



**HAL**  
open science

# Application d'une méthode électrochimique à l'étude de la fixation des *E. Coli* sur supports immergés

Marie-José Jourdain

► **To cite this version:**

Marie-José Jourdain. Application d'une méthode électrochimique à l'étude de la fixation des *E. Coli* sur supports immergés. Ecologie, Environnement. Université Paul Verlaine - Metz, 1983. Français. NNT : 1983METZ002S . tel-01775650

**HAL Id: tel-01775650**

**<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01775650>**

Submitted on 24 Apr 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](mailto: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.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

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

S<sub>1</sub>/M<sub>2</sub>

83/14

1<sup>er</sup> ex

UNIVERSITE DE METZ

CENTRE DES SCIENCES DE L'ENVIRONNEMENT

APPLICATION D'UNE METHODE  
ELECTROCHIMIQUE A L'ETUDE DE LA  
FIXATION DES E. COLI SUR SUPPORTS IMMERGES

THESE

presentée par Mme JOURDAIN Marie-José  
pour obtenir le grade de Docteur de 3ème cycle  
option Ecologie



Soutenu le 22 juin 1983 devant la Commission d'Examen :

PRESIDENT

M. BLOCK J.C.  
Professeur au Centre des Sciences de l'Environnement METZ

MEMBRES DU JURY

Melle VASSEUR P.  
Professeur au Centre des Sciences de l'Environnement METZ

Mme SCHWARZBROD J.  
Professeur à la Faculté des Sciences Pharmaceutiques NANCY

M. NETCHE M.

BIBLIOTHEQUE UNIVERSITAIRE DE METZ

NANCY



022 420207 3

*A tous ceux qui me sont chers,*

*Avec toute mon affection.*

AVANT - PROPOS

Ce travail a été effectué à l'Institut de Recherches Hydrologiques de NANCY sous la direction scientifique de Monsieur F. COLIN. Il nous a accueilli dans son laboratoire et inspiré ce travail. Par l'étendue de ses connaissances il a su nous passionner dans ce vaste domaine de l'écologie des eaux.

Nous tenons à lui exprimer tout notre respect et notre profonde gratitude.

A notre Président de Thèse

Monsieur le Professeur J.C. BLOCK

En me guidant avec compétence, m'a prodigué ses conseils judicieux et ses encouragements bienveillants qu'il soit assuré de mes plus profonds remerciements et de ma reconnaissance.

A nos juges

Melle P. VASSEUR professeur au Centre des Sciences de l'Environnement de Metz qu'elle accepte l'expression de notre reconnaissance pour avoir bien voulu juger notre travail.

Mme J. SCHWARZBROD professeur à la Faculté de Pharmacie de Nancy qui m'a fait l'honneur de participer à ce jury.

M. M. METCHE professeur de biochimie appliquée à l'INPL de Nancy pour avoir bien voulu m'honorer de sa présence.

Je tiens à associer mes remerciements à toutes les personnes du laboratoire de L'Institut de Recherches Hydrologiques qui ont su nous aider à l'élaboration de ce travail.

A M. GASSER et Mme CHILLET pour leur efficacité et leur gentillesse, qu'ils soient remerciés pour leur contribution à la dactylographie de ce travail.

BIBLIOTHEQUE UNIVERSITAIRE - METZ	
N° inv.	19830045
Cote	S/113 83/2
Loc	Magasin

*La réalisation de ce travail de recherche a été rendu possible  
grâce à la participation financière du Ministère de l'Environnement,  
Comité Scientifique "EAU" (marché n°79-02-010)*

## S O M M A I R E

I - <u>INTRODUCTION</u>	1
II - <u>SITUATION BIBLIOGRAPHIQUE</u>	3
II-1. Mécanismes de la fixation	4
II-1.1. Fixation réversible	5
II-1.2. Fixation irréversible	10
II-2. Place et nature des polysaccharides	10
II-2.1. Place des polysaccharides	10
II-2.2. Nature des polysaccharides bactériens	11
II-2.3. Composition des polysaccharides	11
II-3. Paramètres influençant la fixation des bactéries et la formation de film biologique	14
II-3.1. Facteurs impliqués dans la fixation dépendant des micro-organismes	14
II-3.2. Facteurs influençant la fixation en relation avec la nature du support	18
II-3.3. Caractéristiques physico-chimiques du milieu intervenant dans la fixation	21
II-4. Cinétique de fixation	25
III - <u>OBJECTIFS DU TRAVAIL</u>	28
IV - <u>MATERIEL</u>	30
IV-1. Eaux de travail	30
IV-1.1. Liquide de Ringer	30
IV-1.2. Eaux synthétiques chargées en matières organiques biodégradables	30
IV-1.3. Eaux synthétiques à pH contrôlé	33
IV-1.4. Eaux minéralisées	33
IV-1.5. Eaux usées	34
IV-1.6. Eaux de rivières	35
IV-2. Microorganismes testés	36
IV-3. Matériels supports	36
IV-3.1. Le platine	36
IV-3.2. L'acier	36
IV-3.3. Le bois	37
IV-3.4. Le caoutchouc	37
IV-3.5. Le P.V.C.	37
IV-3.6. Le verre	37
IV-4. Dispositif expérimental utilisé pour l'étude de la mesure électrochimique des coliformes	40
IV-5. Appareil pour le dosage de l'A.T.P.	42

.../...

V - METHODES	43
V-1. Analyses physico-chimiques des eaux	43
V-2. Mesure de la mouillabilité des matériaux	44
V-3. Nuérotation des microorganismes	45
V-3.1. Dénombrement total des bactéries	45
V-3.2. Dénombrement des <u>Escherichia coli</u>	46
V-4. Dosage de l'Adénosine-tri-phosphate (A.T.P.)	48
V-5. Méthode d'analyse des résultats	50
VI - PROTOCOLE EXPERIMENTAL	52
VI-1. Adaptation de la méthode de WILKINS à l'étude des <u>E.coli</u> fixés	52
VI-1.1. Utilisation et sensibilité de la méthode de WILKINS à l'étude des <u>E.coli</u> libres	52
VI-1.2. Adaptation de la méthode électrochimique à la mesure des <u>E.coli</u> fixés sur platine	53
VI-1.3. Adaptation de la méthode électrochimique à la mesure des <u>E.coli</u> fixés sur supports solides	54
VI-2. Influence du milieu et du matériau sur la fixation des <u>E.coli</u> (souche de laboratoire)	54
VI-2.1. Evaluation de l'influence de la concentration initiale en ensemblement d' <u>E.coli</u> sur la quantité d' <u>E.coli</u> fixés sur les cinq matériaux supports au cours de temps d'immersion croissants	55
VI-2.2. Evaluation de l'influence de la concentration en matières organiques biodégradables sur la quantité d' <u>E.coli</u> fixés sur les cinq matériaux supports	56
VI-2.3. Influence de la minéralisation sur la quantité d' <u>E.coli</u> fixés sur les cinq matériaux au cours du temps	56
VI-2.4. Influence du pH sur la quantité d' <u>E.coli</u> fixés sur les cinq matériaux supports au cours du temps	57
VI-2.5. Influence de la température sur la quantité d' <u>E.coli</u> fixés sur les cinq matériaux supports au cours du temps	57
VI-3. Evaluation des paramètres gouvernant la fixation des <u>E.coli</u> . Essais in-situ avec bactéries indigènes	58
VII - RESULTATS	60
VII-1. Adaptation de la méthode de WILKINS à l'étude de la fixation des <u>E.coli</u> en culture pure	60
VII-1.1. Etude du temps de latence	60
VII-1.2. Etude de la dérive du potentiel	64
VII-1.3. Comparaison entre la méthode électrochimique et la méthode de numérotation bactérienne en culture mixte	65
VII-2. Influence du milieu et de la nature du support sur la cinétique de fixation des <u>E.coli</u> fixés	67
VII-2.1. Influence de la concentration en <u>E.coli</u> et de la nature des supports sur la fixation	67
VII-2.2. Influence de la concentration en matières organiques du milieu	74
VII-2.3. Influence de la minéralisation	76
VII-2.4. Influence du pH des eaux	83
VII-2.5. Influence de la température	89



VII-3. Application de la mesure électrochimique au dénombrement des <u>E.coli</u> fixés à des matériaux supports immergés dans des milieux hydriques. Essais in situ	92
VIII - <u>DISCUSSIONS</u>	105
VIII-1. Utilisation d'une méthode instrumentale pour quantifier les <u>E.coli</u> fixés sur supports	105
VIII-1.1. Le temps de latence	105
VIII-1.2. La dérive du potentiel	106
VIII-1.3. Comparaison de la méthode électrochimique avec d'autres méthodes de dénombrement des <u>E.coli</u>	106
VIII-2. Influence du milieu et de la nature du support sur la cinétique de fixation des <u>E.coli</u> , essais en laboratoire	106
VIII-2.1. Influence de la concentration en <u>E.coli</u>	106
VIII-2.2. Influence de la concentration en matières organiques du milieu	107
VIII-2.3. Influence de la minéralisation	108
VIII-2.4. Influence du pH	108
VIII-2.5. Influence de la température	109
VIII-2.6. Influence de la nature des matériaux	109
VIII-3. Essais in situ	109
IX - <u>CONCLUSIONS</u>	111
X - <u>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</u>	113

## I. INTRODUCTION

Les eaux superficielles continentales se trouvent contaminées par des apports de micro-organismes pathogènes, en provenance des eaux de ruissellement, d'effluents d'origine domestique, urbains ou ruraux, plus ou moins complètement traités par des techniques d'épuration, dont l'objet même est l'élimination des matières organiques biodégradables, et non celle des micro-organismes pathogènes.

La survie des micro-organismes pathogènes dans les milieux récepteurs et leur maintien dans l'espace sont étroitement fonction de leurs possibilités de fixation sur les surfaces solides (particules en suspension, sédiments, matériaux constituant le lit des cours d'eau). Si les bactéries présentes dans un courant d'eau rapide ne pouvaient se fixer, elles seraient rapidement éliminées du milieu, qui serait en grande partie stérile.

Des dénombrements effectués dans le laboratoire de l'Université de CALGARY et à la station de LETHBRIDGE, dans l'Alberta, ont montré qu'une surface de 1 cm<sup>2</sup> fixait jusqu'à 10<sup>6</sup> bactéries, alors que 1 cm<sup>3</sup> d'eau, en regard, n'en contenait que 10<sup>3</sup>. En milieu pollué, la fixation peut atteindre 10<sup>10</sup> cellules par cm<sup>2</sup>.

Ceci est connu depuis fort longtemps, dès l'année 1943 ; par contre, le mécanisme responsable de la fixation des bactéries sur les surfaces solides n'a été étudié que tout récemment, surtout depuis 1969, dans le cas des bactéries vivant dans le milieu aquatique. Il a été démontré que cette fixation résulte de la formation, par les bactéries, de fibres polysaccharidiques susceptibles de se fixer fortement aux surfaces solides. La découverte d'un tel mécanisme, a posteriori évident, n'est relativement récente que parce qu'il ne se manifeste pas toujours en culture pure, où il ne confère aucun avantage sélectif alors qu'il est énergétiquement coûteux.

La formation de ces polysaccharides à la surface des bactéries dans certaines conditions de milieu, le fait qu'il ait été démontré que ce phénomène était essentiel à la survie et à la prolifération des bactéries en général, et des pathogènes en particulier, dans les milieux récepteurs, justifie une étude

systematique de l'influence de parametres tels que le pH, la salinite, la temperature, la nature et la concentration des substrats nutritifs presents, sur la fixation des bacteries a des materiaux supports de nature differente.

Si, dans cette etude, le choix s'est porte sur le suivi d'une bacterie indicatrice de pollution fecale, en l'occurrence E. coli, il est justifie en grande partie par le fait qu'E. coli intervient dans toutes les methodes officielles de controle sanitaire des milieux hydriques, sa numeration indiquant le degre de contamination fecale.

La mise au point d'une methode instrumentale par voie electrochimique pour denommer les E. coli fixes sur supports immerges peut trouver son application pour quantifier les E. coli fixes et suivre leur cinetique de fixation. Les resultats obtenus sont rapportes dans cette etude.

-----

## II. SITUATION BIBLIOGRAPHIQUE

La facilité avec laquelle les micro-organismes s'accroissent à la surface de substrats est la cause de maints problèmes économiques et biologiques.

Les micro-organismes peuvent, par exemple, coloniser des structures humaines immergées dans l'environnement aquatique, provoquant la corrosion et le fouling, tandis que de nombreuses maladies d'animaux et de plantes résultent de la croissance de micro-organismes pathogènes associés à des structures cellulaires.

Toutefois, ces inconvénients ternissent les effets bénéfiques de l'activité des micro-organismes, leur croissance sur différentes surfaces de l'environnement, avec en particulier leur rôle dans le turn-over des résidus organiques, est exploitée par l'homme pour la filtration et l'épuration de l'eau.

Vu cette diversité et la pluralité des phénomènes rencontrés dans la fixation des micro-organismes, il n'existe pas de théorie décrivant tous les aspects de la fixation.

Les questions principalement posées sont :

- Quel est le mécanisme permettant aux micro-organismes de se fixer à la surface d'un solide ?
- Peut-on en prévoir les mécanismes par certaines caractéristiques des micro-organismes ?
- Certains matériaux supports sont-ils meilleurs ou plus sélectifs que d'autres ?

Les publications nombreuses, - environ un millier, - démontrent la fixation des micro-organismes à différents substrats.

Les principales variables pouvant affecter les micro-organismes quant à leur fixation sur des surfaces solides sont énumérées par DANIELS (1980) :

- Caractères dus à l'organisme :

- . Espèce
- . Milieu de culture
- . Age
- . Concentration

- Caractères dus à l'adsorbant ou au substrat :

- . Type
- . Forme ionique
- . Taille
- . Possibilités d'interactions
- . Concentration

- Caractères dus à l'environnement ou au milieu :

- . Concentration en ions hydrogène
- . Concentration saline
- . Composés organiques
- . Durée de contact
- . Température

Ces différents éléments seront tour à tour examinés.

## II.1. Mécanismes de la fixation.

L'accumulation des micro-organismes sur une surface peut être décrite en trois étapes. Dès 1948, ZoBELL - cité par de nombreuses publications - a décrit cette particularité, et depuis, celle-ci a été défendue par FLETCHER (1980), MARSHALL et al. (1971), CORPE (1970).

- 1ère étape : Adsorption ou immobilisation des cellules à l'approche du substrat (phase réversible) ;
- 2ème étape : Attachement ou fixation des micro-organismes au substrat (phase irréversible) ;
- 3ème étape : Colonisation et croissance des micro-organismes sur la surface envahie.

### II.1.1. Fixation réversible.

#### a)- Attraction électrostatique.

Quand un solide est immergé dans un milieu hydrique, il acquiert une charge électrique ; cette charge dépend en grande partie de la composition de la phase aqueuse. Dès qu'une surface est chargée électriquement, elle est attirée vers les ions chargés de signe contraire. Ce processus est en opposition avec les mouvements thermiques entourant les ions.

Ces effets d'attraction électrostatique et de mouvements thermiques ont pour résultat de créer des régions plus ou moins denses en particules chargées, et de former une double couche électrique entre une surface plane et une particule sphérique.

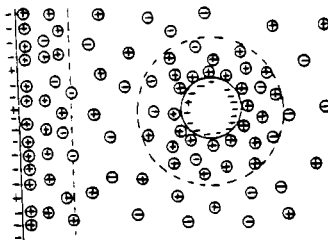


Figure 1.

Double couche électrique entre une surface plane et une particule sphérique.

En général, en milieu hydrique, la bactérie et la surface de colonisation à la fois sont chargées négativement, et l'équation de POISSON et BOLTZMANN permet de résoudre la détermination des forces électrostatiques. Les forces électrostatiques ne peuvent à elles seules expliquer les interactions possibles entre la bactérie et les surfaces. Comme les bactéries ne sont pas des

particules idéales, elles n'ont pas une géométrie simple et une composition moléculaire uniforme ; elles sont capables de déformations, de réactions chimiques internes qui peuvent modifier la composition interne et la surface, et de nombreuses forces peuvent déstabiliser les bactéries des surfaces, des forces de faible amplitude et de forte spécificité ; elles ont été recensées par PETHICA (1961) en forces attractives et répulsives, et elles sont citées par DANIELS (1980) par ordre d'amplitude décroissante.

- Forces attractives :

- . Liaisons chimiques (hydrogène, liaison thio-amide et ester),
- . Formation de doublets (  $- NH^+ \dots COO^-$  ),
- . Formation de triplets (  $- COO^- \dots Ca^{++} \dots COO^-$  ),
- . Liaisons interparticulaires,
- . Charges attractives de signes opposés,
- . Forces électrostatiques,
- . Tension de surface,
- . Forces de Van der WAALS attractives,
- . Forces électromagnétiques,
- . Forces hydrodynamiques,
- . Forces diffusionnelles,
- . Forces gravitaires,
- . Chimiotactisme positif.

- Forces répulsives :

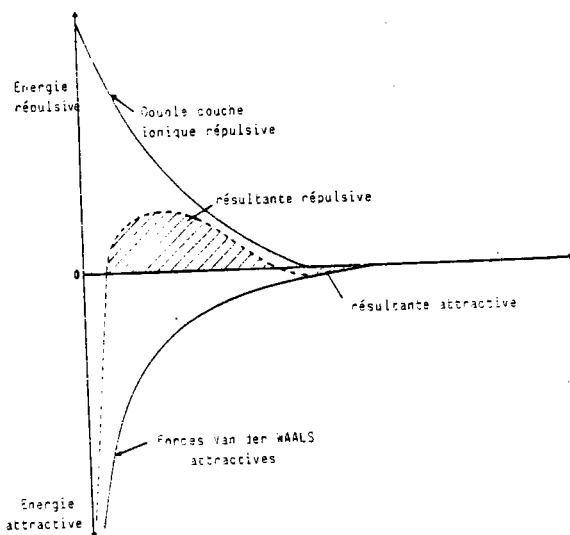
- . Charges répulsives entre cellules de même charge,
- . Forces de Van der WAALS répulsives,
- . Exclusion stérique,
- . Chimiotactisme négatif.

b)- Théorie de D.L.V.O. (DERJAGIUN & LANDLAU, 1941, VERWEY & OVERBEEK, 1948).

Si les bactéries ne sont pas capables de dominer les barrières électrostatiques répulsives, la fixation n'est possible que par la théorie de D.L.V.O. Ce modèle peut être utilisé pour expliquer l'adhésion entre des cellules chargées négativement et des substrats chargés négativement.

En accord avec cette théorie, la fixation dépend de la balance entre les forces faibles attractives - forces de Van der WAALS - et des forces électrostatiques répulsives importantes.

Figure 2.2 : Diagramme de représentation des forces de Van der WAALS et de la double couche ionique d'après MARSHALL (1980).



En grande partie intervient la composition ionique du milieu ainsi que la charge et le rayon de courbure des deux surfaces.

Ces forces mutuelles peuvent se définir sous forme d'énergie libre :  $G_i = G_A + G_E$

$G_A$  forces attractives = forces de Van der WAALS

$G_E$  forces répulsives = double couche ionique.

$$G_A = \frac{A}{6} \left[ \frac{2a}{h} \frac{(h+a)}{(h+2a)} - \ln \left( \frac{h+2a}{h} \right) \right]$$

A = constante de HAMAKER

$$A = (A_1^{\frac{1}{2}} - A_3^{\frac{1}{2}}) (A_2^{\frac{1}{2}} - A_3^{\frac{1}{2}})$$

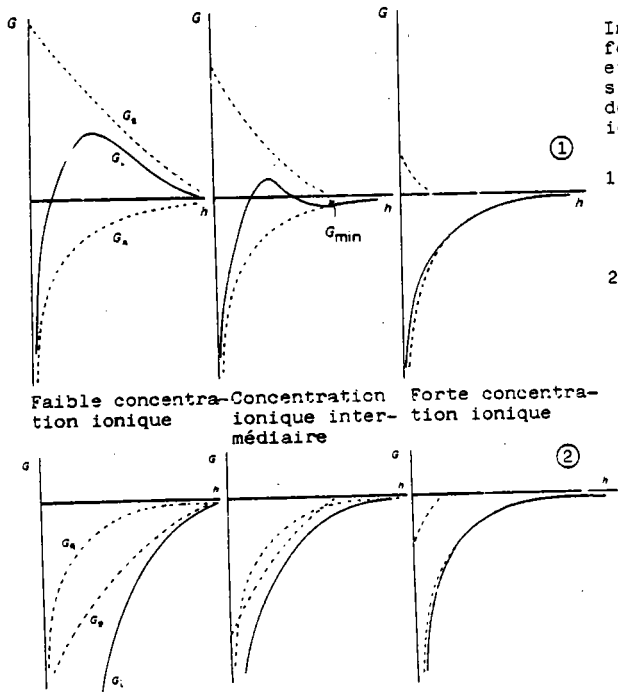
$A_1$  = substrat,  $A_2$  = particule,  $A_3$  = milieu.



Pour évaluer la double couche ionique il est nécessaire de connaître le potentiel électrique de chaque surface

$$GE = \frac{\epsilon}{4} \left( \frac{a_1 \cdot a_2}{a_1 + a_2} \right) \left[ (\psi_1 + \psi_2)^2 + \ln(1 + e^{-KH}) + (\psi_1 - \psi_2)^2 \ln(1 - e^{-KH}) \right]$$

- $\epsilon$  = constante dielectrique de l'eau
- $K$  = dépend de la concentration ionique du milieu
- $H$  = distance séparant les deux particules
- $\psi_1$  = potentiel du substrat
- $\psi_2$  = potentiel de la bactérie.



**Figure 2.3.**  
Interaction entre forces attractives et forces répulsives en fonction de la concentration ionique

- 1 = particule et surface de même signe
- 2 = particule et surface de signes opposés

d'après RUTTER et VINCENT (1980)

En prenant comme modèle idéal une surface plane et une particule sphérique, RITTER (1980) démontre, pour des bactéries et des surfaces de même signe dans un milieu électrolytiquement pauvre, que les particules sont rejetées de la surface quand l'énergie libre est élevée ; par contre, dans un milieu fortement ionique, la barrière d'énergie libre est éliminée, une attraction ferme se produit.

Quand les particules et la surface sont de signes opposés, l'attraction est forte, elle diminue avec la concentration ionique du milieu et, dans tous les cas, elle évolue vers une fixation irréversible et permanente.

MARSHALL et al (1971) utilisent cette théorie pour expliquer la réaction réversible et suggèrent que cette étape initiale, durant laquelle la cellule semble attacher au substrat, peut facilement se déstabiliser par un simple lavage.

Le modèle idéal d'une surface sphérique et d'une surface plane est clairement inadéquat dans des systèmes réels, et en particulier dans les systèmes biologiques, pour les raisons données par TADROS (1980) :

- les particules et les substrats ne sont pas lisses, ce qui implique que la zone de contact n'est pas un seul point mais plusieurs,
- la nature complexe de la surface cellulaire peut permettre à de nombreuses interactions de se produire :
  - \* interactions hydrophobes et hydrophiles,
  - \* liaisons hydrogène et électrostatiques,
- possibilités de production, par les micro-organismes, de macromolécules complexes.

PETHICA (1980) souligne également que cette stabilité colloïdale implique des calculs complexes, aucune de ces variables ne peut bien se mesurer. La théorie de D.L.V.O. néglige la tension de surface ; aussi propose-t-il le traitement donné par HALL (1972), modèle thermodynamique d'un système interactif entre des particules colloïdales ayant une taille et une géométrie arbitraires et autorisant des déformations.

### II.1.2. Fixation irréversible.

La fixation la plus commune est le fait de polymères extracellulaires formant une enveloppe autour de la cellule et permettant une consolidation des micro-organismes à la surface du support.

La phase réversible est décrite alors comme une étape nécessaire à la synthèse de ces polysaccharides extracellulaires. FLETCHER (1979) note qu'une fixation peut avoir lieu immédiatement, sans cette phase réversible.

## II.2. Place et nature des polysaccharides.

### II.2.1. Place des polysaccharides.

La microflore hétérotrophe présente dans les eaux est susceptible de former des polysaccharides extracellulaires. Cette formation joue un rôle important, bien que non exclusif, dans la floculation spontanée des micro-organismes des boues activées des stations d'épuration biologique.

Elle est également impliquée dans le phénomène de "bulking" ou gonflement des boues, qui intervient en milieu nutritionnel déséquilibré.

La formation de polysaccharides semble être un phénomène très général, qui ne se limite pas au cas des bactéries, mais se retrouve chez la plupart des organismes cellulaires Procaryotes et Eucaryotes tels que les bactéries, les algues, les champignons, les amibes, les cellules végétales ou animales (DUDMAN, 1977).

COSTERTON et al (1978) précisent que la formation des exopolysaccharides est utile dans un milieu riche et énergétiquement favorable ; par contre, dans un environnement défavorable, ces polymères sont nécessaires à la survie. Dans un environnement naturel, où la compétition pour la vie est sévère, cette production d'exopolymères par les bactéries est un moyen de stocker des éléments nutritifs.

- \* Les bactéries constituent, au niveau du site de fixation, une zone d'adsorption et d'échange.
- \* La trame formée par les exopolymères va permettre une agrégation de particules en suspension, qui pourront être utilisées en fin de la phase de croissance traduisant souvent le manque de nutriments dissous en quantité suffisante.
- \* Ces exopolysaccharides vont servir de point d'ancrage avec un

support solide, ces supports pouvant être de toute nature, inerte ou vivante. FLETCHER et FLOODGATE (1973). La fixation en milieu immergé permet aux bactéries d'être baignées par un flux leur assurant un renouvellement constant des matières nutritives.

### II.2.2. Nature des polysaccharides bactériens.

Les polysaccharides, que l'on nomme également exopolysaccharides, peuvent prendre la forme d'une capsule discrète visible par la méthode de coloration à l'encre de Chine, DUGUID (1951), ou peuvent se présenter sous un film extracellulaire apparemment non lié à la surface bactérienne.

Les bactéries muqueuses produisent généralement des films, comme E. coli, tandis que Streptococcus pneumoniae ou Klebsiella aerogenes forment des capsules discrètes.

WILKINSON (1958), cité par SUTHERLAND (1977), remarque que le matériel capsulaire est très hydraté, puisqu'il contient 98 % d'eau. Ceci a pour conséquence de donner une consistance gélatineuse, ainsi qu'un indice de réfraction très proche de celui de l'eau.

Une visualisation exacte des interactions des capsules et des films avec la paroi bactérienne est possible grâce aux progrès récents (utilisation du microscope électronique).

Histologiquement, l'évidence est faite que la partie adhésive de la bactérie est un polymère acide, mais il n'y a aucune indication positive pour que ce soit un polysaccharide. Cette adhésivité est toujours présente, que les bactéries soient libres ou fixées. L'existence de cette première pellicule est responsable de la fixation initiale. FLETCHER et FLOODGATE (1973).

Une deuxième pellicule apparaît dérivée de la première comme une pellicule macromoléculaire, plus diffuse et plus réticulée, elle a l'apparence d'un gel hydraté, et cette deuxième pellicule provoque la fixation définitive.

### II.2.3. Composition des polysaccharides.

Les polysaccharides sont isolés par précipitation avec de l'acétone ou de l'isopropanol, et purifiés par dialyse contre un courant d'eau, puis reprécipités et séchés à l'air.

#### Les différents constituants.

Les exopolysaccharides sont composés de nombreux monomères, que l'on rencontre également dans la composition des lipopolysaccharides, SUTHERLAND (1977).

- sont rencontrés avec une grande fréquence :

- . hexoses neutres : D-glucose  
D-galactose  
D-mannose
- . des méthylpentoses (6-déoxyhexoses) : fucose  
rhamnose.

Les pentoses sont plus rarement rencontrés ; les heptoses et les acides octéniques, fréquents dans les lipopolysaccharides, sont absents.

Sont rencontrés avec une grande fréquence : les polyols (ribitol et glycérol) similaires à ceux trouvés dans les acides teichoïques des parois cellulaires des bactéries Gram positives.

Les sucres aminés et les acides uroniques sont largement présents, en particulier :

- N acétyl - D - glucosamine
- N acétyl - D - galactosamine
- acide N-acétyl neuramique
- acide D-glucuronique
- acide D-galacturonique
- acide D-mannuronique
- acide L-guluronique.

A côté de ces composés sont également présents des phosphates,

- des groupements alkylés : - o acétyl  
- formate  
- succinate.

La grande variété des constituants possibles explique que l'on ne puisse pas prévoir à l'avance la composition des polysaccharides isolés d'une culture bactérienne, et encore moins anticiper sur ses propriétés physiques ou autres. La composition des polysaccharides varie en effet d'une espèce bactérienne à une autre.

### Synthèse des polysaccharides.

#### • Conditions.

Les exopolysaccharides se reconnaissent à l'apparence des colonies et à la viscosité du milieu liquide et de culture.

Peu d'études approfondies relatent les conditions physiologiques requises pour la formation des exopolysaccharides.

