



AVERTISSEMENT

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

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

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

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

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

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

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

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

UNIVERSITE HENRI POINCARE – NANCY I

2005

ECOLE DOCTORALE « BIOLOGIE SANTE ENVIRONNEMENT »

THESE

Présentée et soutenue publiquement

Le 24 mai 2005



Pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE HENRI-POINCARE – NANCY I

Mention Chimie et Microbiologie de l'Eau

Par Céline BOUTELEUX

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

Sujet :

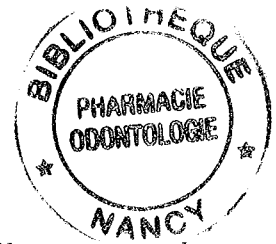
SURVIE D'ENTÉROBACTÉRIES DANS LES EAUX DE DISTRIBUTION : RÔLE DE LA MATIÈRE ORGANIQUE D'ORIGINE ALGALE

DB 31 361

MEMBRES DU JURY

Juges : P. Hartemann (Professeur, Université Henri-Poincaré, Nancy, France)
L. Mathieu (Maître de conférences, Ecole pratique des Hautes Etudes, Paris, France)
J.-C. Block (Professeur, Université Henri-Poincaré, Nancy, France)
M. Djafer (Ingénieur, Générale des Eaux, Paris, France)

Rapporteurs : P. Servais (Professeur, Université libre de Bruxelles, Bruxelles, Belgique)
D. Fontvieille (Professeur, Université de Savoie, Le Bourget du Lac, France)



Remerciements

Je souhaite remercier les organismes partenaires du programme de recherche « Biofilm », qui par leur participation financière, ont permis la réalisation de ces travaux : l'Agence de l'Eau Seine-Normandie, le Centre International de l'Eau de Nancy, la Communauté Urbaine du Grand Nancy, la Générale des Eaux, Véolia et le Syndicat des Eaux d'Ile de France.

Je tiens à exprimer mes remerciements à M. Philippe Hartemann, Directeur du Service d'Etudes et de Recherche en Environnement et Santé, pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire et sous la direction de qui cette thèse a été réalisée.

Je remercie également très vivement Mme Laurence Mathieu pour m'avoir suivie, guidée et accordé tant de temps durant ces quatre dernières années, pour m'avoir fait confiance et m'avoir donné le goût de la recherche scientifique. Merci également d'avoir accepté d'être membre de ce jury.

Mes remerciements vont également à M. Pierre Servais et à M. Dominique Fontvieille pour l'intérêt qu'ils ont bien voulu porter à ce travail en acceptant d'en être les rapporteurs.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude à M. Jean-Claude Block pour les nombreuses réunions ayant permis d'orienter et de structurer ce travail de recherche et pour sa participation à ce jury.

De même, je remercie M. Malik Djafer pour avoir accepté de se joindre à ce jury de thèse.

Merci également à M. Sylvain Fass pour sa convivialité, ses commentaires et ses conseils lors des nombreuses séances de travail.

Je voudrais également associer à ces remerciements M. Jean-Philippe Croué et Mlle Hélène Habarou pour leurs connaissances et leur contribution concernant la caractérisation de la matière organique, ainsi que Mlle Lory Mouchot pour son aide en statistique.

Je remercie chaleureusement tous les membres du SERES, pour leur accueil et leur sympathie avec une mention particulière pour Danièle Pauly, Adrien Ducret et Thomas Josse sans qui une partie de ce travail n'aurait pas pu être effectuée. Merci aussi à Sylvie pour sa bonne humeur.

Pour l'amitié... je tiens à remercier Magali B., Vincent G., Catherine R., Anne B., Marie F., Frédéric M., Sandy S., Céline H., Pascal H. ... pour leur soutien et leurs conseils ainsi que tous les étudiants avec qui il fut agréable de faire un bout de chemin : Magali D., Oussama A., Thomas C., Isabelle B., Damien G. ...

Un grand merci à mes parents, à Stéphanie et Stéphane (et Clément, à sa manière), ainsi qu'à Rémi et Denise pour leur soutien et leurs encouragements permanents.

Enfin, je voudrais dédier ce mémoire à Raynald sans avoir besoin, je crois, d'en écrire plus... Merci.

« Rien ne nous plaît que le combat, mais non pas la victoire... Ainsi dans le jeu, ainsi dans la recherche de la vérité... De même, dans les passions... Nous ne cherchons jamais les choses, mais la recherche des choses. »

Pascal, Pensées, II, 135.

Sommaire général



Liste des publications.....	2
Liste des abréviations	3
Chapitre I. Introduction générale.....	4
Chapitre II. Analyse bibliographique	7
II.1. Les Entérobactéries des eaux de distribution.....	8
II.2. La matière organique des eaux de distribution	46
II.3. Cas particulier de la matière organique d'origine algale (MOA)	61
Chapitre III. Matériel et méthodes.....	78
Chapitre IV. Caractérisation de la matière organique algale (MOA) susceptible d'être présente dans l'eau de distribution lors d'un bloom algal	100
IV.1. Introduction.....	101
IV.2. MOA naturellement sécrétée par les algues (MOA-NS)	102
IV.3. MOA naturellement sécrétée par les algues puis oxydée (MOA-NS-ox)	109
IV.4. MOA issue de l'oxydation d'algues (MOA-ox).....	114
IV.5. Discussion.....	129
Chapitre V. Influence de la MOA sur le comportement d' <i>E. coli</i> dans l'eau potable en absence de bactéries autochtones.....	136
V.1. Introduction.....	137
V.2. <i>Escherichia coli</i> behavior in the presence of organic matter released by algae exposed to water treatment chemicals	138
V.3. Essais complémentaires concernant l'effet de la MOA-Cl ₂ sur <i>E. coli</i>	147
V.4. Comportement d' <i>E. coli</i> en présence de MOA-NS traitée ou non par oxydation	150
V.5. Discussion.....	159
Chapitre VI. Influence de la MOA sur le comportement d' <i>E. coli</i> dans l'eau potable en présence de bactéries autochtones	165
VI.1. Introduction.....	166
VI.2. Effet de la MOA sur le comportement d' <i>E. coli</i> en suspension en conditions statiques	167
VI.3. Effet de la MOA sur le comportement d' <i>E. coli</i> en suspension et fixé en conditions dynamiques	177
VI.4. Discussion.....	187
Chapitre VII. Influence de la MOA sur le comportement des <i>Enterobacteriaceae</i> naturellement présentes dans les eaux potables.....	191
VII.1. Introduction.....	192
VII.2. Quantification des <i>Enterobacteriaceae</i> dans les eaux brutes et les eaux traitées – cas de l'usine E. Imbeaux de Nancy	193
VII.3. Effect of algal organic matter on the behavior of <i>Enterobacteriaceae</i> naturally occurring in drinking water and detected by fluorescent <i>in situ</i> hybridization	202
VII.4. Discussion.....	222
Chapitre VIII. Conclusions générales	225
Chapitre IX. Références bibliographiques	230
Chapitre X. Annexes	247

