

DEGRADATION DE LA QUALITE MICROBIOLOGIQUE DE L'EAU AU COURS DE SA DISTRIBUTION : MISE EN PLACE D'UN PROTOCOLE DE QUANTIFICATION DES BIOMASSES FIXEES.

E.Delahaye (*), Y.Levi (**), G.Lebion (***), A.Montiel (*)

* SAGEP, 9 rue Schoelcher, 75014 Paris France

** Université Paris XI, Faculté de pharmacie, Chatenay-Malabry, Laboratoire Santé Publique-Environnement.

*** Université Paris XI, Orsay, Institut de Génétique et de Microbiologie.

RESUME.

La présence de matières organiques dissoutes biodégradables et de micro-organismes dans l'eau en sortie d'usine de potabilisation aboutit invariablement à l'établissement d'un écosystème microbien complexe appelé biofilm à l'interface liquide-canalisation. Les stratégies classiques de désinfection (chloration et chloramination notamment) sont d'une faible efficacité sur cette biomasse fixée si l'on souhaite limiter les doses de chlore pour éviter la formation de sous-produits.

Afin de pouvoir étudier ce type de phénomène en conditions réelles, un protocole d'étude est mis en place pour permettre tout à la fois de quantifier les biomasses fixées et d'estimer le potentiel de formation de biofilm par une eau donnée. Basé sur des travaux européens, un système simple d'incubateur a été développé permettant la formation de biofilm en situation de terrain et en alimentation continue pour ensuite procéder au décrochage par les ultrasons des biomasses fixées. Le biofilm formé est alors quantifié par utilisation d'un milieu gélosé permettant la croissance des bactéries stressées.

Les résultats devraient permettre d'une part de mieux établir un protocole analytique permettant de suivre avec précision le potentiel des différentes ressources en eau de la ville de Paris à générer des biomasses fixées et d'autre part d'en apprécier les variations au cours des saisons. Ceci afin d'optimiser les traitements dans l'objectif d'un meilleur maintien de la qualité microbiologique de l'eau pendant sa distribution.

Dans cette optique, il fallait tout d'abord valider l'utilisation des incubateurs comme système expérimental simple permettant une estimation des biomasses fixées et notamment s'assurer de l'homogénéité de la colonisation de ceux-ci par le biofilm. De plus, il convenait aussi d'optimiser le protocole d'ensemencement sur milieu R2A (DIFCO).

Les résultats ont permis de déterminer un protocole strict d'ensemencement qui sera donc utilisé pour toute la suite de cette étude sur les biomasses fixées en réseau de distribution. Il semble par ailleurs que l'homogénéité de colonisation des incubateurs utilisés soit directement dépendante des débits d'alimentation.

INTRODUCTION.

En matière de traitement et de distribution une désinfection finale au chlore est fréquemment utilisée pour le maintien de la qualité microbiologique de l'eau. Mais il apparaît aujourd'hui que cette technique est loin d'être idéale : dans tous les réseaux de distribution se développe un écosystème microbien fixé complexe (biofilm), source potentielle de contamination.

De plus :

- la chloration peut déboucher sur la formation de composés organochlorés dont certains ont des propriétés mutagènes
- l'efficacité du chlore est limitée vis à vis des cellules fixées [1]
- la concentration en chlore est une fonction décroissante du temps de séjour [1, 2]

Formation et structure d'un biofilm.

L'établissement d'un biofilm débute par la formation, en quelques heures, d'un film de conditionnement par fixation de polysaccharides et de glycoprotéines dont la présence va favoriser l'attachement (réversible ou irréversible) de bactéries, de préférence sur des hétérogénéités de surface. Ce sont ces bactéries fixées qui vont se multiplier en fonction des nutriments présents dans l'eau et de la capacité qu'ils auront à diffuser à travers la matrice de substances polymériques extracellulaires (EPS) qui entoure les cellules. Puis, sous l'effet de facteurs hydrauliques [3] et biologiques, le biofilm atteint et conserve un état d'équilibre.