De plus, le problème est de **transposer** des résultats expérimentaux de laboratoire aux multiples interprétations possibles dans l'environnement.

Les bactéries aérobies ou anaérobies facultatives sont celles qui synthétisent le plus d'exopolysaccharides, toutefois des bactéries anaérobies strictes sont capables d'en produire par exemple les clostridium, COSTERTON (1975).

La composition des polymères semble indépendante du substrat et de la source d'énergie, WILKINSON et al 1975 cité par SUTHERLAND 1977;

La formation d'exopolysaccharides est favorisée par un certain nombre de conditions nutritionnelles en particulier un excès de carbohydrate ou des déficiences en nutriments, WILKINSON (1975).

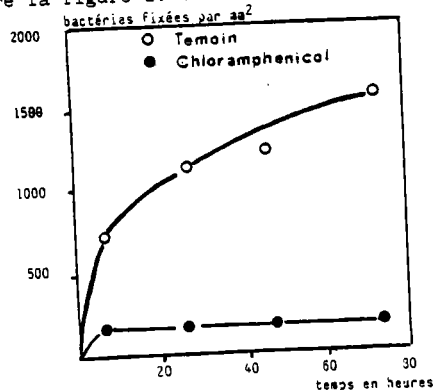
L'environnement ionique requis pour une production maximale de polysaccharides comprend des ions  $K^+$ ,  $Mg^{++}$  et  $Ca^{++}$ . Les cations bivalents sont bien connus pour être des cofacteurs d'enzymes impliqués dans la synthèse des polysaccharides.

L'intégrité de la surface bactérienne est nécessaire à la production d'exopolysaccharides. La perte d'enzymes liés par des suspensions cellulaires lavées se traduit par un arrêt de la synthèse des exopolysaccharides.

MARSHALL (1971) a montré que la formation des polymères peut être inhibée par le chloramphenicol qui bloque les mécanismes enzymatiques, par voie de conséquence, le nombre de bactéries fixées diminue comme le montre la figure 2.4.

Figure 2.4.

Action du chloramphenicol sur la fixation des bactéries en milieu marin sur du verre.



### \* Précurseurs.

Les sucres nucléotides diphosphates (U.D.P.) sont des précurseurs intervenant dans la synthèse des exopolysaccharides :

- . U.D.P. - glucose
- . U.D.P. - galactose
- . U.D.P. - acide glucuronique.

Ces précurseurs existent aussi pour les groupements alkyls ; ainsi l'acétyl Co A a été reconnu comme précurseur des groupements O - acétyl.

La régulation des synthèses de polysaccharides a lieu par l'intermédiaire de la concentration initiale des précurseurs.

Deux mécanismes de synthèse sont possibles ; les exopolysaccharides peuvent être produits par la membrane cytoplasmique en utilisant des précurseurs formés intracellulairement, ou par des précurseurs spécifiques formés dans l'environnement extracellulaire. Toutefois il n'est pas possible de prévoir la nature des exopolysaccharides synthétisés ; beaucoup de bactéries comprennent des unités répétitives contenant deux à six monosaccharides souvent accompagnés de groupements alkylés.

La synthèse des exopolysaccharides est apparemment dépendante de la disponibilité de transporteurs lipidiques isoprénoïdes. La synthèse peut être abaissée par une réduction des lipides utilisables, tandis qu'au contraire elle peut être accélérée en présence de beaucoup de lipides libres.

### II.3. Paramètres influençant la fixation des bactéries et la formation de film biologique.

Les paramètres en rapport avec la fixation sont :

- la bactérie et son état physiologique,
- le substrat ou matériel support,
- le milieu séparant la surface et les facteurs externes.

#### II.3.1. Facteurs impliqués dans la fixation dépendant des micro-organismes.

##### \* Nature des bactéries.

Toutes les espèces bactériennes ne sont pas adsorbables ; déjà ZOBELL en 1943 a noté cette particularité.

ZVYAGINTSEV (1959), LARSEN (1964), ZOBELL (1943), cités par MARSHALL (1971), affirment qu'il n'y a pas de lien étroit dans la position systématique des micro-organismes, leur réaction Gram, leur morphologie, leur mobilité et l'aptitude des bactéries à se fixer sur un support, en contradiction avec des observations ultérieures.

Les bâtonnets ou bacilles petits ( $< 0,8 \mu$  de long) Gram négatifs adhèrent en premier et sont initiateurs de film après une heure d'immersion en milieu marin ces bactéries appartiennent au genre Pseudomonas, Flavobacterium et Achromobacter.

Les formes pédonculées et filamenteuses comme les Caulobacter et Hyphobacterium apparaissent seulement après 24 heures.

En dernier, se fixent les diatomées et les protozoaires.

Bactéries isolées sur du verre en milieu marin d'après 3 auteurs :

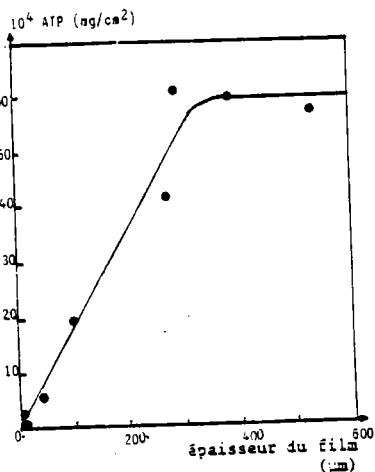
FLOODGATE (1971)	O'NEIL et WILCOX (1971)	CORPE (1973)
Pseudomonas	Pseudomonas	Pseudomonas
Vibrio	Vibrio	Achromobacter
Spirillum	Achromobacter	Flavobacterium
Arthrobacter	Flavobacterium	Caulobacter
Bacillus	Bacillus	Hyphobacterium
Sarcina	Micrococcus	
Corynebacterium		
Caulobacter		

L'extension des films avec augmentation d'épaisseur peut inclure dans la matrice des microorganismes non viables.

LA MOTTA cité par MARSHALL (1971) a mesuré la viabilité des organismes constituant un film en mesurant la concentration en ATP au cours de l'augmentation de l'épaisseur du film formé sur un filtre d'eau potable figure 2.5.

Figure 2.5. :

La concentration en ATP augmente parallèlement à l'épaisseur du film jusqu'à une épaisseur de 320  $\mu$ . Au-delà la concentration en ATP demeure constante indiquant une présence d'organismes non viables ou de constituants abiotiques dans la matrice.





Les cultures hétérogènes ont une supériorité sur les cultures pures ; REID cité par FLETCHER (1977).

Les bactéries aérobies ou anaérobies facultatives sont généralement les premières qui colonisent un support.

Un environnement aérobie produit plus de film qu'un environnement anaérobie ; HEUKELÉKIAN (1958).

Une adaptation morphologique peut se produire, - cité par MARSHALL (1975) - permettant une meilleure approche des supports. Chez Vibrio alginolyticus, cette bactérie ne produit qu'un seul flagelle polaire en milieu aqueux, tandis que proche d'un milieu solide, elle produit de nombreux flagelles ; le flagelle monotriche permet une mobilité accrue en milieu aqueux, tandis que des flagelles péritriches permettent une meilleure adhésion à un support.

Cette faculté d'adaptation morphologique permet ainsi aux bactéries d'évoluer dans des milieux différents, leur assurant toutes les chances de survie dans l'environnement.

#### \* Caractéristiques en rapport avec le métabolisme et la physiologie des bactéries.

MARSHALL (1971) observe que les bactéries chimiorganotrophes, et particulièrement les bactéries zymogènes, adhèrent plus facilement aux surfaces. Les bactéries zymogènes, caractérisées par des coefficients  $\mu_{max}$  et  $K_s$  élevés, montrent une réponse rapide à un niveau élevé de nutriments ; elles se multiplient lentement si le niveau en nutriments est faible, dans le cas contraire elles se multiplient rapidement.

MARSHALL (1979) ; la première colonisation des surfaces est faite par les bactéries zymogènes naines ; en effet, la croissance en milieu aquatique est souvent carencée d'un nutriment ou même de plusieurs. Cette privation constitue un stress qui se répercute sur leur développement, et si l'activité métabolique est diminuée, il en est de même de la taille qui passe de  $1 \mu$  à  $0,5 \mu$ . Après 12 à 24 heures, elles peuvent être remplacées par des formes de taille normale.

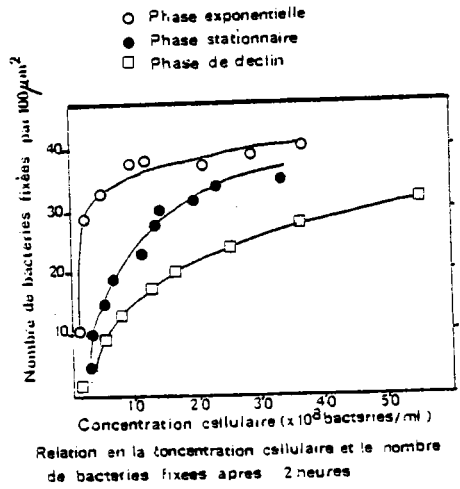
L'autre condition indispensable à la fixation est l'intégrité de la paroi cellulaire, MEADOWS (1971).

Des bactéries tuées par la chaleur ou la formaline ont moins de facilité de se fixer sur des supports, car la synthèse enzymatique ne doit pas être altérée pour qu'il puisse y avoir formation de polysaccharides.

FLETCHER (1977) a étudié la fixation des Pseudomonas au polystyrène en milieu marin en examinant successivement la concentration et l'âge des cultures. Le nombre de bactéries fixées est maximum pendant la phase exponentielle, puis décroît successivement pendant la phase stationnaire et la phase de déclin, comme l'indique la figure 2.6.

Figure 2.6. :

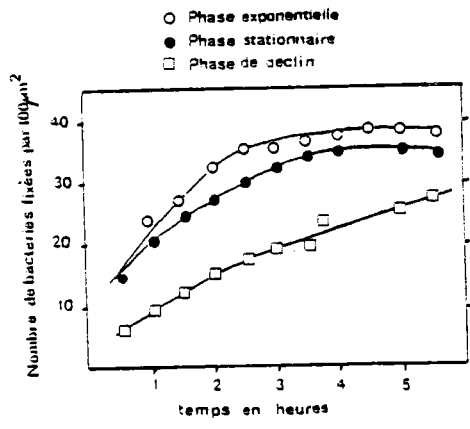
Influence de la phase de croissance sur la capacité de fixation du polystyrène par Pseudomonas en milieu marin



Le temps requis pour cette fixation est fonction également de l'âge de la cellule Figure 2.7.

Figure 2.7. :

Influence de la phase de croissance sur la vitesse de colonisation du polystyrène par Pseudomonas en milieu marin



L'influence de l'âge de la culture cellulaire sur les possibilités de fixation est due à deux facteurs :

- des changements de mobilité,
- des changements dans la quantité de polymères produits.

La mobilité cellulaire peut faciliter la fixation en augmentant les rencontres entre les micro-organismes avec le substrat, de sorte que statistiquement, la probabilité de fixation est plus élevée. Les différences rencontrées dans la mobilité cellulaire liées à l'âge de la culture expliquent les différences d'aptitude à la fixation.

La production et la sécrétion des polymères adhésifs sont plus importantes en phase exponentielle qu'en phase de déclin, et provoquent par conséquent une aptitude de fixation plus élevée pendant la phase exponentielle.

### II.3.2. Facteurs influençant la fixation en relation avec la nature du support.

Les propriétés physico-chimiques de surface.

Sur une surface solide, il existe de nombreuses liaisons libres, et la quantité de liaisons représente l'énergie libre de surface.

Les solides minéraux à points de fusion élevés, comme les métaux, le verre, ont tendance à avoir une surface d'énergie élevée (5 000 à 500 erg/cm<sup>2</sup>), comparativement aux solides organiques à point de fusion bas, avec une énergie libre de 100 erg/cm<sup>2</sup>.

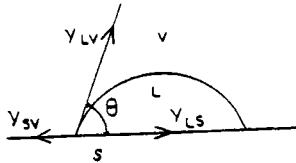
La tendance est de combler les liaisons libres pour en fait diminuer l'énergie de surface par le biais d'une adsorption de substance à la surface du substrat.

La fixation sur des matériaux par les bactéries est en fait déterminée par :

- l'énergie libre de surface et
- la tension critique interfaciale du milieu liquide, ou mouillabilité. DEXTER (1975).

La mesure de la mouillabilité peut être appréciée en plaçant une goutte de liquide sur une surface solide plane. L'étalement de la goutte est décrit par l'angle de contact (figure 2.8, technique de la goutte de ZISMAN.

Figure 2.8 : Diagramme montrant l'angle de contact formé par une goutte de liquide (L) sur une surface solide (S) dans une atmosphère de vapeur (V).



L'équation de YOUNG exprime :

$$\gamma_{SV} = \gamma_{SL} + \gamma_{LV} \cos \theta$$

où  $\gamma_{SV}$  = tension solide/vapeur  
 $\gamma_{SL}$  = " solide/liquide  
 $\gamma_{LV}$  = " liquide/vapeur

L'angle de contact, ou tension critique de surface, se définit comme étant l'angle formé par le plan du solide et le plan tangent au liquide, la ligne de contact entre l'air, le liquide et le solide, angle situé du côté du liquide.

Tension critique de surface pour quelques polymères organiques d'après SHAFRIN (1966) :

	tension critique de surface
Poly(tétrafluoroéthylène)	18,5 $\gamma_c$ (mN/m)
Polyéthylène	31
Polystyrène	33 - 35
Poly(vinylchloride)	39
Poly(éthylène téréphtalate)	49

FLETCHER et LOEB (1979) montrent que des substrats hydrophobes comme le polystyrène, le teflon, permettent un maximum de bactéries fixées. La fixation à des substrats hydrophiles est plus rare et plus complexe.

Le nombre de bactéries est faible sur un substrat de tension de surface élevée et chargé négativement, comme le verre et le mica, et les plastiques oxydés.

Sur des substrats de tension de surface élevée, mais chargés positivement ou neutres, le nombre de bactéries est relativement plus élevé, suggérant que la charge de surface influence le degré de fixation sur des surfaces à tension de surface élevée.

Le faible nombre de bactéries fixées sur des surfaces chargées négativement est lié à la présence de charges négatives sur les bactéries. La répulsion électrostatique intervient comme facteur d'inhibition.

La possibilité d'interactions hydrophobes est responsable d'une grande variété de mécanismes de fixation. La littérature contient un nombre élevé d'exemples ; celle-ci inclut les bactéries fixées à du germanium silicisé, MARSHALL (1976), à du verre recouvert par du triméthylchlorosilicate, ZVYAGINTSEV (1967), polystyrène, LOEB (1977), RUTTER et ABBOTT (1978), FLETCHER et LOEB (1979).

MARSHALL et CRUICKSHANK (1973) ont observé chez Flexibacter aurantiacus CW7 et Hyphomicrobium vulgare ZV S80 l'orientation par des portions de surfaces cellulaires plus hydrophobes que le reste de la surface cellulaire.

Les polymères adsorbés sur un substrat peuvent contribuer à une inhibition de la fixation des bactéries, en transformant une surface hydrophobe, favorable à la fixation, en une surface hydrophile non favorable.

DEXTER en 1975 montre que beaucoup de bactéries se fixent sur des surfaces hydrophiles ; de même, d'autres auteurs cités par BAIER (1979) rappellent les études de CARTER (1967), HARRIS (1973) et MAROUDAS (1975), indiquant une tendance des bactéries chargées négativement à la fixation sur des surfaces hydrophiles, en contradiction avec l'étude de FLETCHER (1979), et contrairement à ce qui pourrait se passer si les forces électrostatiques répulsives sont des facteurs prépondérants dans l'adhésion de cellules.

Des liaisons supplémentaires sont possibles :

- . liaisons hydrophobes,
- . interactions stériques,
- . réactions spécifiques entre les groupements fonctionnels de surface.

Il est très difficile de prévoir la fixation des populations bactériennes des eaux naturelles, car l'application de critères se heurte à la complexité des phénomènes dus à :

- l'influence de composés dissous sur l'état de surface du substrat et des bactéries,
- l'existence de bactéries différentes qui peuvent posséder des caractéristiques de surface différentes,
- la multiplicité des types d'interactions possibles.

FLETCHER et LOEB (1979) notent que dans des conditions expérimentales en laboratoire, la préférence des bactéries a lieu pour des surfaces hydrophobes, alors qu'in situ la meilleure fixation peut avoir lieu sur des surfaces hydrophiles.

Pour comprendre la fixation préférentielle des micro-organismes, il faut avoir des informations détaillées sur :

- le substrat,
- les composés dissous,
- la population bactérienne concernée.

Il semble souhaitable de privilégier l'étude de l'influence de la mouillabilité du substrat sur la fixation.

### II.3.3. Caractéristiques physico-chimiques du milieu intervenant dans la fixation.

#### \* Rôle du pH.

La fixation des bactéries est maximale lorsque le pH est maintenu vers la neutralité ; REID (1960) cité par MARSHALL (1979).

L'électronégativité des bactéries décroît lorsque le niveau de leur pH dépasse leur point isoélectrique; à des valeurs de pH au-dessous de leur pI, la charge totale des bactéries devient positive.

Dans beaucoup de cas, l'adsorption peut être réversible simplement en altérant le pH ; DANIELS (1980). Le maximum d'adsorption a lieu à pH 3 - 6.

#### \* Rôle de l'ionocité du milieu.

La présence de cations influence la fixation de plusieurs manières :

- indirectement en influençant la physiologie cellulaire et la perméabilité membranaire,
- directement par leur accumulation à la surface et en formant une double couche électrique,
- en contribuant à maintenir l'intégrité structurale des polymères adhésifs.

MARSHALL (1971) a étudié l'adhésion de Pseudomonas, souche R<sub>3</sub>, et Achromobacter, souche R<sub>8</sub>, en milieu marin, et a montré l'importance de la composition ionique du milieu.

Pendant la phase réversible de la fixation, le comportement de Pseudomonas R<sub>3</sub> n'est pas affecté par l'absence de cations divalents.

Les bactéries sont fixées réversiblement à de plus faibles concentrations en électrolyte bivalent ( $MgSO_4$ ) qu'en électrolyte monovalent ( $NaCl$ ), conformément à ce qu'on peut attendre de l'effet de ces ions sur la double couche ionique.

Dans les deux cas, toutes les bactéries seraient repoussées de la surface dès que l'épaisseur de la double couche dépasse 200 Å .

L'attraction initiale réversible des bactéries aux surfaces dépend donc de l'importance des forces répulsives de la double couche par rapport aux forces attractives de Van der WAALS, selon un mécanisme identique à celui de la coagulation des colloïdes.

Pendant la phase irréversible chez Pseudomonas R<sub>3</sub>, l'absence d'ions  $Ca^{++}$  et/ou  $Mg^{++}$  entrave la fixation des bactéries aux supports solides:

Les observations montrent qu'interviennent successivement dans la fixation deux phénomènes obéissant à des lois différentes, où la concentration en calcium et magnésium semble jouer en sens inverse.

En effet, ces éléments peuvent favoriser la fixation réversible par un effet purement physico-chimique de neutralisation de charge et coagulation, tandis que leur absence joue défavorablement en inhibant la formation de polymères susceptibles de réaliser l'accrochage irréversible entre les bactéries et le support, suivant un mécanisme analogue à celui de la floculation des colloïdes par les polyélectrolytes.

Des agents complexants sont également utilisés pour inhiber et déstabiliser la fixation, comme l'EDTA.

Si l'influence d'électrolytes dissous laisse suggérer que l'adsorption obéit à des lois chimiques, elle peut également s'expliquer en termes physiologiques. La croissance peut être inhibée par l'absence de  $Ca^{++}$  et  $Mg^{++}$ . MARSHALL (1971).

#### \* Rôle de la température.

Le plus souvent, les températures propices à la fixation des bactéries et celles requises pour la croissance en film sont confondues.

Plusieurs températures optimales à la croissance des films ont été indiquées :

Citées par MARSHALL (1979)

REID (1960) : 27° C

GREEN (1965) : 20 à 30° C

SANDERS (1966) 20 à 40° C

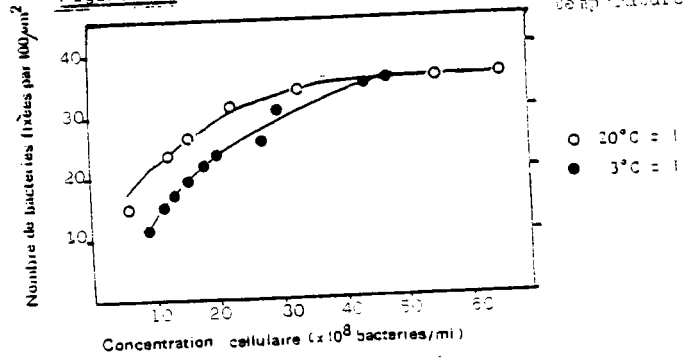
HEUKÉLEKIAN (1945) montre que la quantité de bactéries fixées décroît quand la température croît.

FARREL (1967), cité par MARSHALL (1979), a étudié la synthèse des polysaccharides. La température optimale peut être différente de celle observée pour la croissance des micro-organismes considérés.

Ainsi *E. coli* à 15 et 20° C produit 25 fois plus de polysaccharides qu'à sa température optimale de croissance, 37° C.

FLETCHER (1977), dans son expérimentation sur *Pseudomonas* et sa capacité de fixation en milieu marin au polystyrène, révèle qu'à 3 ± 1° C, la fixation est inférieure comparativement à 20° C.

Figure 2.9. Nombre de bactéries fixées en fonction de la concentration cellulaire et de la température.



La baisse de fixation aux températures basses peut être due à trois causes :

- la fixation demeure réduite à 3 ± 1° C par rapport à 20 ± 1° C par suite d'une augmentation de la viscosité du milieu,
- des températures élevées favorisent l'adsorption chimique et certains types d'adsorption physique,
- la température peut affecter la physiologie des organismes.

\* Rôle des éléments nutritifs.

HEUKÉLEKIAN et HELLER (1940) démontrent que la fixation bactérienne a lieu plus particulièrement lorsque la concentration des éléments nutritifs est trop faible pour permettre aux micro-organismes de se multiplier en milieu aqueux.



ZoBELL (1943), cité par de nombreux auteurs, confirme expérimentalement cette hypothèse. Quand les conditions deviennent drastiques, il est plus facile et plus avantageux pour les micro-organismes attachés de concentrer les substrats macromoléculaires dans les interstices du film, où se trouvent localisés les enzymes extracellulaires nécessaires à la dégradation et l'ingestion des substrats nutritifs. ZoBELL a pu mesurer un film bactérien, même lorsque la quantité de substrat organique était comprise entre 0,05 mg et 25 mg/l.

La nature du substrat nutritif et sa capacité d'être oxydé revêtent une grande importance dans l'extension des films. HEUKELEKIAN (1956) note l'accroissement des films dans les eaux usées après addition de glucose et/ou de peptone. Le glucose procure une source d'énergie rapide facilement convertible en éléments carbonés nécessaires à la synthèse de polysaccharides.

ATKINSON et SWILLEY (1967), cités par SUTHERLAND (1977), indiquent la présence de matériaux minéraux colloïdaux inhibe l'assimilation des nutriments par des films microbiens. Il existe une relation entre la solubilité, la taille des molécules nutritives organiques et les phénomènes d'adsorption de ces molécules à la surface des films.

#### \* Rôle de l'oxygène dissous.

SANDERS (1971) confirme des observations antérieures, à savoir que l'activité d'un film bactérien fixé est indépendante de la concentration en oxygène dissous ; ses mesures d'oxygène sur tout le profil d'un film ont montré que l'oxygène dissous existe toujours sous la couche active de cellules ; des films de 200 µm d'épaisseur sont toujours en aérobiose dans un milieu contenant 7 à 8 mg O<sub>2</sub>/l.

Pourtant, dès que l'épaisseur du film ne permet plus la diffusion de l'oxygène, il peut y avoir un décrochage du film formé, observations fréquentes faites in situ.

#### \* Agitation.

Des flux élevés retardent la fixation initiale des bactéries, mais une fois celle-ci réalisée, des flux importants ne compromettent pas la croissance des films bactériens adhérents à des supports ; HEUKELEKIAN (1956).

Les résultats expérimentaux de SANDERS, en 1966, montrent des dépendances étroites entre le flux, la température, la consommation d'oxygène sur la production de films microbiens dans une culture continue.

Pourtant l'agitation favorise les interactions possibles entre les bactéries et le substrat.

L'intensité du flux a une importance, mais son seuil limite, compromettant la fixation initiale, n'a pas été mentionné.

#### II. 4. Cinétique de fixation.

FLETCHER (1977) a montré la similitude formelle entre les modèles décrivant l'adsorption moléculaire et l'adhésion bactérienne.

Dans les deux cas, le processus est contrôlé par la concentration de la solution ou la culture bactérienne, le temps et la température.

La relation entre la concentration de la solution et l'adsorption à température constante est décrite sous le terme d'isotherme d'adsorption. FLETCHER a appliqué les équations de LANGMUIR au cas des bactéries marines adsorbées sur du polystyrène.

Le degré d'adsorption des bactéries est proportionnel à la concentration de la culture,  $[X]_s$ . Ainsi, la probabilité pour qu'une bactérie vienne en contact avec un site vacant peut être écrite :

$$(1) \quad R = K [X]_s (1 - \Theta)$$

$\Theta$  est la fraction de la surface recouverte par les bactéries. Le nombre de bactéries adsorbées  $[X]_{ads}$  est directement proportionnel à la fraction de la surface recouverte.

$$(2) \quad [X]_{ads} = K' \Theta$$

en simplifiant l'équation (1) et (2).

$$(3) \quad R = K [X]_s \left(1 - \frac{[X]_{ads}}{K'}\right)$$

ou, sous forme linéaire :

$$(4) \quad K_s = \frac{[X]_s [X]_{ads}}{K'} + \frac{R}{K}$$

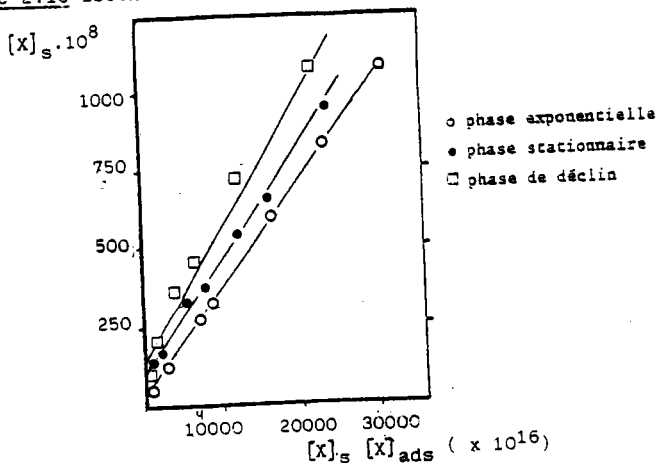
Le degré d'adsorption est en rapport avec  $K$ , la concentration de la culture, et le nombre de sites d'adsorption vacants.

$K'$  est en rapport avec le nombre de bactéries requises pour couvrir complètement une unité de surface.

Ici,  $K$  indique l'intensité de l'adsorption, et  $K'$  est une constante dépendant de la capacité d'adsorption à la surface. Elle n'est pas liée à l'intensité de l'adsorption.

Les graphes reproduisant l'adsorption des bactéries à différents âges de leur culture permettent la détermination des valeurs  $K'$  et  $R/K$  à partir de la pente et de l'ordonnée à l'origine des courbes. Figure 2.10.

Figure 2.10 Isotherme d'adsorption en fonction de l'âge des bactéries



Culture bactérienne	$R/k$ $\times 10^3$	pente $1/K' (x 10^{-3})$	$k'$ $\times 10^3$
phase exponentielle	25,1	0,035	28,6
phase stationnaire	85,7	0,038	26,3
phase de déclin	114,7	0,044	22,7

Il est important de souligner cette possibilité de décrire l'adhésion bactérienne avec un modèle mathématique établi pour l'adsorption physico-chimique. Ceci laisse supposer que la fixation initiale des bactéries puisse être contrôlée par des phénomènes non biologiques tels que l'adsorption.

\* Extension d'un biofilm ; cinétique de croissance.

KORNEGAY et ANDREW (1967), cités par MARSHALL (1979), distinguent trois phases distinctes :

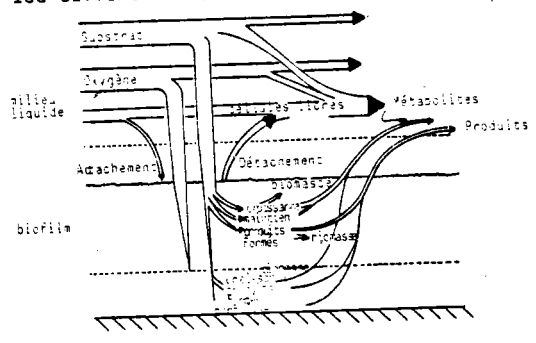
- La première phase est une phase de croissance exponentielle du film et elle dure jusqu'à atteinte d'une certaine épaisseur du film dite "active". Durant cette phase, l'utilisation des éléments nutritifs n'est pas perturbée par l'accroissement du film. Durant la deuxième phase, la croissance du film est linéaire, mais au-delà d'une certaine épaisseur critique débute la troisième phase, au cours de laquelle l'accumulation est nulle et les nouvelles cellules formées se détachent.

