⁻¹)	227
ESSAI ESCHERICHIA COLI N°1 ET N°2	228
Tableau IX.52 : Essai n°1. <i>E. coli</i> cultivables sur gélose au TTC-tergitol (24h à 37(±1)°C) (UFC mL ⁻¹)	228
Tableau IX.53 : Essai n°2. <i>E. coli</i> cultivables sur gélose au TTC-tergitol (24h à 37(±1)°C) (UFC mL ⁻¹)	228
ESSAIS SUR PILOTES ROTOTORQUES, INJECTION DE CITROBACTER FREUNDII N°1	228
Tableau IX.54 : Coliformes cultivables sur gélose mT7 (24h à 35(±2)°C) (UFC mL ⁻¹)	228
Tableau IX.55 : Coliformes cultivables sur gélose mEndo (24h à 35(±2)°C) (UFC mL ⁻¹)	228
ESSAIS SUR PILOTES ROTOTORQUES, INJECTION DE CITROBACTER FREUNDII N°2	228
Tableau IX.56 : Coliformes cultivables sur gélose mT7 (24h à 35(±2)°C) (UFC mL ⁻¹)	228
Tableau IX.57 : Coliformes cultivables sur gélose mEndo (24h à 35(±2)°C) (UFC mL ⁻¹)	229
ESSAIS SUR PILOTES ROTOTORQUES, INJECTION DE CITROBACTER FREUNDII N°3	229
Tableau IX.58 : Coliformes cultivables sur gélose mT7 (24h à 35(±2)°C) (UFC mL ⁻¹)	229
Tableau IX.59 : Coliformes cultivables sur gélose mEndo (24h à 35(±2)°C) (UFC mL ⁻¹)	229
ESSAIS SUR PILOTES ROTOTORQUES, SUIVI PAR FISH	230
COMPOSITION DE POPULATIONS TÉMOINS	230
Essai n°A, Phase de Colonisation	230
Tableau IX.60 : Comptes par FISH (% de cellules totales hybridées avec une sonde)	230
Tableau IX.61 : Suivi de la teneur en carbone organique total, (mg C L ⁻¹)	230
Tableau IX.62 : Suivi du pH	230
Essai n°B, Phase de Colonisation	231
Tableau IX.64 : Comptes par FISH, (% de cellules totales hybridées avec une sonde)	231
Essai n°C. Phase de Colonisation	231
Tableau IX.65 : Comptes par FISH (% de cellules totales hybridées avec une sonde)	231
Tableau IX.66 : Dénombrements totaux de bactéries par marquage au DAPI, (cellules cm ⁻²)	231
COMPOSITION DE POPULATIONS PHOSPHATÉS	231
Tableau IX.67 : Comptes par FISH dans les biofilms, (% de cellules totales hybridées avec une sonde)	231
COMPOSITION DE POPULATIONS FIXÉES DÉSINFECTÉES	232
Expérience A : chloration à 1 mg Cl₂L⁻¹, Début de chloration à T=113 jours	232
Tableau IX.68 : Comptes par FISH dans les biofilms (% de cellules totales hybridées) Exp. A (chloration)	232
Tableau IX.69 : Bactéries cultivables sur gélose R2A, après 7 jours d'incubation à 22(±2)°C (mL ⁻¹) et dénombrements totaux de bactéries dans un biofilm chloré pendant la chloration. Exp. A (chloration)	232
Tableau IX.70 : Suivi de la teneur en carbone organique total (mg C L ⁻¹). Exp. A (chloration)	232
Tableau IX.71 : Suivi du résiduel de chlore, dans le réacteur chloré. Exp. A (chloration)	232
Tableau IX.72 : Suivi du pH. Exp. A (chloration)	232
Tableau IX.73 : Suivi de la température. Exp. A (chloration)	232
Expérience B : chloration à 0,75 mg Cl₂L⁻¹, Début de chloration à T=50 jours	233
Tableau IX.74 : Comptes par FISH, (% de cellules totales hybridées avec une sonde) Exp. B. (chloration)	233
Tableau IX.75 : Dénombrements totaux de bactéries dans les biofilms (bactéries cm ⁻²). Exp. B. (chloration)	233
Tableau IX.76 : Suivi du résiduel de chlore, dans le réacteur chloré (mg Cl ₂ L ⁻¹) Exp. B. (chloration)	233
Tableau IX.77 : Suivi de la teneur en carbone organique total (mg C L ⁻¹). Exp. B. (chloration)	233
Tableau IX.78 : Suivi du pH. Exp. B. (chloration)	234
Tableau IX.79 : Suivi de la température (°C). Exp. B. (chloration)	234
Expériences Cet D : chloramination et effet sur la composition du biofilm	234
Tableau IX.80 : Comptes par FISH pendant la monochloramination, en fonction de la dose de monochloramine appliquée Exp. C et D (chloramination)	234
COMPOSITION DES POPULATIONS SUSPENDUES, ESSAI B	234
Tableau IX.81 : Comptes par FISH en entrée et sortie de deux pilotes sans traitement, (T=116 jours)	234

Annexe IX-1 : Chapitre IV

Expérience n°1 en condition A

Tableau IX.1 : Bactéries cultivables sur gélose R2A, après 7 jours d'incubation à 22(±2)°C (UFC m L⁻¹),

Jour de mesure après enrichissement en P	µg P-PO ₄ L ⁻¹ ajoutés				
	0	3	17	33	333
0	3,15×10 ¹	3,15×10 ¹	3,15×10 ¹	3,15×10 ¹	3,15×10 ¹
2	6,48×10 ²	2,35×10 ²	1,34×10 ²	1,50×10 ²	5,77×10 ²
5	ND	ND	ND	ND	ND
9	1,81×10 ⁵	2,05×10 ⁵	1,18×10 ⁵	2,14×10 ⁵	1,22×10 ⁵

(ND : non déterminé)

Tableau IX.2 : Nombre total de bactéries dénombrées par marquage au DAPI (cellules m L⁻¹)

Jour de mesure après enrichissement en P	µg P-PO ₄ L ⁻¹ ajoutés				
	0	3	17	33	333
0	5,44×10 ⁴	5,44×10 ⁴	5,44×10 ⁴	5,44×10 ⁴	5,44×10 ⁴
2	9,16×10 ⁴	1,10×10 ⁵	9,82×10 ⁴	9,07×10 ⁴	1,06×10 ⁵
5	8,92×10 ⁵	1,03×10 ⁶	1,17×10 ⁶	1,13×10 ⁶	9,95×10 ⁶
9	1,04×10 ⁶	9,60×10 ⁵	1,13×10 ⁶	1,04×10 ⁶	1,09×10 ⁶

Tableau IX.3 : pH à 20°C

Jour de mesure après enrichissement en P	µg P-PO ₄ L ⁻¹ ajoutés				
	0	3	17	33	333
0	7,61	7,61	7,61	7,61	7,61
2	7,69	7,71	7,57	7,77	7,65
5	7,60	7,66	7,59	7,65	7,56
9	7,68	7,66	7,67	7,66	7,66

Tableau IX.4 : COT (mg C L⁻¹)

Jour de mesure après enrichissement en P	µg P-PO ₄ L ⁻¹ ajoutés				
	0	3	17	33	333
0	1,79 ± 0,01	1,79 ± 0,01	1,79 ± 0,01	1,79 ± 0,01	1,79 ± 0,01
2	1,31 ± 0,04	1,33 ± 0,02	1,46 ± 0,16	1,62 ± 0,01	1,63 ± 0,03
5	1,45 ± 0,01	1,43 ± 0,01	1,44 ± 0,01	1,44 ± 0,01	1,45 ± 0,01
9	1,47 ± 0,03	1,43 ± 0,06	1,46 ± 0,06	1,44 ± 0,03	1,46 ± 0,07

Tableau IX.5 : Teneur en nitrates mesurée (mg N-NO₃ L⁻¹)

Jour de mesure après enrichissement en P	µg P-PO ₄ L ⁻¹ ajoutés				
	0	3	17	33	333
0	1,22	1,22	1,22	1,22	1,22
2	1,20	1,17	0,88	0,99	0,88
5	1,22	1,20	0,88	0,88	0,72
9	1,20	1,17	1,20	1,17	1,24

Tableau IX.6 : Teneur en phosphates mesurée (µg P-PO₄ L⁻¹)

Jour de mesure après enrichissement en P	µg P-PO ₄ L ⁻¹ ajoutés				
	0	3	17	33	333
0	<3	<3	<3	<3	<3
2	<3	7	<3	10	215
5	<3	<3	<3	<3	215
9	<3	<3	<3	23	317

Expérience n°2 en condition A

Tableau IX.7 : Bactéries cultivables sur gélose R2A, après 7 jours d'incubation à 22 (± 2)°C (UFC m L⁻¹)

Jour de mesure après enrichissement en P	$\mu\text{g P-PO}_4 \text{ L}^{-1}$ ajoutés				
	0	3	17	33	333
0	$3,87 \times 10^1$	$3,87 \times 10^1$	$3,87 \times 10^1$	$3,87 \times 10^1$	$3,87 \times 10^1$
2	$1,01 \times 10^4$	$2,05 \times 10^4$	$8,64 \times 10^3$	$1,02 \times 10^4$	$7,00 \times 10^3$
5	$5,10 \times 10^4$	$3,10 \times 10^4$	$5,00 \times 10^4$	$5,46 \times 10^4$	$5,91 \times 10^4$
9	$3,24 \times 10^4$	$1,17 \times 10^4$	$6,13 \times 10^4$	$4,41 \times 10^4$	$4,14 \times 10^4$

Tableau IX.8 : Nombre total de bactéries dénombrées par marquage au DAPI (Cellules m L⁻¹)

Jour de mesure après enrichissement en P	$\mu\text{g P-PO}_4 \text{ L}^{-1}$ ajoutés				
	0	3	17	33	333
0	$6,46 \times 10^4$	$6,46 \times 10^4$	$6,46 \times 10^4$	$6,46 \times 10^4$	$6,46 \times 10^4$
2	$8,49 \times 10^4$	$9,82 \times 10^4$	$9,49 \times 10^4$	$9,41 \times 10^4$	$8,57 \times 10^4$
5	$6,86 \times 10^5$	$5,42 \times 10^5$	$8,45 \times 10^5$	$7,69 \times 10^5$	$7,64 \times 10^5$
9	$9,15 \times 10^5$	$6,93 \times 10^5$	$1,19 \times 10^6$	$9,88 \times 10^5$	$9,34 \times 10^5$