Liste des publications et communications

Publications publiées et en préparation

- **Bouteleux C., Saby S., Tozza D., Cavard J., Lahoussine V., Hartemann P., and Mathieu L. (2005).** *Escherichia coli* behavior in the presence of organic matter released by algae exposed to water treatment chemicals. *Applied and Environmental Microbiology*. **71**, 2, 734-740.
- **Bouteleux C., Saby S., Tozza D., Cavard J., Lahoussine V., and Mathieu L. (2005).** Influence of algal organic matter on *Escherichia coli* behaviour. *Water Science and Technology: Water Supply*. **4**, 5-6, 399-407.
- **Bouteleux C., Josse T., Pauly D., and Mathieu L.** Effect of algal organic matter on the behavior of *Enterobacteriaceae* naturally occurring in drinking water and detected by fluorescent *in situ* hybridization. Soumis à la revue *Applied and Environmental Microbiology*.
- **Bouteleux C., Hartemann P., and Mathieu L.** Characterization of dissolved organic matter released by *Chlorella* algae after exposure to chlorine and ozone. A soumettre à *Water Research*.

Communications

- **Bouteleux C., Boualam M., Saby S., Gatel D., et Mathieu L. (2003).** Survie de bactéries coliformes en présence de matière organique d'origine algale. Colloque "Au Fil de l'Eau", 10-12 mars, Nancy, France.
- **Bouteleux C., Hartemann P., et Mathieu L. (2004).** Survie d'*Escherichia coli* en présence de matière organique relarguée par des algues après chloration et ozonation. Congrès de la Société Française de Microbiologie, 10-12 mai, Bordeaux, France.
- **Bouteleux C., Hartemann P., et Mathieu L. (2004).** Influence de la matière organique algale sur la survie d'*Escherichia coli*. Congrès de la Société Française de Microbiologie, 10-12 mai, Bordeaux, France.
- **Bouteleux C., Saby S., Tozza D., Cavard J., Lahoussine V., and Mathieu L. (2004).** Influence of Algal Organic Matter on *Escherichia coli* behaviour. Congrès de l'International Water Association, 19-24 septembre, Marrakech, Maroc.

Abbreviations



- AAT : acides aminés totaux
- C : carbone
- COD : carbone organique dissous
- CODB : carbone organique dissous biodégradable
- COP : carbone organique particulaire
- COT : carbone organique total
- DVC : direct viable count
- FISH : fluorescent *in situ* hybridization
- Fluo₄₂₄ : fluorescence émise à 424 nm
- Fluo₄₇₀ : fluorescence émise à 470 nm
- HPSEC : high performance size exclusion chromatography
- MMA : masse moléculaire apparente
- MO : matière organique
- MOA : matière organique algale
- MOA-Cl₂ : matière organique algale issue de la chloration d'algues
- MOA-NS : matière organique algale issue de la sécrétion naturelle des algues
- MOA-NS-Cl₂ : MOA-NS chlorée
- MOA-NS-O₃ : MOA-NS ozonée
- MOA-NS-ox : MOA-NS oxydée
- MOA-O₃ : matière organique algale issue de l'ozonation d'algues
- MOA-ox : matière organique algale issue de l'oxydation d'algues
- MOD : matière organique dissoute
- PM : poids moléculaire
- SUVA₂₅₄ : absorbance UV à 254 nm spécifique (UV₂₅₄/COD)
- UFC : unité formant colonie
- UV : ultraviolet
- UV₂₅₄ : absorbance UV à 254 nm
- UV₂₇₀ : absorbance UV à 270 nm



Chapitre I - Introduction générale

Le maintien de la qualité de l'eau de la sortie de l'usine de traitement jusqu'au robinet du consommateur est une préoccupation majeure des traiteurs et distributeurs d'eau. Malgré l'emploi de désinfectants comme le chlore, plusieurs auteurs ont montré la possibilité de multiplication bactérienne dans le réseau de distribution d'eau potable (Mathieu *et al.*, 1995 ; LeChevallier *et al.*, 1996a ; Servais, 1996 ; Volk et Joret, 1994). Certaines populations bactériennes sont donc capables de s'adapter, transitoirement ou non, aux conditions oligotrophes rencontrées dans les réseaux (LeChevallier *et al.*, 1987 ; LeChevallier, 1990). Ce phénomène peut toucher les indicateurs de contamination microbiologique des eaux, comme *E. coli*, ou des bactéries pathogènes ou pathogènes opportunistes, comme les Entérobactéries, et induire ainsi des infections chez les individus les plus exposés. La présence de tels organismes dans les eaux destinées à la consommation humaine est incompatible avec les exigences de qualité des consommateurs et des autorités sanitaires. Pour être déclarées conformes, les eaux distribuées doivent entre autres, être exemptes d'*E. coli* cultivable sur milieu nutritif gélosé sélectif.

Cette croissance bactérienne a été reliée à plusieurs paramètres tels que la température de l'eau, le pH, la corrosion, le résiduel de chlore ou encore la matière organique dissoute, et particulièrement sa fraction biodégradable (Appenzeller *et al.*, 2001 ; Boualam *et al.*, 2002 ; Camper *et al.*, 1991 ; Colbourne *et al.*, 1991 ; LeChevallier, 1990 ; LeChevallier *et al.*, 1988b, 1991a, 1996a ; Mathieu *et al.*, 1992 ; Sibille *et al.*, 1997 ; Van der Kooij, 1997 ; Volk *et al.*, 1996). Cette dernière est apparue depuis de nombreuses années comme un paramètre déterminant (Servais *et al.*, 1987, 1992a) dans la stabilité microbiologique des eaux puisqu'elle constitue une source de carbone et d'énergie indispensable à la croissance des bactéries hétérotrophes, dont les Entérobactéries. La matière organique dissoute a été largement décrite et caractérisée dans le cas des eaux naturelles (Legube, 1991 ; Legube *et al.*, 1990 ; Martin-Mousset *et al.*, 1997 ; Thurman, 1985) mais, elle est au contraire très mal connue dans le cas des eaux traitées destinées à la distribution. Certains auteurs montrent clairement que la nature des composés organiques change en fonction des traitements (Croué *et al.*, 1993) et de la saison (Croué *et al.*, 1999), sans toutefois établir un lien avec des événements saisonniers singuliers tels qu'une crue ou un bloom algal. Ces épisodes saisonniers pouvant modifier la qualité de la matière organique des eaux brutes et donc des eaux traitées (les traitements conventionnels n'éliminant pas la totalité des composés organiques des eaux brutes) ont été suggérés comme étant un catalyseur de la croissance bactérienne (Boualam *et al.*, 2002 ; LeChevallier *et al.*, 1990b ; Lowther et Moser, 1984). Lake *et al.* (2001) ont d'ailleurs