SANDERS (1967) distingue également trois phases :

- La première phase, ou croissance exponentielle, débute par la fixation initiale jusqu'à ce qu'une couche de micro-organismes couvre la surface support (épaisseur d'environ 10 µ). Durant cette période, chaque micro-organisme est en contact direct avec le milieu liquide, et il y a assez d'éléments nutritifs et d'oxygène pour maintenir un état de croissance. Comme tous les organismes sont dans le même état de croissance, les consommations d'oxygène et d'éléments nutritifs sont proportionnelles à l'augmentation de la masse des organismes. La consommation d'éléments nutritifs est supérieure à la quantité immédiatement assimilée, une partie de ces éléments étant stockée.
- Une deuxième phase, la phase stationnaire, débute au moment où les micro-organismes ayant formé une couche complète se multiplient jusqu'à atteindre une épaisseur de film limitante à la diffusion de l'oxygène. La couche externe est constamment en contact avec l'oxygène et les éléments nutritifs et continue à se développer, tandis que les couches en profondeur reçoivent uniquement l'oxygène et les éléments nutritifs pouvant diffuser jusqu'à elles. Les couches profondes entrent par conséquent en état de croissance ralentie ou endogène.
- La troisième phase commence lorsque l'épaisseur du film ne permet plus la diffusion de l'oxygène, le film se détachant alors de la surface de son support.

CHARACKLIS (1973), BRYERS et CHARACKLIS (1981), CHARACKLIS (1981) proposent un schéma d'extension et une application d'un modèle mathématique décrivant les différentes phases. Figure 2.11.

Figure 2.11 - Schéma d'extension d'un biofilm d'après CHARACKLIS (1981).



### III. OBJECTIFS DU TRAVAIL

Il n'entre pas dans nos intentions d'étudier en détail le mécanisme de la fixation des bactéries, en particulier la composition des polysaccharides extracellulaires sécrétés par les bactéries, ces points faisant l'objet de recherches intensives par des équipes hautement spécialisées.

Par contre, nous avons abordé le sujet par le biais de l'étude expérimentale de la fixation des bactéries, notamment d'E. coli, sur des matériaux supports immergés en fonction des conditions du milieu.

Nous avons tout d'abord recherché la possibilité de quantifier les E. coli fixés aux surfaces solides, et nous avons examiné en priorité l'utilisation de la détection électrochimique de l'hydrogène dégagé par les E. coli. Cette méthode a été mise au point par WILKINS et al. (1974) pour dénombrer les E. coli en suspension dans un milieu hydrique.

La première étape a consisté à vérifier la validité de la méthode électrochimique de WILKINS et al. (1974) pour numérer les E. coli en suspension dans l'eau.

La deuxième étape a consisté à modifier la méthode pour la rendre apte à numérer les E. coli lorsqu'ils se trouvent fixés sur un support solide immergé.

Cette méthode mise au point a permis l'étude, en laboratoire, de la cinétique de fixation des E. coli en culture pure, et d'observer l'influence de différents paramètres du milieu et également le comportement des matériaux supports. Les supports solides ont été choisis pour couvrir la gamme de ceux que nous pouvons rencontrer le plus fréquemment dans l'environnement, à savoir : le bois, le caoutchouc, le verre, le P.V.C. et l'acier.

Nous avons étudié la fixation des E. coli in situ, dans des effluents et dans des eaux continentales superficielles, par immersion des différents types de matériaux cités précédemment.

Les résultats obtenus ont permis d'aboutir à des conclusions relatives à l'influence des conditions de milieu sur la fixation des E. coli aux surfaces solides.

-----

IV. MATERIEL

IV.1. Eaux de travail.

Six types d'eaux ont été utilisés dans l'étude expérimentale (solutions synthétiques ou eaux naturelles), correspondant à des charges variables en matières organiques.

IV.1.1. Liquide de Ringer :

La solution isotonique de Ringer, diluée au 1/4 dans de l'eau distillée, avait la composition suivante avant dilution :

NaCl .....	9	g
KCl .....	0,42	g
CaCl <sub>2</sub> .....	0,42	g
NaHCO <sub>3</sub> .....	0,20	g
Eau distillée :	1000	ml

Elle a été stérilisée à 120° C pendant 20 minutes et stockée à + 4° C.

IV.1.2. Eaux synthétiques chargées en matières organiques biodégradables :

Une eau chargée en matières organiques biodégradables et en minéraux a été réalisée en ajoutant, à de l'eau du robinet du District de NANCY, différents composés, dont les quantités sont rapportées dans le tableau 4.1.

Tableau 4.1.

Composition de l'eau synthétique chargée en  
matière organique biodégradable.

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	11,15 mg
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .....	20,50 mg
CaCl <sub>2</sub> .....	84,00 mg
Peptone (Bactopeptone DIFCO).	0,75 mg
Caséine .....	24,00 mg
Amidon soluble .....	63,00 mg
Saccharose .....	63,00 mg
Cellulose .....	25,00 mg
Huile Labrafil M 1944 CS ....	0,045 ml
NH <sub>4</sub> OH 25 % NH <sub>3</sub> .....	0,039 ml
Détergent (laurylsulfate), solution à 40 mg/l .....	0,050 ml
Solution d'oligoéléments de Winogradsky .....	0,5 ml
Eau de distribution publique.	1000 ml

-----

Solution d'oligoéléments de Winogradsky

Molybdate de potassium .....	0,05 g
Borate de sodium .....	0,05 g
Nitrate de cobalt .....	0,03 g
Sulfate de cadmium .....	0,05 g
Sulfate de cuivre .....	0,05 g
Sulfate de zinc .....	0,05 g
Sulfate de manganèse .....	0,05 g
Perchlorure de fer .....	1 goutte
Eau distillée .....	1000 ml



Cette solution a été stérilisée à 120° C pendant 20 minutes et stockée à + 4° C.

Les caractéristiques physico-chimiques de cette solution sont données dans le tableau 4.2.

Tableau 4.2.

Caractéristiques de l'eau synthétique chargée en matière organique biodégradable.

DBO <sub>5</sub> .....	200 mg/l
DCO .....	300 "
MeST .....	250 "
pH .....	7,2
N total .....	56 mg/l
PO <sub>4</sub> <sup>---</sup> .....	12,3 mg/l
SO <sub>4</sub> <sup>--</sup> .....	70,0 "
Cl <sup>-</sup> .....	120,0 "
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> .....	350,0 "
Ca <sup>++</sup> .....	170,0 "
Mg <sup>++</sup> .....	5,0 "
Na <sup>+</sup> .....	78,4 "
K <sup>+</sup> .....	10,4 "

Le carbone total, l'azote total et le phosphore total sont dans les proportions suivantes :

$$\frac{N}{P} = 5 \quad \frac{C}{N} = 5,81$$

Cette solution synthétique a été utilisée telle quelle ou diluée au dixième dans de l'eau distillée pour obtenir une DBO<sub>5</sub> de 20 mg C<sub>2</sub>/l.

Ces deux eaux synthétiques correspondent respectivement au niveau de contamination en matières organiques dégradables :

- d'une eau usée brute,
- d'une eau usée épurée.

IV.1.3. Eaux synthétiques à pH contrôlé.

Une eau synthétique, chargée en matière organique biodégradable, de  $UBO_5 = 200 \text{ mg } C_2/1$ , a été maintenue à trois pH :

- pH 5,5 à l'aide d'acide acétique dilué au 1/3,
- pH 8,5 à l'aide de soude N,
- pH 7,0 à l'aide de soude N.

Ces eaux ont été stérilisées à  $120^\circ \text{ C}$  pendant 20 minutes. Le pH a été contrôlé après stérilisation et réajusté si nécessaire.

IV.1.4. Eaux minéralisées.

Trois eaux de minéralisation fondamentalement différente et d'origine naturelle ont été utilisées. Leur composition est donnée dans le tableau 4.3.

Tableau 4.3.

Caractéristiques des eaux minéralisées.

	Eau douce	Eau dure bicarbonatée	Eau dure bicarbonatée et sulfatée
Résistivité, ohms.cm ...	8 390	2 535	1 395
Dureté (T.H.), °français	4,2	23,9	42,7
$Ca^{++}$ (mg/l) .....	15	90,5	125,0
$Na^+$ " .....	7,4	2	27,5
$K^+$ " .....	2,3	0,25	2
$HCO_3^-$ " .....	48,8	201,30	299,0
$Cl^-$ " .....	11,0	16,00	15,0
$SO_4^{--}$ " .....	18,9	26,90	220,0
pH .....	7,40	7,75	7,65

Elles ont été stérilisées à  $120^\circ \text{ C}$  pendant 20 minutes.

IV.1.5. Eaux usées.

Les eaux usées brutes et épurées ont été choisies dans les essais in situ, d'une part à l'entrée (après dégrillage), et d'autre part à la sortie de la station d'épuration biologique de l'agglomération NANCY - MAXEVILLE.

Les caractéristiques physico-chimiques sont présentées dans le tableau 4.4. Les caractéristiques correspondent à la moyenne des valeurs relevées pendant la durée de l'expérimentation.

Tableau 4.4.

Caractéristiques des eaux usées  
utilisées dans l'expérimentation.

Paramètres	Lieu de prélèvement	Station d'épuration de NANCY-MAXEVILLE. Eau brute après dégrillage	Station d'épuration de NANCY-MAXEVILLE. Eau épurée après traitement biologique
pH .....		7,3	7,2
DBO <sub>5</sub> (mg O <sub>2</sub> /l) .....		148	20
DCO " .....		232	36
Numération totale à 37° C après 24 h d'incubation, par ml .....		17 . 10 <sup>3</sup>	3 . 10 <sup>4</sup>
<u>E. coli</u> par ml .....		12 . 10 <sup>3</sup>	93

IV.1.6. Eaux de rivières.

Les eaux des rivières Meurthe et Moselle ont été utilisées au cours de nos essais in situ. Les caractéristiques physico-chimiques moyennes de ces eaux sont présentées dans le tableau 4.5.

Tableau 4.5.

Caractéristiques physico-chimiques moyennes des eaux de rivières utilisées au cours de l'expérimentation.

Paramètres	Lieu de prélèvement	Meurthe	Moselle
DBO <sub>5</sub> (mg O <sub>2</sub> /l) .....		18	< 4
DCO " .....		48	8
pH .....		7,7	7,6
Résistivité, ohms.cm .....		1 700	4 630
Cl <sup>-</sup> (mg/l) .....		980	11,5
SO <sub>4</sub> <sup>--</sup> " .....		69	61
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> " .....		116	70,5
Dureté (T.H.) (degrés français)...		89	12
Ca <sup>++</sup> (mg/l) .....		345	30
Mg <sup>++</sup> " .....		7,5	11,9
Na <sup>+</sup> " .....		295	9,5
Numération totale à 37° C après 24 h d'incubation, par ml .....		30 000	3 500
<u>E. coli</u> , par ml .....		4 600	46
A.T.P., mg/l .....		0,05	0,01

#### IV.2. Microorganismes testés.

Dans tous les cas, les essais ont été réalisés avec des échantillons contenant des Escherichia coli indigènes ou de laboratoire.

Dans ce dernier cas, Escherichia coli (souche de l'Institut Pasteur N° 54 117) a été utilisé sous forme d'une suspension bactérienne provenant d'une culture asynchrone de 18 heures incubée à 37° C dans 50 ml de bouillon nutritif ordinaire (Institut Pasteur production, S 6 406). Cette suspension bactérienne a été centrifugée à 5 000 g pendant 10 minutes et remise en suspension dans 50 ml de liquide de Ringer stérile.

L'opération a été renouvelée trois fois afin d'éliminer au maximum le milieu de culture. La concentration de cette suspension bactérienne a été appréciée par la méthode d'inclusion en gélose (norme AFNOR T 90-401). Elle titrait environ  $10^9$  E. coli par millilitre.

#### IV.3. Matériels supports.

Six matériaux solides ont été retenus pour l'expérimentation. Ils ont été choisis en fonction de leurs propriétés de surface présumées nettement différentes, et de leur inertie chimique et biologique. Ce sont :

##### IV.3.1. le platine :

- sous forme d'un fil de diamètre 0,5 mm, de longueur utile 10 cm. Sa surface utile développée était de 1,57 cm<sup>2</sup> ;
- sous forme d'une grille comportant 12,5 mailles par cm<sup>2</sup>, de longueur 5 cm et de largeur 3 cm. Les mailles avaient un diamètre de 0,10 mm. La surface totale développée était de 15 cm<sup>2</sup>.

##### IV.3.2. l'acier :

Acier inox           ATSJ 304 L,  
norme AFNOR Z 2 CN 18:10.

IV.3.3. le bois :

Sapin non verni, provenant de lattes utilisées en menuiserie.

IV.3.4. le caoutchouc :

Caoutchouc naturel (N.R.) référence 1412, provenant d'un manufacturier caoutchoutier.

IV.3.5. le P.V.C. :

Polychlorure de vinyle de norme alimentaire, plastifié.

IV.3.6. le verre :

Lame de verre borosilicaté, utilisée en microscopie.

Les cinq derniers matériaux ont été utilisés sous forme de plaquettes dont les dimensions et les surfaces sont indiquées dans le tableau 4.6.

Tableau 4.6.

Dimensions externes des plaquettes.

Matériaux	Dimensions (cm)			Surface totale calculée (cm <sup>2</sup> )
	Longueur	x largeur	x épaisseur	
Acier	6,60	x 3,18	x 0,10	43,9
Bois	4,90	x 1,93	x 0,50	25,8
Caoutchouc	4,89	x 2,90	x 0,15	30,7
P.V.C.	4,76	x 2,95	x 0,20	31,1
Verre	5,96	x 2,54	x 0,09	31,8

Ces différents matériaux ont été préparés avec soin à chaque expérimentation.

L'acier et le verre ont été lavés avec un détergent dilué au 1/10 (D.D.N. 50), puis dégraissés sous ultra-sons à l'aide d'un appareil ALCATEL type 20 200 muni d'une sonotrode T 20 dissipant une puissance de 200 watts et une fréquence voisine de 20 KHZ dans un bain de benzène pendant deux minutes, et enfin rincés plusieurs fois à l'eau distillée et séchés à 105° C.

Le P.V.C., le caoutchouc, le platine et le bois ont subi le même traitement, hormis la phase de dégraissage, et sont séchés à une température de 60° C.

Lors des expérimentations, aussi bien en laboratoire qu'in situ, des plaquettes neuves des différents matériaux ont été employées ; sont récupérés et réutilisés uniquement les fils de platine.

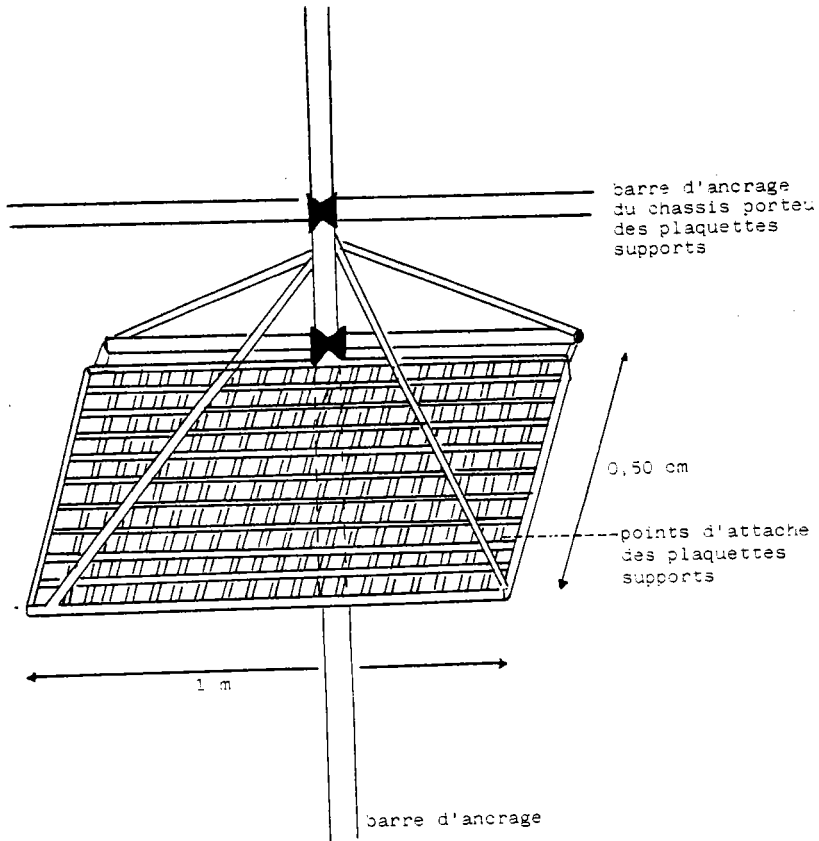
En conséquence, le nombre de plaquettes de chaque type de matériau a été prévu en fonction du nombre de déterminations et de la fréquence des prélèvements.

Pour les expériences de laboratoire, les différents matériaux sont fixés, en évitant un chevauchement, par un fil de nylon à une tringle de bois reposant sur un cristallisateur en verre borosilicaté stérilisable, d'une contenance de 2 litres, de forme basse (diamètre 26 cm, hauteur 10 cm). Une plaque de verre servait de couvercle et évitait les contaminations avec l'extérieur.

Pour les expérimentations in situ, les différents matériaux ont été fixés à un chassis à immerger dans l'eau, et pouvant être facilement manoeuvré pour recueillir les différents matériaux. Les plaquettes des divers matériaux sont maintenues au chassis par des fils de nylon.

La figure 4.7. indique le schéma de montage.

Figure 4.7. Schéma représentant le dispositif expérimental, chassis d'immersion des matériaux supports in situ.





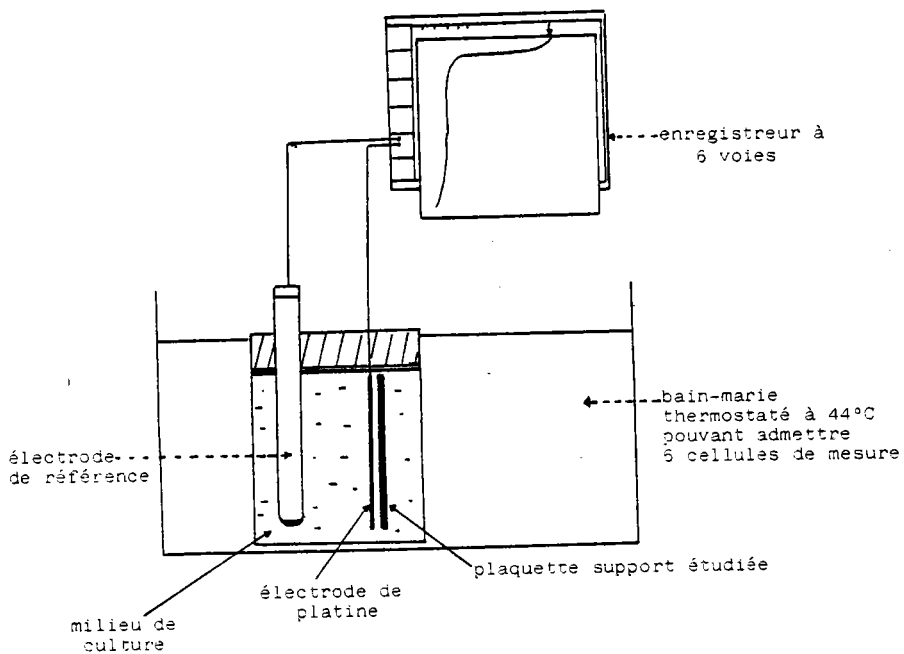
IV.4. Dispositif expérimental utilisé pour l'étude de la mesure électrochimique des coliformes.

Le dispositif expérimental se composait :

- d'un bain thermostaté pouvant contenir six cellules de mesure, avec régulation de la température à  $\pm 0,5^\circ \text{C}$  ;
- d'un millivoltmètre enregistreur, d'impédance d'entrée supérieure à 1 mégohm (GOERTZ type SERVOCOR 460), à 6 voies d'entrée, permettant de faire fonctionner en parallèle, et de façon indépendante, six dispositifs de mesure identiques ; il peut mesurer une gamme étendue de potentiel ; l'ajustement a été réalisé entre - 1250 mV et + 1250 mV avec une vitesse de déroulement du papier de 2 cm/heure ;
- de six cellules de mesure en pyrex, stérilisables, d'un volume unitaire total de 150 ml, comprenant chacune :
  - . deux électrodes fixées sur un bouchon en caoutchouc obturant l'ouverture supérieure de la cellule. Les deux électrodes sont reliées au millivoltmètre enregistreur et sont respectivement :
    - \* pour la cathode, un fil de platine tel qu'il a été décrit précédemment, mais d'une longueur utile dans la cellule de 5 cm,
    - \* pour l'anode, une électrode de référence INGOLD 360 K1 (argent/chlorure d'argent), stérilisable à la vapeur. Cette électrode peut être alimentée sous pression jusqu'à 2 bars par un réservoir de KCl pressurisé.

L'ensemble du dispositif expérimental est schématisé par la figure 4.8.

Figure 4.8. : Schéma du dispositif expérimental.



#### IV.5. Appareil pour le dosage de l'A.T.P.

Le dosage de l'extrait d'A.T.P. par la réaction de bioluminescence nécessite un appareillage pour mesurer la quantité de lumière émise.

Un biomètre à luminescence modèle 760, fabriqué par Du PONT Instruments, a été utilisé. Outre l'appareil, cette firme commercialise les réactifs nécessaires au dosage de l'A.T.P., notamment la luciférine-luciférase lyophilisée, référence 760 145 902.

Les caractéristiques principales de cet appareil sont :

- la possibilité de travailler sous 5 décades, minimisant ainsi les dilutions ;
- sa sensibilité de  $10^{-13}$  grammes d'A.T.P. pour une injection de 10  $\mu$ l ;
- calibration aisée de l'appareil avec des solutions standardisées d'A.T.P.

-----

V. M É T H O D E S

V.1. Analyses physico-chimiques des eaux.

Sur les eaux synthétiques, les eaux superficielles et les eaux usées, plusieurs paramètres ont été mesurés :

- pH ..... : il a été mesuré à l'aide d'un pH-mètre ORION 501 (précision 0,01), muni d'une électrode de verre combinée ORION pH référence 91.05.
- Résistivité : elle a été mesurée avec un conductivimètre TACUSSEL selon la norme AFNOR T 90-031, février 1973.
- Dureté ..... : elle a été déterminée selon la norme AFNOR T 90-003, avril 1978.
- Alcalinité. : elle a été mesurée selon le protocole de la norme AFNOR T 90-036.
- Chlorures.. : ils ont été dosés par le nitrate d'argent en présence de chromate de potassium comme indicateur, selon la norme AFNOR T 90-014.
- Sulfates... : ils ont été dosés par gravimétrie selon la norme AFNOR T 90-009.
- Calcium ... : il a été mesuré par dosage complexométrique à l'E.D.T.A.
- La demande chimique en oxygène, ou DCO : elle a été mesurée selon la norme AFNOR T 90-101 et exprimée en mg d'oxygène consommé dans les conditions de l'essai par les matières oxydables présentes dans un litre d'eau.
- La demande biochimique en oxygène en 5 jours, ou DBO<sub>5</sub> : elle a été mesurée selon la norme AFNOR T 90-103 et exprimée en mg d'oxygène nécessaire pour assurer la dégradation par voie biochimique et la métabolisation à une température de 20° C, à l'abri de la lumière, pendant 5 jours, des matières organiques présentes dans un litre d'eau.

V.2. Mesure de la mouillabilité des matériaux.

La mouillabilité des différents matériaux supports retenus a été appréciée par la détermination de leur tension interfaciale avec l'eau, les matériaux étant d'autant plus mouillables que leur tension interfaciale est faible. Cette méthode internationale est connue sous le nom de l' "Union Carbide Wetting Test TAPPI, juin 1970".

Un mélange de cellosolve ( $C_2H_5O-CH_3$ , éther monoéthylique de l'éthylène glycol) et de Formamide ( $H-CO-NH_2$ ) a été préparé dans des proportions croissantes de formamide (0 à 99 %) pour correspondre à 22 étalons de niveau en tension interfaciale connu allant respectivement de 30 à 56 dynes par cm (tableau 5.1).

Tableau 5.1.

Préparations respectives des  
22 étalons.

Etalon	Formamide en %	Cellosolve en %	Niveau en dynes/cm
1	0	100	30
2	2,5	97,5	31
3	10,5	89,5	32
4	19,0	81,0	33
5	26,5	73,5	34
6	35,0	65,0	35
7	42,5	57,5	36
8	48,5	51,5	37
9	54,0	46,0	38
10	59,0	41,0	39
11	63,5	36,5	40
12	67,5	32,5	41
13	71,5	28,5	42
14	74,7	25,3	43
15	78,0	22,0	44
16	80,3	19,7	45
17	83,0	17,0	46
18	87,0	13,0	48
19	90,7	9,3	50
20	93,7	6,3	52
21	96,5	3,5	54
22	99,0	1,0	56

Le test a consisté à imbiber un coton hydrophile de solution à 40 dynes/cm et à étaler la solution sur toute la longueur du matériau. La solution a réagi de deux manières :

- en restant établie, donc bonne adhérence, pendant plus de 2 secondes : test positif,
- en se cassant et se rétractant, donc mauvaise adhérence : test négatif.

Si le test était positif, il a fallu procéder de même avec un étalon de valeur supérieure, et ainsi de suite jusqu'à ce qu'il devienne négatif. Le dernier test positif correspond à la valeur d'adhérence du matériau. Au contraire, si le test était négatif, il fallait procéder de même avec un étalon de valeur inférieure, et ainsi de suite jusqu'à ce qu'il devienne positif. Le premier test positif était celui de l'adhérence du matériau.

Ceci a permis de classer les différents matériaux du plus mouillable au moins mouillable :

	<u>Tension interfaciale</u> <u>dynes/cm</u>
Bois .....	30
Caoutchouc .....	31
P.V.C. ....	34
Acier inoxydable .....	35
Verre .....	50

### V.3. Numération des microorganismes.

#### V.3.1. Dénombrement total des bactéries.

Les bactéries ont été numérées à partir des échantillons d'eau, ou à partir des supports préalablement lavés par trois jets successifs d'eau distillée stérile, puis grattés à l'aide d'une lamelle de verre stérile, dans un volume déterminé de liquide de Ringer.

La numération a été conduite selon la méthode d'incorporation en gélose, norme AFNOR 90-401.

Un millilitre de l'échantillon, ou ses dilutions au dixième, ont été incorporés à de la gélose (gélose standard pour dénombrement, Institut Pasteur Paris 64 477), maintenue en surfusion à 42° C dans des boîtes de Petri stériles de 90 mm de diamètre.

Deux boîtes ont étéensemencées pour chaque dilution et incubées à 37° C pendant 24 heures.

Les colonies ont été comptées et ont été exprimées en nombre de microorganismes par millilitre d'eau de l'échantillon initial et par cm<sup>2</sup> de surface du matériau analysé.

### V.3.2. Dénombrement des Escherichia coli.

Les cultures pures d'Escherichia coli ont été numérées par la méthode d'incorporation en gélose décrite en V.3.1.

Pour les eaux de rivières et les eaux usées contenant des populations bactériennes mixtes, deux méthodes de dénombrement ont été utilisées :

- la technique de dénombrement des coliformes fécaux en milieu liquide :

Les résultats ont été exprimés en nombre le plus probable (N.P.P.) d'E. coli par 100 ml selon la norme AFNOR T 90-413.

Les eaux et les échantillons obtenus par grattage et lavage des surfaces, selon la technique énoncée précédemment, ont été inoculés dans des tubes de milieu lactosé au pourpre de bromocrésol avec une cloche de Durham (Institut Pasteur référence 64 O41), à raison de trois tubes par dilution.

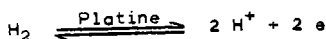
Après incubation à 37° C pendant 48 heures, tous les tubes fermentant le lactose, avec production de gaz, ont été confirmés par repiquage dans du bouillon bilié au vert brillant (Institut Pasteur référence 64 O57) et de l'eau peptonée (Institut Pasteur référence 64 337), et incubation à 44° C pendant 48 heures.

- Méthode électrochimique de numération des E. coli :

La méthode électrochimique, mise au point par WILKINS et al. en 1974, est basée sur la relation linéaire entre la concentration initiale en bactéries coliformes et le dégagement d'hydrogène lors d'une culture sur milieu nutritif. Cette méthode permet de déterminer la concentration initiale en coliformes.

La méthodologie consiste à introduire un volume déterminé de l'eau étudiée dans un milieu sélectif favorable à la croissance des coliformes, comme le milieu lactosé au pourpre de bromocrésol (Institut Pasteur référence 64 O41), où se trouvent plongées une électrode de platine et une électrode de référence, et à incuber le tout à une température choisie ; un effet sélectif peut s'exercer par la température du milieu, qui, à 44° C, favorise la croissance des E. coli au détriment des autres coliformes non thermotolérants.