Tableau IX.9 : pH à 20°C

Jour de mesure après enrichissement en P	$\mu\text{g P-PO}_4 \text{ L}^{-1}$ ajoutés				
	0	3	17	33	333
0	7,72	7,72	7,72	7,72	7,72
2	7,80	7,83	7,44	7,83	7,82
5	7,84	7,87	7,87	7,76	7,80
9	7,79	7,86	7,72	7,82	7,79

Tableau IX.10 : COT (mg C L⁻¹)

Jour de mesure après enrichissement en P	$\mu\text{g P-PO}_4 \text{ L}^{-1}$ ajoutés				
	0	3	17	33	333
0	$2,00 \pm 0,05$	$2,00 \pm 0,05$	$2,00 \pm 0,05$	$2,00 \pm 0,05$	$2,00 \pm 0,05$
2	$2,07 \pm 0,10$	$2,00 \pm 0,04$	$1,99 \pm 0,03$	$2,04 \pm 0,03$	$2,00 \pm 0,02$
5	$1,98 \pm 0,19$	$1,92 \pm 0,13$	$1,93 \pm 0,04$	$1,92 \pm 0,03$	$1,90 \pm 0,03$
9	$1,87 \pm 0,07$	$1,80 \pm 0,03$	$1,88 \pm 0,09$	$1,79 \pm 0,02$	$1,89 \pm 0,12$

Tableau IX.11 : Teneur en nitrates mesurée (mg N-NO₃ L⁻¹)

Jour de mesure après enrichissement en P	$\mu\text{g P-PO}_4 \text{ L}^{-1}$ ajoutés				
	0	3	17	33	333
0	1,83	1,83	1,83	1,83	1,83
2	1,83	1,83	1,83	1,85	1,83
5	1,83	1,83	1,83	1,81	1,81
9	1,83	1,83	1,83	1,85	-

Tableau IX.12 : Teneur en phosphates mesurée ($\mu\text{g P-PO}_4 \text{ L}^{-1}$)

Jour de mesure après enrichissement en P	$\mu\text{g P-PO}_4 \text{ L}^{-1}$ ajoutés				
	0	3	17	33	333
0	<3	<3	<3	<3	<3
2	<3	<3	<3	23	323
5	<3	<3	<3	23	317
9	<3	<3	<3	<3	-

Expérience n°1 en condition B

Tableau IX.13 : Bactéries cultivables sur gélose R2A, après 7 jours d'incubation à 22 (± 2)°C (UFC m L⁻¹)

Jour de mesure après enrichissement en P	µg P-PO ₄ L ⁻¹ ajoutés				
	0	5	25	50	500
0	8	8	8	8	8
2	2,43×10 ²	9,0×10 ¹	1,89×10 ²	1,71×10 ²	2,43×10 ²
5	2,34×10 ⁴	3,06×10 ⁴	1,17×10 ⁴	3,51×10 ⁴	4,59×10 ⁴
9	2,52×10 ⁴	2,34×10 ⁴	1,53×10 ⁴	4,68×10 ⁴	6,04×10 ⁴

Tableau IX.14 : Nombre total de bactéries dénombrées par marquage au DAPI (Cellules m L⁻¹)

Jour de mesure après enrichissement en P	µg P-PO ₄ L ⁻¹ ajoutés				
	0	5	25	50	500
0	1,10×10 ⁵	1,10×10 ⁵	1,10×10 ⁵	1,10×10 ⁵	1,10×10 ⁵
2	7,16×10 ⁴	5,39×10 ⁴	5,62×10 ⁴	5,95×10 ⁴	5,47×10 ⁴
5	6,59×10 ⁵	7,68×10 ⁵	7,16×10 ⁵	8,26×10 ⁵	7,62×10 ⁵
8	8,22×10 ⁵	9,19×10 ⁵	9,60×10 ⁵	1,06×10 ⁶	1,01×10 ⁶

Tableau IX.15 : pH à 20°C

Jour de mesure après enrichissement en P	µg P-PO ₄ L ⁻¹ ajoutés				
	0	5	25	50	500
0	7,40	7,40	7,40	7,40	7,40
2	7,60	7,46	7,62	7,65	7,54
5	7,61	7,56	7,63	7,63	7,63
8	7,74	7,70	7,67	7,69	7,66

Tableau IX.16 : COT (mg C L⁻¹)

Jour de mesure après enrichissement en P	µg P-PO ₄ L ⁻¹ ajoutés				
	0	5	25	50	500
0	1,52 ± 0,01	1,52 ± 0,01	1,52 ± 0,01	1,52 ± 0,01	1,52 ± 0,01
2	1,54 ± 0,02	1,32 ± 0,03	1,46 ± 0,02	ND	1,55 ± 0,01
5	1,49 ± 0,07	1,46 ± 0,07	1,43 ± 0,02	1,47 ± 0,02	1,44 ± 0,03
8	1,46 ± 0,01	1,46 ± 0,01	1,44 ± 0,01	1,46 ± 0,02	1,20 ± 0,01

Tableau IX.17 : Teneur en nitrates mesurée (mg N-NO₃ L⁻¹)

Jour de mesure après enrichissement en P	µg P-PO ₄ L ⁻¹ ajoutés				
	0	5	25	50	500
0	1,22	1,22	1,20	1,20	1,20
2	1,22	1,22	1,20	1,20	1,17
5	1,20	1,20	1,22	1,17	1,22
8	1,20	1,20	1,22	1,20	1,17

Tableau IX.18 : Teneur en phosphates mesurée (µg P-PO₄ L⁻¹)

Jour de mesure après enrichissement en P	µg P-PO ₄ L ⁻¹ ajoutés				
	0	5	25	50	500
0	<3	<3	<3	<3	<3
2	29	10	10	39	555
5	<3	10	33	16	568
8	16	<3	13	16	326

Expérience n°2 en condition B

Tableau IX.19 : Bactéries cultivables sur gélose R₂A, après 7 jours d'incubation à 22(±2)°C (UFC mL⁻¹)

Jour de mesure après enrichissement en P	µg P-PO ₄ L ⁻¹ ajoutés				
	0	5	25	50	500
0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0
2	1,40×10 ²	1,30×10 ²	2,00×10 ²	2,40×10 ²	3,60×10 ²
5	1,40×10 ⁴	3,18×10 ⁴	1,20×10 ⁴	2,36×10 ⁴	2,88×10 ⁴
8	2,30×10 ⁴	5,54×10 ⁴	5,00×10 ³	8,56×10 ³	2,52×10 ⁴

Tableau IX.20 : Nombre total de bactéries dénombrées par marquage au DAPI (Cellules mL⁻¹)

Jour de mesure après enrichissement en P	µg P-PO ₄ L ⁻¹ ajoutés				
	0	5	25	50	500
0	8,90×10 ⁴	8,90×10 ⁴	8,90×10 ⁴	8,90×10 ⁴	8,90×10 ⁴
2	8,10×10 ⁴	9,18×10 ⁴	9,18×10 ⁴	8,49×10 ⁴	8,82×10 ⁴
5	5,32×10 ⁵	6,77×10 ⁵	6,49×10 ⁵	6,69×10 ⁵	5,56×10 ⁵
8	7,99×10 ⁵	9,83×10 ⁵	9,90×10 ⁵	9,65×10 ⁵	8,81×10 ⁵

Tableau IX.21 : pH à 20°C

Jour de mesure après enrichissement en P	µg P-PO ₄ L ⁻¹ ajoutés				
	0	5	25	50	500
0	7,70	7,70	7,70	7,70	7,70
2	7,79	7,83	7,79	7,78	7,75
5	7,78	7,83	7,80	7,82	7,67
8	7,71	7,68	7,69	7,70	7,62

Tableau IX.22 : COT (mg C L⁻¹)

Jour de mesure après enrichissement en P	µg P-PO ₄ L ⁻¹ ajoutés				
	0	5	25	50	500
0	1,68 ± 0,01	1,68	1,68	1,68	1,68
2	1,73 ± 0,01	1,74 ± 0,02	1,71 ± 0,01	1,75 ± 0,00	1,70 ± 0,00
5	1,71 ± 0,01	1,70 ± 0,01	1,72 ± 0,05	1,69 ± 0,02	1,68 ± 0,03
8	1,65 ± 0,01	1,68 ± 0,02	1,73 ± 0,05	1,72 ± 0,07	1,71 ± 0,05

Tableau IX.23 : Teneur en nitrates mesurée (mg N-NO₃ L⁻¹)

Jour de mesure après enrichissement en P	µg P-PO ₄ L ⁻¹ ajoutés				
	0	5	25	50	500
0	1,31	1,31	1,31	1,31	1,31
2	1,31	1,29	1,31	1,29	1,26
5	1,38	1,29	1,29	1,31	1,26
8	1,29	1,29	1,29	1,29	1,31

Tableau IX.24 : Teneur en phosphates mesurée (µg P-PO₄ L⁻¹)

Jour de mesure après enrichissement en P	µg P-PO ₄ L ⁻¹ ajoutés				
	0	5	25	50	500
0	<3	<3	<3	<3	<3
2	23	23	<3	20	444
5	<3	<3	10	16	463
8	<3	<3	7	10	333

Essais sur les pilotes RotoTorque™ : Effet des phosphates sur les biofilms (application des phosphates à T=63 j.)