mis en évidence un lien fort entre la fin d'un bloom algal et la présence de bactéries coliformes dans le système de distribution. La présence dans l'eau traitée des produits excrétés par les algues a été suspectée comme représentant une source nutritionnelle supplémentaire expliquant la recroissance bactérienne en réseau. En effet, les données bibliographiques concernant la caractérisation des matières organiques sécrétées par les algues indiquent une composition atypique des molécules issues de blooms algaux (Kroen et Rayburn, 1984 ; Mathay, 1993) dont la quasi-totalité peut occasionner des phénomènes de croissance d'un large ensemble de populations bactériennes (Jensen, 1983 ; Keil and Kirchman, 1991 ; Maurin *et al.*, 1997), y compris sans doute des Entérobactéries (Ashbold *et al.*, 1997).

Dans ce contexte, les travaux présentés ici ont eu pour objectif d'estimer si la matière organique d'origine algale (MOA), susceptible d'être présente dans l'eau de distribution lors des épisodes de blooms algaux, pouvait contribuer à l'instabilité biologique des eaux potables, particulièrement en terme d'Entérobactéries. Pour ce faire, l'effet de la MOA sur le comportement (croissance, cultivabilité, modification de l'intégrité membranaire) des Entérobactéries (population indigène des eaux ou souches de laboratoire) dans des eaux de distribution où la croissance est généralement limitée par les nutriments carbonés a été estimé. Cette approche a été réalisée grâce à l'utilisation de la méthode FISH (fluorescent *in situ* hybridization) qui a permis de cibler spécifiquement les Entérobactéries parmi la population bactérienne totale sans passer par une étape de culture sur gélose. Deux origines principales de MOA ont été testées :

- La MOA naturellement sécrétée par les algues au cours de leur croissance (susceptible d'être présente dans l'eau de ressource pendant un bloom algal).
- La MOA relarguée par les algues suite à un stress oxydant (chlore ou ozone) (susceptible d'être retrouvée dans l'eau traitée si la filière utilise une étape de préoxydation).

L'idée étant de travailler sur la nature et/ou l'origine des composés organiques, l'eau de réseau a toujours été supplémentée avec des quantités équivalentes de matière organique biodégradable (+0,2 mg CODB L⁻¹ en moyenne) provenant des différents substrats testés (MOA naturellement sécrétée par les algues, MOA relarguée par des algues chlorées ou ozonées, acétate).

L'analyse bibliographique constitue le chapitre II de ce mémoire et fait la synthèse des connaissances actuelles concernant (i) les Entérobactéries des eaux de distribution en insistant sur les facteurs influençant leur survie/croissance dans le réseau, (ii) la matière organique des eaux de distribution (origine et composition), et (iii) le cas particulier de la matière organique d'origine algale (origine, composition, mécanismes d'excrétion, relation avec les bactéries).

Le chapitre III détaille le matériel et les méthodes employés durant ce travail.

Le chapitre IV est consacré à la caractérisation physico-chimique des différentes origines de MOA testées dans les essais et obtenues à partir d'une culture algale de laboratoire. L'objectif de cette partie est de connaître la composition de ces MOA susceptibles d'être retrouvées dans l'eau traitée, de manière à pouvoir les comparer et estimer leur potentiel biodégradable.

Le chapitre V présente l'effet d'un ajout de MOA dans une eau de distribution déchlorée stérile sur le comportement d'*E. coli*, pris comme modèle d'Entérobactéries. Ces essais ont été réalisés en conditions statiques (batch) et en absence de bactérie autochtone pour pouvoir estimer l'effet direct de la MOA sur cette population d'Entérobactéries.

Le chapitre VI évalue l'effet de l'ajout de MOA sur le comportement d'*E. coli* en présence cette fois des bactéries autochtones de l'eau de distribution (non stérile). Des essais en conditions statiques (batch) et dynamiques (réacteurs Propella™) ont été réalisés de manière à étudier l'effet sur les populations planctonique et fixée.

Le chapitre VII décrit l'impact de la MOA sur le comportement des Entérobactéries naturellement présentes dans les eaux potables mais non détectables par les méthodes classiques de culture sur gélose. Ce chapitre est divisé en 2 parties : (i) la mise en évidence de la présence d'Entérobactéries dans les eaux potables grâce à la méthode d'hybridation *in situ* (FISH), et (ii) l'effet de la MOA sur cette sous-population bactérienne des eaux potables.

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

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

Chapitre II - Analyse bibliographique

II.1. Les Entérobactéries des eaux de distribution.....	8
II.1.1. Définition taxonomique et caractères généraux des Entérobactéries.....	9
II.1.2. Méthodes de détection des Entérobactéries dans les eaux potables.....	12
II.1.2.1. Méthodes classiques.....	13
II.1.2.2. Méthodes enzymatiques.....	14
II.1.2.3. Méthodes moléculaires	15
II.1.3. Origine des Entérobactéries dans les eaux de distribution.....	22
II.1.4. Occurrence des Entérobactéries dans les eaux de distribution.....	25
II.1.5. Facteurs influençant la survie/croissance des Entérobactéries dans les eaux de distribution.....	31
II.1.5.1. La température	31
II.1.5.2. Le pH et l'équilibre calco-carbonique	32
II.1.5.3. Les nutriments bactériens.....	34
II.1.5.4. Le type et la concentration de désinfectant.....	38
II.1.5.5. Le régime hydraulique	40
II.1.5.6. Le matériau des canalisations et la corrosion.....	41
II.1.5.7. Le biofilm et l'accumulation de sédiments dans les canalisations.....	42
II.1.5.8. La présence d'autres microorganismes.....	43
II.1.5.9. Les précipitations	45
II.2. La matière organique des eaux de distribution	46
II.2.1. Origine de la matière organique des eaux de distribution.....	47
II.2.1.1. La matière organique des eaux brutes.....	47
II.2.1.1.1. Origine	47
II.2.1.1.2. Composition.....	47
II.2.1.2. Effets des traitements sur la matière organique des eaux brutes.....	51
II.2.1.2.1. La coagulation-floculation-décantation	52
II.2.1.2.2. La filtration	53
II.2.1.2.3. L'oxydation.....	55
II.2.2. Composition de la matière organique des eaux potables	58
II.3. Cas Particulier de la matière organique d'origine algale (MOA)	61
II.3.1. Origine de la MOA	61
II.3.1.1. Sécrétion due au métabolisme.....	61
II.3.1.2. Relargage dû à un stress.....	63
II.3.2. Composition chimique de la MOA	65
II.3.2.1. MOA naturellement sécrétée au cours de la croissance.....	65
II.3.2.2. MOA relarguée après un stress oxydant	68
II.3.3. Facteurs influençant l'excrétion de MOA.....	69
II.3.3.1. Conditions physiologiques et environnementales.....	70
II.3.3.2. Espèces d'algues	71
II.3.4. Mécanismes d'excrétion de la MOA	73
II.3.5. Relation MOA - bactéries	74