Les coliformes se multiplient en produisant de l'hydrogène, qui peut être détecté par l'électrode de platine agissant comme électrode à hydrogène :



Le potentiel électrique de l'électrode de platine par rapport à une électrode de référence variera en fonction de la quantité d'hydrogène présente. Le dégagement d'hydrogène donne lieu à une variation mesurable du potentiel de l'électrode à hydrogène, que l'on peut suivre sur un enregistreur.

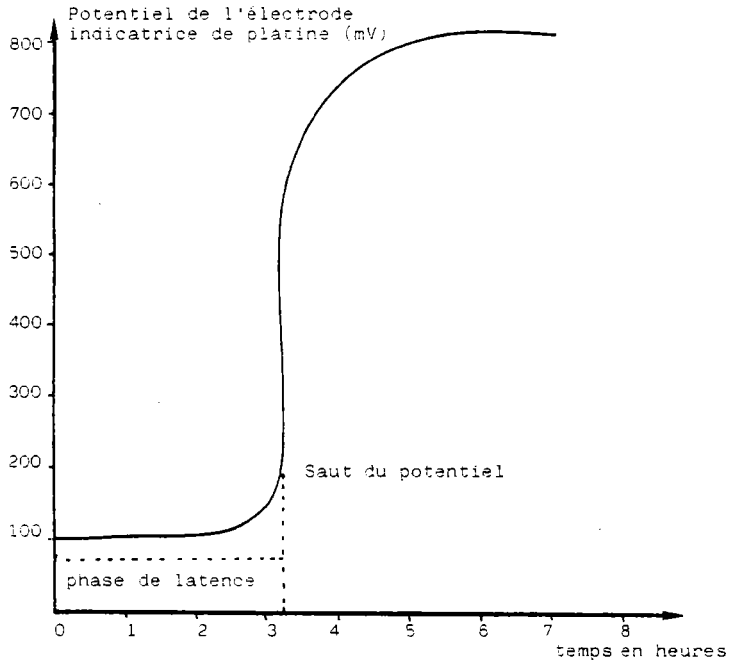
Le délai au bout duquel le potentiel à hydrogène varie est en relation avec la concentration initiale des bactéries productrices d'hydrogène. Les courbes de réponse lues sur l'enregistreur, et schématisées à la figure 5.2, révèlent trois parties correspondant à :

- . une période de latence,
- . une période d'accroissement rapide du potentiel,
- . une période de déclin du potentiel.

Pour chaque diminution d'un facteur de 10 de la concentration en coliformes de l'ensemencement, selon WILKINS et al. 1974, la période de latence augmente de 60 à 70 minutes.



Figure 5.2. : Exemple type de courbe expérimentale enregistrée.



Seul le principe de cette méthode est présenté ici, car la technique décrite par WILKINS et al. en 1974 nécessitait d'être vérifiée et adaptée au dénombrement des E. coli fixés sur support solide.

#### V.4. Dosage de l'Adénosine-tri-phosphate (A.T.P.).

Le dosage de l'adénosine-tri-phosphate a permis d'évaluer la quantité de biomasse vivante dans un milieu hydrogène. Sa détermination consiste en deux phases bien distinctes : l'extraction de l'A.T.P. et le dosage de l'extrait obtenu.

- L'extraction de l'A.T.P. a été réalisée par une lyse chimique des cellules par le diméthylsulfoxyde à 90 % (D.M.S.O.,  $C_2H_5OH$  art. 2951 Merck).

Trois millilitres de D.M.S.O. sont mis en contact pendant 60 secondes avec les plaquettes supports recueillies dans une boîte de Petri stérile, en ayant soin que toutes les surfaces du matériau soient imprégnées par le D.M.S.O.

Pour éviter toute dénaturation de l'A.T.P., 12 ml de solution tamponnée MOPS 0,01 M (3-morpholinopropane,  $C_7H_{15}NO_4S$  Merck art. 6229) sont ajoutés et mis en contact pendant une durée de 120 secondes. Durant toute cette phase d'extraction, la meilleure homogénéisation entre les plaquettes supports et les liquides en contact est favorisée par un raclage de toutes les surfaces du matériau à l'aide d'une lamelle stérile et conservation, au sein du liquide d'extraction, de toutes les parties susceptibles de décrochement.

L'extrait obtenu est conservé dans un bain de glace, ou congelé à  $-18^{\circ}C$  si son dosage est différé, le temps de conservation ne dépassant en aucun cas 15 jours.

- Le dosage de l'extrait d'A.T.P. par la réaction de bioluminescence.

Le principe du dosage utilisé repose sur l'excitation du système luciférine-luciférase (provenant de la luciole Photinus pyralis, et l'émission de photons proportionnellement à la quantité d'A.T.P. présente dans l'échantillon.

Cette réaction de bioluminescence utilise trois réactifs :

- . une solution de luciférine-luciférase : cette solution est reconstituée à partir de lyophilisats de luciférine (0,71 mM), luciférase  $\geq 100$  unités, à raison de 3 ml d'eau bidistillée stérile, permettant l'obtention de 25 cuvettes de réaction de 100  $\mu$ l,
- . l'extrait microbien contenant l'A.T.P. à doser ; aucun traitement n'a eu lieu pour éliminer les autres molécules présentes. 10  $\mu$ l sont injectés dans chaque cuvette de réaction au moment de la mesure ; l'opération est répétée trois fois.
- . Les solutions standardisées d'A.T.P. sont utilisées pour calibrer l'appareillage, ce qui permet un étalonnage interne et des lectures directes des quantités d'A.T.P. présentes dans l'extrait injecté.

### V.5. Méthode d'analyse des résultats.

Lorsque l'expérimentation a donné lieu à un couple de deux variables, les points ont été représentés dans un repère cartésien. Chaque fois qu'il a été possible de déceler un nuage de points dans une direction rectiligne, l'étude quantitative de la corrélation linéaire entre les deux variables a été recherchée.

L'équation de la droite de régression par ajustement des moindres carrés est donnée par la formule :

$$Y = aX + b.$$

Les constantes a et b sont les solutions du système :

$$\begin{aligned}\sum Y &= bN + a \sum X \\ \sum XY &= b \sum X + a \sum X^2\end{aligned}$$

$$a = \frac{N \sum XY - (\sum X)(\sum Y)}{N \sum X^2 - (\sum X)^2}$$

$$b = \frac{(\sum Y)(\sum X^2) - (\sum X)(\sum XY)}{N \sum X^2 - (\sum X)^2}$$

Le degré de dépendance des deux variables, ou coefficient de corrélation linéaire r, est obtenu :

$$r = \frac{N \sum XY - (\sum X)(\sum Y)}{\sqrt{[N \sum X^2 - (\sum X)^2] \cdot [N \sum Y^2 - (\sum Y)^2]}}$$

Le coefficient de corrélation permet uniquement de vérifier s'il existe une corrélation linéaire entre deux variables. Les limites de confiance du coefficient de corrélation permettent de discuter sur la validité des résultats. L'utilisation d'un ordinateur de poche CASIO FX702P, a permis les calculs rapides des coefficients de l'analyse de corrélation linéaire.

Dans tous les autres cas où des analyses statistiques n'étaient pas possibles, des représentations graphiques et le report des résultats sous forme de tableaux ont permis une interprétation des résultats expérimentaux.

-----

VI. PROCOOLE EXPERIMENTAL

La mise au point de la méthode électrochimique développée par WILKINS et al., 1974, pour des dénombrements d'E. coli libres en milieu aqueux, a été étendue et son adaptation aux dénombrements d'E. coli fixés sur supports s'est déroulée en plusieurs étapes.

VI.1. Adaptation de la méthode de WILKINS à l'étude des E. coli fixés.

VI.1.1. Utilisation et sensibilité de la méthode de WILKINS à l'étude des E. coli libres.

Utilisation du dispositif expérimental décrit dans le chapitre "Matériel" pour l'étude de la mesure électrochimique des coliformes, et répondant aux spécifications décrites dans les travaux de WILKINS et al. 1974. Six concentrations en E. coli provenant de culture pure, et titrées au départ, ont été soumises à la méthode électrochimique. L'enregistrement des potentiels d'hydrogène a permis de mesurer la période de latence avant la dérive du potentiel.

Dix millilitres de cette série de six concentrations en E. coli de 2/ml à  $1 \cdot 10^4$ /ml, sont ensemencés dans 90 ml de bouillon lactosé au pourpre de bromocrésol contenus dans la cellule de mesure.

Chaque essai, réalisé en double, a permis de mettre en relation la concentration initiale de bactéries et le temps nécessaire à la dérive de potentiel de l'électrode indicatrice, et de tracer une courbe de référence pour une incubation à 44° C.

VI.1.2. Adaptation de la méthode électrochimique à la mesure des E. coli fixés sur platine.

- Etalonnage sur fils de platine :

Dénombrer les E. coli fixés sur un support par voie électrochimique peut avoir un intérêt non négligeable. Dans un premier temps, on a envisagé la possibilité d'utiliser simultanément l'électrode de platine comme matériau support de fixation et comme électrode indicatrice d'hydrogène.

On utilise le même dispositif décrit dans le chapitre "Matériel" pour numérer les E. coli en phase aqueuse. Dans ce cas, le milieu de culture était stérile, et il suffisait d'immerger les fils de platine à la surface desquels étaient fixés les E. coli.

La croissance des E. coli générateurs d'hydrogène devant se faire au voisinage immédiat de l'électrode, la viscosité du milieu de culture a été augmentée par addition de gel de xanthane Rhodopol R 23 (Rhône-Poulenc) à une concentration de 7,5 g/l.

La cellule était initialement remplie avec 100 ml de bouillon au pourpre de bromocrésol, et la température d'incubation était de 44° C.

L'étalonnage proprement dit s'est opéré comme suit : des fils de platine stériles, d'une surface utile identique et de longueur 10 cm, sont immergés pendant des durées croissantes dans des suspensions de cultures pures d'E. coli de différentes concentrations, afin de couvrir une gamme étendue d'E. coli fixés sur ces fils de platine.

La numération des bactéries fixées a eu lieu en double, à la fois par les méthodes conventionnelles de microbiologie et par la méthode électrochimique. On ne prenait chaque fois en compte que les E. coli adhérant au fil de platine. Un triple rinçage par écoulement rapide de 10 ml d'eau distillée stérile a été effectué.

La relation graphique entre le nombre d'E. coli fixés sur le fil de platine, en fonction du temps de latence avant la dérive du potentiel de l'électrode indicatrice, a été déterminée.

### VI.1.3. Adaptation de la méthode électrochimique à la mesure des E. coli fixés sur supports solides.

Il était indispensable d'adapter la méthode électrochimique, de façon à pouvoir effectuer des numérations d'E. coli fixés sur des matériaux de natures diverses.

Le principe a consisté à accoler, au moment de la mesure électrochimique, le matériau à une électrode plane de platine de dimensions voisines, comme décrit au chapitre "Matériel".

Il était nécessaire de mettre en relation le temps de latence avant la dérive du potentiel, avec le nombre d'E. coli fixés sur le matériau.

Des plaquettes de P.V.C., décrites dans le chapitre "Matériel" sont immergées pendant des durées croissantes dans des suspensions d'E. coli de concentrations différentes. Les E. coli fixés sont quantifiés simultanément par la méthode utilisant le nombre le plus probable en milieu liquide et par mesure électrochimique, en les introduisant dans la cellule électrochimique contenant 100 ml de milieu de culture de même composition que dans le cas des fils de platine, et en ayant soin de les accoler à l'électrode de platine plane. L'incubation a lieu à 44° C.

Avant introduction dans la cellule de mesure, un triple rinçage par écoulement rapide de 10 ml d'eau distillée stérile a été fait, comme pour les fils de platine, avant de mesurer uniquement les E. coli fixés.

Une corrélation graphique entre le nombre d'E. coli fixés sur les plaques de P.V.C. et le temps de latence avant la dérive du potentiel de l'électrode de platine indicatrice d'hydrogène, a pu être dressée.

### VI.2. Influence du milieu et du matériau sur la fixation des E. coli (souche de laboratoire).

La méthode chimique pour quantifier les E. coli fixés aux différents supports a été appliquée au suivi de la cinétique de la fixation des E. coli au cours du temps, en fonction des caractéristiques physico-chimiques du milieu.

Les plaquettes des cinq matériaux supports décrits au chapitre "Matériel" sont immergées en nombre suffisant pour permettre leur prélèvement au bout de temps croissants, chaque mesure étant destructive.

Le volume total d'eau d'immersion a été dans tous les cas de deux litres.

La quantité d'E. coli de départ, ainsi que les paramètres variables, sont indiqués dans le développement des essais ci-après, où sont chaque fois précisés

- . le but des essais,
- . le type d'eau,
- . la population initiale en E. coli libres,
- . les matériaux supports mis en contact, la durée globale de leur immersion, ainsi que le nombre de prélèvements.

VI.2.1. Évaluation de l'influence de la concentration initiale enensemencement d'E. coli sur la quantité d'E. coli fixés sur les cinq matériaux supports au cours de temps d'immersion croissants.

- Milieu synthétique de contact ; le liquide de Ringer dilué au 1/4 a été utilisé.
- Température de l'eau :  $20 \pm 1^\circ \text{C}$ .
- pH :  $7 \pm 0,1$ .
- Deux concentrations initiales en E. coli :
  - .  $1 \times 10^4$  E. coli/ml
  - .  $1 \times 10^2$  E. coli/ml
- Essais statiques.
- Matériaux utilisés : bois, caoutchouc, P.V.C., acier et verre.
- Durée totale d'immersion : 360 heures. Prélèvement de chaque matériau après 8, 14, 48, 190 et 360 heures d'immersion.



VI.2.2. Évaluation de l'influence de la concentration en matières organiques biodégradables sur la quantité d'E. coli fixés sur les cinq matériaux supports.

- Milieu de contact : eau d'égout synthétique à deux concentrations :
  - . DBO<sub>5</sub> = 200 mg O<sub>2</sub>/l
  - . DBO<sub>5</sub> = 20 mg O<sub>2</sub>/l
- Température de l'eau : 20 ± 1° C.
- pH = 7 ± 0,1
- Population initiale en E. coli : 1 x 10<sup>4</sup>/ml
- Matériaux supports testés :
  - bois, caoutchouc, P.V.C., verre, acier.
- Essais statiques et agités par mouvement giratoire à 300 tours par minute ; agitation uniquement appliquée au bois et au caoutchouc, et ce pour une DBO<sub>5</sub> de 200 mg O<sub>2</sub>/l.
- Durée totale d'immersion : 324 heures.
- Prélèvement de chaque matériau après des durées d'immersion croissantes correspondant à des durées moyennes de 24, 72, 112 et 316 heures de contact.

VI.2.3. Influence de la minéralisation sur la quantité d'E. coli fixés sur les cinq matériaux au cours du temps.

- Milieu de contact : eaux naturelles correspondant à des eaux de minéralisations fondamentalement différentes :
  - . Eau douce à faible minéralisation, pH = 7,40
  - . Eau dure de minéralisation bicarbonatée calcique, pH = 7,75
  - . Eau dure de minéralisation sulfatée calcique, pH = 7,65
- Température de l'eau : 20 ± 1° C.
- Absence d'agitation.

- Population initiale en E. coli :  $2,5 \times 10^5$ /ml.
- Matériaux supports testés :  
bois, caoutchouc, P.V.C., verre et acier.
- Prélèvement de chaque matériau après des durées d'immersion correspondants aux temps : 8, 24, 48; 124, 192 et 288 heures de contact.

VI.2.4. Influence du pH sur la quantité d'E. coli fixés sur les cinq matériaux supports au cours du temps.

- Milieu de contact : eau d'égout synthétique,  $\text{DBO}_5 = 200 \text{ mg O}_2/\text{l}$
- Température de l'eau :  $20 \pm 1^\circ \text{C}$ .
- Absence d'agitation.
- Population initiale en E. coli :  $1,5 \times 10^5$ /ml
- Trois séries d'essais :
  - . pH = 7 + 0,1 eau synthétique
  - . pH = 5,5  $\pm$  0,1 à l'aide d'acide acétique dilué au 1/3
  - . pH = 8,5  $\pm$  0,1 à l'aide de soude N.
- Matériaux supports testés :  
bois, caoutchouc, P.V.C., verre et acier.
- Prélèvements de chaque matériau après des durées d'immersion correspondant aux temps de 8, 24, 48, 72, 192 et 360 heures de contact

VI.2.5. Influence de la température sur la quantité d'E. coli fixés sur les cinq matériaux supports au cours du temps.

- Milieu de contact : eau d'égout synthétique,  $\text{DBO}_5 = 200 \text{ mg O}_2/\text{l}$
- Absence d'agitation.
- pH = 7  $\pm$  0,1
- Population initiale en E. coli :  $1,5 \times 10^5$ /ml

- Dans une première série d'essais, la température de l'eau est maintenue à  $20 \pm 1^\circ$  C pendant 3 jours consécutifs, puis refroidie et conservée à  $15 \pm 1^\circ$  C.
- Dans une deuxième série d'essais, la température de l'eau est maintenue à  $10 \pm 1^\circ$  C pendant 8 jours consécutifs, puis réchauffée et conservée à  $15 \pm 1^\circ$  C.
- Matériaux supports testés :

bois, caoutchouc, P.V.C., verre, acier.

Prélèvements de chaque matériau après des durées d'immersion correspondant :

pour la 1<sup>ère</sup> série d'essais : à 8, 24, 48, 72, 75, 85, 96, 120 et 264 heures de contact ;

et pour la 2<sup>ème</sup> série d'essais : à 8, 24, 48, 72, 192, 200, 216, 250 et 386 heures de contact.

### VI.3. Evaluation des paramètres gouvernant la fixation des E. coli: Essais in situ avec bactéries indigènes.

Les cinq matériaux, sous forme de plaquettes en nombre suffisant, sont fixées à des chassis immergés dans quatre types d'eaux :

- Eaux superficielles continentales :
  - . Eau de rivière peu polluée (Moselle) dans son cours supérieur,
  - . Eau de rivière plus polluée (Meurthe) au niveau de l'agglomération nancéienne.
- Eaux de station urbaine :
  - . A l'entrée de la station urbaine de NANCY-MAXEVILLE, après le dégrilleur,
  - . A la sortie du décanteur secondaire, eau épurée après traitement biologique.

Les caractéristiques propres à ces types d'eaux sont données dans le chapitre "Matériel".

Les prélèvements ont eu lieu :

- pour la première série d'eaux : après 8, 24, 48, 72 heures, 8 jours, 15, 30 et 55 jours ;
- et pour la deuxième série d'eaux : après 8, 24, 48, 72 heures et 8 jours.

La quantité d'E. coli fixés a été évaluée par la méthode électrochimique ; de plus, des prélèvements en double ont été entrepris pour évaluer la quantité de biomasse vivante, par l'intermédiaire du dosage de l'A.T.P.

## VII. RÉSULTATS

Les résultats obtenus au cours de cette étude sont présentés en trois parties :

- d'une part, les essais d'adaptation de la méthode de WILKINS au dénombrement des E. coli fixés,
- d'autre part, l'étude en laboratoire de l'effet des caractéristiques du milieu et du matériau sur la cinétique de fixation des E. coli,
- enfin, l'étude de la fixation des E. coli dans différents milieux récepteurs.

### VII.1. Adaptation de la méthode de WILKINS à l'étude de la fixation des E. coli en culture pure.

La méthode électrochimique développée par WILKINS et al. (1971) met en relation le temps de latence de la dérive du potentiel d'hydrogène avec le nombre d'E. coli initialement présents dans une suspension liquide.

Son adaptation à l'étude des E. coli fixés sur supports nécessite d'en vérifier les principales caractéristiques, à savoir :

- le temps de latence,
- la dérive du potentiel,
- sa valeur obtenue comparativement à une autre méthode conventionnelle, utilisée en microbiologie pour dénombrer les E. coli.

#### VII.1.1. Étude du temps de latence.

Les résultats de comparaison entre le temps de latence avant le saut de potentiel de l'électrode indicatrice de platine et le nombre d'E. coli fixés sur support sont rassemblés dans le tableau 7.1.

TABLEAU 7.1.: RESULTATS DE TEMPS DE LATENCE EN FONCTION DU NOMBRE E.coli FIXES INITIALEMENT

Corrélation entre le nombre d' <u>E.coli</u> libres introduits initialement en milieu aqueux et la dérive du potentiel incubation à 44°C		Corrélation entre le nombre d' <u>E.coli</u> initialement fixés sur fil de platine et la dérive du potentiel incubation à 44°C		Corrélation entre le nombre d' <u>E.coli</u> initialement fixés sur plaque de platine et la dérive du potentiel incubation à 44°C	
Nombre <u>E. coli</u> par ml	temps de latence	Nombre <u>E.coli</u> fixés	temps de latence	Nombre <u>E.coli</u> fixés	temps de latence
2	5 h 35	2	7 h 33	5	7 h 00
2	5 h 30	2	7 h 26	5	6 h 50
5	5 h 00	3	7 h 45	50	5 h 50
5	5 h 10	14	6 h 22	70	5 h 45
50	3 h 50	40	5 h 48	300	5 h 00
50	4 h 00	100	5 h 33	300	5 h 05
200	3 h 15	110	5 h 28	3000	3 h 55
200	3 h 10	1000	4 h 13	30000	2 h 45
2000	2 h 00	2000	3 h 45	30000	2 h 50
2000	2 h 00	50000	2 h 20	200000	2 h 00
10000	1 h 10	500000	1 h 10	200000	1 h 50
10000	1 h 10	300000	1 h 20		

Les mesures obtenues correspondent aux trois situations suivantes :

- a)- L'électrode de platine, sous forme de fil, est utilisée comme dans le mode opératoire de WILKINS et sert d'électrode indicatrice d'hydrogène produit par les E. coli, et permet de dénombrer les E. coli libres dans un milieu liquide ;
- b)- L'électrode de platine, sous forme de fil, sert à la fois de support et d'électrode de mesure ;
- c)- L'électrode de platine est de forme plane pour permettre un contact étroit avec le matériau étudié servant de support de fixation aux E. coli.

Dans les trois cas cités, la température d'incubation de la cellule était de 44° C.

Comme le montre la figure 7.2, construite à partir des résultats du tableau 7.1, le temps de latence est une fonction logarithmique du nombre d'E. coli introduits dans la cellule de mesure, que ceux-ci soient initialement libres ou fixés sur l'électrode de platine ou sur le matériel support.

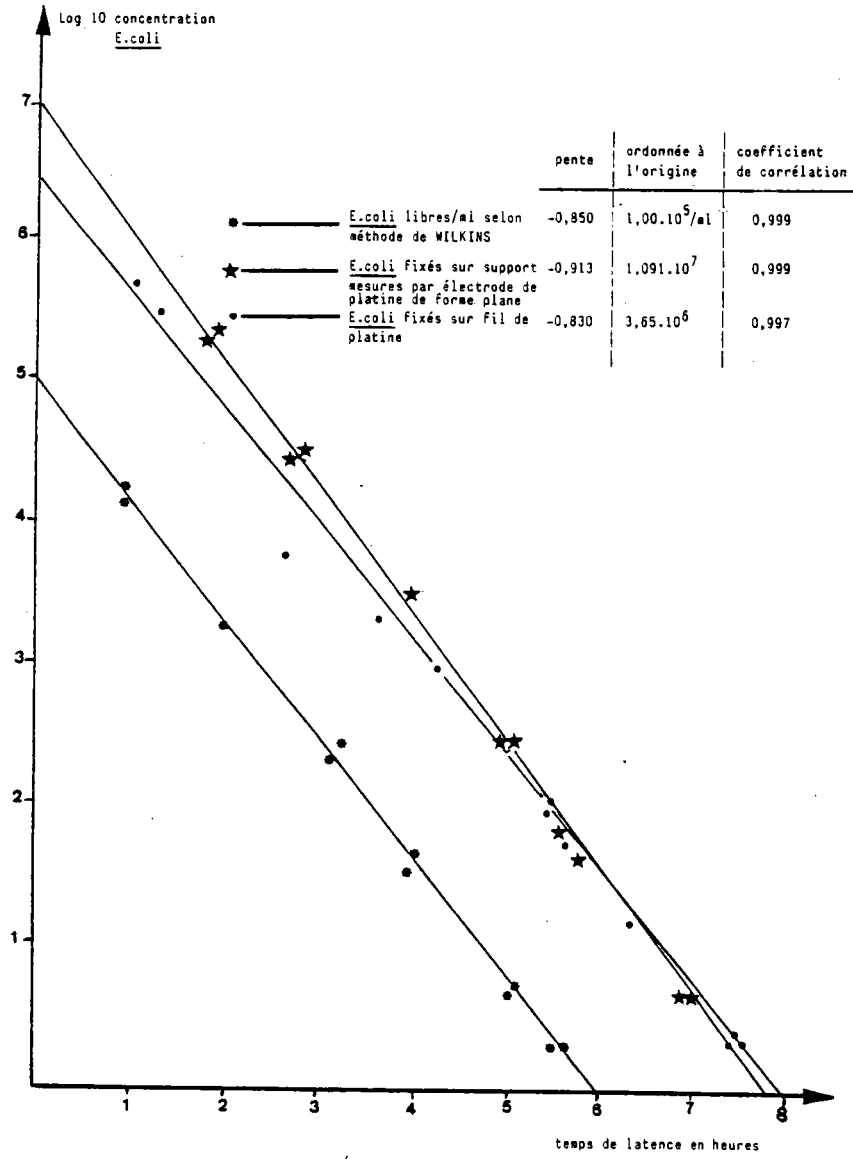
Dans le cas où les E. coli sont fixés, la période de latence diminue de 60 minutes pour chaque augmentation d'une puissance de 10 de la concentration en E. coli. Ce délai est plus long pour les E. coli libres et atteint 75 minutes.

Pour obtenir une dérive immédiate du potentiel à hydrogène, une présence de  $10^5$  E. coli libres par millilitre est suffisante, tandis qu'il faut  $3,6 \cdot 10^6$  E. coli fixés. Cette variation laisse supposer une différence de capacité de production ou de diffusion de l'hydrogène entre ces deux états, libre et fixé, d'E. coli.

Les pentes des droites obtenues en mesurant les E. coli sur fil de platine et sur support en contact étroit avec l'électrode de platine sous forme plane, sont respectivement de - 0,830 et - 0,913.

Ce faible écart, en rapport avec la surface développée des électrodes, variant elle de 1 à 12, montre que la surface ou la configuration de l'électrode de platine n'intervient quasiment pas ;

Figure 7.2. RELATION ENTRE LE TEMPS DE LATENCE ET LA QUANTITE D'E.coli INTRODUIIS DANS LA CELLULE DE MESURE ELECTROCHIMIQUE





seule la quantité d'E. coli présents intervient d'une manière prépondérante.

Les droites obtenues vont servir de courbes d'étalonnage dans les essais ultérieurs, et permettront de mettre en relation le temps de latence de la dérive du potentiel enregistré avec le nombre d'E. coli initialement fixés sur supports.

VII.1.2. Etude de la dérive du potentiel.

Les essais visant à déterminer le nombre d'E. coli fixés sur fil de platine au moment de la dérive du potentiel, par une méthode classique de numération bactérienne, sont rassemblés sous forme de tableau 7.3.

Tableau 7.3.

Résultats de numération d'E. coli fixés sur fil de platine au moment de la dérive du potentiel.

Numération des <u>E. coli</u> fixés sur fil de platine	Période de latence avant la dérive du potentiel	Numération des <u>E. coli</u> fixés au moment de la dérive du potentiel
2	7 h 26 mn	$6,5 \cdot 10^6$
2	7 h 33 mn	$7,3 \cdot 10^6$
3	7 h 46 mn	$6,4 \cdot 10^6$
14	6 h 22 mn	$6,3 \cdot 10^6$
40	5 h 48 mn	$5,2 \cdot 10^6$
100	5 h 33 mn	$7,5 \cdot 10^6$
110	5 h 28 mn	$7,1 \cdot 10^6$
300 000	1 h 20 mn	$6,6 \cdot 10^6$
	Moyenne .....	$6,6 \cdot 10^6$
	Ecart-type ....	6,16

Le temps de latence enregistré avant la dérive du potentiel, en fonction du nombre d'E. coli fixés sur fil de platine, confirme les résultats observés préalablement.

Le début du saut de potentiel est toujours enregistré pour une valeur de  $6,6 \cdot 10^6$  E. coli fixés sur l'électrode indicatrice.

Ceci correspond sensiblement à la valeur de l'ordonnée à l'origine de  $1,091 \cdot 10^7$  obtenue en mettant en relation le temps de latence et la quantité d'E. coli fixés sur fil de platine (courbe d'étalonnage figure 7.2).

Il existe une interdépendance entre le niveau en E. coli et le démarrage de la dérive du potentiel.