Structuralement, un biofilm à l'équilibre est non homogène pour l'épaisseur et les densités de polymères, ces paramètres connaissant des variations importantes. Ainsi, si sur un biofilm artificiel de *Pseudomonas aeruginosa*, 90 % des épaisseurs mesurées sont inférieures ou égales à 47 µm on note cependant une grande amplitude de variations (moyenne de 31,9 µm, écart-type de 10,6 µm) avec l'existence de pics et de vallées très marqués [4, 5]. La topographie d'un biofilm est de plus influencée par la nature du peuplement bactérien [6], avec notamment un moindre recouvrement des surfaces lorsque les bactéries ne sont pas douées de motilité.

Micro-organismes et biofilms.

De nombreux types de micro-organismes sont présents dans un biofilm: bactéries, virus, algues, protozoaires, champignons et levures. Mais, les algues ne prolifèrent pas sans lumière, les champignons et levures exigent des concentrations importantes en éléments organiques, et les virus susceptibles de pathogénicité ne se reproduisent pas dans l'environnement considéré [7]. Exception faite des contaminations accidentelles (travaux, rupture de conduite...), pour que des bactéries s'intègrent au biofilm, il faut avant tout qu'elles survivent au traitement. Le suivi quantitatif et qualitatif de la flore bactérienne pendant les traitements, permet les constatations suivantes [8]:

- le nombre de bactéries hétérotrophes chute de façon constante de l'eau brute à l'eau ozonée
- après ozonation, 75 % des survivants sont gram positifs
- la filtration sur charbon actif en grains entraîne une augmentation du nombre de bactéries hétérotrophes, quasiment au niveau quantitatif de l'eau brute, notamment par une forte réapparition des gram négatifs
- des bactéries associées à des particules en suspension ou groupées en agrégats, présentent une plus grande résistance au chlore [9].

Une fois passée la désinfection, c'est par fixation que les bactéries vont trouver un moyen de s'adapter aux conditions ultra-oligotrophes du réseau. On rencontre dans un biofilm la majorité des bactéries recherchées en contrôle sanitaire, y compris des indicateurs de contamination fécale [10]. Ce sont les bactéries hétérotrophes qui prédominent et, bien que protégées par une matrice d'exopolymères, elles sont dans un milieu peu favorable et présentent souvent un état métabolique particulier (Viable Non Cultivable) qui rend leur culture délicate sur des milieux gélosés classiques.

IMPORTANCE DE LA MATIÈRE ORGANIQUE DISSOUE BIODÉGRADABLE.

Du point de vue nutritif, le carbone organique est le principal élément à prendre en compte puisque l'azote et le phosphore ne sont pratiquement jamais des facteurs limitant dans les eaux potables issues d'eaux de surface et ce pour la plupart des espèces bactériennes [7]. La matière

organique, qu'il convient donc de considérer en tant que source de carbone, peut-être présente dans l'eau sous différentes formes. On distingue notamment le carbone organique total (COT, quantité de carbone présent dans les matières organiques dissoutes et en suspension) du carbone organique dissous (COD, quantité de carbone présent dans les matières organiques dissoutes, terme arbitraire désignant les éléments de taille inférieure à 0,4 μm). Au sein du COD, il existe une fraction appelée CODB (Carbone Organique Dissous Biodégradable) à même de servir de nutriments aux micro-organismes, qui représente en moyenne 30 % du COD.