II.1. Les Entérobactéries des eaux de distribution

Les réseaux de distribution d'eau potable sont alimentés en continu par des flux de matières organiques et inorganiques, ainsi que par des microorganismes provenant de l'usine de potabilisation mais aussi d'incidents ponctuels sur le réseau lui-même (ruptures d'intégrité, dépassements de traitements, réparations) (Craun, 1980 ; Kirmeyer *et al.*, 2001 ; LeChevallier *et al.*, 1999). Les principales populations représentées sont les bactéries, les virus, les protistes et les macroinvertébrés (Amblard *et al.*, 1996 ; Block *et al.*, 1997, Gauthier *et al.*, 1999a ; Laurent *et al.*, 1993 ; Rose *et al.*, 1988 ; Servais *et al.*, 1995b ; Zacheus *et al.*, 2001). Sont également présents des champignons microscopiques et des levures (Hinzelin et Block, 1985 ; Zacheus *et al.*, 2001) ainsi que des microalgues (Amblard *et al.*, 1996 ; Rizet *et al.*, 1984). Tous ces organismes se retrouvent en proportions variables dans les réseaux, le plus souvent fixés à la surface des matériaux sous forme de microcolonies mélangées à des produits de corrosion et des précipités inorganiques, cet ensemble formant le biofilm (Block, 1989 ; Block et Appenzeller, 2001 ; Haudidier *et al.*, 1988 ; Paquin *et al.*, 1992).

Parmi les microorganismes parvenant dans les réseaux de distribution, les bactéries hétérotrophes s'adaptent aisément aux conditions oligotrophes même en présence d'un résiduel de désinfectant et peuvent représenter jusqu'à 91% de la biomasse totale (Amblard *et al.*, 1996). La présence de ces bactéries peut avoir un impact sur la santé du consommateur puisque certaines présentent un pouvoir pathogène ou pathogène opportuniste (Tableau II.1) pouvant induire des infections (Craun, 1980 ; Lippy et Waltrip, 1984 ; Payment *et al.*, 1991, 1994, 1997) . Cependant, la recherche exhaustive des bactéries indésirables n'étant pas envisageable compte tenu du nombre d'espèces à rechercher, de leurs faibles concentrations et des techniques analytiques souvent longues et d'efficacité limitée, la qualité microbiologique des eaux potables est généralement appréciée par la surveillance d'indicateurs de contamination des eaux (bactéries coliformes, streptocoques fécaux et spores de clostridium sulfito-réducteur). Pour ces raisons, nous avons choisi dans cette étude de nous intéresser plus particulièrement à une famille de bactéries, celle des *Enterobacteriaceae*. En effet, les Entérobactéries revêtent une importance particulière puisqu'une grande partie des bactéries composant cette famille présente un pouvoir pathogène (*Salmonella*, *E. coli*, *Yersinia pestis*...) et que certaines sont utilisées comme indicatrices de contamination fécale des eaux potables (bactéries coliformes) (Joly et Reynaud, 2003). Leur présence dans l'eau potable pose donc des problèmes tant en terme de santé publique qu'en terme de non-conformités. La détection de bactéries coliformes cultivables sur milieu sélectif dans des eaux potables est d'ailleurs une des causes les plus fréquentes de non-conformité sanitaire.

Après avoir détaillé les caractéristiques générales des *Enterobacteriaceae*, ce chapitre a donc pour but de passer en revue les connaissances actuelles sur les méthodes de détection spécifiques de ces bactéries, leur origine et leur occurrence dans les eaux de distribution, ainsi que les facteurs influençant leur survie dans les eaux potables.

Tableau II.1. Principales maladies d'origine hydrique liées à des bactéries (d'après Delarras, 2003 ; Desselberger, 2000 ; EPA, 2002 ; Haslay et Leclerc, 1993 ; OMS, 2004).

Agents bactériens	Maladie	Données épidémiologiques mondiales
<i>Salmonella typhi</i> <i>Salmonella paratyphi A et b</i>	Fièvres typhoïdes et paratyphoïdes	17 millions de cas/an
<i>Shigella dysenteriae</i>	Dysenterie bacillaire	Entre 600000 et 1 million de cas mortels par an en régions tropicales
<i>Shigella sp.</i>	Diarrhées	Cas dans les pays industrialisés
<i>Vibrio cholerae</i>	Choléra	384000 cas par an
<i>Campylobacter jejuni/coli</i>	Campylobactériose (diarrhées)	A l'origine de 5 à 14% des diarrhées dans le monde
<i>Escherichia coli O157:H7</i> <i>Salmonella sp.</i>	Gastro-entérites aiguës et diarrhées	-
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Entérocolite aiguës	-
<i>Legionella pneumophila</i>	Maladie du Légionnaire, fièvre de Pontiac	-
<i>Helicobacter pylori</i>	Gastrites, ulcères gastriques	-
<i>Leptospira sp.</i>	Leptospirose	De 0,1 à 1/100000 habitants sous climats tempérés et 10 ou plus pour 100000 habitants sous climats tropicaux
<i>Chlamydia trachomatis</i>	trachome	360 millions de cas

II.1.1. Définition taxonomique et caractères généraux des Entérobactéries

Taxonomie :

Actuellement, les Entérobactéries sont placées sur la base du séquençage des ARN 5S et 16S dans l'un des 10 groupes formant les Eubactéries, celui des Protéobactéries (Figure II.1). Dans ce groupe, elles appartiennent à la sous-classe gamma. La subdivision des genres et espèces à l'intérieur de la famille des Entérobactéries est basée sur la comparaison des caractéristiques physiologiques, biochimiques, antigéniques et génétiques des bactéries. Même si la classification est en constante évolution, les *Enterobacteriaceae* comptent aujourd'hui près de 140 espèces regroupées en 33 genres identifiés listés dans le tableau II.2 (Joly et Reynaud, 2003).