Tableau IX.25 : Bactéries cultivables sur gélose R2A(7 j à 22(±2)°C) dans les biofilms pendant la colonisation et de traitement aux phosphates

Jours depuis le début de la colonisation	Teneurs en UFC cm ⁻²			
	Témoins		*Traités aux phosphates	
	n°1	n°2	n°1	n°2
34	4,4×10 ⁴ ± 2,4×10 ⁴	1,7×10 ⁵ ± 0,9×10 ⁵	3,1×10 ³ ± 0,9×10 ³	7,5×10 ³ ± 1,1×10 ³
48	3,8×10 ⁵ ± 0,1×10 ⁵	7,2×10 ⁴ ± 1,6×10 ⁴	3,8×10 ⁵ ± 0,9×10 ⁵	1,1×10 ⁵ ± 0,7×10 ⁵
62	9,0×10 ⁴ ± 1,6×10 ⁴	1,2×10 ⁵ ± 0,3×10 ⁵	1,5×10 ⁵ ± 0,6×10 ⁵	8,4×10 ⁴ ± 2,2×10 ⁴
76	5,3×10 ⁵ ± 0,9×10 ⁵	2,1×10 ⁵ ± 0,8×10 ⁵	*7,4×10 ⁵ ± 1,6×10 ⁵	*2,2×10 ⁵ ± 0,7×10 ⁵
90	4,3×10 ⁵ ± 1,5×10 ⁵	1,9×10 ⁵ ± 0,3×10 ⁵	*7,6×10 ⁵ ± 2,0×10 ⁵	*7,9×10 ⁵ ± 1,6×10 ⁵
104	1,2×10 ⁶ ± 0,5×10 ⁶	1,1×10 ⁶ ± 8×10 ³	*9,1×10 ⁵ ± 8×10 ³	*8,4×10 ⁵ ± 3,4×10 ⁵

Tableau IX.26 : Dénombrements totaux de bactéries par marquage au DAPI dans les biofilms pendant la colonisation et de traitement aux phosphates

Jours depuis le début de la colonisation	Teneurs en cellules cm ⁻²			
	Témoins		*Traités aux phosphates	
	n°1	n°2	n°1	n°2
34	3,3×10 ⁶ ± 1,1×10 ⁶	2,6×10 ⁶ ± 1,5×10 ⁶	4,0×10 ⁶ ± 1,0×10 ⁶	4,6×10 ⁶ ± 0,9×10 ⁶
48	9,9×10 ⁶ ± 1,4×10 ⁶	7,2×10 ⁶ ± 1,4×10 ⁶	1,2×10 ⁷ ± 0,2×10 ⁶	1,2×10 ⁷ ± 0,05×10 ⁷
62	8,4×10 ⁶ ± 2,3×10 ⁶	1,0×10 ⁷ ± 0,1×10 ⁷	9,5×10 ⁶ ± 0,2×10 ⁶	5,7×10 ⁶ ± 1,1×10 ⁶
76	2,4×10 ⁷ ± 0,2×10 ⁷	1,8×10 ⁷ ± 0,2×10 ⁷	*2,3×10 ⁷ ± 0,3×10 ⁷	*2,0×10 ⁷ ± 0,4×10 ⁷
90	2,8×10 ⁷ ± 0,2×10 ⁷	2,1×10 ⁷ ± 0,3×10 ⁷	*2,7×10 ⁷ ± 0,5×10 ⁷	*2,8×10 ⁷ ± 0,4×10 ⁷
104	2,7×10 ⁷ ± 0,01×10 ⁷	3,0×10 ⁷ ± 0,1×10 ⁷	*3,7×10 ⁷ ± 0,7×10 ⁷	*2,7×10 ⁷ ± 0,01×10 ⁷

Tableau IX.27 : Activité exoprotéolytique potentielle dans les biofilms pendant la colonisation et de traitement aux phosphates

Jours depuis le début de la colonisation	Teneurs en nmol βN cm ⁻² min ⁻¹			
	Témoins		*Traités aux phosphates	
	n°1	n°2	n°1	n°2
34	4,2×10 ⁻³ ± 3,5×10 ⁻³	LD	1,6×10 ⁻³ ± 0,5×10 ⁻³	2,3×10 ⁻³ ± 0,3×10 ⁻³
48	3,3×10 ⁻³ ± 2,4×10 ⁻³	6,3×10 ⁻³ ± 0,7×10 ⁻³	8,1×10 ⁻³ ± 2,5×10 ⁻³	8,8×10 ⁻³ ± 1,7×10 ⁻³
62	8,4×10 ⁻³ ± 3,1×10 ⁻³	1,2×10 ⁻² ± 0,4×10 ⁻²	1,2×10 ⁻² ± 0,5×10 ⁻²	9,3×10 ⁻³ ± 2,4×10 ⁻³
76	2,1×10 ⁻² ± 0,1×10 ⁻²	1,9×10 ⁻² ± 0,3×10 ⁻²	*2,7×10 ⁻² ± 0,5×10 ⁻²	*4,5×10 ⁻² ± 0,8×10 ⁻²
90	4,4×10 ⁻² ± 0,2×10 ⁻²	2,9×10 ⁻² ± 0,7×10 ⁻²	*2,2×10 ⁻² ± 0,3×10 ⁻²	*3,3×10 ⁻² ± 0,5×10 ⁻²
104	5,1×10 ⁻² ± 0,4×10 ⁻²	4,3×10 ⁻² ± 0,6×10 ⁻²	*3,9×10 ⁻² ± 1,6×10 ⁻²	*3,8×10 ⁻² ± 0,3×10 ⁻²

Tableau IX.28 : Teneur en hydrates de carbone dans les biofilms, pendant la colonisation à T=63 jours.

Hydrates de carbone	Teneur (nmol cm ⁻²)			
	Témoins		Traités aux phosphates	
	n°1	n°2	n°1	n°2
Fucose	0,05	0,13 ± 0,01	0,16 ± 0,04	0,18 ± 0,02
2-déoxy-D-galactose	0,17 ± 0,01	0,16 ± 0,01	0,15 ± 0,02	0,16 ± 0,01
Rhamnose	0,11 ± 0,01	0,20 ± 0,004	0,12 ± 0,01	0,12 ± 0,01
Arabinose	0,25 ± 0,03	0,22 ± 0,01	0,22 ± 0,04	0,26 ± 0,01
Glucosamine HCl	0,16 ± 0,01	0,08 ± 0,003	0,20 ± 0,05	0,19 ± 0,04
Galactose	0,03	0,03	0,05 ± 0,01	0,05
Glucose	0,86 ± 0,06	1,14 ± 0,04	1,31 ± 0,16	1,35 ± 0,18
Mannose + Xylose	0,73 ± 0,05	0,83 ± 0,02	0,75 ± 0,07	0,84 ± 0,10
Fructose	1,16 ± 0,10	0,84 ± 0,04	0,88 ± 0,05	0,83 ± 0,15
Ribose	-	-	-	-
Sucrose	0,04 ± 0,0	0,07 ± 0,01	0,05 ± 0,01	0,05 ± 0,1

Tableau IX.29 : Hydrates de carbone pendant le traitement aux phosphates à T=104 jours,

Hydrates de carbone	Teneur (nmol cm ⁻²)			
	Témoins		Traités aux phosphates	
	n°1	n°2	n°1	n°2
Fucose	0,5 ± 0,01	0,483	0,5 ± 0,001	0,5
2-déoxy-D-galactose	<LD	<LD	<LD	<LD
Rhamnose	1,7 ± 0,3	1,322	1,4 ± 0,06	1,4 ± 0,1
Arabinose	1,2 ± 0,1	0,343	1,0 ± 0,2	0,9 ± 0,3
Glucosamine	<LD	<LD	<LD	<LD
Galactose	5,7 ± 0,04	4,393	5,5 ± 0,01	5,0 ± 0,6
Glucose	6,9 ± 0,1	5,567	6,4 ± 0,2	6,1 ± 0,3
Mannose + Xylose	1,3 ± 0,1	1,078	1,3 ± 0,04	1,2 ± 0,1
Fructose + Sucrose	<LD	<LD	<LD	<LD
Ribose	0,1 ± 0,01	0,094	0,1 ± 0,004	0,1 ± 0,01

NB : Application de phosphates à T= 63 jours,

Tableau IX.30 : Teneur en acides aminés dans les biofilms après hydrolyse, pendant la colonisation à T=63 jours

Acides aminés	Teneur (nmol cm ⁻²)			
	Témoins		Traités aux phosphates	
	n°1	n°2	n°1	n°2
Asparagine	0,06 ± 0,01	0,10 ± 0,004	0,09 ± 0,006	0,08 ± 0,01
Ac. Glutamique	0,03 ± 0,001	0,05 ± 0,003	0,04 ± 0,001	0,04
Sérine	0,00 ± 0,001	0,06 ± 0,01	0,05 ± 0,003	0,05 ± 0,004
Histidine	<LD	<LD	<LD	<LD
Arginine	0,03 ± 0,001	0,04	0,04	0,03
Glycine	0,29 ± 0,01	0,61 ± 0,02	0,53 ± 0,01	0,49 ± 0,02
Thréonine	<LD	<LD	<LD	<LD
Alanine	0,05 ± 0,002	0,09	0,08 ± 0,01	0,08 ± 0,001
Tyrosine	0,01 ± 0,002	0,02 ± 0,005	<LD	<LD
Méthionine	<LD	<LD	<LD	<LD
Valine	0,00	0,02 ± 0,006	0,03 ± 0,01	0,02 ± 0,01
Phénylalanine	0,01 ± 0,001	0,04 ± 0,001	0,04 ± 0,004	0,03
Isoleucine	<LD	<LD	<LD	<LD
Leucine	0,02	0,02 ± 0,001	0,04 ± 0,02	0,02
lysine	0,10 ± 0,004	0,13 ± 0,004	0,11 ± 0,02	0,12 ± 0,003

NB : Application de phosphates à T= 63 jours,

Tableau IX.31 : Teneur en acides aminés dans les biofilms après hydrolyse, pendant la phase de traitement aux phosphates à T=104 jours

Acides aminés	Teneurs en nmol cm ⁻²			
	Témoin		Traités aux phosphates	
	n°1	n°2	n°1	n°2
Asparagine	0,11 ± 0,002	0,11 ± 0,001	0,11	0,11 ± 0,01
Ac. Glutamique	0,06 ± 0,002	0,05 ± 0,002	0,06 ± 0,01	0,05 ± 0,01
Sérine	<LD	<LD	<LD	<LD
Histidine	<LD	<LD	<LD	<LD
Arginine	0,05 ± 0,002	0,04 ± 0,003	0,05 ± 0,003	0,05 ± 0,003
Glycine	0,53 ± 0,016	0,54 ± 0,01	0,47 ± 0,001	0,46 ± 0,15
Thréonine	<LD	<LD	<LD	<LD
Alanine	0,10 ± 0,01	0,09 ± 0,01	0,10	0,09 ± 0,02
Tyrosine	0,01 ± 0,01	0,02 ± 0,01	<LD	<LD
Méthionine	<LD	<LD	<LD	<LD
Valine	0,03 ± 0,003	0,03	0,03 ± 0,01	0,03 ± 0,01
Phénylalanine	0,03 ± 0,01	0,04 ± 0,002	0,02 ± 0,001	0,05
Isoleucine	0,08 ± 0,003	0,08 ± 0,001	0,05 ± 0,001	0,08 ± 0,003
Leucine	0,06 ± 0,004	0,06 ± 0,004	0,06 ± 0,002	0,06 ± 0,01
lysine	0,16 ± 0,003	0,13 ± 0,004	0,16 ± 0,002	0,14 ± 0,01