La composition du COD est estimée à [11]:

- 50% de substances humiques (acides humiques et fulviques)
- 5 à 10 % d'acides carboxyliques
- 2 à 3 % d'acides aminés
- 5 à 10 % de sucres

Il n'existe que peu d'informations sur la relation existant entre la nature chimique des matières organiques dissoutes et leur degré de biodégradabilité. Mais globalement, pour des concentrations trop importantes (supérieures à 0,15 ppm), on constate que la quantité de matières organiques dissoutes biodégradables est une fonction décroissante de la distance parcourue depuis le départ de l'usine et/ou du temps écoulé [12, 13]. Plus que la chloration, l'une des façons de lutter contre la formation de biofilm est donc de limiter la quantité de matières organiques biodégradables dans l'eau au départ de l'usine. Certains auteurs [14] proposent 0,15 ppm en CODB comme valeur seuil garantissant la stabilité biologique d'une eau, concept consistant à atteindre des concentrations en matières organiques dissoutes biodégradables telles qu'elles ne varient pas en cours de distribution, c'est à dire telles que les composés organiques biodégradables ne soient pas transformés en biomasse bactérienne.

C'est l'un des buts des dernières étapes de traitement qui consistent fréquemment en un couplage ozonation/filtration sur charbon actif en grain (CAG). L'ozone, utilisé dans le traitement des eaux pour ses vertus microbicides, a aussi comme propriété de fragmenter les molécules de haut poids moléculaire. Ainsi, le CODB augmente après ozonation [8, 15]. C'est l'étape suivante de filtration sur CAG qui permet d'éliminer la matière organique biodégradable formée. Lors de cette étape, deux phénomènes se combinent : adsorption à la surface des grains de CAG et biodégradation par les micro-organismes les ayant colonisés. Ce sont tout à la fois l'âge des charbons et la qualité de l'eau à filtrer qui détermineront la prévalence de l'un de ces phénomènes par rapport à l'autre.

INTERACTIONS CHLORE/BACTERIES/MATIERES ORGANIQUES DISSOUTES BIODEGRADABLES.

Dans un réseau de distribution d'eau potable, il existe deux zones distinctes [14]:

- la plus proche du point d'alimentation est sous l'influence directe du désinfectant, sans consommation de matières organiques dissoutes biodégradables, la biomasse fixée y est peu abondante et les bactéries planctoniques en quantité équivalente à l'eau produite
- dans la seconde, le désinfectant a été consommé et on observe une nette augmentation de la biomasse bactérienne libre et fixée ainsi qu'une diminution en CODB.

En présence ou non de désinfectant résiduel, des relations ont pu être mises en évidence entre les trois paramètres considérés [1; 13; 16]. La plupart de ces observations lient la biomasse (libre ou fixée) à la concentration en chlore et en matières organiques dissoutes biodégradables.

Cadre de l'étude.

Dans un premier temps, le but est de disposer d'un protocole simple de quantification des biomasses fixées en réseau de distribution. Pour ce faire, il faut avant tout posséder un système permettant de recueillir du biofilm. La SAGEP a donc fabriqué des incubateurs à même de remplir ce rôle. Dans la mesure où toutes les expérimentations à venir seront faites sur un extrait provenant de tels incubateurs, il apparaît primordial de savoir si la colonisation de ceux-ci se fait de façon homogène, et sinon de connaître la répartition de la biomasse dans le système expérimental employé. Le degré d'homogénéité des incubateurs a donc été testé par utilisation de milieu R2A (DIFCO) [17] qui convient d'avantage que d'autres à la mise en culture de bactéries stressées par les conditions environnementales [17]. A ce titre, des travaux dont l'objectif était d'optimiser la mise en culture des bactéries du biofilm ont aussi été aussi menés.

MATERIEL ET METHODES.