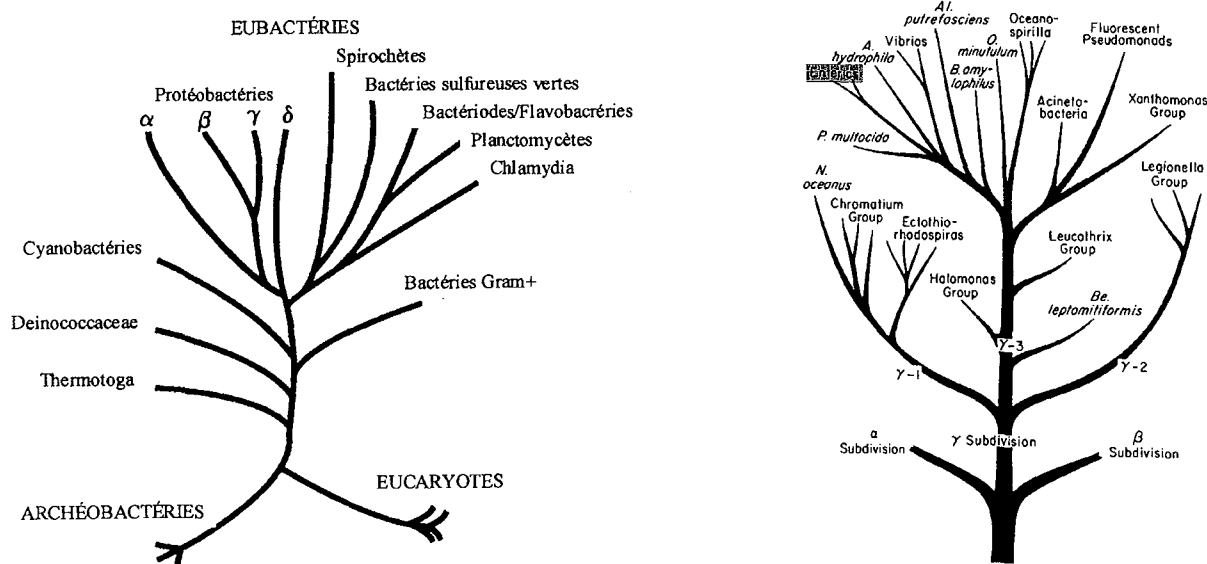


Figure II.1. Arbres phylogénétiques montrant l'évolution et les relations entre les différents groupes bactériens principaux (à gauche) (d'après Zavarzin *et al.*, 1991) et entre les gamma-protéobactéries (à droite) (d'après Woese *et al.*, 1985).

Tableau II.2. Différents genres appartenant aux *Enterobacteriaceae* (d'après Delarras (2003), Joly et Reynaud (2003) et Leclerc *et al.* (2001)). Les astérisques indiquent les genres identifiés comme présentant des espèces de bactéries coliformes.

Genres traditionnels	Genres rares ou récemment décrits
<i>Escherichia</i> *, <i>Shigella</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Citrobacter</i> *, <i>Klebsiella</i> *, <i>Enterobacter</i> *, <i>Serratia</i> *, <i>Hafnia</i> , <i>Proteus</i> , <i>Providencia</i> , <i>Yersinia</i> *, <i>Erwinia</i> , <i>Morganella</i>	<i>Cedecea</i> *, <i>Ewingella</i> *, <i>Pantoea</i> *, <i>Rahnella</i> *, <i>Budvicia</i> *, <i>Buttiauxella</i> *, <i>Khuyvera</i> *, <i>Leclercia</i> , <i>Tatumella</i> *, <i>Moellerella</i> , <i>Trabulsiella</i> *, <i>Yokenella</i> *, <i>Edwardsiella</i> , <i>Leminorella</i> , <i>Pragia</i> , <i>Photorhabdus</i> , <i>Xenorhabdus</i> , <i>Obesumbacterium</i> , <i>Arsenophorus</i> , Groupes entériques ^a 58, 59, 60, 63 et 64, 68, 69

^a souches présentant les caractéristiques des Entérobactéries mais avec des caractères phénotypiques et génomiques n'ayant pas permis de les relier rigoureusement aux autres espèces identifiées.

Caractères généraux :

Les Entérobactéries sont définies par un ensemble de caractères généraux communs. Ce sont des bacilles à Gram négatif, non sporulés, le plus souvent mobiles grâce à une ciliature péritriche, mais immobiles dans le cas des genres *Klebsiella*, *Shigella* et *Yersinia pestis*. Elles sont aérobies-anaérobies facultatives et elles cultivent rapidement sur milieu ordinaire (18 à 24 heures à 37°C). Elles fermentent le D-glucose avec ou sans production de gaz et réduisent les nitrates en nitrites (sauf certaines souches d'*Erwinia* et de *Yersinia*). Elles n'ont pas d'oxydase et possèdent une catalase (sauf *Shigella dysenteriae* sérotype 1) (Joly et Reynaud, 2003).

Les Entérobactéries ont une composition caractéristique des bases constituant leur ADN (GC% compris généralement entre 50 et 60) et possèdent un antigène commun très spécifique appelé couramment antigène de Kunin ou ECA (« enterobacterial common antigen »).

Elles sont chimio-organotrophes, c'est-à-dire qu'elles produisent leur énergie lors de réactions chimiques d'oxydation-réduction et qu'elles nécessitent un substrat organique. De nombreuses espèces sont prototrophes (elles peuvent se multiplier en présence d'une source unique de carbone et d'énergie et synthétiser tous les éléments nécessaires à leur croissance), quelques-unes sont auxotrophes et nécessitent donc la présence d'un ou plusieurs facteurs de croissance (acides aminés ou vitamines) dans leur milieu de culture (Joly et Reynaud, 2003).

Habitat :

Elles sont largement répandues dans l'environnement (sols, végétaux, eau...) et dans l'intestin de l'homme et des animaux. Certaines espèces ont une niche écologique très étroite. Ainsi *Salmonella typhi* (responsable de la fièvre typhoïde) n'est retrouvée que dans l'intestin de l'homme. D'autres, les plus nombreuses, sont ubiquitaires. *Klebsiella pneumoniae* par exemple, très présente dans l'environnement, est aussi retrouvée dans l'intestin de nombreuses espèces de primates (Joly et Reynaud, 2003).

Pouvoir pathogène :

Le pouvoir pathogène des Entérobactéries chez l'homme est considérable. Les infections sont soit bien définies et peuvent concerner tous les sujets, soit non spécifiques touchant les sujets immunodéprimés. Dans le premier cas, les espèces responsables sont précises. Ainsi, *Yersinia pestis* est responsable de la peste, *Salmonella serovar Typhi* de la fièvre typhoïde. Une dizaine d'espèces dont *E. coli*, *Salmonella enterica*, *Shigella sp.* et *Yersinia enterocolitica* sont à l'origine de syndromes diarrhéiques et d'autres infections intestinales. De nombreuses espèces (environ 40) sont impliquées dans des processus infectieux de localisation et de fréquence très diverses. Dans la majorité des cas, l'origine de l'infection est soit endogène à partir des flores bactériennes, soit exogène par ingestion d'aliments ou d'eau contaminés. Par contre, les Entérobactéries sont aussi retrouvées, depuis une vingtaine d'années, dans la moitié des infections nosocomiales. Les espèces responsables sont en majorité *E. coli* mais aussi *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Proteus*, *Providencia* (Joly et Reynaud, 2003).