NB : Application de phosphates à T= 63 jours,

Tableau IX.32 : Teneurs en carbone organique total pendant la colonisation et le traitement aux phosphates *

Jours	Teneurs en mg C L ⁻¹			
	Eau en entrée du système	Moyenne après ajout de carbone	moyenne Entrées	Moyenne des sorties
7	2,51	2,67 ± 0,07	2,72 ± 0,05	2,41 ± 0,06
14	2,30	2,45 ± 0,08	2,61 ± 0,42	2,23 ± 0,02
21	2,08	2,38 ± 0,16	2,32 ± 0,09	2,13 ± 0,04
27	2,16	2,31 ± 0,08	2,40 ± 0,20	2,11 ± 0,03
35	2,97	3,16 ± 0,25	2,93 ± 0,12	2,73 ± 0,32
41	2,97	2,86 ± 0,08	2,93 ± 0,16	2,93 ± 0,10
47	2,96	2,84 ± 0,20	2,67 ± 0,15	2,62 ± 0,36
56	2,36	2,61 ± 0,24	2,56 ± 0,12	2,38 ± 0,07
63	2,86	2,90 ± 0,07	2,86 ± 0,09	2,71 ± 0,13
75	2,86	2,90 ± 0,07	2,86 ± 0,09	2,71 ± 0,13
84	2,59	2,90 ± 0,13	2,64 ± 0,05	2,41 ± 0,09
91	2,71	2,93 ± 0,11	2,83 ± 0,17	2,61 ± 0,18
98	2,41	2,53 ± 0,22	2,33 ± 0,13	2,31 ± 0,11

* Application de phosphates à T= 63 jours

Tableau IX.33 : Suivi du pH pendant la colonisation et le traitement aux phosphates*

Jours	Entrée du système	Sortie Témoin	Sortie phosphate	Sortie Témoin	Sortie phosphate	Moyenne pilotes
17		7,63	7,62	7,6	7,61	7,6 ± 0,01
27	7,62	7,65	7,61	7,62	7,63	7,6 ± 0,02
37	7,55	7,76	7,73	7,65	7,71	7,7 ± 0,05
42	7,51	7,53	7,53	7,53	7,54	7,5 ± 0,01
57	7,64	7,58	7,62	7,62	7,63	7,6 ± 0,02
66	7,54	7,51	7,51	7,55	7,54	7,5 ± 0,02
70	7,17	7,22	7,18	7,21	7,23	7,2 ± 0,02
85	7,56	7,54	7,53	7,56	7,59	7,6 ± 0,03
99	7,49	7,48	7,5	7,56	7,52	7,5 ± 0,03
124	7,47	7,39	7,45	7,41	7,42	7,4 ± 0,02

*: Application de phosphates à T= 63 jours,

Tableau IX.34 : Suivi des phosphates (mg P L⁻¹) pendant le traitement aux phosphates*

Jours	Témoins		Traités aux phosphates	
	n°1	n°2	n°1	n°2
64	0,014	<0,01	0,51	0,48
65	<0,01	<0,01	0,48	0,50
68	<0,01	<0,01	0,47	0,49
69	<0,01	<0,01	0,46	0,49
70	<0,01	<0,01	0,48	0,56
72	0,012	<0,01	0,60	0,54
75	<0,01	<0,01	0,51	0,43
83	<0,01	<0,01	0,52	0,55
84	<0,01	<0,01	0,55	0,61
91	<0,01	<0,01	0,50	0,52
94	<0,01	<0,01	0,50	0,51
96	<0,01	0,018	0,57	0,55
97	<0,01	<0,01	0,58	0,50
99	<0,01	<0,01	0,58	0,52
103	<0,01	<0,01	0,46	0,51

*: Application de phosphates à T= 63 jours,

Tableau IX.35 : Suivi de la température (°C) pendant la colonisation et le traitement aux phosphates*

Jours	Pilotes	Jours	Pilotes	Jours	Pilotes	Jours	Pilotes
2	24	17	22	30	24	56	22
4	23	18	23	31	24	57	21
5	23	19	23	33	23	60	23
6	22,5	20	17,5	35	23	63	23
7	22,5	21	22,5	37	22,5	65	24
8	22,5	22	23	38	23,5	66	22,5
9	23	23	21,5	42	23	71	23
11	22	24	23	44	23	80	23
12	22	26	23,5	49	23	89	23,5
13	22	27	20,5	50	24	98	21
14	22	28	21,5	51	25	124	22,5
15	22,5	29	23	55	21		

* : Application de phosphates à T= 63 jours,
Moyenne : 22,6 ($\pm 1,2$) °C

Annexe IX-2 : Chapitre V- effet des phosphates et de la chloramination sur les biofilms

Tableau IX.36 : Bactéries cultivables sur gélose R₂A (7 j à 22(±2)°C), pendant la chloramination (UFC cm⁻²)

Jours depuis le début de la colonisation	Témoin n°1 0,6 mg NH ₂ Cl L ⁻¹	Témoin n°2 1,9 mg NH ₂ Cl L ⁻¹	phosphaté n°1 0,6 mg NH ₂ Cl L ⁻¹	phosphaté n°2 1,9 mg NH ₂ Cl L ⁻¹
111	1,1×10 ⁴ ± 0,9×10 ⁴	4,9×10 ¹ ± 0,9×10 ¹	7,90×10 ⁴ ± 0,1×10 ⁴	4,9×10 ¹ ± 0,9 10 ¹
118	1,1×10 ² ± 0,1×10 ²	2,4 ± 1,7	6,60×10 ³ ± 0,3×10 ³	2,4 ± 1,7
132	6,1×10 ⁰ ± 1×10 ⁻⁵	5,5 ± 0,9	5,85×10 ³ ± 0,5×10 ³	5,5 ± 0,9

Tableau IX.37 : Dénombrements totaux de bactéries par marquage pendant la chloramination (cellules cm⁻²)

Jours depuis le début de la colonisation	0,6mg NH ₂ Cl L ⁻¹ Témoin n°1	1,9 mg NH ₂ Cl L ⁻¹ Témoin n°2	0,6 mg NH ₂ Cl L ⁻¹ phosphate n°1	1,9 mg NH ₂ Cl L ⁻¹ phosphate n°2
111	2,3×10 ⁷ ± 0,4×10 ⁷	1,4×10 ⁷ ± 0,1×10 ⁷	1,8×10 ⁷ ± 0,2×10 ⁷	1,6×10 ⁷ ± 0,1×10 ⁷
118	1,8×10 ⁷ ± 0,04×10 ⁵	1,5×10 ⁷ ± 0,3×10 ⁷	1,7×10 ⁷ ± 0,03×10 ⁷	1,6×10 ⁷ ± 0,01×10 ⁷
132	1,0×10 ⁷ ± 0,03×10 ⁷	6,3×10 ⁶ ± 1,3×10 ⁶	9,5×10 ⁶ ± 1,1×10 ⁶	9,4×10 ⁶ ± 1,7×10 ⁶

Tableau IX.38 : Activité exoprotéolytique potentielle pendant la chloramination

Jours depuis le début de la colonisation	Exprimé en nmolβN cm ⁻² min ⁻¹			
	0,6 mg NH ₂ Cl L ⁻¹ Témoin n°1	1,9 mg NH ₂ Cl L ⁻¹ Témoin n°2	0,6 mg NH ₂ Cl L ⁻¹ phosphate n°1	1,9 mg NH ₂ Cl L ⁻¹ phosphate n°2
111	9,5×10 ⁻³ ± 0,5×10 ⁻³	1,0×10 ⁻³ ± 0,1×10 ⁻³	9,9×10 ⁻³ ± 0,8×10 ⁻³	1,2×10 ⁻³ ± 0,5×10 ⁻³
118	1,3×10 ⁻³ ± 0,2×10 ⁻³	9,6×10 ⁻⁴ ± 2,4×10 ⁻⁴	1,2×10 ⁻³ ± 1,0×10 ⁻³	9,9×10 ⁻⁴ ± 3,6×10 ⁻⁴
132	9,8×10 ⁻⁴ ± 9,8×10 ⁻⁴	7,2×10 ⁻⁴ ± 2,1×10 ⁻⁴	7,2×10 ⁻⁴ ± 7,2×10 ⁻⁴	9,7×10 ⁻⁴ ± 6,5×10 ⁻⁴

Tableau IX.39 : Teneur en acides aminés dans les biofilms après hydrolyse à T=132 jours

Acides aminés	Teneur en nmol cm ⁻²			
	0,6mg NH ₂ Cl L ⁻¹ Témoin n°1	1,9 mg NH ₂ Cl L ⁻¹ Témoin n°2	0,6 mg NH ₂ Cl L ⁻¹ Phosphaté n°1	1,9 mg NH ₂ Cl L ⁻¹ Phosphaté n°2
Asparagine	0,05 ± 0,01	0,04 ± 0,004	0,08 ± 0,003	0,06 ± 0,01
Ac. Glutamique	0,02 ± 0,002	0,03 ± 0,001	0,03 ± 0,001	0,03
Sérine	0,03 ± 0,01	0,03 ± 0,003	0,04 ± 0,003	0,03 ± 0,003
Histidine	<LD	<LD	<LD	<LD
Arginine	0,01 ± 0,001	<LD	0,01 ± 0,001	0,01
Glycine	0,34 ± 0,01	0,34	0,47 ± 0,001	0,35 ± 0,02
Thréonine	<LD	<LD	<LD	<LD
Alanine	0,03 ± 0,002	0,02 ± 0,001	0,05	0,03 ± 0,001
Tyrosine	<LD	<LD	<LD	<LD
Méthionine	<LD	<LD	<LD	<LD
Valine	<LD	<LD	0,01 ± 0,001	<LD
Phénylalanine	<LD	<LD	<LD	<LD
Isoleucine	0,08 ± 0,001	0,08 ± 0,001	0,07	0,07 ± 0,001
Leucine	0,02	0,02 ± 0,002	0,03 ± 0,001	0,02 ± 0,003
lysine	0,03 ± 0,001	0,03 ± 0,001	0,04 ± 0,001	0,03 ± 0,001