Le principe est de permettre la colonisation de billes de verre (diamètre 6 mm) contenues dans une colonne (incubateur) alimentée en flux ascendant. En plus d'un faible potentiel à la formation de biofilm, le verre présente des avantages importants par rapport à d'autres matériaux :

- faible coût
- facilité de nettoyage et de désinfection
- absence de relargage de matières organiques dissoutes biodégradables, ce qui interdit donc toute interférence avec le potentiel de l'eau utilisée pour la formation de biofilm

Pour éviter des comptages fastidieux en procédant par pesée, l'homogénéité du lot de billes utilisé a été vérifiée avant utilisation. Avant incubation, les billes de verre sont lavées, mises à tremper pendant 24 heures dans de l'eau déminéralisée à 2 ppm de chlore libre puis passées pendant 4 heures au four à 550°C. Elles sont ensuite introduites stérilement dans les incubateurs. Ceux-ci sont constitués d'une colonne en inox, de diamètre intérieur 24 mm et de 24 cm de long. Le choix de l'inox permet d'employer le même protocole de nettoyage que pour les billes et là encore de s'affranchir des phénomènes de relargage de matières organiques dissoutes biodégradables rencontrés avec d'autres matériaux [18]. L'étanchéité des incubateurs est majoritairement assurée par des joints en téflon.

Chaque incubateur contient 185 g de billes de verre, soit environ 650 billes, ce qui correspond à une surface de colonisation de 750 cm² et à un volume interstitiel (c'est à dire disponible pour le passage de l'eau) de 65.10⁻⁶ m³.

Après colonisation, les billes, réparties par lot de 14 g (prélevés de haut en bas), sont rincées délicatement (eau de qualité HPLC stérilisée 15 minutes à 120 °C) puis transvasées dans des flacons en verre contenant 10 ml de la même eau. Ces flacons sont ensuite passés 2 minutes aux ultrasons (cuve Branson 1510), le niveau d'eau dans le flacon se situant 1 cm sous la surface de l'eau dans la cuve. Des travaux préliminaires n'ayant pas permis de dégager de différences notables (ou répétables) entre les résultats obtenus pour différents temps de sonication ou différentes hauteurs du pilulier dans la cuve, ce protocole de décrochage est donc largement inspiré de travaux européens sur la mesure des biomasses fixées [19].

Deux types d'eaux correspondant à des étapes différentes de la chaîne de traitement de Joinville le Pont ont été utilisées au cours de cette étude pour la formation de biofilm :

- eau préfiltrée, correspondant à un traitement par bio-coagulation sur biolite puis une filtration sur sable à une vitesse de 8 m/h
- eau produite quittant l'usine pour alimenter Paris.

Milieu R2A.

Afin de déterminer un protocole strict de mise en culture sur milieu gélosé, deux modes d'ensemencement du milieu R2A (DIFCO) ont été comparés : par inclusion ou en surface. Pour chacune de ces deux méthodes, x μL du sonicat sont prélevés et complétés à 100 μL avec de l'eau de qualité HPLC stérile. L'ensemble de la préparation est ensuite vortexé. Chaque ensemencement est réalisé en triplicat.

Pour les ensemencements en surface, 25 ml de milieu R2A en surfusion sont coulés dans une boîte de Petri stérile de 100 mm de diamètre. Après que le milieu se soit solidifié à température ambiante, 5 billes de verre stériles (diamètre 6 mm) sont ajoutées dans chaque boîte. Après dépôt des 100 μL de préparation à la surface, la boîte est délicatement agitée dans un plan horizontal, de telle façon que les billes parcourent l'ensemble de sa surface. Après séchage à température ambiante, les billes sont vidées et on place la boîte 7 jours à 22 °C pour incubation.

Pour les ensemencements en profondeur, les 100 μL de préparation sont préalablement déposés au fond de la boîte puis recouverts par 25 ml de milieu R2A (DIFCO) à une température de 50 °C. Après une brève homogénéisation, l'incubation se déroule dans les mêmes conditions que celles décrites pour les ensemencements en surface.

RESULTATS.

Comparaison des deux modes d'ensemencements.