#### VII.1.3. Comparaison entre la méthode électrochimique et la méthode de numération bactérienne en culture mixte.

Les résultats obtenus en quantifiant les E. coli fixés sur P.V.C. par la méthode électrochimique et par la méthode classiquement employée en bactériologie pour le dénombrement des coliformes fécaux en milieu liquide sont rassemblés dans le tableau 7.4.

Dans le cas de l'évaluation par la méthode électrochimique, le nombre d'E. coli fixés est obtenu graphiquement après enregistrement du temps de latence de la dérive du potentiel.

Tableau 7.4.

Résultats de numération de E. coli fixés sur P.V.C. et évalués par la méthode électrochimique et la méthode utilisant le nombre le plus probable en milieu liquide.

Nombre d' <u>E. coli</u> évalué par méthode électrochimique :	$7,5 \cdot 10^3$	$1,2 \cdot 10^5$	$1,0 \cdot 10^6$	$2,0 \cdot 10^6$
Limites de confiance à 95 % :	$3,9 \cdot 10^3 - 1,1 \cdot 10^4$	$8,4 \cdot 10^4 - 4,8 \cdot 10^5$	$6,4 \cdot 10^5 - 4,6 \cdot 10^6$	$7,4 \cdot 10^5 - 5,6 \cdot 10^6$
Nombre d' <u>E. coli</u> évalué par la technique du N.P.P. en milieu liquide	$9,1 \cdot 10^3$	$9,1 \cdot 10^4$	$9,4 \cdot 10^5$	$8,5 \cdot 10^5$
Limites de confiance à 95 % :	$1,9 \cdot 10^3 - 4,2 \cdot 10^4$	$1,9 \cdot 10^4 - 4,2 \cdot 10^5$	$2,0 \cdot 10^5 - 4,4 \cdot 10^6$	$1,8 \cdot 10^5 - 3,9 \cdot 10^6$

Si, par les deux méthodes, les résultats obtenus ne sont pas significativement différents et laissent préjuger favorablement de l'adaptation de la méthode électrochimique au problème de quantification des E. coli fixés, il faut néanmoins souligner que l'amplitude des intervalles de confiance à 95 % est très importante et limite les comparaisons.

La méthode du N.P.F., en utilisant trois ensemencements par dilution, estime une quantité d'E. coli ; comparativement, la méthode électrochimique peut être entachée de l'erreur due à l'appréciation du début de la dérive du potentiel, et son étalonnage utilise une méthode elle aussi discutable.

#### VII.2. Influence du milieu et de la nature du support sur la cinétique de fixation des E. coli fixés (essais de laboratoire).

La méthode électrochimique se révélant adaptée pour permettre de multiples observations sur le comportement des différents matériaux solides choisis (acier, bois, caoutchouc, P.V.C., verre), elle a été retenue pour étudier l'influence des paramètres intervenant dans le milieu, particulièrement :

- la concentration initiale en E. coli,
- la concentration en matières organiques biodégradables,
- la minéralisation du milieu,
- le pH,
- la température.

##### VII.2.1. Influence de la concentration en E. coli et de la nature des supports sur la fixation.

Le nombre d'E. coli fixés sur les différents supports, en fonction du temps d'immersion et de l'ensemencement initial ( $10^4$  et  $10^4$  par ml) dans un milieu synthétique exempt de matière organique biodégradable, est présenté dans le tableau 7.5.

TABLEAU 7.5.: INFLUENCE DE LA CONCENTRATION INITIALE SUR LA FIXATION DES E.coli SUR DIFFERENTS SUPPORTS AU COURS DE TEMPS CROISSANTS DE CONTACT.

Résultats exprimés en nombre d'E.coli fixés par cm<sup>2</sup>.

Matériau	Ensemencement initial <u>E.coli</u> /ml	Temps de contact en heures				
		8	14	48	190	350
BOIS	10 <sup>2</sup>		0,58	0,15	0,66	0,15
	10 <sup>4</sup>	0,15		4,80	6,50	4,20
	10 <sup>4</sup>			30,6	9,8	28
	10 <sup>2</sup>					
CAOUTCHOUC	10 <sup>2</sup>		0,13	0,13	0,49	0,49
	10 <sup>4</sup>	0,16		1,30	21	2,20
	10 <sup>4</sup>			10	42,8	4,50
	10 <sup>2</sup>					
P.V.C.	10 <sup>2</sup>		0,13	6,10	70,7	0,96
	10 <sup>4</sup>	0,12		7,40	70,7	6,10
	10 <sup>4</sup>			1,20	1	6,30
	10 <sup>2</sup>					
ACIER	10 <sup>2</sup>		0,09	0,34	0,91	0,34
	10 <sup>4</sup>	0,09		2,50	9,10	0,34
	10 <sup>4</sup>			7,30	10	1
	10 <sup>2</sup>					
VERRE	10 <sup>2</sup>		0,47	0,53	1,25	0,18
	10 <sup>4</sup>	0,47		2,20	6,20	3,40
	10 <sup>4</sup>			4,10	4,90	18,90
	10 <sup>2</sup>					

<u>E.coli</u> Bactéries libres par ml	10 <sup>2</sup>		0,12.10 <sup>3</sup>	0,8.10 <sup>3</sup>	0,6.10 <sup>3</sup>	0,9.10 <sup>3</sup>
	10 <sup>4</sup>	0,34.10 <sup>4</sup>		4,5.10 <sup>4</sup>	3,1.10 <sup>4</sup>	8,4.10 <sup>4</sup>

Dans le cas le plus défavorable, après 48 heures de contact, 0,15 E. coli était fixé par  $\text{cm}^2$  sur un support de bois et, dans le meilleur des cas, 7,4 E. coli fixés par  $\text{cm}^2$  sur un support de P.V.C.

#### Influence de l'ensemencement.

Les rapports des quantités d'E. coli fixés en fonction des ensemencements initiaux ( $10^2$  et  $10^4$  par ml) montrent, après un contact de 48 heures, des valeurs nettement supérieures à 1, sauf pour le P.V.C., traduisant une quantité de bactéries 4 à 30 fois plus importante pour un ensemencement initial 100 fois supérieur.

Cette remarque est encore justifiée pour 190 heures et 350 heures de contact.

Les variations après 190 heures vont de 1 à 42 pour le P.V.C. et le caoutchouc respectivement, et après 350 heures, de 1 à 28 pour l'acier et le bois.

En parallèle, il faut relever une multiplication des bactéries dans le milieu synthétique pour les deux concentrations initiales en E. coli ( $10^2$  et  $10^4$  par ml) : après 48 heures de contact, les taux étaient respectivement de 8 à 4,5 fois supérieurs aux quantités d'E. coli présents dans le milieu liquide.

De ce fait, il n'est pas possible de montrer que les bactéries retrouvées sur les supports sont bien les bactéries initiales libres, ou les bactéries qui se sont multipliées sur le support, ou des bactéries libres qui se sont multipliées puis fixées.

#### Influence du temps de contact.

Au vu tableau 7.5., il apparaît une variation des quantités d'E. coli fixés en fonction du temps.

Un maximum d'E. coli fixés est relevé pour les deux concentrations en E. coli initiales après 190 heures de contact, avec respectivement 70,7 E. coli par  $\text{cm}^2$  sur P.V.C. et 1,25 E. coli par  $\text{cm}^2$  sur le verre.

Les variations peuvent être exprimées en calculant le rapport des populations mesurées à 48 et 190 heures, d'une part, et 190 et 350 heures, d'autre part.

Les valeurs obtenues sont rassemblées dans le tableau 7.6. ci-dessus.

Entre 48 et 190 heures, la quantité d'E. coli fixés augmente dans tous les cas, quels que soient l'ensemencement initial et le type de support considéré.

Cette quantité est 11,6 fois plus importante pour le P.V.C. (avec  $10^2$  E. coli initiaux) et 16,2 et 9,5 fois plus importante respectivement pour le caoutchouc et le P.V.C. (avec  $10^4$  E. coli initiaux).

Pour des temps de contact plus longs de 350 heures, et par rapport à 190 heures, les rapports sont dans tous les cas inférieurs à 1.

Ceci met en évidence une diminution apparente des E. coli fixés, pouvant provenir d'un décrochage des E. coli et/ou d'une lyse ou d'une inactivation des E. coli fixés.

#### Influence des matériaux supports.

Un classement des matériaux supports, en fonction de la quantité d'E. coli fixés au cours des différents temps d'immersion, est établi dans le tableau 7.7.

Tableau 7.6.

Quantité d'E. coli fixés en fonction du temps de contact.

Ensemencement initial en <u>E. coli</u> par ml	Temps d'immersion comparés en heures	Matériaux				
		Bois	Caoutchouc	P.V.C.	Acier	Verre
10 <sup>2</sup>	$\frac{190}{48}$	4,4	3,8	11,6	2,7	2,4
	$\frac{350}{190}$	0,22	1,0	0,01	0,37	0,14
10 <sup>4</sup>	$\frac{190}{48}$	1,40	16,2	9,50	3,60	2,80
	$\frac{350}{190}$	0,64	0,10	0,08	0,03	0,55



Tableau 7.7.

Classement des matériaux en fonction des durées d'immersion.

Classement des supports suivant leur mouillabilité décroissante	Classement des supports suivant la quantité d' <u>E. coli</u> fixés par cm <sup>2</sup>							
	10 <sup>2</sup> <u>E. coli</u> initiaux par ml			10 <sup>4</sup> <u>E. coli</u> initiaux par ml				
	Durée d'immersion			Durée d'immersion				
	48 heures		190 heures	48 heures		190 heures		
Bois	P.V.C.	6,10	P.V.C.	70,7	P.V.C.	7,40	P.V.C.	70
Caoutchouc	Verre	0,53	Verre	1,25	Bois	4,60	Caoutchouc	21
P.V.C.	Acier	0,34	Acier	0,91	Acier	2,50	Acier	9,1
Acier	Bois	0,15	Bois	0,66	Verre	2,20	Bois	6,50
Verre	Caoutchouc	0,13	Caoutchouc	0,49	Caoutchouc	1,30	Verre	6,20

Les classements des matériaux supports suivant la quantité d'E. coli fixés, et le classement des supports suivant leur mouillabilité ne reflètent aucune analogie ; d'autre part, les quantités d'E. coli ne sont pas similaires et le classement diffère selon la quantité initiale en E. coli et selon les durées d'immersion.

Mais dans tous les cas, la quantité d'E. coli fixés est la plus importante sur le P.V.C. et atteint 70,7 E. coli par cm<sup>2</sup> dans le meilleur des cas après 190 heures de contact.

Le P.V.C. peut fixer jusqu'à 144 fois plus d'E. coli après 190 heures de contact par rapport au caoutchouc, matériau le moins apte, et ce pour un ensemencement initial de 10<sup>2</sup> E. coli par ml.

Cette différence est moins prononcée pour un ensemencement initial de 10<sup>4</sup> E. coli par ml, le P.V.C. fixant plus de 3 fois mieux E. coli que le caoutchouc et 11 fois plus que le verre, pour une durée d'immersion comparable de 190 heures.

Par affinité décroissante des E. coli aux différents matériaux, outre le P.V.C., l'ordre de classement est :

- . le verre,
- . l'acier,
- . le bois et
- . le caoutchouc

pour un ensemencement initial en E. coli de 10<sup>2</sup> par ml et quel que soit le temps de contact. Pour un ensemencement initial supérieur, cet ordre n'est pas identique et subit des modifications selon le temps d'immersion. Toutefois, les différences entre les quantités d'E. coli fixés entre ces quatre derniers matériaux sont moins marquées que pour le P.V.C., et oscillent entre 3 et 4 fois plus d'E. coli fixés.

### VII.2.2. Influence de la concentration en matières organiques du milieu.

Les résultats des essais de fixation des E. coli sur les différents supports, en fonction d'un apport de matières organiques biodégradables (20 et 200 mg/l de DBO<sub>5</sub>), sont reportés sous forme de graphes (figure 7.9).

Avec une eau contenant 200 mg/l de matières organiques biodégradables et un ensemencement identique voisin de  $1 \cdot 10^4$  E. coli par ml, un support bois fixe 276 E. coli par cm<sup>2</sup>, alors que le support acier n'en fixe que 1,60 par cm<sup>2</sup> dans les mêmes conditions.

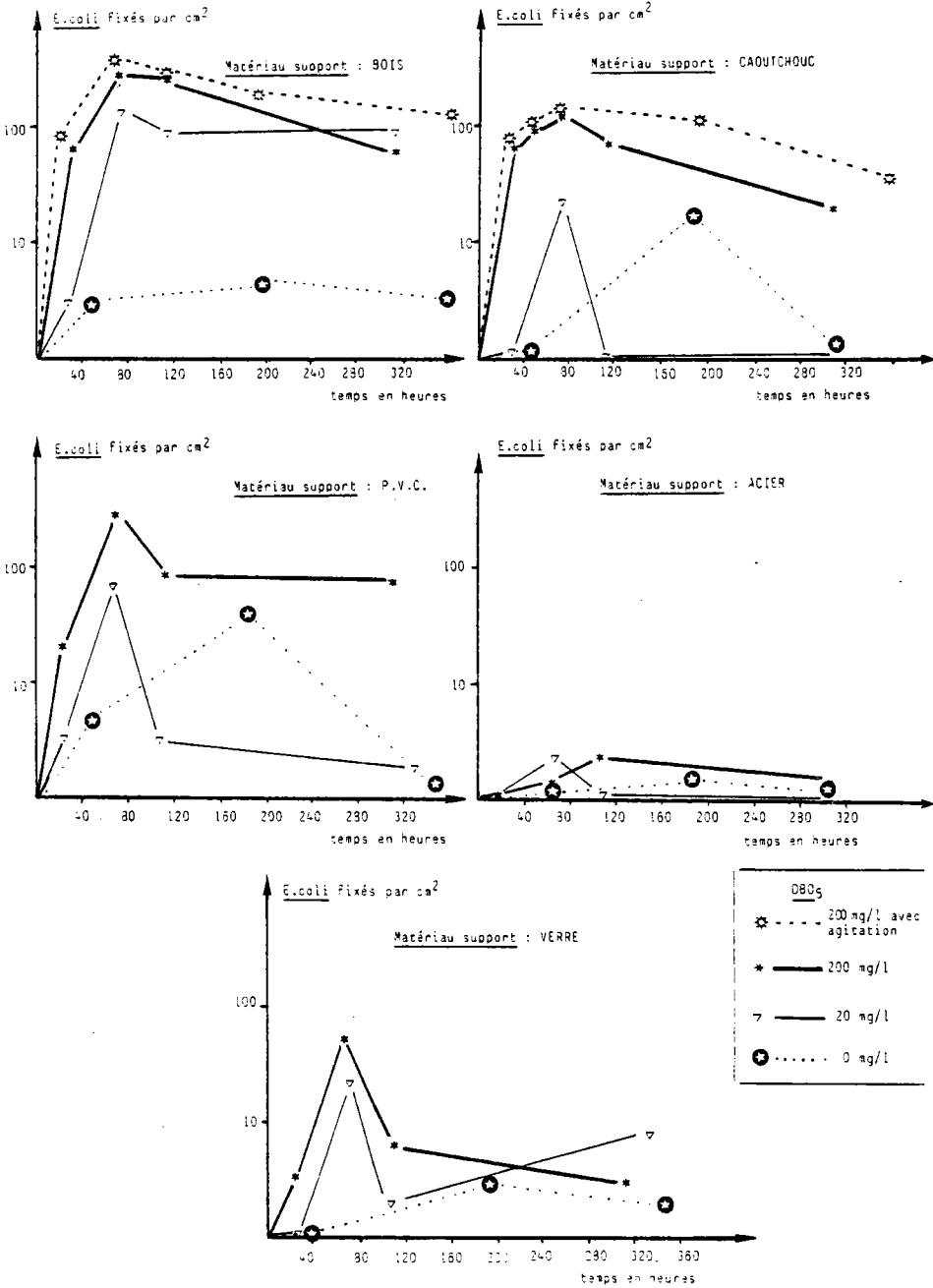
- Dans tous les cas, l'allure des courbes E. coli fixés est en forme de cloche avec un optimum vers 72 heures. L'augmentation est très rapide entre 0 heures et 24 heures, particulièrement pour le bois et le caoutchouc, et voisine de 3 E. coli/h/cm<sup>2</sup>.

La diminution est plus lente pour le bois et le caoutchouc, mais marque une rupture brutale pour le P.V.C. et le verre entre 80 et 120 heures.

- L'influence de l'agitation du milieu, testée pour les supports bois et caoutchouc, montre que la cinétique de fixation reste identique entre 0 heure et 72 heures, que le milieu soit non agité ou agité ; par contre, l'agitation du milieu ralentit la diminution apparente du nombre des E. coli fixés, comparativement à l'essai non agité. Après 320 heures de contact, pour le bois et le caoutchouc, respectivement, + 11 % et + 15 % de E. coli fixés sont retrouvés entre le milieu agité et non agité.
- La diminution de la concentration en matières organiques biodégradables (DBO<sub>5</sub> = 20 mg/l) entraîne, dans quelques cas, un retard à la colonisation du matériau, comparativement aux essais à 200 mg/l, notamment pour le caoutchouc et le verre. Ainsi, une quantité plus faible d'E. coli est fixée après 72 heures de contact. Le nombre des E. coli fixés sur bois, caoutchouc, P.V.C., verre, est respectivement 1,8 - 7 - 4 et 3,5 fois moins important.

Cependant l'allure générale des courbes reste le plus souvent identique, sauf dans le cas du caoutchouc et du P.V.C. où la diminution suivant le maximum de fixation (72 heures) est plus importante de 73 et 23 fois moins, respectivement.

INFLUENCE DE LA PRESENCE DE MATIERES ORGANIQUES BIODEGRADABLES SUR LA FIXATION DES *E.coli* SUR SUPPORTS ARTIFICIELS. Figure 7.8.



Le classement des matériaux supports en fonction de la quantité d'E. coli fixés au cours des différents temps d'immersion est établi dans le tableau 7.9. (voir page suivante).

Les différents matériaux ne permettent pas la fixation de quantités similaires en bactéries. Le tableau 7.9. montre que leur classification en fonction du degré de colonisation ne suit pas la classification basée sur l'indice de mouillabilité, et diffère selon la quantité de matières organiques ajoutée et selon le temps d'immersion.

### VII.2.3. Influence de la minéralisation.

Trois eaux de minéralisation différente, correspondant aux caractéristiques d'une eau douce, d'une eau dure bicarbonatée et d'une eau dure bicarbonique sulfatée, ont été testées. Les résultats des essais de fixation d'E. coli sur les différents supports, en fonction de la minéralisation, sont reportés dans le tableau 7.10 et sous forme de graphes (figures 7.11 et 7.12).

Avec une eau dure bicarbonatée et un ensemencement de  $1 \cdot 10^5$  E. coli par ml, le support bois a fixé 19 379 E. coli par  $\text{cm}^2$  après 48 heures d'immersion, alors que le support acier n'en a fixé que 31,9 par  $\text{cm}^2$ .

Mais dans tous les cas, l'allure des courbes d'E. coli fixés est en forme de cloche, avec le même optimum déjà noté précédemment vers 72 heures. L'augmentation est très rapide entre 0 et 24 heures, particulièrement pour le bois, le caoutchouc, le P.V.C. et le verre, et varie entre 2 et 200 E. coli/h/ $\text{cm}^2$ .

La diminution est plus lente pour le bois ; les quatre autres matériaux supports accusent une rupture plus marquée, qui se situe entre 80 et 150 heures.

L'allure générale des courbes reste le plus souvent identique pour les trois minéralisations d'eau testées, sauf pour l'acier, où l'optimum de colonisation des E. coli est nettement décalé pour une eau bicarbonatée calcique par rapport à l'eau douce et l'eau dure sulfatée.

Tableau 7.9.

Classement des matériaux immergés dans une eau contenant des  
matières organiques biodégradables (20 et 200 mg/l de DBO<sub>5</sub>).

Classement des supports suivant leur mouillabilité décroissante	Classement des matériaux suivant la quantité d' <u>E. coli</u> fixés par cm <sup>2</sup>							
	Quantité de matières organiques biodégradables							
	20 mg/l			200 mg/l				
	Durée d'immersion			Durée d'immersion				
	3 jours		5 jours	3 jours		5 jours		
Bois	Bois	154	Bois	96	P.V.C.	289	Bois	270
Caoutchouc	P.V.C.	70	P.V.C.	3,5	Bois	276	P.V.C.	80,3
P.V.C.	Verre	22	Verre	2,2	Caoutchouc	146	Caoutchouc	71,6
Acier	Caoutchouc	21	Caoutchouc	0,98	Verre	53	Verre	6,3
Verre	Acier	2	Acier	0,68	Acier	1,6	Acier	2,5

**TABLEAU 7.10 : INFLUENCE DE LA MINERALISATION SUR LA FIXATION DES *E.coli* SUR SUPPORTS ARTIFICIELS.**

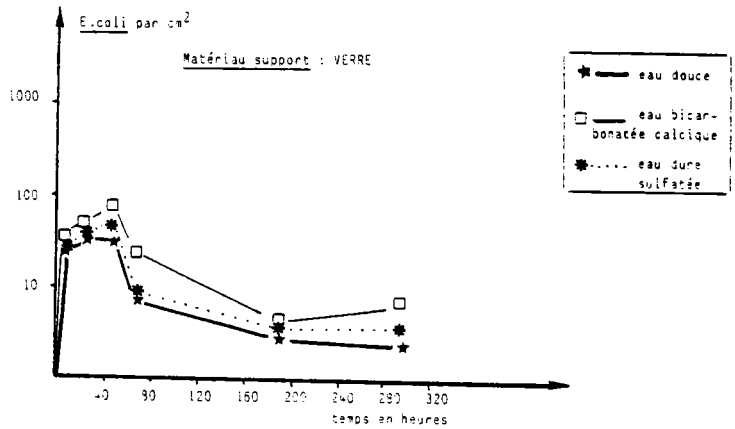
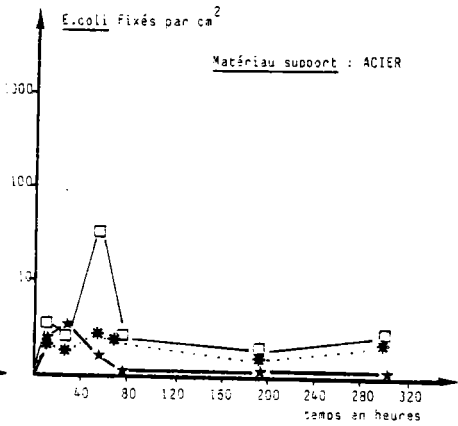
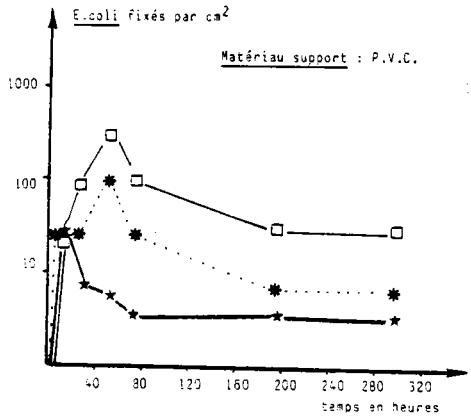
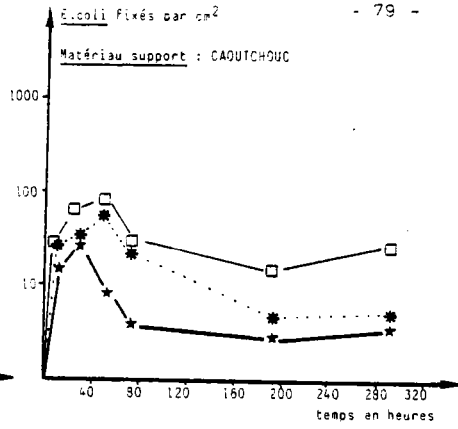
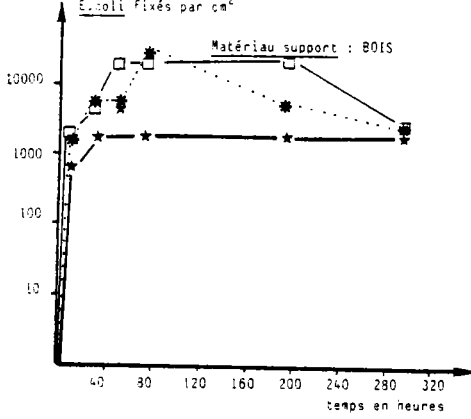
Résultats exprimés en nombre d'*E.coli* fixés par cm<sup>2</sup>.

Temps de contact en heures	Matériaux	Eau douce	Eau dure bicarbonatée	Eau dure bicarbonatée et sulfatée
9	Bois	697,67	2325,58	1937,98
	Caoutchouc	13,33	27,68	27,68
	P.V.C.	27,33	20,90	27,33
	Acier	2,50	3,42	2,50
	Verre	20,44	26,73	26,73
24	Bois	1937,98	4651,16	4651,16
	Caoutchouc	27,68	55,37	27,68
	P.V.C.	6,43	90,38	27,33
	Acier	3,42	2,50	1,90
	Verre	26,73	44,02	44,02
48	Bois	4651,16	19379,84	4651,16
	Caoutchouc	6,51	75,59	55,57
	P.V.C.	5,78	282,95	90,38
	Acier	1,92	31,89	2,50
	Verre	26,73	78,61	44,02
72	Bois	1937,98	19379,84	2325,58
	Caoutchouc	3,58	27,68	21,17
	P.V.C.	3,53	90,38	27,33
	Acier	0,91	2,50	2,50
	Verre	6,29	20,44	6,29
192	Bois	1937,98	19379,84	4651,16
	Caoutchouc	2,60	13,33	4,38
	P.V.C.	3,53	27,33	6,43
	Acier	0,91	1,90	1,90
	Verre	2,51	4,72	1,72
298	Bois	1937,98	2325,58	2325,58
	Caoutchouc	3,58	21,17	1,39
	P.V.C.	3,53	27,33	6,43
	Acier	0,91	2,50	2,50
	Verre	2,51	6,29	1,72

INFLUENCE DE LA MINÉRALISATION DE L'EAU SUR LA FIXATION DES E.coli SUR SUPPORTS ARTIFICIELS.

Figure 7.11.

E.coli fixés par cm<sup>2</sup>

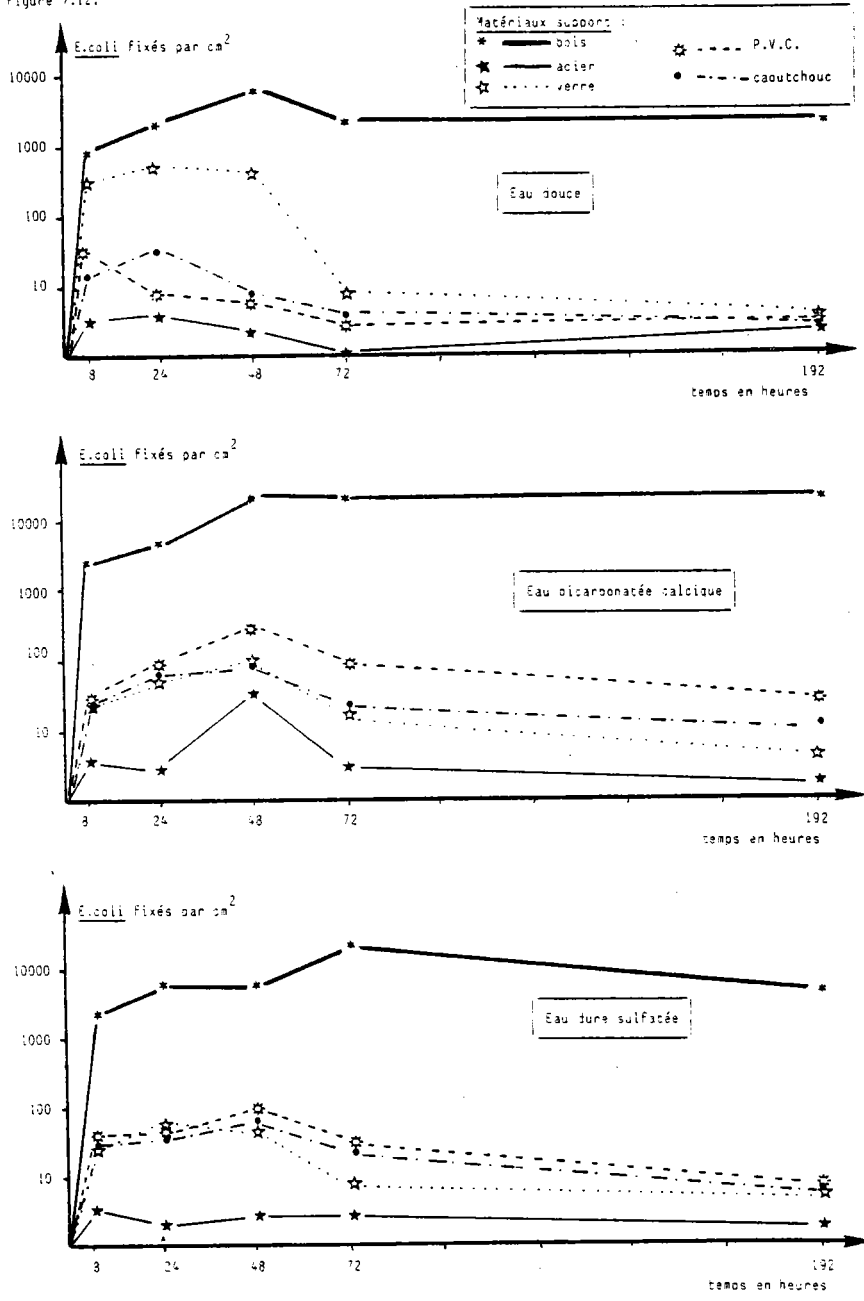


\* — eau douce  
 □ — eau bicarbonate calcique  
 \*... eau dure sulfatée



INFLUENCE DE LA MINERALISATION SUR LA FIXATION DES E.coli SUR SUPPORTS ARTIFICIELS IMMERGES EN MILIEU LIQUIDE

Figure 7.12.