(LD : Limite de détection)

Tableau IX.40 : Teneur dans les biofilms en hydrates de carbone après hydrolyse à T=132 jours

Hydrate de carbone	Teneur en nmol cm ⁻²			
	0,6mg NH ₂ Cl L ⁻¹	1,9 mg NH ₂ Cl L ⁻¹	0,6 mg NH ₂ Cl L ⁻¹	1,9 mg NH ₂ Cl L ⁻¹
	Témoin n°1	Témoin n°2	Phosphate n°1	Phosphate n°2
Fucose	0,31 ± 0,07	0,29 ± 0,03	0,44 ± 0,03	0,33 ± 0,04
2-déoxy-D-galactose	<LD	<LD	<LD	<LD
Rhamnose + Arabinose	0,71 ± 0,05	0,40 ± 0,04	0,96 ± 0,03	0,75
Glucosamine + Galactose	0,60 ± 0,03	0,44	0,89 ± 0,01	0,72 ± 0,02
Glucose	2,65 ± 0,26	2,56 ± 0,03	3,68 ± 0,05	3,26 ± 0,08
Mannose + Xylose	0,32 ± 0,02	0,34 ± 0,04	0,47	0,42
Fructose + Sucrose	<LD	<LD	<LD	<LD
Ribose	0,19 ± 0,10	0,15 ± 0,08	0,41 ± 0,07	0,17 ± 0,04

(LD : Limite de détection)

Tableau IX.41 : Suivi de la teneur en carbone organique total (mg C L⁻¹) pendant la chloramination

Jours	Eau en entrée du système	Moyenne après ajout de carbone	moyenne Entrées	Moyenne des sorties
107	2,99	2,96 ± 0,10	2,84 ± 0,10	2,58 ± 0,14
132	2,47	2,56 ± 0,14	2,33 ± 0,04	2,29 ± 0,08

Tableau IX.42 : Suivi des résiduels de monochloramine (mg NH₂Cl L⁻¹)

Jours	mg NH ₂ Cl L ⁻¹ appliqués				Jours	mg NH ₂ Cl L ⁻¹ appliqués			
	Témoin n°1	0,6 +Phosphate n°1	Témoin n°2	1,9 +Phosphate n°2		Témoin n°1	0,6 +Phosphate n°1	Témoin n°2	1,9 +Phosphate n°2
107	0,02	0,03	1,5	1,3	119	0,5	0,4	1,7	1,6
107	0,02	0,01	1,4	1,3	120	0,3	0,3	1,5	1,5
108	0,04	0,04	1,5	1,4	120	0,4	0,4	1,7	1,6
108	0,02	0,00	1,5	1,5	120	0,5	0,4	ND	ND
109	0,04	0,02	1,5	1,5	121	0,4	0,4	1,6	1,5
110	0,05	0,03	1,5	1,4	121	0,4	0,4	1,7	1,7
111	0,06	0,03	1,4	1,4	122	0,6	0,5	1,7	1,6
111	ND	ND	1,6	1,5	123	0,5	0,5	1,8	1,7
111	0,06	0,05	1,4	1,3	124	0,5	0,5	1,7	1,6
111	ND	ND	1,6	1,5	124	ND	ND	ND	ND
112	0,06	0,08	1,5	1,3	124	0,6	0,6	1,9	1,8
112	ND	ND	1,6	1,4	124	0,5	0,4	1,6	1,4
112	0,4	0,3	1,7	1,7	125	0,5	0,5	1,6	1,5
113	0,5	0,5	1,7	1,5	125	0,5	0,5	1,6	1,6
113	0,5	0,5	1,8	1,6	126	0,5	0,4	1,5	1,5
114	0,5	0,5	1,5	1,5	126	0,5	0,5	1,6	1,6
114	0,5	0,5	1,6	1,5	127	0,5	0,5	1,6	1,6
115	0,4	0,4	1,6	1,5	127	0,5	0,5	1,6	1,5
116	0,4	0,4	1,6	1,4	128	0,4	0,4	1,7	1,6
116	0,5	0,5	1,4	1,3	128	0,5	0,4	1,7	1,7
117	0,5	0,4	1,6	1,5	130	0,4	0,3	1,5	1,4
117	0,5	0,5	1,7	1,5	131	0,4	0,4	1,8	1,7
118	0,4	0,4	1,7	1,4	131	0,5	0,5	1,63	1,6
118	0,4	0,4	1,5	1,4	132	0,6	0,5	1,67	1,7
119	0,4	0,4	1,7	1,5					

Tableau IX.43 : Suivi du pH pendant la phase de chloramination

jours	Entrée du système	Sortie Témoin	Sortie phosphate	Sortie Témoin	Sortie phosphate	Moyenne pilotes
124	7,47	7,39	7,45	7,41	7,42	7,4 ± 0,02

Tableau IX.44 : Suivi des phosphates (mg P L⁻¹) pendant la chloramination

Jours	Phase de chloramination			
	Témoins		Traités aux phosphates	
	n°1	n°2	n°1*	n°2**
105	<0,01	<0,01	0,69	0,64
106	<0,01	<0,01	0,58	0,48
108	<0,01	<0,01	0,46	0,48
111	<0,01	<0,01	0,43	0,40
112	<0,01	<0,01	0,47	0,44
113	0,015	<0,01	0,45	0,44
114	<0,01	<0,01	0,47	0,45
119	<0,01	<0,01	0,49	0,47
121	<0,01	<0,01	0,48	0,51
124	<0,01	<0,01	0,51	0,49
125	<0,01	<0,01	0,54	0,52
126	<0,01	<0,01	0,59	0,50
127	<0,01	<0,01	0,61	0,58
131	<0,01	<0,01	0,55	0,61
132	<0,01	<0,01	0,62	0,65

*0,6 mg NH₂Cl L⁻¹ appliqués

**1,9 mg NH₂Cl L⁻¹ appliqué

Tableau IX.45 : Suivi des % d'orthophosphates dans les réacteurs traités aux phosphates, exp. A

Jours	Phase phosphates seuls		Jours	Phase chloramination	
	n°1	n°2		n°1	n°2
81	44,9	50,7	104	52,5	62,0
84	49,6	52,8	111	54,4	59,1
90	51,2	55,4	115	47,8	40,3
95	46,8	51,4	118	47,4	36,9
98	54,5	56,6	119	48,7	36,9
			126	45,8	36,0

Tableau IX.46 : Activité exoprotéolytique potentiel dans les biofilms pendant la colonisation, exp. A

Jours depuis le début de la colonisation	Teneurs en nmolβN cm ⁻² min ⁻¹			
	Témoins		Traités aux phosphates	
	n°1	n°2	n°1	n°2
61	2,6×10 ⁻² ± 1,1×10 ⁻²	2,5×10 ⁻² ± 4,8×10 ⁻³	2,3×10 ⁻² ± 1,1×10 ⁻²	2,3×10 ⁻² ± 3,1×10 ⁻³
76	3,8×10 ⁻² ± 1,6×10 ⁻²	3,8×10 ⁻² ± 8,9×10 ⁻³	4,0×10 ⁻² ± 1,1×10 ⁻³	5,4×10 ⁻² ± 1,0×10 ⁻²
89	4,3×10 ⁻² ± 3,8×10 ⁻³	4,1×10 ⁻² ± 1,2×10 ⁻³	3,5×10 ⁻² ± 5,4×10 ⁻³	4,6×10 ⁻² ± 9,8×10 ⁻³
102	5,5×10 ⁻² ± 4,1×10 ⁻³	4,0×10 ⁻² ± 8,3×10 ⁻³	5,1×10 ⁻² ± 1,2×10 ⁻²	6,3×10 ⁻² ± 2,1×10 ⁻²
113	8,3×10 ⁻² ± 1,1×10 ⁻²	6,0×10 ⁻² ± 4,2×10 ⁻³	6,6×10 ⁻² ± 1,2×10 ⁻²	7,2×10 ⁻² ± 7,9×10 ⁻⁴

Tableau IX.47 : Suivi % d'orthophosphates dans les pilotes traités aux phosphates, exp. B.

Début du traitement à T= 63 jours, Début de désinfection à T=104 jours

Jours	Phase phosphates seuls		Jours	Phase chloramination	
	n°1	n°2		n°1	n°2
64	54,6	64,4	105	53,6	52,1
65	58,4	63,8	106	50,5	58,8
68	59,8	56,1	108	51,0	50,2
69	56,4	57,1	111	56,1	50,0
70	60,7	56,7	112	50,7	48,8
72	52,4	59,1	113	56,8	49,3
75	59,1	59,3	114	55,4	48,2
83	59,1	59,3	119	45,3	42,9
84	60,4	59,2	121	51,2	43,6
91	57,6	59,4	124	44,9	46,2
94	58,1	57,4	125	41,9	42,2
96	50,8	55,0	126	45,2	52,1
97	51,7	58,8	127	40,2	44,3
99	55,8	57,6	131	48,7	44,9
103	54,4	57,6	132	47,8	46,6

Annexe IX-3 : Chapitre VI

Essai préliminaire sur 4 souches de coliformes

Tableau IX.48 : Coliformes cultivables sur gélose au TTC-tergitol (24h à 37(±1)°C)(UFC mL⁻¹)

Jours après inoculation	<i>E. cloacae</i>	<i>E. coli</i>	<i>C. freundii</i>	<i>K. pneumoniae</i>
0	8,3×10 ²	6,7×10 ²	1,12×10 ³	5,7×10 ²
1	2,5	2,2×10 ¹	8,5×10 ²	2,5
2	5,8×10 ⁻¹	< 10 ⁻²	6,7×10 ²	1,1×10 ⁻²
4	5,9×10 ⁻¹	< 10 ⁻²	3,3×10 ⁴	3,7×10 ⁻²
7	1,6	< 10 ⁻²	8,3×10 ⁴	1,1×10 ⁻²
8	1,0	< 10 ⁻²	1,3×10 ⁵	2×10 ⁻²

Tableau IX.49 : Nombre total de bactéries dénombrées par marquage au DAPI (cellules mL⁻¹)