Afin de réaliser cette comparaison, un incubateur a été exposé pendant 14 jours à l'eau quittant l'usine de Joinville le Pont pour alimenter Paris, dans les conditions décrites précédemment. Bien que les sonications aient été menées comme indiqué plus haut, les différentes fractions de sonicat ont ensuite été rassemblées pour constituer l'innoculat. Vingt-cinq boîtes ont été ensemencées en surface avec 100 μL de sonicat non dilué, vingt-cinq autres en profondeur avec le même volume d'innoculat. Les résultats des dénombrements après 7 jours d'incubation à 22 °C sont présentés dans le tableau 1.

Tableau 1 : paramètres descriptifs des distributions de dénombrements de bactéries pour des lots de 25 ensemencements en surface (S) et en profondeur (P) sur milieu R2A.

	S	P
Moyenne	173,2	179,2
Ecart-type	19,8	36,4
Coefficient de Variation (%)	11,5	20,3
Minimum	132,0	121,0
Maximum	207,0	245,0
Mediane	174,0	171,0
1er quartile	166,0	158,0
3eme quartile	186,0	210,0

Homogénéité des incubateurs

Première série d'essais.

Afin d'obtenir du biofilm en grande quantité, deux incubateurs ont été alimentés à un débit de 0,8 L/min, respectivement 3 et 5 jours sur l'eau préfiltrée de l'usine de Joinville le Pont. Connaissant déjà la meilleure répétabilité des ensemencements en surface, 10 μL de sonicat complétés à 100 μL avec de l'eau de qualité HPLC stérile étaient inoculés de la sorte.

Les résultats en Unités Formant Colonies (UFC)/cm² sont présentés sur les figures 1 et 2 pour les différentes fractions de 14 g de billes prélevées de haut en bas, la fraction 1 étant celle située en sortie d'incubateur.

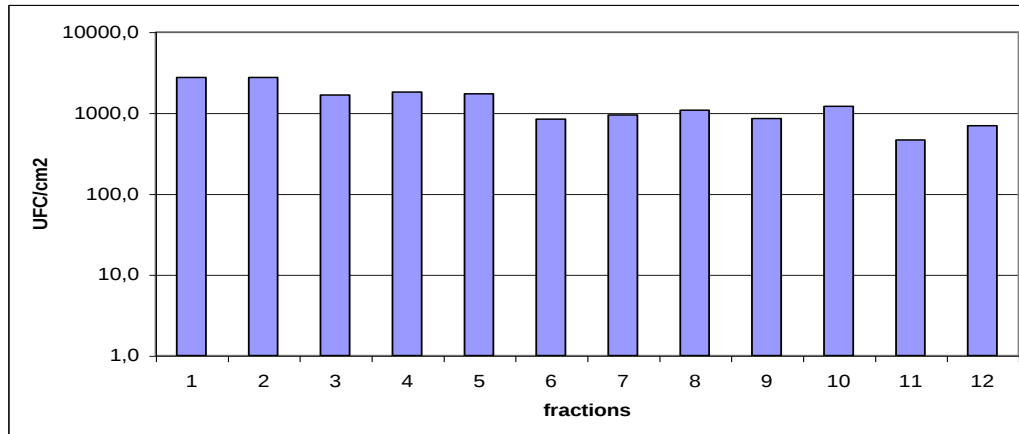


Figure 1 : densités de biofilm pour les différentes fractions d'une colonne colonisée 3 jours par de l'eau préfiltrée à un débit de 0,8 L/min.