Pour tous les matériaux, l'aptitude de colonisation des E. coli est plus importante avec une eau bicarbonatée calcique, puis viennent, par ordre décroissant, l'eau dure sulfatée et l'eau douce. Cette différence est très nette pour le P.V.C., le caoutchouc et l'acier : après 48 heures de contact, le P.V.C., dans une eau bicarbonatée calcique, fixe 48,9 fois plus d'E. coli par  $\text{cm}^2$  qu'une eau douce, et 3,5 fois plus d'E. coli par  $\text{cm}^2$  qu'une eau dure sulfatée.

Pour des délais d'immersion plus longs, la différence des trois types de minéralisations est moins importante, comme le montre l'aptitude à fixer ou à maintenir les E. coli, en particulier pour le verre, le bois et l'acier. Ainsi, après 288 heures d'immersion, le verre, immergé dans une eau douce, fixe 2,5 E. coli par  $\text{cm}^2$  ; dans l'eau dure bicarbonatée et dans l'eau dure bicarbonatée sulfatée, 4,7 E. coli par  $\text{cm}^2$ .

Par contre, pour le P.V.C. et le caoutchouc, les différences entre les trois types d'eaux subsistent avec une plus forte variation : dans une eau dure bicarbonatée, le caoutchouc fixe 4,2 fois plus d'E. coli par  $\text{cm}^2$  que dans une eau dure sulfatée, et 7,7 fois plus d'E. coli par  $\text{cm}^2$  que dans une eau douce.

L'allure des courbes (figure 7.12) permet de classer les matériaux pour les trois types d'eaux envisagés. Le chevauchement des courbes montre que la classification des matériaux n'est pas uniforme tout au long de la période d'immersion. Pour les trois types d'eaux, le bois marque une nette supériorité de fixation sur les autres matériaux, et ce tout au long des essais.

Les particularités entre les différents types de matériaux sont très nettes pendant les premières heures d'immersion, et ce jusqu'à 72 heures de contact. Cependant, en fin d'immersion, l'allure des courbes est voisine, en particulier pour l'eau douce et l'eau dure sulfatée, plus variable dans le cas d'une eau bicarbonatée calcique. Après 192 heures d'immersion dans une eau bicarbonatée calcique, le nombre d'E. coli fixés par  $\text{cm}^2$  est deux fois plus important pour le P.V.C. que pour le caoutchouc, lui-même 4 fois plus important que pour le verre et 15 fois plus élevé que pour l'acier.

Tableau 7.13.

Classement des matériaux dans des eaux de minéralisations différentes.

Classement des matériaux suivant leur mouillabilité décroissante	Classement des matériaux supports suivant la quantité d'E. coli fixés par cm <sup>2</sup>					
	Eau douce		Eau bicarbonatée calcique		Eau dure sulfatée	
	Durée d'immersion		Durée d'immersion		Durée d'immersion	
	24 heures	72 heures	24 heures	72 heures	24 heures	72 heures
Bois	Bois 1937,9	Bois 1937,9	Bois 4651,1	Bois 19379,8	Bois 4651,1	Bois 2325,5
Caoutchouc	Caoutchouc 27,6	Verre 6,29	PVC 55,3	PVC 80,3	Verre 44,0	PVC 27,3
P.V.C.	Verre 26,7	Caoutchouc 3,5	Caoutchouc 80,3	Caoutchouc 27,6	Caoutchouc 27,6	Caoutchouc 21,1
Acier	PVC 6,4	PVC 3,5	Verre 44,0	Verre 20,4	PVC 27,3	Verre 6,2
Verre	Acier 3,4	Acier 0,9	Acier 2,5	Acier 2,5	Acier 1,8	Acier 2,5

#### VII.2.4. Influence du pH des eaux.

Trois eaux à différents pH, respectivement de 5, 7 et 8.5, ont été testées. Les résultats de fixation de E. coli sur les différents matériaux supports, en fonction du pH, sont reportés dans le tableau 7.14 et les figures 7.15 et 7.16.

Avec une eau à pH 7 et un ensemencement de  $1,5 \times 10^5$  E. coli par ml, le support bois a fixé 1 937 E. coli par  $\text{cm}^2$  après 48 heures d'immersion, et le support acier n'a fixé que 69,1 E. coli par  $\text{cm}^2$ .

L'allure des courbes E. coli fixés présente une forme ascendante rapide, suivie d'un plateau. L'optimum est noté, comme dans les expériences précédentes, vers 72 heures. L'augmentation est très rapide entre 0 et 24 heures, particulièrement pour le bois et le P.V.C., et varie entre 20 et 11 E. coli/h/ $\text{cm}^2$ .

Mais dans une eau à pH 8.5, le caoutchouc, après 48 heures d'immersion, montre un maintien ou une fixation plus élevée d'E. coli par  $\text{cm}^2$ , 11 fois plus importante par rapport à une immersion de 24 heures. La colonisation est encore plus tardive, toujours à ce pH de 8.5., pour l'acier et ne s'établit qu'après 72 heures d'immersion.

Pour tous les matériaux supports testés, l'aptitude de colonisation des E. coli est plus importante avec une eau à pH 7, puis viennent, par ordre décroissant, l'eau à pH 5 et l'eau à pH 8,5. Cette différence est très marquée pour l'acier et le verre dès 48 heures de contact : l'acier, dans une eau à pH 7, fixe 67,2 fois plus d'E. coli par  $\text{cm}^2$  que dans une eau à pH 8.5, et 2,6 fois plus d'E. coli par  $\text{cm}^2$  que dans une eau à pH 5.

Pour des délais d'immersion plus longs, la différence entre les trois valeurs de pH s'estompe quelque peu, comme le montre l'aptitude à fixer ou à maintenir E. coli, en particulier pour le P.V.C., le caoutchouc et le bois. Ainsi, après 360 heures d'immersion, le P.V.C. immergé dans une eau à pH 7 fixe 4,8 fois plus d'E. coli par  $\text{cm}^2$  que dans une eau à pH 8,5 et 1,3 fois plus que dans une eau à pH 5.

Par contre, pour l'acier et le verre, les différences entre les trois eaux testées subsistent avec une plus grande variation au cours d'une durée prolongée d'immersion. Dans une eau à pH 7,

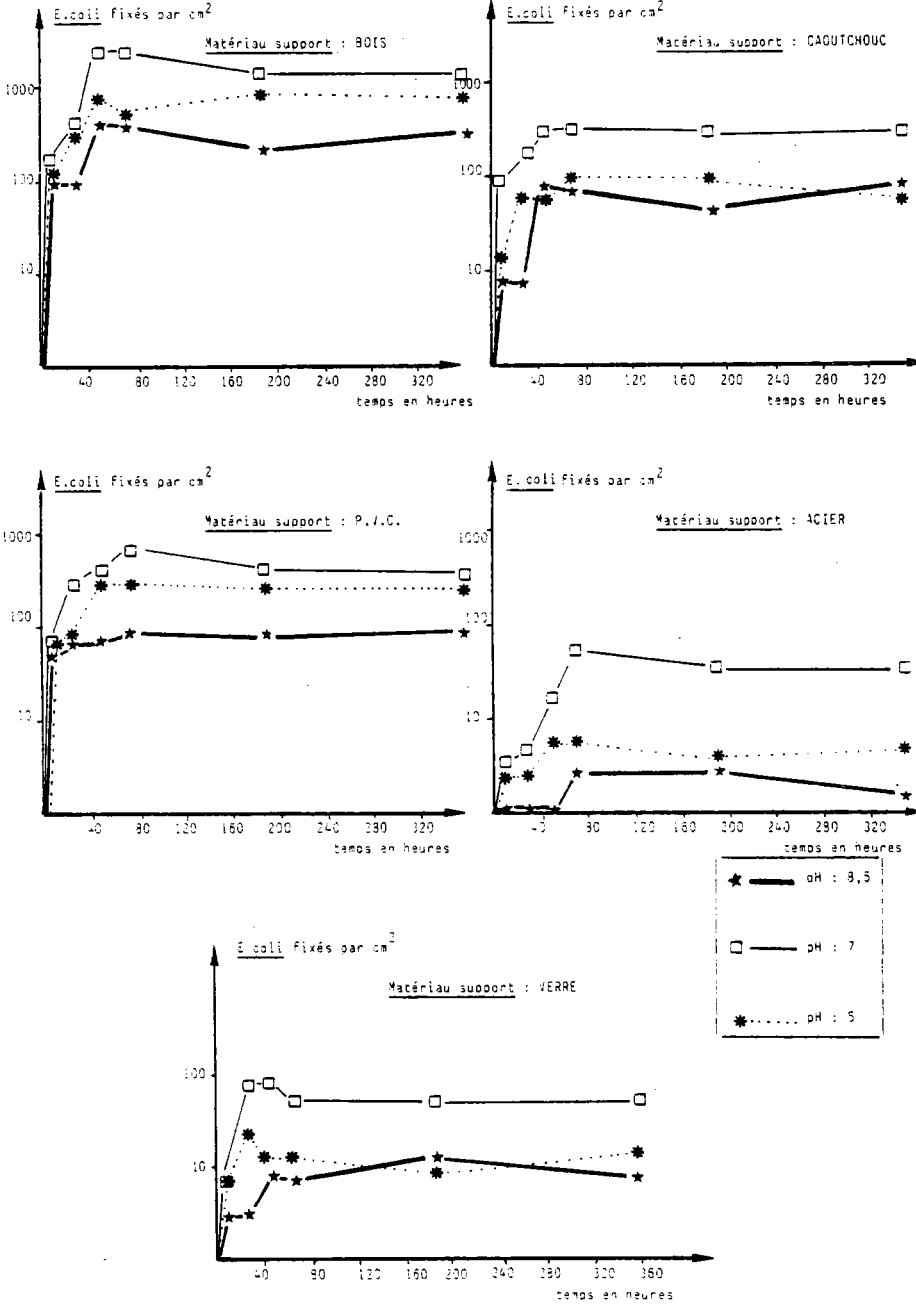
TABLEAU 7.14.: INFLUENCE DU pH SUR LA FIXATION DES E.coli SUR SUPPORTS ARTIFICIELS

Résultats exprimés en nombre d'E.coli par cm<sup>2</sup>.

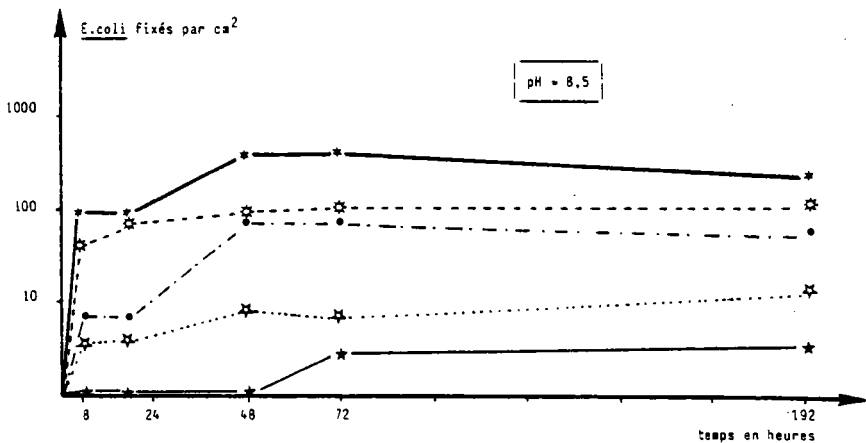
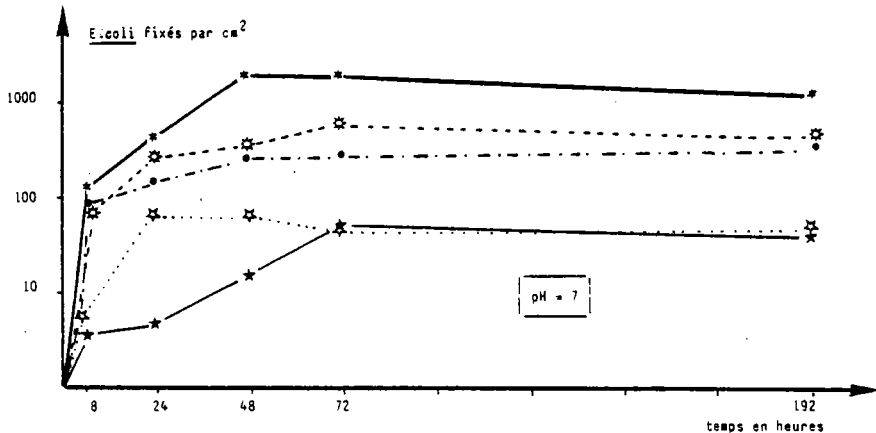
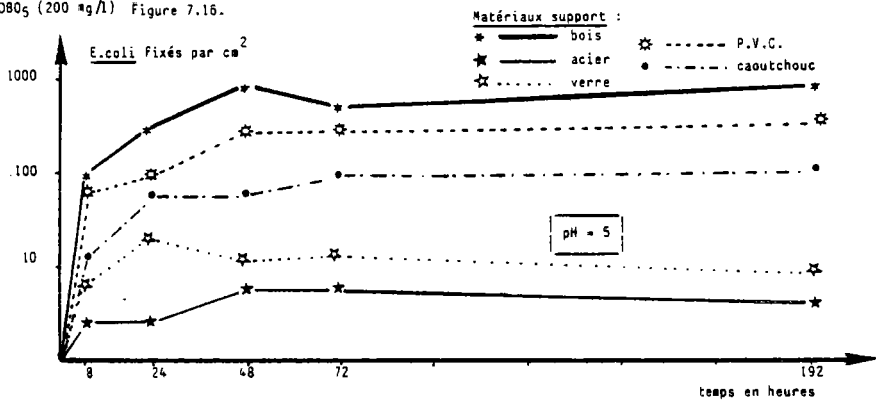
Temps de contact en heures	Matériaux	pH 5	pH 7	pH 8,5
8	Bois	96,89	155,00	96,89
	Caoutchouc	13	81,43	6,50
	P.V.C.	70,70	70,70	45,00
	Acier	2,50	3,70	0,10
	Verre	6,39	6,29	3,46
24	Bois	310,07	465,11	96,39
	Caoutchouc	55,40	162,86	6,50
	P.V.C.	90,38	282,95	70,70
	Acier	2,50	4,55	0,91
	Verre	20,44	59,18	3,46
48	Bois	697,67	1937,98	341,08
	Caoutchouc	55,40	286,64	71,65
	P.V.C.	257,23	385,85	70,70
	Acier	5,69	14,80	0,22
	Verre	12,57	59,18	7,36
72	Bois	465,11	1937,97	341,08
	Caoutchouc	91,40	286,64	71,65
	P.V.C.	257,23	578,77	90,38
	Acier	5,69	50,11	2,50
	Verre	12,57	45,72	6,29
192	Bois	697,67	1162,79	193,79
	Caoutchouc	91,40	286,64	45,60
	P.V.C.	257,23	385,85	90,38
	Acier	3,41	38,72	2,50
	Verre	6,29	45,72	12,57
360	Bois	697,65	1162,79	297,67
	Caoutchouc	55,40	286,64	55,60
	P.V.C.	239,38	385,85	90,38
	Acier	4,55	38,72	1,45
	Verre	12,57	45,72	6,92

INFLUENCE DU pH SUR LA FIXATION DES *E. coli* SUR SUPPORTS ARTIFICIELS.

Figure 7.15.



INFLUENCE DU pH SUR LA FIXATION DES *E.coli* SUR SUPPORTS ARTIFICIELS INMERSÉS EN MILIEU SYNTHÉTIQUE  
 DBO<sub>5</sub> (200 µg/l) Figure 7.16.



l'acier fixe 8,5 fois plus d'E. coli par  $\text{cm}^2$  que dans une eau à pH 5, et 26,5 fois plus dans une eau à pH 8,5.

L'allure des courbes (figure 7.16) permet de classer, pour les trois types d'eaux à pH différents testés, les matériaux supports. La classification est quasiment uniforme tout au long de la durée d'immersion ; seuls sont notés quelques chevauchements pour les eaux à pH 7 et 8,5. Pour les trois types d'eaux, le bois marque une très nette supériorité de fixation par rapport aux autres matériaux.

Les particularités entre les différents types de matériaux supports sont toujours très nettes, en particulier dès 24 heures d'immersion, et se conservent tout au long de la durée d'immersion, notamment pour l'eau à pH 5.

Après 48 heures d'immersion dans une eau à pH 5, le nombre d'E. coli fixés par  $\text{cm}^2$  est 4,6 fois plus important pour le P.V.C. que pour le caoutchouc, lui-même 20,4 fois plus élevé que le verre et 45 fois plus élevé que l'acier. Après 192 heures d'immersion, les proportions d'E. coli fixés ou maintenus par  $\text{cm}^2$  sont respectivement 3,1 fois plus importantes pour le P.V.C. que pour le caoutchouc, lui-même 40,8 fois plus important que le verre et 75,4 fois plus élevé que l'acier.



Tableau 7.17.

Classement des matériaux immergés dans  
des eaux à pH 5 - 7 et 8,5.

Classement des matériaux par ordre de mouillabilité décroissante	Classement des matériaux supports suivant la quantité d' <u>E. coli</u> fixés par cm <sup>2</sup>					
	Eau à pH 5		Eau à pH 7		Eau à pH 8,5	
	Durée d'immersion		Durée d'immersion		Durée d'immersion	
	24 heures	72 heures	24 heures	72 heures	24 heures	72 heures
	Bois	Bois 310,0	Bois 465,1	Bois 465,1	Bois 1937,0	Bois 96,8
Caoutchouc	P.V.C. 80,3	P.V.C. 257,2	P.V.C. 282,9	P.V.C. 578,7	P.V.C. 70,7	P.V.C. 80,3
P.V.C.	Caoutchouc 55,3	Caoutchouc 81,4	Caoutchouc 162,8	Caoutchouc 286,6	Caoutchouc 6,5	Caoutchouc 71,6
Acier	Verre 20,4	Verre 12,5	Verre 69,1	Acier 50,1	Verre 3,46	Verre 6,29
Verre	Acier 2,5	Acier 5,6	Acier 4,5	Verre 45,7	Acier 0,91	Acier 2,50

#### VII.2.5. Influence de la température.

L'influence de la température sur la cinétique de fixation des E. coli sur les différents matériaux supports a été cherchée à 20° et 10° C. Les résultats sont représentés sous forme de graphe figure 7.18.

Dans le premier cas, cette température est maintenue à 20° C pendant trois jours, durée correspondant au maximum de fixation constaté dans les essais antérieurs, puis l'ensemble a été refroidi et maintenu à 15° C.

Dans le deuxième cas, la température de 10° C a été maintenue jusqu'à obtention d'un optimum de fixation, puis l'ensemble a subi un réchauffement et maintenu à 15° C.

Les résultats de fixation des E. coli sur les différents matériaux supports, dès les premiers jours d'immersion, montrent que la fixation des E. coli est plus élevée à une température de 20° C qu'à une température de 10° C. Avec une eau à 10° C, le support bois, après 48 heures d'immersion, fixe 697,6 E. coli par cm<sup>2</sup>, soit 2,7 fois moins que dans une eau à 20° C.

Cette différence entre les deux températures d'incubation est encore plus sensible avec le support acier : celui-ci ne fixe que 4,55 E. coli par cm<sup>2</sup> à 10° C, alors qu'à 20° C, le nombre d'E. coli fixés atteint 14,8 par cm<sup>2</sup>.

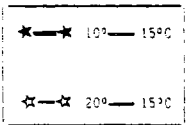
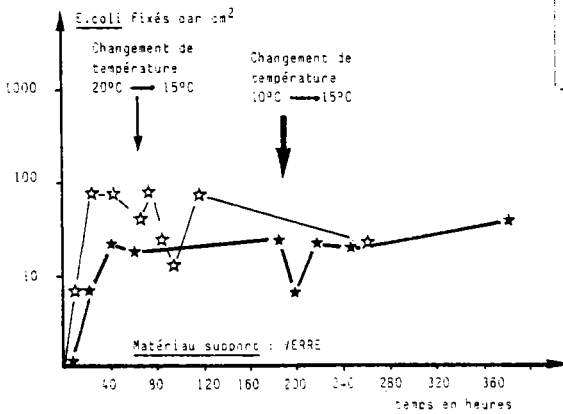
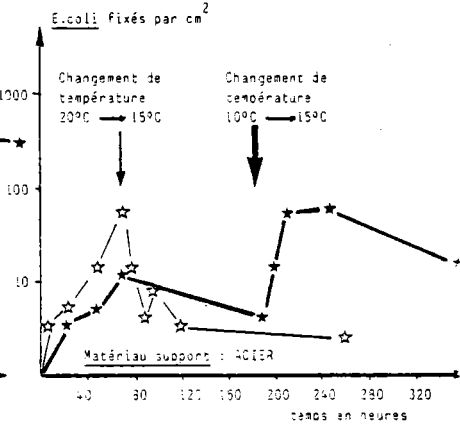
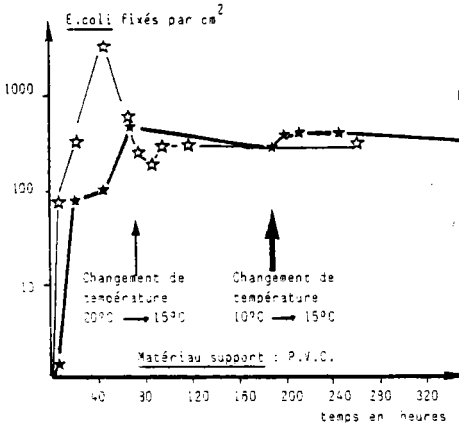
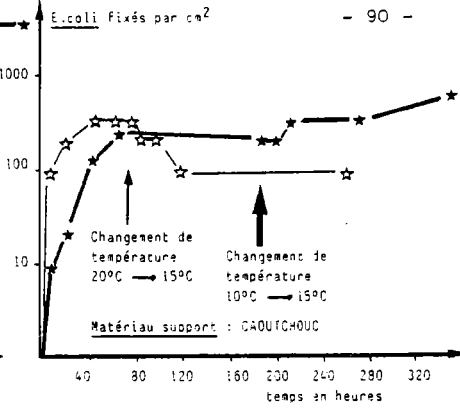
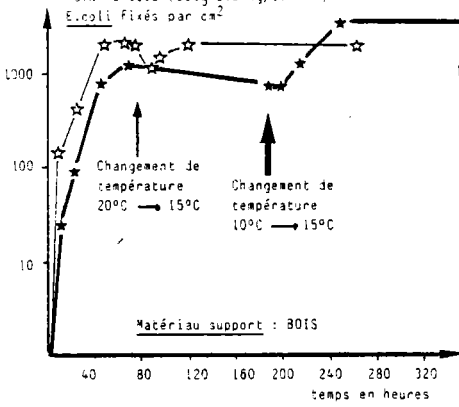
Pour tous les matériaux supports testés, la fixation est moins importante à 10° qu'à 20° C ; néanmoins l'allure des courbes ne présente pas de parallélisme rigoureux. Cette faiblesse de colonisation n'est pas constante durant toutes les périodes d'immersion comparées. Cet écart de colonisation joue plus particulièrement sur le verre, le P.V.C. et l'acier et, à un degré moindre, sur le bois et le caoutchouc.

A 10° C, le maximum d'E. coli fixés par cm<sup>2</sup> est également atteint après trois jours d'immersion.

#### - Influence d'un refroidissement de l'eau sur la fixation aux différents matériaux supports.

Le passage d'une température de 20° à 15° C se traduit, dans le jour qui suit, par une réduction notable du nombre d'E. coli fixés sur les matériaux, cette réduction pouvant provenir d'un décrochage des bactéries initialement fixées ou/et d'une inhibition de leur multiplication au sein même du support.

INFLUENCE DE LA TEMPERATURE SUR LA FIXATION DES *E. coli* SUR SUPPORTS ARTIFICIELS IMMERGES EN MILIEU SYNTHETIQUE (DBO<sub>5</sub> 200 mg/l). Figure 7.18



Le nombre d'E. coli fixés peut être de 6 à 2 fois moins important, comparativement aux valeurs obtenues à 20° C., pour le P.V.C. et l'acier ; par contre, pour le bois, le caoutchouc, le verre, cette réduction n'est pas évidente, et n'intervient que sur une durée d'une journée.

Le même niveau en E. coli fixés par cm<sup>2</sup> avant refroidissement est atteint pour le bois et le verre ; par contre, pour l'acier, le verre et le caoutchouc, la répercussion de la diminution des E. coli fixés par cm<sup>2</sup> après refroidissement du milieu d'immersion se manifeste sur une plus longue durée.

- Influence d'un réchauffement de l'eau sur la fixation des E. coli aux différents supports.

Le passage de 10 à 15° C de la température de l'eau d'immersion se manifeste très différemment suivant les matériaux.

- . Pour le bois et l'acier, ce réchauffement se traduit par une brusque augmentation du nombre d'E. coli fixés par cm<sup>2</sup>, suivie d'un palier plus ou moins stationnaire ; ainsi le bois, 48 heures après ce changement de température, voit le nombre d'E. coli fixés par cm<sup>2</sup> passer de 697,6 à 3 488,4 par cm<sup>2</sup>, soit un gain de 58 E. coli par heure.
- . Pour le verre, légère diminution pour atteindre le même niveau observé avant ce réchauffement.
- . Pour le caoutchouc et le P.V.C., la légère augmentation du nombre d'E. coli semble très minime ; il est hasardeux de l'imputer au seul fait du changement de température.

Bien que la durée des essais soit sans doute insuffisante pour aboutir à une concentration d'E. coli fixés à l'état d'équilibre à 15° C, il est important de remarquer que quel que soit le support, le nombre d'E. coli fixés par cm<sup>2</sup> est plus important lorsque la température de base de 10° C a subi un léger échauffement de 5° C, comparativement à une température de base de 20° C ayant subi un léger refroidissement de 5° C.

VII.3. Application de la mesure électrochimique au dénombrement des *E. coli* fixés à des matériaux supports immergés dans des milieux hydriques. Essais in situ.

Les différents supports : bois, caoutchouc, P.V.C., acier, verre, sont immergés dans quatre eaux de caractéristiques très différentes, tant sur le plan de leur composition chimique que sur le plan de leur degré de contamination.

Ces quatre eaux sont respectivement : une eau d'entrée de station urbaine, sa sortie, et deux eaux superficielles (Meurthe et Moselle).

Le degré de peuplement en *E. coli* libres dans la phase aqueuse varie dans un rapport de 260 entre l'eau à l'entrée de la station et l'eau de Moselle ; le nombre d'*E. coli* par ml atteint  $12 \times 10^3$  contre 43 pour l'eau de Moselle.

Comparativement, le dénombrement des *E. coli* fixés sur bois après 192 heures d'immersion atteint 155 038 *E. coli* par  $\text{cm}^2$ , soit 179 fois plus que pour le bois immergé dans l'eau de Moselle pendant la même durée.

Les différentes valeurs relevées en *E. coli* fixés et en A.T.P. sur les matériaux supports en fonction du temps d'immersion dans les quatre types d'eaux, sont regroupées sous forme de tableau 7.19 et de figures 7.20 et 7.21.

L'allure des courbes montre que les matériaux peuvent être classés suivant leur aptitude à fixer les *E. coli* : des différences très nettes apparaissent entre certains matériaux supports comme le bois et l'acier. Après 192 heures d'immersion dans l'eau de Moselle le bois fixe 357 fois plus d'*E. coli* par  $\text{cm}^2$  que l'acier, avec respectivement 891,4 *E. coli* fixés par  $\text{cm}^2$  sur le bois contre 2,5 seulement par  $\text{cm}^2$  sur l'acier.

L'allure générale des courbes montre une colonisation rapide des matériaux supports dès les trois premiers jours de contact avec le milieu hydrique, suivie par une phase stationnaire, avec des cas particuliers comme celui des matériaux supports immergés en sortie de station d'épuration, où la phase stationnaire est moins nette.

TABLEAU 7.19 : RESULTATS DES QUANTITES E.coli FIXES ET D'ATP FIXES SUR DIFFERENTS SUPPORTS IMMERGES IN SITU.