Jours après inoculation	<i>E. cloacae</i>	<i>E. coli</i>	<i>C. freundii</i>	<i>K. pneumoniae</i>
0	1,41×10 ³	1,03×10 ³	1,37×10 ³	1,28×10 ³
1	9,23×10 ²	1,15×10 ³	2,18×10 ³	1,43×10 ³
2	1,23×10 ³	9,23×10 ²	8,55×10 ²	1,54×10 ³
4	1,69×10 ³	1,03×10 ³	4,93×10 ⁴	1,90×10 ⁶
7	1,80×10 ³	8,72×10 ²	1,01×10 ⁵	1,33×10 ³
8	1,28×10 ³	1,03×10 ³	1,09×10 ⁵	8,72×10 ²

Essai *Citrobacter freundii* n°1 et n°2

Tableau IX.50 : Essai n°1. *C. freundii* cultivables sur gélose au TTC-tergitol (24h à 37°C) (UFC mL⁻¹)

Jour de mesure après enrichissement en P	µg P-PO ₄ L ⁻¹ ajoutés				
	0	3	17	33	333
0 avant ajout de <i>C. freundii</i>	0	0	0	0	0
0	4,59×10 ²	4,59×10 ²	4,59×10 ²	4,59×10 ²	4,59×10 ²
1	4,50×10 ¹	5,04×10 ¹	4,05×10 ¹	3,60	1,30×10 ²
2	1,81×10 ¹	3,74×10 ¹	1,80×10 ⁻¹	< 10 ⁻²	1,72×10 ²
5	9,00×10 ⁻²	2,70×10 ⁰	< 10 ⁻²	8,37×10 ⁻¹	1,80×10 ¹
9	< 10 ⁻²	1,80×10 ⁻¹	< 10 ⁻²	5,05×10 ⁻¹	2,39×10 ¹

Tableau IX.51 : Essai n°2. *C. freundii* cultivables sur gélose au TTC-tergitol (24h à 37°C) (UFC mL⁻¹)

Jour de mesure après enrichissement en P	µg P-PO ₄ L ⁻¹ ajoutés				
	0	3	17	33	333
0 avant ajout de <i>C. freundii</i>	0	0	0	0	0
0	1,99×10 ³	1,99×10 ³	1,99×10 ³	1,99×10 ³	1,99×10 ³
1	1,45×10 ³	1,70×10 ³	1,49×10 ³	9,64×10 ²	1,04×10 ³
2	2,88×10 ¹	1,68×10 ²	1,13×10 ²	6,03×10 ¹	1,94×10 ²
5	1,98×10 ⁻¹	4,05×10 ¹	3,24×10 ¹	2,43×10 ¹	4,60×10 ¹
9	6,03	1,70×10 ¹	1,81×10 ¹	9,01	3,96×10 ¹

Essai *Escherichia coli* n°1 et n°2Tableau IX.52 : Essai n°1. *E. coli* cultivables sur gélose au TTC-tergitol (24h à 37(±1)°C) (UFC mL⁻¹)

Jour de mesure après enrichissement en P	µg P-PO ₄ L ⁻¹ ajoutés				
	0	5	25	50	500
0 avant ajout de <i>E. coli</i>	0	0	0	0	0
0	7,00×10 ²	7,00×10 ²	7,00×10 ²	7,00×10 ²	7,00×10 ²
1	8,0×10 ¹	2,36×10 ²	2,18×10 ²	2,73×10 ²	1,91×10 ²
2	1×10 ⁻²	1,8×10 ⁻¹	2,7×10 ⁻¹	3,9×10 ⁻¹	1,4
5	< 10 ⁻²	< 10 ⁻²	< 10 ⁻²	< 10 ⁻²	< 10 ⁻²
9	< 10 ⁻²	< 10 ⁻²	< 10 ⁻²	< 10 ⁻²	< 10 ⁻²

Tableau IX.53 : Essai n°2. *E. coli* cultivables sur gélose au TTC-tergitol (24h à 37(±1)°C) (UFC mL⁻¹)

Jour de mesure après enrichissement en P	µg P-PO ₄ L ⁻¹ ajoutés				
	0	5	25	50	500
0 avant ajout de <i>E. coli</i>	0	0	0	0	0
0	1,36×10 ³	1,36×10 ³	1,36×10 ³	1,36×10 ³	1,36×10 ³
1	8,0×10 ²	1,20×10 ³	1,40×10 ³	1,00×10 ³	1,13×10 ³
2	1,65×10 ²	1,65×10 ²	1,60×10 ²	1,86×10 ²	1,76×10 ²
5	3×10 ⁻²	1,0×10 ⁻¹	3,0×10 ⁻¹	7×10 ⁻²	8,9×10 ⁻¹
8	2×10 ⁻²	7×10 ⁻²	2,3×10 ⁻¹	1×10 ⁻²	3,4×10 ⁻¹

Essais sur pilotes Rotatorques, Injection de *Citrobacter freundii* n°1Tableau IX.54 : Coliformes cultivables sur gélose mT7 (24h à 35(±2)°C) (UFC mL⁻¹)

Heures après inoculation	Témoins			
	n°1	n°2	n°3	n°4
1	5,20×10 ⁷	7,80×10 ⁷	6,50×10 ⁷	5,80×10 ⁷
20	1,35×10 ¹	5,45×10 ¹	1,42×10 ¹	5,14
24	9,91×10 ⁻¹	1,11×10 ¹	1,22×10 ¹	4,59
48,75	< 10 ⁻²	7,21×10 ⁻¹	4,77×10 ⁻¹	1,80×10 ⁻²
91,75	< 10 ⁻²	< 10 ⁻²	< 10 ⁻²	< 10 ⁻²

Tableau IX.55 : Coliformes cultivables sur gélose mEndo (24h à 35(±2)°C) (UFC mL⁻¹)

Heures après inoculation	Témoins			
	n°1	n°2	n°3	n°4
1	6,50×10 ⁷	6,30×10 ⁷	6,20×10 ⁷	5,20×10 ⁷
20	1,62	1,38×10 ¹	9,01×10 ⁻¹	4,05
24	1,80×10 ⁻¹	7,03	1,98	1,80×10 ⁻¹
48,75	< 10 ⁻²	6,13×10 ⁻¹	1,89×10 ⁻¹	< 10 ⁻²
91,75	< 10 ⁻²	1,00×10 ⁻²	1,00×10 ⁻²	< 10 ⁻²

Essais sur pilotes Rotatorques, Injection de *Citrobacter freundii* n°2Tableau IX.56 : Coliformes cultivables sur gélose mT7 (24h à 35(±2)°C) (UFC mL⁻¹)

Heures après inoculation	Témoins		0,5 mg P L ⁻¹ ajoutés	
	n°1	n°2	n°1	n°2
0	3,84×10 ⁷	3,68×10 ⁷	4,03×10 ⁷	3,16×10 ⁷
15	2,90×10 ³	1,04×10 ³	6,22×10 ²	2,09×10 ³
18	5,50×10 ²	3,90×10 ²	2,49×10 ³	2,70×10 ²
20	1,71×10 ²	1,07×10 ²	3,38×10 ²	2,63×10 ²
38	6,73×10 ⁻¹	3,48	2,89	2,31×10 ¹
41	3,36×10 ⁻¹	1,45	1,60	1,29×10 ¹

Tableau IX.57 : Coliformes cultivables sur gélose mEndo (24h à 35(±2)°C) (UFC mL⁻¹)

Heures après inoculation	Témoins		0,5 mg P L ⁻¹ ajoutés	
	n°1	n°2	n°1	n°2
0	3,63×10 ⁷	3,48×10 ⁷	3,81×10 ⁷	2,99×10 ⁷
15	3,03×10 ³	5,14×10 ²	7,93×10 ²	1,41×10 ³
18	8,00×10 ²	3,60×10 ²	3,21×10 ³	2,10×10 ²
20	1,63×10 ²	1,14×10 ²	4,20×10 ²	2,69×10 ²
38	6,73×10 ⁻¹	3,65	3,55	2,24×10 ¹
41	3,36×10 ⁻¹	1,43	2,37	1,17×10 ¹

Essais sur pilotes Rototorques, Injection de *Citrobacter freundii* n°3Tableau IX.58 : Coliformes cultivables sur gélose mT7 (24h à 35(±2)°C) (UFC mL⁻¹)

Heures après inoculation	Témoins		0,5 mg P L ⁻¹ ajoutés	
	n°1	n°2	n°1	n°2
0	1,1×10 ⁷	7,4×10 ⁶	1,2 10 ⁷	1,1×10 ⁷
3	1,6×10 ⁶	1,7×10 ⁶	2,4 10 ⁶	1,4×10 ⁶
18	3,7	2,8×10 ²	1,0 10 ²	6,5×10 ¹
20	1,3×10 ¹	2,6×10 ¹	3,3 10 ¹	1,4×10 ¹
23	3,2	7,0	8,6	5,4
42	1,4×10 ⁻¹	4,3×10 ⁻¹	6,2 10 ⁻¹	2,9×10 ⁻¹
45	1,4×10 ⁻¹	2,7×10 ⁻¹	3,8 10 ⁻¹	1,5×10 ⁻¹
67	3,0×10 ⁻²	6,5×10 ⁻²	5,5 10 ⁻²	2,5×10 ⁻²
115	<5×10 ⁻³	<5×10 ⁻³	<5×10 ⁻³	<5×10 ⁻³

Tableau IX.59 : Coliformes cultivables sur gélose mEndo (24h à 35(±2)°C) (UFC mL⁻¹)

Heures après inoculation	Témoins		0,5 mg P L ⁻¹ ajoutés	
	n°1	n°2	n°1	n°2
0	8,9×10 ⁶	6,5×10 ⁶	6,9×10 ⁶	8,7×10 ⁶
3	7,1×10 ⁵	5,7×10 ⁵	1,2×10 ⁶	7,1×10 ⁵
18	5,7	3,3	3,8	1,7
20	1,9	3,3	3,8	1,7
23	1,0	2,5	1,3	7,9×10 ⁻¹
42	1,1×10 ⁻¹	4,3×10 ⁻¹	4,2×10 ⁻¹	2,7×10 ⁻¹
45	7,5×10 ⁻²	2,2×10 ⁻¹	3,1×10 ⁻¹	4,5×10 ⁻²
67	3,5×10 ⁻²	4,0×10 ⁻²	6,0×10 ⁻²	4,5×10 ⁻²
115	<5×10 ⁻³	<5×10 ⁻³	5,0×10 ⁻³	<5×10 ⁻³