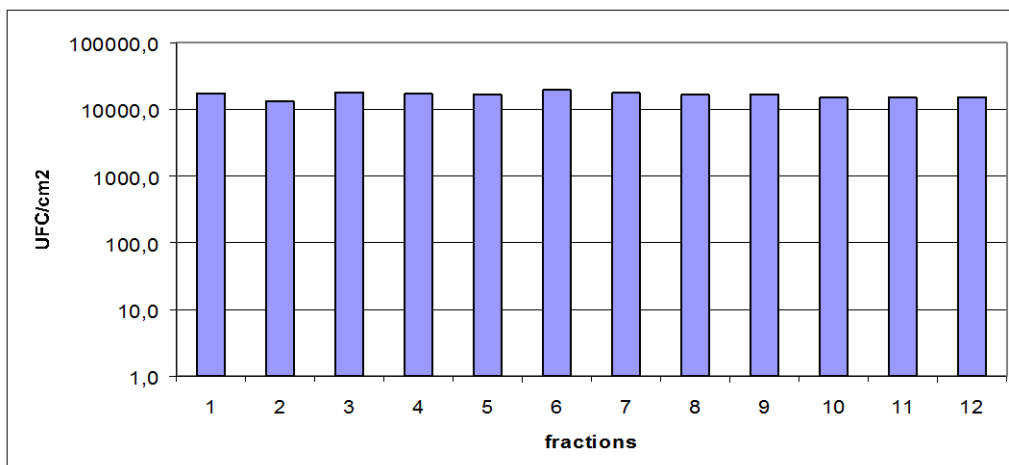


Figure 2 : densités de biofilm pour les différentes fractions d'une colonne colonisée 5 jours par de l'eau préfiltrée à un débit de 0,8 L/min.

Seconde série d'essais.

Un incubateur a été branché pendant 14 jours sur l'eau produite quittant l'usine. Il était alimenté à un débit de 6 L/min, afin de se placer dans des conditions de vitesse les plus proches possibles de celles existant en réseau de distribution (0,5 m/s). Les résultats en UFC/cm² sont présentés sur la figure 3 pour les différentes fractions.

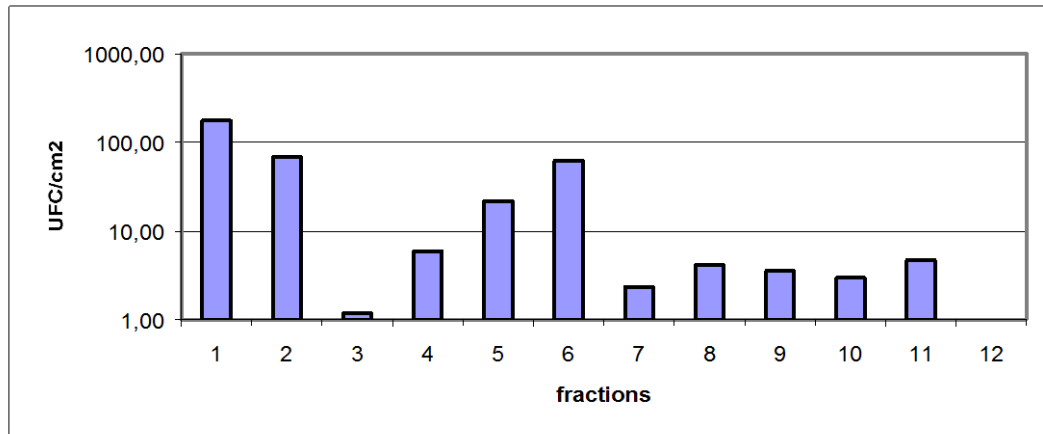


Figure 3 : densités de biofilm pour les différentes fractions d'une colonne colonisée 14 jours par de l'eau produite à un débit de 6 L/min.

Sur ce même incubateur, une mesure de COT après regroupement des différentes fractions de sonicat donne une valeur de 7,5 ppm alors qu'en moyenne le COT de l'eau produite est de 1 ppm.

DISCUSSION.

Comparaison des deux modes d'ensemencements.

La figure 4 a été établie de la façon suivante :

- la hauteur du rectangle correspond à l'écart interquartile, intervalle contenant 50 % des valeurs, et dont il est évident que plus il est réduit moins les valeurs sont dispersées
- les barres supérieures et inférieures correspondent quant à elles aux valeurs maximales et minimales observées pour chacune des deux méthodes à comparer.