Les Entérobactéries coliformes :

Parmi cette grande famille des *Enterobacteriaceae*, un groupe, sans aucune signification taxonomique, est d'une importance primordiale pour le microbiologiste de l'eau : c'est le groupe

des bactéries coliformes. Ces bactéries sont en effet utilisées dans le monde entier comme indicateurs de contamination fécale et, à ce titre, ont été retenues par les instances de réglementation comme un des marqueurs de la qualité microbiologique des eaux de distribution et des aliments. A titre d'exemple, pour qu'elle soit déclarée conforme et apte à la consommation humaine, l'eau potable doit être exempte d'*E. coli*. La détection des bactéries coliformes cultivables sur milieu nutritif sélectif dans des eaux potables est une des causes les plus fréquentes de non-conformité sanitaire.

Ces dernières représentent une part importante des Entérobactéries puisqu'environ la moitié des différents genres cités ci-dessus (Tableau II.2) sont des coliformes. Leur classification est basée sur des critères uniquement biochimiques. Leur définition diffère légèrement selon le pays ou l'organisation en charge de surveiller les coliformes (APHA, 1998 ; AFNOR, 1990). Les pays européens utilisent une définition proposée par l'Association Française de Normalisation (AFNOR, 1990) qui décrit les coliformes comme des bacilles non sporulés, gram-négatifs, oxydase-négatifs, aérobies ou anaérobies facultatifs, capables de pousser en présence de sels biliaires ou de tout autre agent de surface ayant des propriétés équivalentes et aptes à fermenter le lactose, avec production de gaz et d'acide en 48 heures à $37 \pm 1^\circ\text{C}$.

Si la majorité des bactéries coliformes sont des organismes issus des fèces de l'homme et des animaux à sang chaud, certaines espèces comme *Serratia fonticola*, *Enterobacter intermedium*... sont aussi présentes naturellement dans les environnements aquatiques et proviennent uniquement d'eaux ou de sols non exposés aux activités anthropiques (Kreig, 1984). Les bactéries coliformes d'origine fécale ne sont pas autochtones des milieux oligotrophes. En effet, il est généralement admis que ces bactéries requièrent pour croître des concentrations en nutriments plus importantes que celles nécessaires aux bactéries hétérotrophes autochtones des réseaux de distribution d'eau potable (LeChevallier et McFeters, 1985a).

II.1.2. Méthodes de détection des Entérobactéries dans les eaux potables

Les méthodes classiques de détection des Entérobactéries dans les eaux de distribution sont basées sur une étape de culture. Or, plusieurs études ont montré l'existence de bactéries, dont des Entérobactéries, viables mais non cultivables (VNC) dans les échantillons environnementaux, remettant ainsi en cause l'association non-cultivable/non-viable (Federighi, 2004 ; Grimes et Colwell, 1986 ; Kell *et al.*, 1998 ; McDougald *et al.*, 1998 ; Montfort et Baleux, 1999 ; Oliver, 2000 ; Pommepuy *et al.*, 1996 ; Roszak et Colwell, 1987 ; Steinert *et al.*, 1997). En effet, au sein d'une population bactérienne, se retrouvent en proportions variables des bactéries cultivables, mortes et, entre ces deux extrêmes physiologiques, des bactéries plus ou moins actives, des

bactéries dormantes, blessées ou stressées (Maul *et al.*, 1989). Plusieurs méthodes ont donc été développées pour évaluer le statut physiologique des bactéries. Ces méthodes, principalement basées sur l'étude de la perméabilité membranaire, de l'intégrité des acides nucléiques, de la mesure d'activités enzymatiques (respiration, capacité d'élongation en présence d'inhibiteur de la division)..., ne sont cependant pas spécifiques d'une espèce, d'un genre ou d'une famille de bactéries comme les *Enterobacteriaceae*. Pour cette raison, plusieurs auteurs ont développé des techniques enzymatiques, immunologiques et plus récemment des méthodes moléculaires (PCR et hybridation *in situ*) permettant de cibler un groupe phylogénétique précis. Toutes ces techniques appliquées aux *Enterobacteriaceae* dans les eaux potables, et particulièrement aux coliformes, ont fait l'objet d'une revue de Rompré *et al.* (2002) et ne seront que brièvement décrites ici. Seule l'hybridation *in situ* qui a été utilisée dans ce travail sera détaillée.

II.1.2.1. Méthodes classiques

Les méthodes classiques sont basées sur la capacité des Entérobactéries à cultiver sur ou dans des milieux nutritifs. En eau de distribution, les deux techniques principales utilisées pour dénombrer les bactéries coliformes (seules Entérobactéries recherchées en contrôle sanitaire) sont la technique d'ensemencement en milieu liquide et la technique par filtration sur membrane (AFNOR, 1985, 2000a), cette dernière étant la plus utilisée.

Ces méthodes présentent l'avantage d'être faciles à mettre en œuvre et peu coûteuses. La première est utile en présence d'eau turbide ou colorée, tandis que la deuxième permet l'analyse de grands volumes d'eau augmentant ainsi la sensibilité et la fiabilité. Cependant, ces deux techniques présentent des inconvénients, dont le principal est un long temps de réponse (jusqu'à 96h pour la détermination du NPP en milieu liquide). De plus, plusieurs interférences (densité forte en coliformes ou en hétérotrophes totales, nature du milieu) ont été mises en évidence et contribuent à sous-estimer l'abondance des coliformes dans l'échantillon (Burlingame *et al.*, 1984 ; Clark, 1980 ; Evans *et al.*, 1981 ; Mc Feters *et al.*, 1982 ; Seidler *et al.*, 1981). Mais le problème majeur de cette technique est son inefficacité à détecter les bactéries viables mais non cultivables, état pouvant être induit par une multitude de facteurs chimiques ou physiques au cours du traitement de potabilisation. Certains milieux de culture comme le m-T7 ont été créés spécifiquement pour détecter les coliformes blessés dans l'eau potable (LeChevallier *et al.*, 1993). Cependant, même si plusieurs études ont montré que ce milieu permettait de détecter plus de bactéries coliformes (LeChevallier *et al.*, 1983 ; McFeters *et al.*, 1986), son efficacité est controversée et dépendrait de la nature du stress ayant engendré la non cultivabilité sur milieu classique (Adams *et al.*, 1989 ; Rice *et al.*, 1987).