B O I S

Durée d'immersion en heures \ Déterminations	E.coli par cm <sup>2</sup>				ATP 10 <sup>-5</sup> µg par cm <sup>2</sup>			
	Entrée station épuration	Sortie station épuration	Moselle	Meurthe	Entrée station épuration	Sortie station épuration	Moselle	Meurthe
8	19 379,8				620			
24	38 759,6	3 488	290,7	465,1	7 360	48,0	5,8	93,0
48	58 139,5	1 152,7	465,1	465,1	5 038	930	19,7	263
72	116 279,0	1 937,9	697,6	1 162,8	8 140	65,0	23,0	348
192	155 038,7	19 379,8	891,4	3 100,8	13 180	1 042	143	4 651
360			1 744,1	5 813,9			174	5 038
720			2 558,1	4 651,1			182	4 651
1320			1 472,8	3 100			180	5 456

C A O U T C H O U C

Durée d'immersion en heures \ Déterminations	E.coli par cm <sup>2</sup>				ATP 10 <sup>-5</sup> µg par cm <sup>2</sup>			
	Entrée station épuration	Sortie station épuration	Moselle	Meurthe	Entrée station épuration	Sortie station épuration	Moselle	Meurthe
8	162,8				27			
24	586,3	55,3	22,8	35,8	156	24,0	4,2	17,2
48	586,3	2,2	35,8	71,6	404	80,0	11,7	133,5
72	6 514,6	1,3	45,6	130,3	2 896	35,0	19,2	192,0
192	1 628,6	81,4	45,6	71,6	1 600	40,0	26,4	213,0
360			55,3	71,6			35,8	293,0
720			45,6	76,7			34,2	240,0
1320			55,3	76,7			42,6	315,0

TABLEAU 7.19 suite 1 :

P. V. C.

Durée d'immersion en heures	E.coli par cm <sup>2</sup>				ATP 10 <sup>-5</sup> µg par cm <sup>2</sup>			
	Entrée station épuration	Sortie station épuration	Moselle	Meurthe	Entrée station épuration	Sortie station épuration	Moselle	Meurthe
8	1 807				179			
24	1 286	282,9	12,8	22,5	270	57	1,6	5,1
48	6 430,8	54,6	22,5	45,0	717	154	2,9	73,9
72	128 617,3	3,53	35,6	80,4	3 150	33	7,4	154
192	128 617,3	70,7	45,0	90,0	4 530	265	1,3	128,6
360			54,6	128,6			16,4	196,1
720			70,7	70,7			15,1	154
1320			45,0	45,0			14,4	164

A C I E R

Durée d'immersion en heures	E.coli par cm <sup>2</sup>				ATP 10 <sup>-5</sup> µg par cm <sup>2</sup>			
	Entrée station épuration	Sortie station épuration	Moselle	Meurthe	Entrée station épuration	Sortie station épuration	Moselle	Meurthe
8	4,5				18			
24	14,8	0,91	0,91	1,35	9,1	2,4	0,20	2,7
48	38,7	4,55	4,55	1,82	9,1	3,4	0,68	4,3
72	182,2	4,55	4,55	4,55	88,8	19,1	2,05	21,2
192	91,1	1,6	2,50	27,33	102	5,6	2,96	25,1
360			3,41	27,33			3,19	22,7
720			3,87	34,16			2,96	38,7
1320			3,87	15,95			2,5	43,3

TABLEAU 7.19 suite 2 :

V E R R È

Durée d'immersion en heures	E.coli par ca <sup>2</sup>				ATP 10 <sup>-5</sup> µg par ca <sup>2</sup>			
	Entrée station épuration	Sortie station épuration	Moselle	Meurthe	Entrée station épuration	Sortie station épuration	Moselle	Meurthe
8	53,4				8,8			
24	251,5	1,25	1,88	12,58	84,9	3,9	0,63	7,5
48	1 572,3	4,7	12,5	12,58	660	11,3	1,57	15,4
72	47 169,81	1,25	20,4	7,86	503	13,0	3,77	40,8
192	18 867,9	3,46	20,4	12,58	303	4,7	7,8	53,5
360			14,15	22,01			9,2	78,1
720			20,44	26,72			10,7	97,5
1320			12,6	34,5			11,0	182

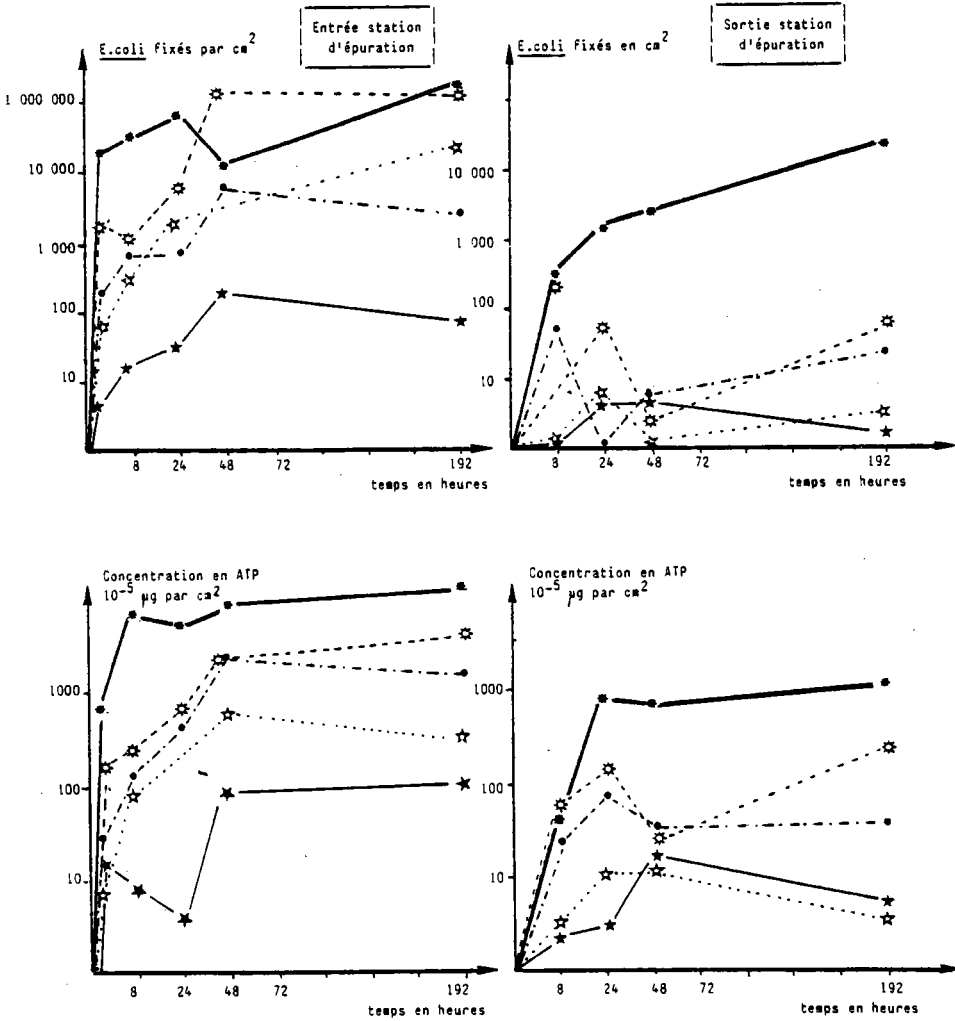


COLONISATION EN E.coli ET BIONASSE TOTALE SUR DIFFERENTS SUPPORTS ARTIFICIELS INMERSÉS EN STATION D'ÉPURATION.

Figure 7.20.

Matériaux supports :

- — bois
- ★ — acier
- ☆ ..... verre
- ⊛ - - - P.V.C.
- - - - caoutchouc

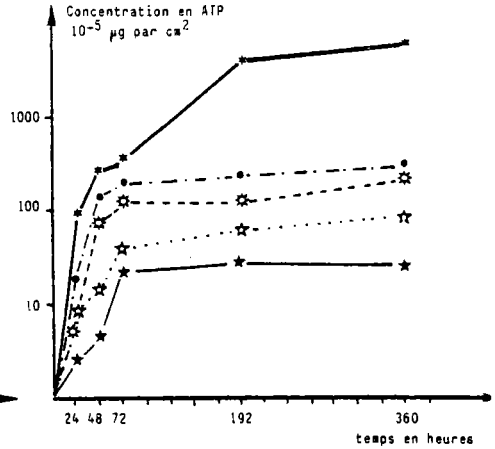
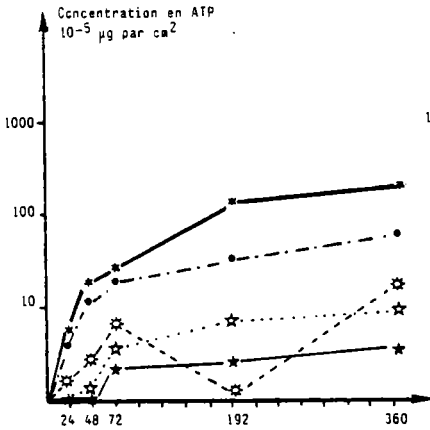
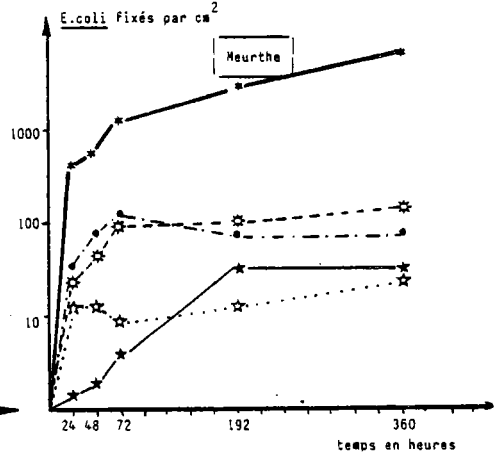
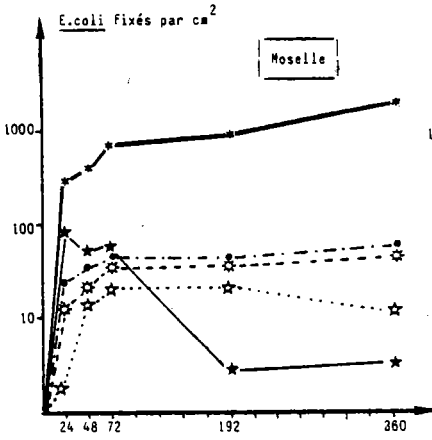


COLONISATION EN *E.coli* ET BIOMASSE TOTALE SUR DIFFERENTS SUPPORTS ARTIFICIELS IMMERGES EN EAUX SUPERFICIELLES

Figure 7.21.

Matériaux supports :

- \* — bois
- \* — acier
- \* ... verre
- \* - - - P.V.C.
- - - - caoutchouc



Les variations entre les différents matériaux sont plus ou moins accentuées suivant les durées d'immersion : ainsi, après 192 heures d'immersion à l'entrée d'une station d'épuration, le bois fixe 155 038,7 E. coli par cm<sup>2</sup>, alors que l'acier n'en fixe que 91,1. Un classement des matériaux supports en fonction de la quantité d'E. coli fixés au cours des différentes périodes d'immersion est fourni dans le tableau 7.22.

Les classements des matériaux supports suivant les quantités d'E. coli fixés et le classement des supports suivant leur mouillabilité ne reflètent aucune analogie. D'autre part, les quantités d'E. coli fixés ne sont pas similaires, et le classement des matériaux diffère légèrement suivant la nature du milieu d'immersion.

Pour les quatre types d'eaux, c'est sur le bois que la quantité d'E. coli fixés est la plus importante.

Un classement des quatre eaux d'immersion, en fonction des quantités d'E. coli fixés pour une même durée d'immersion, peut être fait pour les matériaux supports testés. Ainsi, après 192 heures, le classement est donné dans le tableau 7.23.

L'aptitude à la plus forte colonisation des différents supports se manifeste toujours en entrée de station d'épuration. Le classement pour les trois autres types d'eaux n'est pas toujours analogue, et varie suivant les supports considérés.

La quantité d'E. coli fixés par cm<sup>2</sup> sur le bois, à l'entrée de la station d'épuration, est de 155 038 E. coli par cm<sup>2</sup>, quantité 8, 50 et 173,9 fois supérieure par rapport, respectivement à la sortie de la station d'épuration, à l'eau de la Meurthe et à l'eau de la Moselle.

Tableau 7.22.

Classement des matériaux immergés in situ dans quatre types d'eaux, en fonction des durées d'immersion.

Classement des matériaux par ordre de mouillabilité décroissante	Classement des matériaux supports suivant la quantité d' <u>E. coli</u> fixés par cm <sup>2</sup>							
	Entrée station d'épuration		Sortie station d'épuration		Meurthe		Moselle	
	Durée d'immersion		Durée d'immersion		Durée d'immersion		Durée d'immersion	
	24 heures	192 heures	24 heures	192 heures	24 heures	192 heures	24 heures	192 heures
Bois	Bois 38 759,6	Bois 155 038,7	Bois 3 488	Bois 19 379	Bois 465,1	Bois 3 100,8	Bois 290,7	Bois 891,4
Caoutchouc	P.V.C. 1 286,1	P.V.C. 128 617,3	P.V.C. 282,9	Caoutchouc 81,4	Caoutchouc 35,8	P.V.C. 90,0	Caoutchouc 22,8	Caoutchouc 45,6
P.V.C.	Caoutchouc (586,3)	Verre 18 867,9	Caoutchouc 55,3	P.V.C. 70,4	P.V.C. 22,8	Caoutchouc 71,6	P.V.C. 12,8	P.V.C. 45,0
Acier	Verre 251,5	Caoutchouc 1 628,6	Verre 1,2	Verre 3,4	Verre 12,5	Acier 27,3	Verre 1,8	Verre 20,4
Verre	Acier 2,4	Acier 91,1	Acier 0,9	Acier 1,6	Acier 1,3	Verre 12,5	Acier 0,9	Acier 2,5

Tableau 7.23.

Classement des eaux en fonction de la quantité  
d'E.coli fixés par cm<sup>2</sup> après une immersion de 192 heures  
sur les différents supports testés.

Bois	Caoutchouc	P.V.C.	Acier	Verre
Entrée station 155 038,7	Entrée station 1 628,6	Entrée station 128 617,3	Entrée station 91,1	Entrée station 18 867,9
Sortie station 19 379,8	Sortie station 81,4	Meurthe 90,0	Meurthe 27,3	Moselle 20,4
Meurthe 3 100,8	Meurthe 71,6	Sortie station 70,7	Moselle 2,5	Meurthe 12,5
Moselle 891,4	Moselle 45,6	Moselle 45,0	Sortie station 1,6	Sortie station 3,46

- Corrélation entre le nombre d'E. coli fixés par  $\text{cm}^2$  et la quantité d'A.T.P. fixée par  $\text{cm}^2$ .

La comparaison des mesures d'E. coli fixés par  $\text{cm}^2$  et de la quantité d'A.T.P. fixée par  $\text{cm}^2$  sur les différents matériaux supports est effectuée à chaque prélèvement.

L'analyse de corrélations susceptibles d'exister entre ces deux variables peut être faite :

- d'une part, en fonction du type de matériau support considéré, indépendamment du lieu d'immersion,
- d'autre part, en fonction des quatre types d'eaux d'immersion envisagés, quel que soit le type de matériau support considéré.

Elle donne lieu aux représentations graphiques reportées aux figures 7.24 et 7.25.

L'observation graphique des nuages de points obtenus montre que la dispersion des points suit une direction rectiligne.

L'analyse des corrélations linéaires obtenues entre le nombre d'E. coli fixés par  $\text{cm}^2$  et la quantité d'A.T.P. par  $\text{cm}^2$ , en tenant compte, dans un premier cas, de la nature du matériau support quel que soit le lieu de prélèvement et, dans un second cas, du type d'eau d'immersion quelle que soit la nature du matériau, est reproduite dans le tableau 7.26.

Une corrélation linéaire existe dans tous les cas examinés. Suivant les différents matériaux, elle est variable ; il existe une plus forte corrélation entre le nombre d'E. coli fixés par  $\text{cm}^2$  et la quantité d'A.T.P. fixée par  $\text{cm}^2$  pour l'acier et le P.V.C. ; par contre, elle est plus faible pour le bois et le caoutchouc.

Si l'on considère les quatre types d'eaux d'immersion, il existe une corrélation plus intense dans les eaux de rivières Meurthe et Moselle que dans les eaux usées.



Figure 7.24 : E.coli Fixés en fonction d'ATP Fixés sur les différents supports immergés dans les milieux hydriques.

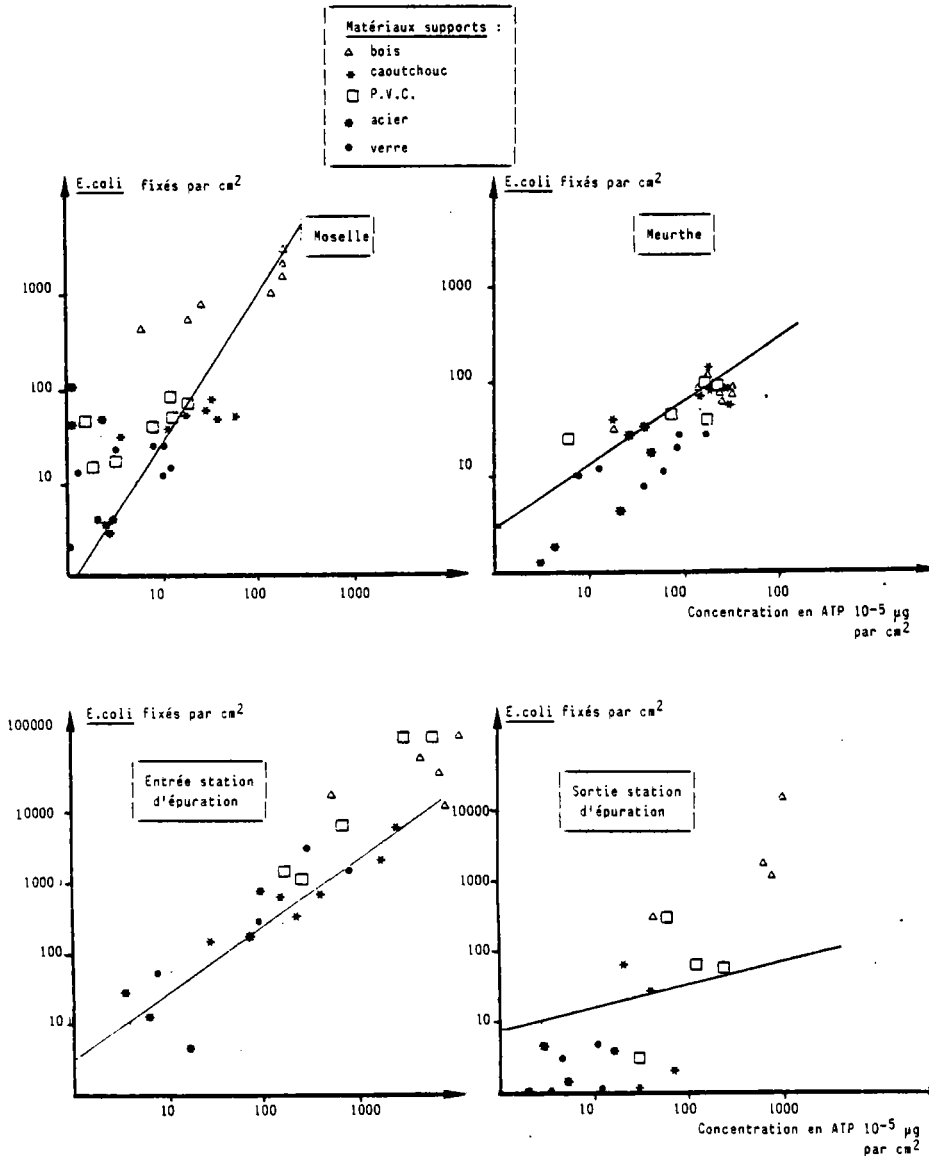


Figure 7.25 : E.coli Fixés en fonction de l'ATP Fixé sur les différents matériaux supports immergés dans les quatre milieux hydriques

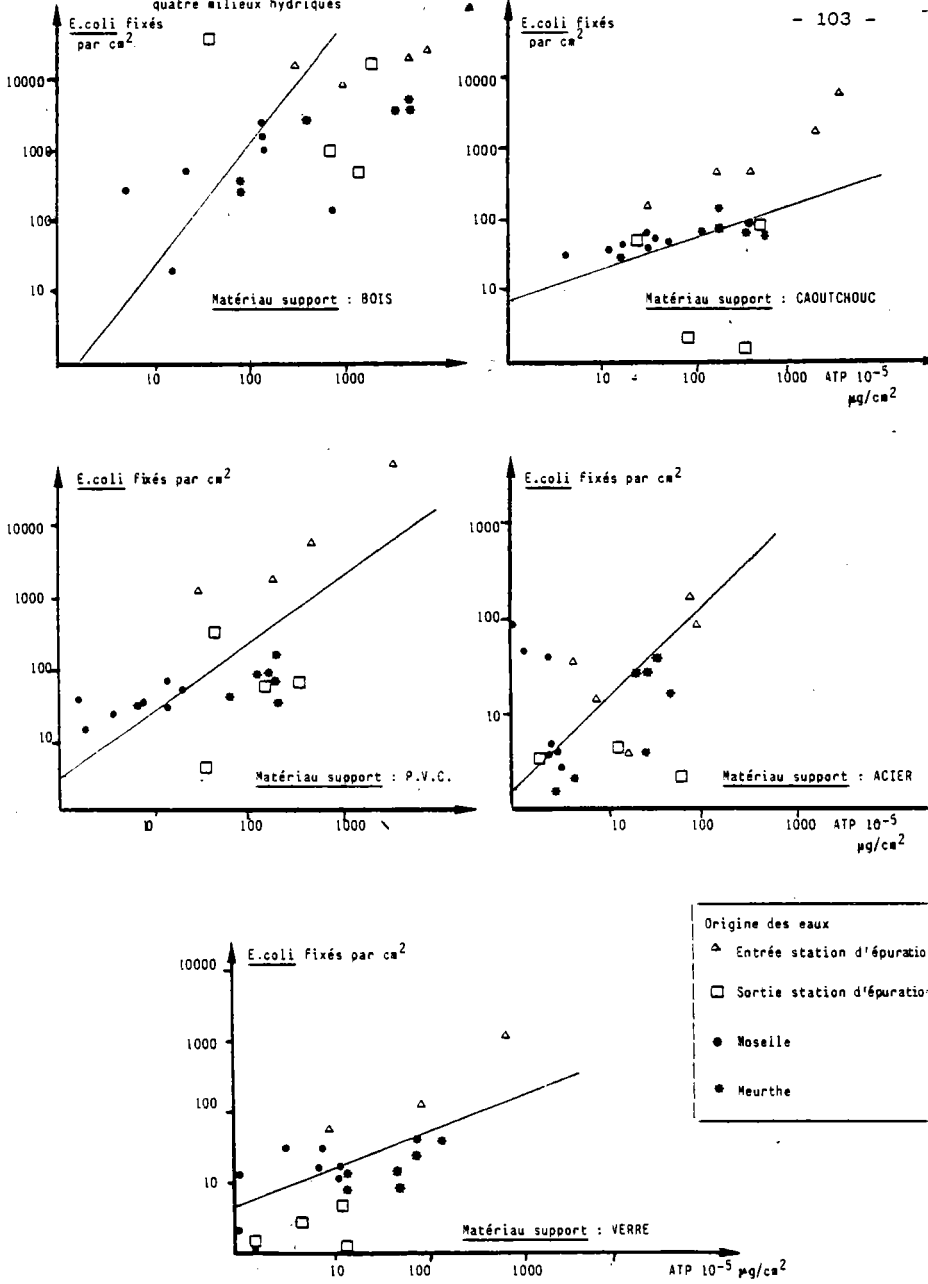




Tableau 7.26.

Analyse des coefficients de corrélations linéaires entre le nombre d'E. coli fixés par cm<sup>2</sup> et la quantité d'A.T.P. fixée par cm<sup>2</sup>, en fonction de la nature du matériau support et du type d'eau d'immersion.

	Pente	Ordonnée à l'origine	Coefficient de corrélation	Limite de confiance à 95 %
Bois	0,825	- 0,327	0,596	0,461
Caoutchouc	0,582	0,808	0,663	0,461
P.V.C.	0,639	0,408	0,772	0,461
Verre	0,449	0,641	0,739	0,461
Acier	0,796	0,195	0,774	0,461
Entrée station d'épuration	0,582	0,508	0,773	0,438
Sortie station d'épuration	0,416	0,931	0,670	0,506
Meurthe	0,844	0,484	0,903	0,357
Moselle	0,687	- 0,124	0,853	0,357

## VIII. DISCUSSIONS

La méthode électrochimique développée par WILKINS et al. (1974) pour dénombrer les E. coli a été adaptée pour quantifier les E. coli fixés sur supports immergés. Les résultats obtenus peuvent amener trois types de commentaires relatifs :

- à la méthode instrumentale mise en oeuvre,
- à l'influence des caractéristiques du milieu et des différents matériaux supports choisis, en laboratoire et en culture pure. Les possibilités de contrôler les paramètres indépendamment les uns des autres sont facilitées et permettent de dégager leur importance,
- à la possibilité d'employer cette technique instrumentale pour dénombrer les E. coli fixés in situ parmi une population hétérogène où les fluctuations du milieu sont multiples.

### VIII. 1. Utilisation d'une méthode instrumentale pour quantifier les E. coli fixés sur supports.

#### VIII. 1.1. Le temps de latence.

Les résultats obtenus en culture pure montrent que le temps de latence avant le saut du potentiel est une fonction linéaire du nombre d'E. coli introduits dans la cellule de mesure, soit :

- libres dans le milieu aqueux,
- fixés à l'électrode indicatrice d'hydrogène ou fil de platine,
- fixés à d'autres éléments supports ; cette utilisation est moins restrictive et plus représentative de situations envisageables dans les milieux récepteurs.

Les résultats, comparativement à ceux obtenus par WILKINS et al. en 1974, 1976, 1978 et 1980, montrent certaines divergences dans les valeurs de temps de latence, de pente et d'ordonnée à l'origine.

Il semble hasardeux de comparer des résultats où les températures d'incubation sont différentes ; les valeurs citées par WILKINS et al. mentionnent les résultats d'expériences faites à 37° C.

Les expérimentations successives de WILKINS et al. mettent l'accent sur la nécessité de contrôler les conditions opératoires; des courbes d'étalonnage dissemblables peuvent être obtenues avec des eaux de minéralisations différentes.

Il semble indispensable, pour une vulgarisation de cette méthodologie, de standardiser l'appareillage et les conditions opératoires.

#### VIII. 1.2. La dérive du potentiel.

Les expériences de WILKINS et al. ne donnent pas d'information sur le saut de potentiel de l'électrode indicatrice.

Il est apparu indispensable de vérifier si le saut de potentiel est en relation étroite avec le nombre d'E. coli présents dans la cellule de mesure.

Les résultats obtenus indiquent une dépendance entre le nombre d'E. coli présents dans la cellule et le début de la dérive du potentiel; la valeur obtenue de  $6 \cdot 10^6$  E. coli/ml correspond sensiblement à la valeur de l'ordonnée à l'origine de la droite de régression tracée dans le cas d'une expérimentation à 44° C.

L'hypothèse peut être formulée, le temps de latence exprime le temps nécessaire pour atteindre, par multiplication cellulaire, la quantité d'E. coli nécessaire au saut du potentiel. Les digressions obtenues dans les résultats peuvent provenir de paramètres affectant la vitesse de multiplication cellulaire.

#### VIII. 1.3. Comparaison de la méthode électrochimique avec d'autres méthodes de dénombrement des E. coli.

Les résultats, entre la méthode électrochimique et la technique utilisant le nombre le plus probable, montrent qu'il est très maladroit de corréliser des résultats où les limites de confiance sont amples; WILKINSON et BOYKIN, en 1980, font les mêmes remarques en comparant à la fois ces deux méthodologies, mais également la méthode de filtration sur membrane.

La méthode électrochimique subit également les erreurs dues à l'appréciation du saut de potentiel; dans le cas de cette étude l'utilisation d'un enregistreur à déroulement minimum de 2 cm par heure a permis de mieux contrôler ce paramètre.

#### VIII. 2. Influence du milieu et de la nature du support sur la cinétique de fixation des E. Coli. Essais en laboratoire.

##### VIII. 2.1. Influence de la concentration en E. coli.

Un ensemencement initial 100 fois supérieur est traduit pour l'ensemble des supports, après 48 heures d'immersion, par une quantité prépondérante en E. coli fixés de 4 à 30 fois plus importante.

FLETCHER (1977), sur Pseudomonas en milieu marin avec un ensemencement 50 fois supérieur, après deux heures d'immersion, note que le polystyrène fixe trois fois plus de Pseudomonas.