Il apparaît alors très clairement que, si les ensemencements en surface et en profondeur donnent des résultats du même ordre, la première technique présente néanmoins une variabilité très inférieure. Ceci est confirmé par l'utilisation d'un test F où F_{cal} (3.38) est supérieur à $F_{0.995}$ (2.97), valeur tabulée de la loi F avec 24 degrés de liberté et un niveau de signification α de 0.01 (test bilatéral).

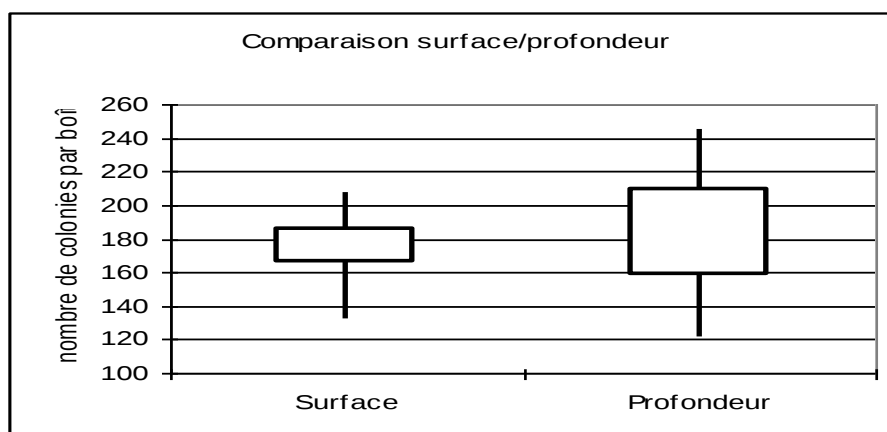


Figure 4 : comparaison surface/profondeur.

Homogénéité des incubateurs.

Après 3 et 5 jours d'exposition à de l'eau préfiltrée, les incubateurs sont colonisés de façon homogène de bas en haut. Deux jours de colonisation supplémentaires par ce type d'eau ont de plus permis une augmentation d'environ 1 log du nombre de bactéries fixées.

Au moins dans certaines conditions de vitesse et de débit d'alimentation, les incubateurs fabriqués par la SAGEP permettent donc de travailler sur l'intégralité d'une surface de 750 cm² colonisée de manière homogène.

Les résultats obtenus sur l'eau produite restent à confirmer en suivant des cinétiques de formation des biofilms sur ce type d'eau tout en continuant à fractionner les colonnes pour les ensemencements. Néanmoins, ceux qui sont exposés ici laissent penser qu'à des débits d'alimentation de l'ordre de 6 L/min, la colonisation se fait préférentiellement dans la seconde moitié de la colonne, c'est à dire en sortie. Une étude menée sur des cylindres de verre disposés dans une colonne alimentée par de l'eau traitée à 0,2 m/s ne met par contre en évidence aucune influence de la position des surfaces à coloniser au sein de l'incubateur sur les densités de biofilms obtenues [20]. Si elle se confirme, c'est donc à des phénomènes de pertes de charge ou de turbulences dues à la présence des billes sur l'ensemble de la section d'une colonne que pourrait sans doute être attribuée une telle observation. Il est possible en effet que les billes exposées en entrée soient soumises à des contraintes hydrodynamiques particulièrement défavorables à la fixation des bactéries.

CONCLUSION.

Les comparaisons réalisées entre ensemencements en profondeur et étalements en surface prouvent clairement que cette seconde méthode est la plus précise. Elle présente en outre l'avantage de former des colonies nettement plus distinctes que lors d'ensemencements en profondeur. Pour la suite de cette étude sur les biomasses fixées en réseaux de distribution, c'est donc la technique d'étalement en surface qui sera employée, selon le protocole exposé plus haut.

D'autre part, il apparaît pour le moment difficile de se placer sur l'eau produite à des conditions cinétiques équivalentes à celles prévalant en réseau de distribution. Les incubateurs seront désormais alimentés à des débits de l'ordre de 1L/min assurant une bonne homogénéité de colonisation.