Essais sur pilotes Rototorques, Suivi par FISH

Composition de populations témoins

Essai n°A, Phase de Colonisation

Tableau IX.60 : Comptes par FISH (% de cellules totales hybridées avec une sonde)

Sonde	Jours	Témoin n°1	Témoin n°2
EUB338	61	70,0±5,5	73,7±6,5
	76	48,7 ± 18,6	63,7 ± 1,5
	89	70,1 ± 5,7	57,54
	102	57,3± 3,6	68,6±0,5
	113	66,2 ± 11,6	72,4±13,3
ALF1b	61	18,4±3,6	18,4±2,6
	76	6,9±5,1	8,2±7,0
	89	10,3 ± 4,3	7,9±4,8
	102	13,3 ± 6,2	11,8±0,7
	113	15,4 ± 4,2	15,5 ± 6,4
BET42a	61	35,0 ± 0,4	18,6 ± 2,0
	76	24,9 ± 0,03	19,6±2,4
	89	27,3 ± 0,2	30,4 ± 0,3
	102	21,0 ± 4,8	27,2 ± 0,6
	113	20,8 ± 4,5	21,7 ± 3,8
GAM42a	61	1,29± 0,37	1,18± 0,02
	76	0,7±0,3	1,07
	89	1,1 ± 0,7	1,1 ± 0,9
	102	0,4±0,5	1,3±0,6
	113	1,4±0,3	1,5±0,2

Tableau IX.61 : Suivi de la teneur en carbone organique total, (mg C L⁻¹)

Jours	Eau en entrée du système	Moyenne après ajout de carbone	moyenne Entrées	Moyenne des sorties
7	2,34	2,39 ± 0,04	ND	2,17 ± 0,08
19	2,03	2,28 ± 0,10	ND	2,09 ± 0,03
40	1,92	2,18 ± 0,12	ND	1,96 ± 0,05
46	2,03	2,16 ± 0,22	1,99 ± 0,02	1,86 ± 0,03
56	1,97	2,11 ± 0,04	1,98 ± 0,03	1,86 ± 0,03
61	2,06	ND	2,02 ± 0,05	1,83 ± 0,04
76	2,00	2,29 ± 0,10	2,03 ± 0,05	1,86 ± 0,01
85	1,99	2,16 ± 0,24	1,85 ± 0,03	1,86 ± 0,19
89	2,02	2,22 ± 0,28	2,22 ± 0,25	1,86 ± 0,14

Tableau IX.62 : Suivi du pH

Jours	pH entrée du système	Témoins n°1	Témoins n°2
7	ND	7,4	7,4
15	ND	7,24	7,24
20	ND	7,3	7,3
28	7,2	7,2	7,1
47	ND	7,28	7,18
53	ND	7,26	7,26
78	ND	7,29	7,23
90	ND	7,34	7,32
111	7,25	7,22	7,23
112	7,24	7,17	7,23

Tableau IX.63 : Suivi de la température (°C)

Jours	Pilote	Jours	Pilotes
7	22,5	53	25
8	23,5	56	25
11	25	61	24
20	24,5	64	25
21	24,5	68	23
22	24,5	71	23,5
28	24,5	78	24
32	25	84	24
35	25	88	25
37	24	104	24
42	24,5	106	25
47	24,125	110	26

Essai n°B, Phase de Colonisation**Tableau IX.64 : Comptes par FISH, (% de cellules totales hybridées avec une sonde)**

Sondes	Jours	Témoins		Traités aux phosphates	
		n°1	n°2	n°1	n°2
EUB338	34	67,1 ± 2,0	65,2 ± 10,5	78,4 ± 5,0	71,7 ± 0,5
	48	55,4 ± 2,0	55,7 ± 5,6	60,2 ± 1,8	55,8 ± 1,0
	62	47,5 ± 1,3	62,4 ± 6,0	65,3 ± 1,2	51,9 ± 5,2
ALF1b	34	20,0 ± 21,4	6,0 ± 0,5	7,4 ± 6,4	4,9 ± 3,6
	48	2,4 ± 1,4	6,4 ± 5,4	1,1 ± 0,8	2,8 ± 2,4
	62	19,3 ± 7,8	10,7 ± 7,6	12,8 ± 6,9	12,4 ± 0,6
BET42a	34	13,0 ± 2,6	23,8 ± 7,5	30,9 ± 9,1	17,1 ± 4,0
	48	16,4 ± 0,7	20,2 ± 5,1	19,2 ± 2,6	10,6 ± 0
	62	6,0 ± 4,5	15,9 ± 3,3	9,5 ± 2,2	11,9 ± 2,7
GAM42a	34	4,3 ± 0,3	2,4 ± 0,1	2,0 ± 1,6	2,0 ± 1,3
	48	1,0 ± 0,4	0,9 ± 0,4	0,5 ± 0,2	0,7 ± 0,3
	62	1,8 ± 1,4	1,3 ± 0,7	0,8 ± 0,4	0,9 ± 0,8

Essai n°C. Phase de Colonisation**Tableau IX.65 : Comptes par FISH (% de cellules totales hybridées avec une sonde)**

Sonde	Jours	% / nombres totaux	
		Témoin	Chlorés avant chloration
EUB338	42	73,2 ± 0,6	65,3 ± 6,1
	49	81,4 ± 0,7	76,5 ± 4,0
ALF1b	42	1,3 ± 0,2	1,8 ± 0,9
	49	0,45 ± 0,1	0,78 ± 0,2
BET42a	42	23,2 ± 3,6	30,4 ± 6,9
	49	22,8	28,1 ± 2,0
GAM42a	42	0,3 ± 0,1	0,3 ± 0,1
	49	0,3 ± 0,03	0,4 ± 0,1

Tableau IX.66 : Dénombrements totaux de bactéries par marquage au DAPI, (cellules cm⁻²)

Jours depuis le début de la colonisation	Témoin	Chloré
42	7,61 10 ⁶ ± 5,8 10 ⁶	2,48 10 ⁶
49	7,6 10 ⁶ ± 0,1 10 ⁶	7,17 10 ⁶ ± 0,1 10 ⁶

Composition de populations phosphatés**Tableau IX.67 : Comptes par FISH dans les biofilms, (% de cellules totales hybridées avec une sonde)**

Sondes	Jours	Témoin n°1	Témoin n°2	Phosphate n°1	Phosphate n°2
EUB338	76	49,7 ± 1,7	50,4 ± 2,8	46,0 ± 2,3	51,1 ± 14,1
	90	58,0 ± 0,8	59,2 ± 11,2	67,1 ± 1,6	63,8 ± 1,9
	104	58,0 ± 7,0	64,7 ± 8,9	59,0 ± 6,0	76,1 ± 0,6
ALF1b	76	11,4 ± 10,6	9,5 ± 1,3	4,5 ± 1,4	6,0 ± 3,0
	90	25,7 ± 5,0	18,9 ± 0,7	25,5 ± 2,3	11,4 ± 8,5
	104	10,6 ± 1,2	9,1 ± 1,4	13,2 ± 6,2	16,5 ± 1,8
BET42a	76	11,6 ± 2,0	15,0 ± 4,2	14,7 ± 5,6	19,3 ± 7,1
	90	27,0 ± 1,6	28,1 ± 0,7	28,1 ± 2,6	25,9 ± 0,5
	104	22,3 ± 2,6	20,0 ± 1,5	27,4 ± 2,8	23,3 ± 3,3
GAM42a	76	2,8 ± 1,8	1,4 ± 0,2	2,3 ± 2,0	4,0 ± 0,9
	90	2,8 ± 0,02	0,7 ± 0,2	3,2 ± 1,0	1,4 ± 0,1
	104	1,5 ± 0,6	0,8 ± 0,4	2,3 ± 1,3	1,5 ± 1,5

Composition de populations fixées désinfectées

Expérience A : chloration à 1 mg Cl₂L⁻¹, Début de chloration à T=113 jours

Tableau IX.68 : Comptes par FISH dans les biofilms (% de cellules totales hybridées) Exp. A (chloration)

Sonde	Jours	1 mg/L Témoin n°2
EUB338	116	23,3 ± 8,5
	120	16,1 ± 7,5
ALF1b	116	2,0 ± 1,0
	120	7,9 ± 1,7
BET42a	116	1,6 ± 1,4
	120	1,3 ± 1,0
GAM42a	116	1,3±0,1
	120	4,8±1,5

Tableau IX.69 : Bactéries cultivables sur gélose R2A, après 7 jours d'incubation à 22(±2)°C (mL⁻¹) et dénombrements totaux de bactéries dans un biofilm chloré pendant la chloration. Exp. A (chloration)

Jours depuis le début de la colonisation	Dénombrements totaux	Cultivables	AEP
116	9,9×10 ⁵ ± 1,3×10 ⁵	3,1×10 ³ ± 6,2×10 ²	<1,2×10 ⁻⁴
120	2,8×10 ⁵ ± 2,9×10 ⁴	8,7×10 ¹ ± 1,2×10 ¹	<1,2×10 ⁻⁴

Tableau IX.70 : Suivi de la teneur en carbone organique total (mg C L⁻¹). Exp. A (chloration)

Jours	Eau en entrée du système	Moyenne après ajout de carbone	moyenne des entrées	Moyenne des sorties
113	2,06	ND	ND	1,93 ± 0,05
116	2,18	2,27 ± 0,14	2,07 ± 0,21	2,08 ± 0,18
120	2,18	2,07 ± 0,08	1,97 ± 0,05	1,90 ± 0,09

Tableau IX.72 : Suivi du pH. Exp. A (chloration)

Jours	pH entrée du système	Témoins + 2,5 mg/L
118	7.32	7.32

Tableau IX.71 : Suivi du résiduel de chlore, dans le réacteur chloré. Exp. A (chloration)

Jours	mg Cl ₂ L ⁻¹
114	0.05
115	0.18
116	0.35
117	0.39
118	0.55
119	0.38
120	0.50
125	0.72
126	0.79
127	0.77

Tableau IX.73 : Suivi de la température. Exp. A (chloration)

Jour	Pilote
111	25
112	25
116	23.5
118	25
119	25
121	26.5

Expérience B : chloration à 0,75 mg Cl₂L⁻¹, Début de chloration à T=50 jours**Tableau IX.74 : Comptes par FISH, (% de cellules totales hybridées avec une sonde) Exp. B. (chloration)**