II.1.2.2. Méthodes enzymatiques

Certaines enzymes sont spécifiques d'un groupe, d'un genre ou d'une espèce de bactéries. Pour cette raison, la possibilité de détecter les Entérobactéries grâce à des activités enzymatiques spécifiques a été étudiée depuis maintenant quelques années. Deux enzymes ont été particulièrement ciblées pour détecter spécifiquement certaines populations d'*Enterobacteriaceae* : la β -D-glucuronidase et la β -D-galactosidase respectivement spécifique d'*E. coli* et des coliformes. Certains substrats artificiels libèrent, sous l'action de ces enzymes, des composés colorés ou fluorescents pouvant être détectés par spectrophotométrie ou fluorométrie. Les différents substrats utilisés sont présentés au tableau II.3.

Tableau II.3. Différents substrats chromogéniques et fluorogéniques utilisés pour détecter *E. coli* ou les coliformes totaux (d'après Rompré *et al.*, 2002).

Substrats utilisés pour détecter la présence de β -D-glucuronidase (<i>E. coli</i>)	Substrats utilisés pour détecter la présence de β -D-galactosidase (coliformes totaux)
<u>Substrats chromogéniques</u> • indoxyl-β-D-glucuronide (IBDG) • complexe phenolphthaléine-mono-β-D-glucuronide • 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-glucuronide (X-Glu)	<u>Substrats chromogéniques</u> • o-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside (ONPG) • p-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside (PNPG) • 6-bromo-2-naphtyl-β-D-galactopyranoside • 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside (X-Gal)
<u>Substrats fluorogéniques</u> • 4-méthylumbelliferyl-β-D-glucuronide (MUGlu)	<u>Substrats fluorogéniques</u> • 4-méthylumbelliferyl-β-D-galactopyranoside (MUGal)

Ces substrats ont été incorporés dans certains milieux de culture liquides ou solides permettant ainsi une confirmation immédiate de la présence d'*E. coli* ou des coliformes. Plusieurs tests commerciaux basés sur ces techniques enzymatiques se sont développés : Colilert (Laboratoires IDEXX, Portland, ME, USA), Colisure (Millipore corporation, Bedford, MA, USA), ColiQuick (Hach, Loveland, CO, USA), Chromocult Coliform Agar (Merck, Darmstadt, Allemagne), Fluorocult *E. coli* Direct Agar (Merck) et le bouillon m-ColiBluc24 (Hach) (Rompré *et al.* 2002). Ces tests enzymatiques ne permettent pas toujours d'augmenter la sensibilité mais ils sont plus spécifiques que les méthodes classiques, faciles à mettre en œuvre et abaissent le temps d'incubation (Rompré *et al.*, 2002). Cependant, ils sont plus coûteux et ne résolvent pas le problème de la détection des bactéries viables non cultivables.

Certains chercheurs ont alors développé des techniques enzymatiques directes et rapides qui ne nécessitent pas d'étape de culture (Berg et Fiksdal, 1988 ; Davies *et al.*, 1995 ; George *et al.*, 2000). La suppression de cette étape de culture a permis d'abaisser considérablement le temps de réponse des méthodes : George *et al.* (2000) ont par exemple développé un protocole utilisant les substrats MUGal et MUGlu permettant la détection des coliformes dans les eaux douces en 30

minutes. Même si ces méthodes se sont avérées efficaces pour estimer rapidement le niveau de contamination des eaux de surface, leurs limites de détection (20 UFC/100 mL pour les coliformes fécaux et 340 UFC/100 mL pour les coliformes totaux) excluent leur utilisation en eau de distribution.

L'utilisation de ces méthodes enzymatiques couplées à une détection par cytométrie en phase solide semble plus prometteuse pour l'étude des eaux potables en permettant de concentrer les échantillons par filtration et de détecter la fluorescence émise grâce à un dispositif laser (ScanRDI® - Chemunex, Ivry-sur-Seine, Paris) (Van Poucke et Nelis, 2000a, b). Ces auteurs proposent un test permettant la détection d'*E. coli* et des coliformes totaux en 3,5 h avec une limite de détection comprise entre 1 et 1000 cellules sur le filtre.

II.1.2.3. Méthodes moléculaires

Les méthodes moléculaires ont été développées pour augmenter la rapidité d'analyse. Elles sont capables d'atteindre un haut niveau de sensibilité et de spécificité sans recourir à une étape de culture.

II.1.2.3.1. Méthodes immunologiques

Les méthodes immunologiques sont basées sur la reconnaissance spécifique d'un antigène par un anticorps et peuvent donc être spécifiques d'une famille, d'un genre, ou même d'un sérotype particulier. Les propriétés du complexe antigène-anticorps peuvent être utilisées (i) pour effectuer une immunocapture des cellules ou des antigènes grâce à la technique ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), et (ii) pour détecter des cellules par immunofluorescence ou par une technique immuno-enzymatique (Rompré *et al.*, 2002).

Pour détecter spécifiquement les *Enterobacteriaceae*, les auteurs ont principalement utilisé l'antigène commun ECA (« enterobacterial common antigen »). Obst *et al.* (1989) ont développé un test ELISA à l'aide d'un anticorps monoclonal dirigé vers cet antigène commun ; mais, une étape de culture de 24 h dans un bouillon nutritif était nécessaire pour atteindre la limite de détection du test (10^5 cellules mL⁻¹). La méthode ELISA, rapide, simple et plutôt sensible puisqu'elle permet de détecter moins de 10^{-9} g d'antigène (Stryer, 1988), s'est avérée très pratique pour détecter des bactéries inoculées dans un milieu, mais son utilisation au sein d'un environnement naturellement contaminé en Entérobactéries, reste limitée, principalement à cause des problèmes de spécificité de l'ECA, certaines études ayant montré que des souches d'*Aeromonas*, de *Pseudomonas*, ou de

Bacillus provoquaient une réponse positive (Hanai *et al.*, 1997 ; Hübner *et al.*, 1992 ; Levasseur *et al.*, 1992).

Les techniques d'immunofluorescence ont l'avantage de détecter spécifiquement une cellule à l'intérieur d'échantillons naturels (Campbell, 1993 ; Hoff, 1993). Un fluorochrome est greffé à l'anticorps choisi et le dénombrement des cellules fluorescentes peut se faire facilement par microscopie en épifluorescence ou cytomètre en phase solide après filtration de l'échantillon, ou par cytométrie en flux. Zacccone *et al.* (1995) ont montré que la technique par filtration et détection en épifluorescence appliquée à des eaux naturelles permettait de dénombrer deux fois plus de coliformes fécaux que la méthode de culture classique. Cependant, ils reportent qu'il existe un seuil en dessous duquel cette méthode n'est pas applicable (si les bactéries ciblées représentent moins de 1% de la population totale). De plus, ces techniques d'immunofluorescence ne fournissent aucune information sur l'état physiologique des bactéries détectées. Rockabrand *et al.* (1999) ont alors développé une technique basée sur le dosage de trois protéines cytosoliques (Dna K, Dps et Fis) spécifiques de divers états physiologiques chez les Entérobactéries. Cependant, aucune étude n'a utilisée cette méthode sur des eaux potables.