Dans l'avenir, de nombreux paramètres testés actuellement vont peu à peu être intégrés à ce protocole d'estimation des biomasses fixés dont des mesures de protéines et de COT fixé ainsi que des numérations bactériennes par épifluorescence.

REMERCIEMENTS.

Nous tenons à remercier G.Hergat et T.Laprée pour la réalisation des incubateurs.

REFERENCES.

- [1] Mathieu *et al.*, « Paramètres gouvernant la prolifération bactérienne dans les réseaux de distribution », Revue des sciences de l'eau, 5, 91-112, 1992.
- [2] Nakache *et al.*, « Evolution dans un réseau de distribution des micro-organismes et d'un nutriment : le CODB. Incidence du temps de transit », Revue des sciences de l'eau, 4, 499-521, 1996.

- [3] U.S.Environmental Protection Agency, « Control of biofilm growth in drinking water distribution systems », Seminar Publication, 1992.
- [4] Stewart *et al.*, « Quantitative observations of heterogeneities in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms », *Appl.Environ.Microbiol.*, 59, 1, 327-329, 1993.
- [5] Stewart *et al.*, « Biofilm structural heterogeneity visualized by three microscopic methods », *Wat.Res.*, vol 29, 8, 2006-2009, 1995.
- [6] Murga *et al.*, « Quantitative analysis of biofilm thickness variability », *Biotechnology and bioengineering*, 45, 503-510 1994.
- [7] Levi, « Les paramètres influençant le développement des germes dans les réseaux d'eau potable », *TSM*, 3, 240-245, 1995.
- [8] Lee et Deininger, « Survival of bacteria after ozonation », *Ozone science & engineering*, 22, 65-75, 1999.
- [9] Ridgway et Olson, « Chlorine resistance patterns of bacteria from two drinking water distribution systems », *Appl.Environ.Microbiol.*, 44, 4, 972-987, 1982.
- [10] Wierenga, « Recovery of coliforms in the presence of a free chlorine residual », *J.Am.Water Works Assoc.*, Novembre 1985, 83-88, 1985.
- [11] Volk *et al.*, « Effects of ozone on the production of Biodegradable Dissolved Organic Carbon (BDOC) during water treatment », *Ozone Science & Engineering*, 15, 389-404, 1993.
- [12] Van der Kooij, « Assimilable Organic Carbon as an indicator of bacterial regrowth », *J.Am.Water Works Assoc.*, Février 1992, 57-65, 1992.
- [13] Van der Kooij, « Potential for biofilm development in drinking water distribution systems », *Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement*, 85, 39S-44S, 1999.
- [14] Servais *et al.*, « Comparison of the bacterial dynamics in various French distributions systems », *J Water SRT-Aqua*, Vol. 44, 1, 10-17, 1995.
- [15] Lefebvre et Croue, « Modifications de la matière organique lors des traitements conventionnels de potabilisation », *Revue des sciences de l'eau*, 8, 463-479, 1995.
- [16] Servais *et al.*, «Development of a model of BDOC and bacterial biomass fluctuations in distribution systems », *Revue des sciences de l'eau*, 8, 427-462, 1995.
- [17] Reasoner et Geldreich, « A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water », *Appl.Environ.Microbiol.*, 49, 1, 1-7, 1984.
- [18] Mathieu *et al.*, « Influence de la nature des matériaux des canalisations sur la prolifération bactérienne : mise en œuvre des tests anglais et hollandais », *TSM*, 2, 37-45, 1998.
- [19] Piriou, « Avancement des travaux du groupe européen AGHTM/CHA sur la mesure des biomasses fixées », *TSM*, 11, 39-47, 1999.
- [20] Van der Kooij *et al.*, « Biofilm formation on surfaces of glass and teflon exposed to treated water », *Wat.Res.*, vol 29, 7, 1655-1662, 1994.