Sonde	Jours	%/Comptes totaux	
		Témoin n°1	Chlorés
EUB338	52	72,1 ± 2,55	4,6 ± 0,1
	56	76,9 ± 2,27	0,86 ± 0,01
ALF1b	52	2,0 ± 1,2	0,28 ± 0,01
	56	3,3 ± 0,05	ND
BET42a	52	20,3 ± 3,8	0,3 ± 0,1
	56	20,02 ± 3,2	ND
GAM42a	52	0,4 ± 0,05	0,1 ± 0,1
	56	0,4 ± 0,5	ND

Début de chloration à T=50 jours

Tableau IX.75 : Dénombrements totaux de bactéries dans les biofilms (bactéries cm²). Exp. B. (chloration)

Jours depuis le début de la colonisation	Témoin	Chloré
52	2,03×10 ⁵ ± 0,01×10 ⁵	5,75×10 ⁶ ± 0,3×10 ⁶
56	5,22×10 ⁴ ± 1,5×10 ⁴	6,03×10 ⁶ ± 1,2×10 ⁶
59	8,10×10 ⁴ ± 1,5×10 ⁴	5,03×10 ⁶ ± 0,7×10 ⁶

Début de chloration à T=50 jours

Tableau IX.76 : Suivi du résiduel de chlore, dans le réacteur chloré (mg Cl₂ L⁻¹) Exp. B. (chloration)

Jours	mg Cl ₂ L ⁻¹
51	0,11
52	0,22
53	0,34
54	0,39
55	0,41
56	0,43
57	0,41
58	0,40
59	0,44

Tableau IX.77 : Suivi de la teneur en carbone organique total (mg C L⁻¹). Exp. B. (chloration)

Jours	Eau en entrée du système	Moyenne après ajout de carbone	moyenne Entrées	Moyenne des sorties
2	1,825	2,06	2,18± 0,17	2,12 ± 0,10
9	2,6	2,29 ± 0,13	2,54 ± 0,16	2,33 ± 0,34
14	2,08	2,26 ± 0,02	2,14 ± 0,07	2,22 ± 0,30
22	1,98	2,32 ± 0,07	2,10	2,10 ± 0,08
31	2,21	2,88 ± 0,18	2,47 ± 0,01	2,80
36	2,22	2,16 ± 0,10	2,07 ± 0,01	1,96 ± 0,01
45	2,08	2,24 ± 0,10	2,15 ± 0,06	2,06
52	2,29	2,38 ± 0,23	2,55 ± 0,08	2,11 ± 0,01
59	ND	2,51 ± 0,01	2,51	2,38 ± 0,11

Début de chloration à T=50 jours

Tableau IX.78 : Suivi du pH. Exp. B. (chloration)

Jours depuis T0	Eau en entrée du système	Témoin	Chloré
2	7,7	7,79	7,79
7	7,73	7,77	7,77
16	7,65	7,62	7,61
23	7,66	7,68	7,68
31	7,59	7,62	7,6
35	7,71	7,66	7,67
45	7,6	7,6	7,6
52	7,63	7,66	7,71
59	7,58	7,55	7,6

Début de chloration à T=50 jours

Tableau IX.79 : Suivi de la température (°C). Exp. B. (chloration)

Jours	Pilotes	Jours	Pilotes	Jours	Pilotes
2	23	15	25	38	24
3	23	17	24,5	40	23
4	23	18	24	41	23,5
6	23	21	24	44	23,5
7	23	23	24	47	23
9	25	31	24,5	50	24
10	25	32	24	52	24
11	24	34	24	56	23
13	24	35	24	59	23
14	24,5	36	25		

Début de chloration à T=50 jours

Expériences Cet D : chloramination et effet sur la composition du biofilmTableau IX.80 : Comptes par FISH pendant la monochloramination, en fonction de la dose de monochloramine appliquée (exprimée en mg NH₂Cl/L), (% de cellules totales hybridées avec une sonde). Exp. C et D (chloramination)

Sonde	Jours	0,6 mg/L	1,9 mg/L	0,6 mg/L	1,9 mg/L
		Témoin n°1	Témoin n°2	Phosphaté n°1	Phosphaté n°2
EUB338	111	48,9 ± 11,2	42,9 ± 14,3	45,4 ± 10,2	34,0 ± 6,6
	118	22,7 ± 1,9	9,7 ± 1,0	26,4 ± 3,2	11,1 ± 1,9
	132	11,9 ± 6,6	7,19 ± 0,03	9,0 ± 3,1	6,4 ± 1,3
ALF1b	111	10,9 ± 5,8	12,1 ± 0,6	4,8 ± 2,6	6,2 ± 3,2
	118	3,54 ± 0,04	0,9 ± 0,7	3,0 ± 0,3	0,8 ± 0,2
	132	0,7 ± 0,1	0,36 ± 0,27	1,4 ± 0,7	0,4 ± 0,02
BET42a	111	9,0 ± 2,1	1,4 ± 0,1	7,6 ± 0,3	2,0 ± 0,5
	118	2,1 ± 2,8	1,6 ± 1,5	1,3 ± 0,6	0,9 ± 0,8
	132	0,34 ± 0,02	1,5 ± 0,6	1,1 ± 0,8	0,8 ± 0,5
GAM42a	111	0,9 ± 0,9	1,0 ± 0,5	0,5 ± 0,4	0,8 ± 0,6
	118	1,4 ± 0,4	0,8 ± 0,1	1,1 ± 0,6	0,4 ± 0,3
	132	0,04 ± 0,02	0,17 ± 0,11	0,34 ± 0,09	0,10 ± 0,10

Composition des populations suspendues, Essai B

Tableau IX.81 : Comptes par FISH en entrée et sortie de deux pilotes sans traitement, (T=116 jours)

	EUB338	ALF1b	BET42a	GAM42a
Entrée n°1	75,7 ± 5,3	2,2 ± 2,0	62,5 ± 2,5	0,3 ± 0,2
Entrée n°2	85,1 ± 3,9	1,0 ± 0,6	62,6 ± 3,6	0,3 ± 0,02
Sortie n°1	76,4 ± 3,9	0,8 ± 0,5	60,4 ± 5,1	0,3 ± 0,1
Sortie n°2	77,6 ± 6,6	2,2 ± 1,7	45,5 ± 2,3	0,3 ± 0,3

Prénom, Nom :

Magali BATTÉ



Nature de la thèse :

**Doctorat de l'Université Henri Poincaré, Nancy I
en Biologie - Santé - Environnement**

VU, APPROUVE et PERMIS D'IMPRIMER

Nancy, le 9 octobre 2001 n° 556

Le Président de l'Université Henri Poincaré, Nancy I

Claude BURLET

Résumé

Les phosphates peuvent être appliqués en eaux potables pour limiter la corrosion et la solubilisation du plomb. Cependant, les phosphates sont des nutriments bactériens essentiels. Aussi, les travaux présentés se sont attachés à déterminer leurs effets sur la physiologie bactérienne, en particulier en évaluant la croissance bactérienne, composition chimique des biofilms, leur diversité taxonomique et leur résistance à la chloramination en présence ou non de phosphates.

Différentes eaux, conditions hydrauliques, populations bactériennes, concentrations en phosphates et solutions de phosphates ont été testées, sans que la physiologie bactérienne ne soit modifiée par les phosphates. La croissance et la cultivabilité des populations libres ne sont pas statistiquement modifiées quelle que soit la dose de phosphates appliquée (entre 0 et 2 mg P L⁻¹). La cultivabilité, l'activité exoprotéolytique potentielle, les dénombrements totaux, les cellules détectées par hybridation *in situ* avec la sonde EUB338 ciblant Eubactéries, la composition des biofilms en termes d'hydrates de carbone et d'acides aminés n'ont pas montré de différences significatives au niveau des biofilms. Les phosphates tendent à se fixer dans les biofilms et la composition taxonomique des biofilms change puisque les Gamma-Proteobactéries sont statistiquement mieux représentées. Par ailleurs, l'ajout subséquent de monochloramine dans les eaux a montré que les bactéries fixées peuvent transitoirement présenter un abattement 2 fois plus faible de leur cultivabilité en présence de phosphates.

Cependant, tels qu'étudiés, les phosphates induisent peu de changements en comparaison des effets de la corrosion sur les densités bactériennes, des effets de la désinfection sur la composition taxonomique des biofilms et de leurs teneurs en hydrates de carbone ou acides aminés ou encore des effets de la fixation à un support (formation d'un biofilm) sur la composition phylogénétique des populations.

Mots clés : Phosphates, réseau de distribution, biofilm, activité exoprotéolytique potentielle (AEP) composition taxonomique (FISH), hydrates de carbone, acides aminés, monochloramine

Abstract

Phosphates may be applied to limit corrosion and plumbosolvency in drinking water distribution system. However, phosphates are bacterial nutrients. Therefore, the study has been focused on phosphate effects on bacterial physiology in terms of bacterial growth, biofilm chemical composition, taxonomic diversity and monochloramine disinfection with or without phosphate addition to drinking water.

Different waters, hydraulics conditions, bacterial populations, phosphate concentrations and phosphate solutions have been tested, without modifying bacterial physiology. Growth and cultivability of suspended populations are not statistically modified whatever the phosphate supply is (from 0 to 2 mg P L⁻¹). None of following biofilms measurements were modified by phosphate addition: cultivability, potential exoproteolytic activity, total counts with DAPI staining, proportion of cells hybridising with EUB338 probe (targeting Eubacteria taxonomic level), biofilm compositions as expressed by carbohydrates, and aminoacids concentrations. However, phosphate concentration of biofilm is doubled, and the proportion of the Gamma-subclass of Proteobacteria in fixed population is statistically enhanced by phosphate addition. Phosphate treatment transiently leads to limit the decrease of cultivability due to chloramination. However, bacterial changes induced by phosphates have few significance compared to (i) their effect on corrosion and thereby on associated-biofilm, (ii) the effects of disinfection on biofilm composition in term of carbohydrates and aminoacids, and taxonomic composition and even (iii) compared to the effect of fixation to a surface (biofilm formation), suspended population being less taxonomically diversified.

Key words: Phosphates, Drinking water distribution system, biofilm, taxonomic composition (FISH), carbohydrates, aminoacids, Potential exoproteolytic activity (PEPA), monochloramine