De même CHARACKLIS (1981), FLETCHER (1980), MARSHALL (1971), HEUKELEKIAN et CROSBY (1956), ont montré une augmentation de la fixation des bactéries, en relation avec une quantité de bactéries libres au départ plus grande. CHARACKLIS (1980) souligne que cette différence est significative et sensible dans les premières heures de mise en contact, mais pour des durées d'immersion beaucoup plus longues cette différence s'estompe.

L'attribution de cette supériorité à coloniser des plaquettes support, dans un milieu riche en bactéries, résulte des possibilités accrues de contact, en particulier pour les bactéries mobiles.

Les bactéries libres à long terme se multiplient ; il est très difficile de démontrer la part réelle des bactéries libres se fixant et la part des bactéries fixées se multipliant. De plus, au cours du temps, des lyses et des décrochements de bactéries peuvent avoir lieu.

Très certainement, la concentration en E. coli est prépondérante dans la phase initiale de fixation, mais au cours de temps d'immersion plus longs, il convient d'utiliser prudemment ce paramètre.

#### VIII. 2.2. Influence de la concentration en matières organiques du milieu.

Plusieurs théories ont été émises, dont l'une rejoint les résultats obtenus : l'augmentation du taux de matières organiques de 20 à 200 mg/l se traduit, après 72 heures d'immersion, par une quantité d'E. coli fixés de 1,8 à 73 fois plus importante. HEUKELEKIAN et CROSBY (1956) notent une constatation similaire dans le cas d'addition de glucose et de peptone, éléments facilement hydrolysables.

MARSHALL (1971) émet certaines restrictions au-delà d'une certaine limite ; dans le cas d'une augmentation supérieure à 30 mg de carbone, on constate une inhibition de la fixation des bactéries.

Les résultats sont en contradiction avec la théorie selon laquelle la fixation des bactéries à des supports est favorisée par des milieux carencés et pauvres en éléments nutritifs.

L'attribution d'une fixation plus forte en E. coli lors d'une augmentation en matières organiques peut être due au fait que les E. coli dégradent facilement ces matières organiques en favorisant leur croissance, et rejoint l'hypothèse émise dans le paragraphe précédent : un plus grand nombre de bactéries est favorable à la fixation.

### VIII. 2.3. Influence de la minéralisation.

L'aptitude à la colonisation des supports est favorisée pour les E. coli dans une eau bicarbonatée calcique : après 48 heures d'immersion, la quantité d'E. coli fixés est 3,5 fois supérieure par rapport à une eau dure sulfatée, et 48,9 fois plus importante que dans une eau douce.

La présence de cations bivalents dans le milieu, en particulier de  $Ca^{++}$ , a un effet bénéfique sur la fixation irréversible (1971), l'intégrité de la paroi cellulaire n'est pas modifiée, mais il n'est pas certain que les cations bivalents soient nécessaires à la biosynthèse des polymères.

MARSHALL (1971) souligne l'effet nul des cations bivalents, en particulier  $Ca^{++}$ , dans la phase réversible. Les mesures des essais expérimentaux ont commencé après 8 heures de contact, délai certainement trop long pour vérifier ce point.

Pourtant ces cations peuvent servir comme éléments favorisant une diminution de l'épaisseur de la double couche ionique, et peuvent contribuer à diminuer les forces répulsives entre la surface du solide et la surface des bactéries.

L'association de cations et d'anions divalents en nombre élevé est moins favorable qu'une présence de cations seuls ; les résultats expérimentaux mentionnent ces différences entre une eau dure calcique et une eau dure bicarbonatée sulfatée.

Une eau douce faiblement ionique ne favorise pas la fixation des E. coli ; l'incidence principale peut en être une déficience dans la synthèse des polysaccharides ou une déstabilisation de la paroi cellulaire, l'énergie libre de surface demeure trop grande et ne permet pas à la cellule bactérienne d'établir des liaisons stables ou autre possibilité, ce sont des modifications dans la composition membranaire impliquée dans la fixation.

### VIII. 2.4. Influence du pH.

L'optimum, pour la fixation des E. coli aux supports, se situe à pH 7, puis viennent, par ordre décroissant, l'eau à pH 5, et l'eau à pH 8,5. Les quantités d'E. coli fixées pour l'acier, après 48 heures d'immersion, sont à pH 7, 67,2 fois plus importantes que pour une eau à pH 8,9 et 2,6 fois plus importantes que dans une eau à pH 5.

MARSHALL (1971) souligne ce fait : une meilleure fixation des bactéries au voisinage de la neutralité du pH.

DANIELS (1980) démontre une meilleure fixation à un pH entre 3 et 6 ; les résultats sont quelque peu différents, mais une bonne fixation est possible à un pH plus acide qu'alcalin ; les résultats expérimentaux confirment ces constatations.

L'influence du pH intervient particulièrement dans le degré de liaison des ions et dans l'intégrité de la paroi cellulaire.

### VIII. 2.5. Influence de la température.

Les résultats obtenus démontrent une meilleure fixation à 20° C qu'à 10° C. FLETCHER (1977) constate une fixation optimale à des températures élevées voisines des conditions idéales de croissance ; le nombre d'E. coli à 10° C est de 4,55 E. coli par cm<sup>2</sup>, alors qu'à 20° C le nombre d'E. coli fixés atteint 14,8 par cm<sup>2</sup>. Une élévation de température se traduit par une augmentation de capacité et de vitesse de fixation, une chute de température a un effet inverse. La réversibilité de la fixation en fonction de la température ne semble toutefois pas totale ; la capacité de fixation, à une température déterminée, est quelque peu fonction de " l'histoire thermique " du milieu, dans la gamme de température prospectée de 10 à 20° C.

L'influence de la température a un effet particulier sur la viscosité du milieu, diminuant l'efficacité de fixation des bactéries aux matériaux supports. L'effet le plus positif d'une élévation de température est l'augmentation des adsorptions chimiques, mais aussi physiques ; d'autre part, la température a un effet bénéfique sur la physiologie des bactéries en favorisant leur croissance.

### VIII. 2.6. Influence de la nature des matériaux.

Dans la majorité des expérimentations, les différents matériaux étudiés : PVC, bois, caoutchouc, verre, acier inoxydable, ont des comportements similaires.

Meilleure fixation pour le bois, support le plus mouillable. Les controverses enregistrées par différents auteurs, concernant l'hydrophobicité et l'aptitude à la fixation, montrent qu'outre la mouillabilité, il faut tenir compte de la charge des matériaux. D'autre part, l'état de surface des matériaux est modifié par les conditions expérimentales.

Pour juger des propriétés des différents matériaux, il faut également considérer les conditions nutritionnelles du milieu ; la présence de matières organiques peut également modifier les propriétés de surface des différents matériaux.

### VIII. 3. Essais in situ.

La comparaison du nombre d'E. coli fixés par unité de surface dans l'eau de rivière non polluée et dans le milieu le plus contaminé étudié, - entrée de station d'épuration urbaine, - montre des valeurs 10 fois plus faibles pour l'acier, 100 à 1000 fois plus faibles pour le verre et le bois, 1000 fois plus faibles pour le PVC et le caoutchouc, en milieu peu contaminé qu'en milieu fortement contaminé bactériologiquement.

L'importance des matières organiques biodégradables semble, tout comme dans les essais de laboratoire, avoir une importance primordiale.

La multitude des autres paramètres qui s'interconnectent ne permet pas de tirer des informations suffisantes pour attribuer une importance particulière à l'un ou à l'autre.

Le peu de résultats expérimentaux obtenus in situ n'autorise pas de conclusions générales. Les conditions de laboratoire ne peuvent être transposées intégralement à un milieu hétérogène complexe.

-----

IX - CONCLUSIONS

La détection électrochimique pour quantifier les E. coli, et plus particulièrement ceux fixés à des supports solides immergés, a été mise au point et a permis de dégager les conclusions suivantes :

Le saut du potentiel de l'électrode indicatrice correspond à une quantité bien précise de  $6 \cdot 10^6$  E. coli, qui doivent être nécessairement présents dans la cellule.

La fixation des E. coli à des supports, quelle que soit leur nature, obéit à une cinétique relativement bien définie et qui se caractérise par une fixation rapide du nombre des E. coli pendant la période de 24 à 72 heures. Les maxima observés atteignent 4651 E. coli par  $\text{cm}^2$  dans le meilleur des cas, contre 4,5 E. coli dans le cas le plus défavorable.

L'influence des caractéristiques suivantes, relatives aux supports solides, a été mise en évidence :

Les différents matériaux solides étudiés : PVC, bois, caoutchouc, verre et acier inoxydable, ont des comportements relatifs identiques dans les diverses conditions expérimentales. Il apparaît ainsi que le caoutchouc, le PVC, et plus particulièrement le bois, ont une grande aptitude à fixer ces bactéries, contrairement au cas du verre et de l'acier inoxydable, où la fixation est nettement moindre.

La fixation des E. coli dans des conditions expérimentales et in situ s'effectue d'autant mieux que le matériau est plus mouillable, comme dans le cas du bois, mais pour les autres matériaux supports, il n'y a pas de relation directe avec l'indice de mouillabilité.

L'influence des caractéristiques du milieu hydrique montre que :

- . La concentration en bactéries, dans le milieu aqueux mis en contact avec les solides, intervient de façon importante sur le nombre de bactéries fixées.
- . La présence de matières organiques biodégradables en solution augmente le nombre de bactéries fixées.
- . La présence d'autres micro-organismes que E. coli semble jouer un rôle positif sur la fixation des bactéries.



. La fixation est influencée par le pH. L'optimum de fixation en culture pure se situe au voisinage de la neutralité. Un écart par rapport à la neutralité se manifesta par une moindre fixation des E. coli ; le phénomène est plus marqué en milieu alcalin

Le protocole expérimental établi ne permet pas de classer les différents paramètres par ordre d'importance.

Il convient de souligner qu'il est toujours très hasardeux de transposer les conclusions obtenues dans des conditions expérimentales de laboratoire à l'échelle du milieu hydrique. Les résultats obtenus sont fragmentaires et ne permettent pas de conclure sur des situations générales ou même particulières. Dans la perspective d'une recherche appliquée, seuls les essais de terrains peuvent être proposés pour permettre de dégager des connaissances plus précises sur les cinétiques de fixation des E. coli sur supports.

-----

X. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ARAI, N., KOJIMA, H. (1978) :

Growth curve of slime bacteria and effects of slime control agent.

Japan Pulp Paper, 3, 59-63.

BAIER, R.E. (1980) :

Substrata influences on adhesion of microorganisms and their resultant new surface properties, in "Adsorption of microorganisms to surfaces", 3, p. 59-104. Bitton, G. & Marshall, edit.

A Wiley Interscience Publication, U.S.A., 439 pages.

BROWN, M.J., & LESTER, J.N. (1979) :

Metal removal in activated sludge : the role of bacterial extracellular polymers.

Water Res., 13, 817-837.

BRYERS, J., & CHARACKLIS, W. (1981) :

Early fouling biofilm formation in a turbulent flow system : overall kinetics.

Water Res., 15, 483-491.

BURNS, R.G. (1980) :

Microbial adhesion to soil surface ; consequences for growth and enzyme activities,

in "Microbial adhesion to surface", 14, p. 249-262.

BERCKELEY, R.C.W., LYNCH, J.M., MELLING, J., RUTTER, P.R., & VINCENT, B., edit.

Ellis Horwood Limited, Publishers, Chichester, U.K., 539 pages.

CHARACKLIS, W.G. (1981) :

Bioengineering Report : Fouling biofilm development, a process analysis.

Biotechnol. Bioeng., 23, 1923-1960.

CHARACKLIS, W.G. (1973) :

Attached microbial growths.

I. Attachment and growth.

Water Res., 7, 1113-1127.

CHARACKLIS, W.G. (1973) :

Attached microbial growths.

II. Frictional resistance due to microbial slimes.

Water Res., 7, 1249-1258.

CHET, I., ASKETH, P., & MITCHELL, R. (1975) :

Repulsion of bacteria from marine surfaces.

Appl. Microbiol., 30, 6, 1043-1045.

COOKSEY, K.E. (1981) :

Requirement for calcium in adhesion of a fouling diatom to glass.

Appl. Environ. Microbiol., 41, 6, 1378-1382.

COOPER, D.G., ZAJIC, J.E., & GERSON, D.F. (1979) :

Interfaces and the aquatic environment.

Proceedings of the Workshop on Microbial Degradation of Pollutants in Marine environments, p. 227-240.

U.S. E.P.A. Report, 600/9 - 79. 012.

CORPE, W.A. (1980) :

Microbial surface components involved in adsorption of microorganisms to surfaces,  
in "Adsorption of Microorganisms to Surfaces", 4, 105-144.

BITTON, G. & MARSHALL, edit.

A Wiley Interscience Publication, U.S.A., 439 pages.

CORPE, W.A. (1975) :

Metal binding properties of surface materials from marine bacteria.

Devs. Ind. Microbiol., 16, 249-255.

CORPE, W.A. (1973) :

Detachment of marine periphytic bacteria from surface.  
Devs. Ind. Microbiol., 15, 281-287.

CORPE, W.A. (1970) :

An acid polysaccharide produced by a primary film-forming marine bacterium.  
Devs. Ind. Microbiol., 11, 402-412.

COSTERTON, J.W. (1980) :

Some techniques involved in study of adsorption of microorganisms to surfaces,  
in : "Adsorption of microorganisms to surface", 12, 403-423.  
BITTON, G. & MARSHALL, édit.  
A Wiley Interscience Publication : John Wiley and Sons, U.S.A., 439 pages.

COSTERTON, J.W., GEESEY, G.G., & CHENG, K.J. (1978) :

Comment collent les bactéries.  
Pour la Science, 5, 100-110.

CRABTREE, K., BOYLE, W., McLOY, E., & ROHLICH, G.A. (1966) :

A mechanism of floc formation by Zoogloea Ramigera.  
J. Wat. Pollut. Control Fed., 38, 12, 1968-1980.

DANIELS, S.L. (1980) :

Mechanisms involved in sorption of microorganisms to solid surface,  
in "Adsorption of microorganisms to surface" 2, 7-58.  
BITTON, G. & MARSHALL, édit.  
A Wiley Interscience Publication, U.S.A., 439 pages.

DEXTER, S.C., SULLIVAN, J.D. Jr., WILLIAMS III J., & WATSON, S.W. (1975) :

Influence of substrate wettability on the attachment of marine bacteria to various surfaces.  
Appl. Microbiol., 30, 2, 298-308.

DUDMAN, W.F. (1977) :

The role of surface polysaccharides in material environments,  
in "Surface carbohydrates of the prokaryotic cell", 9,  
357-414.

SUTHERLAND, I., édit.

Academic Press Inc. (London) Ltd., 472 pages.

FLETCHER, M. (1980) :

The question of passive versus active attachment mechanisms  
in non-specific bacterial adhesion,  
in "Microbial adhesion to surface", 10, 197-210.

BERKELEY, R.C.W., LYNCH, J.M., MELLING, J., RUTTER, P.R.  
& VINCENT, B., édit.

Ellis Horwood Ltd Publishers, Chichester, U.K., 559 pages.

FLETCHER, M. (1980) :

Adherence of marine microorganisms to smooth surfaces,  
11, 347-374.

in "Bacterial Adherence, Receptors and Recognition, Series B,  
vol. 6.

BEACHEY, E.H., édit.

Chapman & Hall, London.

FLETCHER, M. (1979) :

The attachment of bacteria to surfaces in aquatic environ-  
ments,

in "Adhesion of microorganisms to surfaces", 87-108.

ELLWOOD, D.C., MELLING, J., & RUTTER, P., édit.

Special Publication of Society of General Microbiology, 2.  
Academic Press Ind. (London) Ltd., 216 pages.

FLETCHER, M. (1977) :

The effects of culture concentration and age, time and  
temperature on bacterial attachment to polystyrene.

Can. J. Microbiology, 23, 1-6.

FLETCHER, M., LATHAM, M.J., LYNCH, J.M., & RUTTER, P.R. (1980) :

The characteristics of interfaces and their role in micro-  
bial attachment,

in "Microbial Adhesion to surfaces", 3, 67-78.

BERKELEY, P.C.W., LYNCH, J.M., MELLING, J., RUTTER, P.R.,  
& VINCENT, B., édit.

Ellis Horwood Ltd Publishers, Chichester, U.K., 559 pages.

FLETCHER, M. & LOEB, (1979) :

Influence of substratum characteristics on the attachment  
of a marine Pseudomonad to solid surfaces.

Appl. Environ. Microbiol., 37, 1, 67-72.

FLETCHER, M., & FLOODGATE, G.D. (1973) :

An electron-microscopic demonstration of an acidic poly-saccharide involved in the adhesion of a marine bacterium to solid surfaces.

J. Gen. Microbiol., 74, 325-334.

FLOODGATE, G.D. (1979) :

Nutrient limitation.

Proceedings of the Workshop on "Microbial degradation of pollutants in marine environments", 107-118.

U.S. E.P.A. Report, 600/9 - 79 - 012.

FOWLER, M.W., & MCKAY, A.J. (1980) :

The measurement of microbial adhesion, in "Microbial Adhesion to surfaces", 7, 143-161.

BERKELEY, R.C.W., LYNCH, J.M., MELLING, J., RUTTER, P.R., & VINCENT, S., édit.  
Ellis Horwood Limited Publishers, Chichester, U.K., 559 pages.

GELDREICH, E.E. (1978) :

Bacterial populations and indicator concepts in feces, sewage, stormwater and solid wastes, in "Indications of viruses in water and food",

BERG, G., édit.

Ann Arbor Science Publishers.

GREEN, M.B., COOPER, D.E., & JENKINS, S.H. (1965) :

The growth of microbial film on vertical screens dosed with settled sewage.

Int. J. Air Wat. Poll., 9, 807-821.

HEUKELEKIAN, H., & CROSBY, E.S. (1955) :

Slime formation in polluted waters.

I. Laboratory and field study methods.

Sewage Ind. Wastes, 27, 12, 1391-1398.

HEUKELEKIAN, H., & CROSBY, E.S. (1956) :

Slime formation in polluted waters.

II. Factors affecting slime growth.

Sewage Ind. Wastes, 28, 1, 78-92.

HEUKELEKIAN, H., & CROSBY, E.S. (1956) :

Slime formation in polluted waters.

III. Nature and composition of slimes.

Sewage Ind. Wastes, 28, 2, 206-210.

HEUKELEKIAN, H. (1945) :

The relationship between accumulation, biochemical and biological characteristics of film and purification capacity of biofilter and a standard filter.  
I. Film accumulation.

Sewage Works Journal, 17, 1, 23-38.

JANNASCH, H.W. & BUTCHARD, P.H. (1972) :

The role of inert particulate matter in the activity of aquatic microorganisms.

Mem. Inst. Ital. Idrobiol., 29, supplém. 289-308.

KAHANE, I., GAT, O., BANAI, M., BREDT, W., & RAZIN, S. (1979) :

Adherence of *Mycoplasma gallisepticum* to glass.

J. Gen. Microbiol., 111, 217-222.

KIRSCHNER, L.E., & PULEO, J.R. (1979) :

Wipe - Rinse Technique for quantitating microbial contamination on large surfaces.

Appl. Environ. Microbiol., 38, -2, 466-479.

LIPS, A., & JESSUP, N.E. (1979) :

Colloidal aspect of bacterial adhesion,  
in "Adhesion of microorganisms to surfaces", p. 5-27.

ELLWOOD, D.C., MELLING, J., & RUTTER, P., édit.  
Special Publication of the Society of General Microbiology,  
Academic Press Inc., London, Ltd., 216 pages.

MARSHALL, K.C. (1980) :

Bacterial adhesion in natural environments,  
in "Microbial Adhesion to surfaces"; 2, 187-196.

BERKELEY, R.C.W., LYNCH, L.M., MELLING, J., RUTTER, P.R.  
& VINCENT, B., édit.

Ellis Horwood Ltd. Publishers, Chichester, U.K., 559 pages.

MARSHALL, K.C. (1980) :

Adsorption of microorganisms to soils and sediments,  
in "Adsorption of Microorganisms to surfaces", 2, 317-329.

BITTON, G., & MARSHALL, édit.

A Wiley Interscience Publication.  
John Wiley & Sons, U.S.A., 439 pages.

MARSHALL, K.C., & BITTON, G. (1980) :

Microbial adhesion in perspective,  
in "Adsorption of microorganisms to surfaces", 1, p. 1-5.

BITTON, G., & MARSHALL, édit.

A Wiley Interscience Publication, U.S.A., 439 pages.

MARSHALL, K.C. (1978) :

The effects of surfaces on microbial activity,  
in "Water Pollution Microbiology", 2, 51-70.

MITCHELL, R., édit.

A Wiley Interscience Publication, U.K., 442 pages.

MARSHALL, K.C., & CRUICKSHANK, R.H. (1973) :

Cell surface hydrophobicity and the orientation of certain  
bacteria at interfaces.

Arch. Mikrobiol., 91, 29-40.

MARSHALL, K.C., STOUT, R., & MITCHELL, R. (1971) :

Mechanism of the initial events in the sorption of marine  
bacteria to surfaces.

J. Gen. Microbiol., 68, 337-348.

NEUFELD, R.J., ZAJIC, J.E., & GERSON, D.F. (1980) :

Cell surface measurements in hydrocarbon and carbohydrate  
fermentations.

Appl. Environ. Microbiol., 39, 3, 511-517.

NORKRANS, B. (1979) :

Role of surface microlayers.

Proceedings of the Workshop on "Microbial degradation of  
pollutants in marine environments", p. 201-213.

U.S. E.P.A. Report, 600/9 - 79 - 012.

OHGAKI, S., HWANG, S.L. & MATSUMOTO, J. (1978) :

Kinetics of attached microbial growth in a continuous  
stirred tank reactor.

Water Res., 12, 243-249.



PEARL, H.W. (1980) :

Attachment of microorganisms to living and detrital surfaces in freshwater systems, in "Adsorption of microorganisms to surfaces", 11, 375-402.

BITTON, G., & MARSHALL, édit.  
A Wiley Interscience Publication,  
John Wiley & Sons, U.S.A., 439 pages.

PASSMAN, F.J., NOWITSKY, T.J., & WATSON, S.W. (1979) :

Surface microlayers of the North Atlantic : Microbial populations, heterotrophic and hydrocarbonolastic activities. Proceedings of the Workshop on "Microbial degradation of pollutants in marine environments", p. 214-226.  
U.S. E.P.A. Report, 600/9 - 79 - 012.

PAVONI, J., TENNEY, M.W., & EICHELBERGER, W.F. Jr. (1972) :

Bacterial exocellular polymers and biological flocculation.  
J. Wat. Pollut. Control Fed., 44, 3, 414-431.

PEARCE, W.A., & BUCHANAN, T.M. (1980) :

Structure and cell membrane binding. Properties of bacterial fimbriae, 10, 291-344,  
in "Bacterial adherence. Receptors and recognition",  
Series B, vol. 6/E (1980).

BEACHEY, E.H., édit.  
Chapmann & Hall, London.

PERSI, M.A., & BURNHAM, J.C. (1981) :

Gallus domestica York (Vitelline) membrane use for in vitro microbial adherence studies.

Appl. Environ. Microbiol., 42, 2, 364-369.

PETHICA, B.A. (1980) :

Microbial cell adhesion,  
in "Microbial adhesion to surfaces", 1, p. 19-45.

BERKELEY, R.C.W., LYNCH, J.M., MELLING, J., RUTTER, P.R., & VINCENT, B., édit.  
Ellis Horwood Limited Publishers, Chichester, U.K., 559 pages

RATNAM, D.A., PAVLOU, S., & FREDRICKSON, A.G. (1982) :

Effects of attachment of bacteria to chemostat walls in a microbial predator - prey relationship.

Biotechnol. Bioeng., 24, 2675-2694.

RIDGWAY, H.F., & OLSON, B.H. (1981) :

Scanning electron microscope evidence for bacterial colonization of a drinking water distribution system.

Appl. Environ. Microbiol., 41, 1, 274-287.

ROBERTS, A.D. (1979) :

Looking at rubber adhesion.

Rubber Chem. Technol., 52, 23-42.

ROGERS, H.J. (1979) :

Adhesion of microorganisms to surfaces : Some general considerations of the role of the envelope,

in "Adhesion of microorganisms to surfaces", p. 29-55.

ELLWOOD, D.C., MELLINGS, J., & RUTTER, P., édit.

Special publication of the Society of General Microbiology, Academic Press Inc., London, Ltd. p. 216.

ROSENBERG, M. (1981) :

Bacterial adherence to polystyrene. A replica method of screening for bacterial hydrophobicity.

Appl. Environ. Microbiol., 42, 2, 375-377.

RUTTER, P.R., & VINCENT, B. (1980) :

The adhesion of microorganisms to surfaces. Physico-chemical aspects,

in "Microbial adhesion to surfaces", 4, p. 79-92.

BERKELEY, R.C.W., LYNCH, J.M., MELLING, J., RUTTER, P., & VINCENT, B., édit.

Ellis Horwood Limited Publishers, Chichester, U.K., 559 pages

SANDERS, W.M. III (1966) :

Oxygen utilization by slime organisms in continuous cultures

Air and Wat. Pollut. Int. I, 10, 253-276.

SCHOENEN, D., THOFERN, E., & DOTT, W. (1981) :

Recherches sur les proliférations microbiennes sur les matériaux de peinture et de revêtements utilisés dans les réservoirs d'eau potable.

Eau Industries, 1, 49-57.

STEINER, A.E., McLAREN, D.A., & FORSTER, C.F. (1976) :

The nature of activated sludge flocs.

Wat. Res., 10, 25-30.

STOTSKY, G. (1980) :

Microbial adhesion,  
in "Microbial adhesion to surfaces", 13, p. 231-247.

BERKELEY, R.L.W., LYNCH, J.M., MELLING, J., RUTTER, P.R., & VINCENT, B., édit.  
Ellis Horwood Limited Publishers, Chichester, U.K., 559 pages.

SUTHERLAND, J.W. (1977) :

Bacterial exopolysaccharides. Their nature and production,  
in "Surface carbohydrates of the prokaryotic cell", 3,  
p. 24-95.

SUTHERLAND, I., édit.  
Academic Press Inc., London, Ltd., 472 pages.

TADROS, T.F. (1980) :

Particle - surface adhesion,  
in "Microbial adhesion to surfaces", 5, p. 93-116.

BERKELEY, R.C.W., LYNCH, J.M., MELLING, J., RUTTER, P.R., & VINCENT, B., édit.  
Ellis Horwood Limited Publishers, Chichester, U.K., 559 pages.

TOMLINSON, T.G., & SNADDON, D.H.M. (1966) :

Biological oxidation of sewage by films of microorganisms.

Air and Water Pollution Int. J., 10, 865-881.

WARD, J.D. (1980) :

The microbial cell surface and adhesion,  
in "Microbial adhesion to surfaces", 2, p. 47-66.

BERKELEY, R.C.W., LYNCH, J.M., MELLING, J., RUTTER, P.R. & VINCENT, B., édit.  
Ellis Horwood Limited Publishers, Chichester, U.K., 559 pages.

WARDELL, J.N. (1980) :

A continuous culture study of the attachment of bacteria to surfaces,  
in "Microbial adhesion to surfaces", 12, p. 221-230.

BERKELEY, R.C.W., LYNCH, J.M., MELLING, J., RUTTER, P.R.,  
& VINCENT, B., édit.  
Ellis Horwood Limited Publishers, Chichester, U.K., 559 pages.

WEATHER, D.W.F., MARA, D.D., JAWAD, L., & ORAGUI, J. (1980) :

Pseudomonas aeruginosa and Escherichia coli in sewage and  
fresh water.

Water Res., 14, 713-721.

WILKINS, J.R., GRANA, D.C., & FOX, S.S. (1980) :

Combined membrane filtration - Electrochemical microbial  
detection method.

Appl. Environ. Microbiol., 40, 4, 852-853.

WILKINS, J.R., YOUNG, R.N., & BOYKIN, E.H. (1978) :

Multichannel electrochemical microbial detection unit.

Appl. Environ. Microbiol., 35, 1, 214-215.

WILKINS, J.R., & BOYKIN, E.H. (1976) :

Analytical notes. Electrochemical method for early detection  
and monitoring of coliforms.

J. Am. Water Works Assoc., 5, 257-263.

WILKINS, J.R., STONER, G.E., & BOYKIN, E.H. (1974) :

Microbial detection method based on sensing molecular  
hydrogen.

Appl. Microbiol., 27, 5, 949-952.

WOOD, J.M. (1980) :

The interaction of micro-organisms with ion-exchange resins.  
in "Microbial adhesion to surfaces", 8, p. 163-185.

BERKELEY, R.C.W., LYNCH, J.M., MELLING, J., RUTTER, P.R.,  
& VINCENT, B., édit.  
Ellis Horwood Limited Publishers, Chichester, U.K., 559 pages.

ZAJIC, J.E., KOSARIC, N., & BROSSEAU, J.D. (1978) :  
Microbial production of hydrogen, p. 59-109,  
in "Advances in Biochemical Engineering", vol. 9.  
GHOSE, T.K., édit.  
J. SPRINGER-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York.

-----