Le problème principal des techniques immunologiques appliquées à l'eau potable étant la faible quantité de bactéries spécifiques à cibler, certains auteurs ont développé une technique de séparation magnétique permettant de purifier et de concentrer les bactéries cibles de l'échantillon. Cette méthode utilise des billes magnétiques sur lesquelles sont greffés des anticorps mono-ou polyclonaux. Même si cette méthode n'a été que très peu étudiée dans les eaux potables, Pyle *et al.* (1999), en combinant cette technique avec une détection au cytomètre en phase solide, ont montré qu'elle permettait de mettre en évidence plus d'*E. coli* O-157:H7 (utilisation d'anticorps anti-O157 de lapin) que les méthodes classiques.

II.1.2.3.2. Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

La PCR permet d'amplifier des séquences d'ADN par répétition de réactions d'élongation en présence d'une ADN polymérase et d'amorces nucléotidiques spécifiques. La spécificité de détection dépend du degré d'homologie et de la complémentarité entre la cible et l'amorce ainsi que de la température d'hybridation. Cette amplification permet de détecter une séquence rare ou un faible nombre de bactéries cibles dans un échantillon (Bej *et al.*, 1990 ; Burtscher *et al.*, 1999 ; Waage *et al.*, 1999a, b). La méthode de PCR la plus utilisée est basée sur l'amplification *in vitro* de séquences nucléiques obtenues après une étape d'extraction qui peut être réalisée sur des cellules

retenues sur un filtre permettant de concentrer les échantillons (Bej *et al.*, 1991a ; Iqbal *et al.*, 1997 ; Juck *et al.*, 1996 ; Tsen *et al.*, 1998). Les produits amplifiés sont généralement détectés après électrophorèse sur gel d'agarose et marquage par un fluorochrome ou par hybridation avec une sonde marquée. Depuis une dizaine d'années, de nombreux protocoles ont été développés pour détecter les *Enterobacteriaceae*. Les principales études sont reportées au tableau II.4.

Le développement d'amorces spécifiques des bactéries coliformes a été difficile car ce groupe de bactéries inclut plusieurs genres bactériens n'ayant pas forcément de liens taxonomiques. Les auteurs se sont donc focalisés sur l'utilisation d'amorces ciblant le gène *lacZ* (responsable de la production de la β -galactosidase) (Bej *et al.*, 1990, 1991a, b ; Fricker et Fricker, 1994). Ces études ont permis de détecter jusqu'à 1 coliforme pour 100 mL (Bej *et al.*, 1990, 1991a) mais ont démontré que ces amorces ne permettaient pas de discriminer spécifiquement les coliformes ; en effet, certaines autres espèces d'*Enterobacteriaceae* (quelques souches d'*Hafnia alvei* et de *Serratia odorifera*) s'hybrident avec les amorces et donnent des résultats positifs (Fricker et Fricker, 1994). De même, la plupart des amorces utilisées pour détecter spécifiquement *E. coli* réagissent aussi positivement avec plusieurs espèces de *Salmonella* ou *Shigella* (Bej *et al.*, 1990, 1991a, 1991b ; Fricker et Fricker, 1994 ; Iqbal *et al.*, 1997 ; Juck *et al.*, 1996 ; Spierings *et al.*, 1993 ; Tsai *et al.*, 1993 ; Tsen *et al.*, 1998).

Pour augmenter la spécificité, certains auteurs ont proposé la PCR multiplex qui consiste à amplifier simultanément différents fragments d'ADN (Bej *et al.*, 1991a, b) ou encore la nested-PCR qui induit deux étapes consécutives d'amplification. Cette dernière a été utilisée pour détecter plusieurs *Enterobacteriaceae* dans l'eau (Juck *et al.*, 1996 ; Waage *et al.*, 1999a,b). Elle permet une détection rapide (6-8 h) puisque l'étape qui confirme que la séquence amplifiée est correcte (par hybridation de sondes) n'est plus nécessaire.

Malgré leur grande sensibilité, les techniques de PCR ne permettent pas de quantifier les bactéries détectées. La méthode la plus prometteuse est la PCR en temps réel qui permet de mesurer la fluorescence des produits formés pendant les différents cycles d'amplification. Cette technique, déjà testée sur des échantillons cliniques, a montré une plus grande rapidité, ainsi qu'une meilleure sensibilité et spécificité par rapport à la PCR qualitative classique (Bellin *et al.*, 2001). Cependant, en plus des problèmes d'inhibition régulièrement décrits dans les échantillons environnementaux, les techniques de PCR ne fournissent pas d'informations sur l'état physiologique des bactéries détectées.

Tableau II.4. Utilisation de la PCR pour détecter les *Enterobacteriaceae* dans l'eau (adapté de Rompré *et al.*, 2002).

Type de bactérie et références	Type de souche	Amorce	Région amplifiée	Méthode de détection	Limite de détection
<i>Enterobacteriaceae</i>					
Bayardelle et Zafarullah (2002)	Souche pure et isolats cliniques	RFFT7 RFFT8	wec F ^a (103 bp)	Electrophorèse + bromure d'éthidium	1,2 10 ² cellules mL ⁻¹
<i>Coliformes totaux</i>					
Bej <i>et al.</i> (1990)	Souches pures	ZL-1675 ZR2025	lacZ ^b (326 bp)	Electrophorèse + sondes radioactives	1-5 UFC
Bej <i>et al.</i> (1991a et b)	Souches pures	LZL-389 LZR653	lacZ ^b (264 bp)	Electrophorèse + sondes radioactives	1 cellule (PCR multiplex)
Fricker et Fricker (1994)	Souches pures	LZL-389 LZR653	lacZ ^b (264 bp)	Electrophorèse	-
<i>E. coli</i>, <i>Salmonella spp.</i>, <i>Shigella spp.</i>					
Bej <i>et al.</i> (1990)	Souches pures	BL-4910 BR-5219	lamB ^c (309 bp)	Electrophorèse + sondes radioactives	1-5 UFC
<i>E. coli</i>, <i>Shigella spp.</i>					
Bej <i>et al.</i> (1991a et b)	Souches pures	UAL-1939 UAR-2105 URL-301 URR-432	uidA ^d (147bp) uidR ^d (154 bp)	Electrophorèse + sondes radioactives	1 cellule (PCR multiplex)
Spierings <i>et al.</i> (1993)	Souches pures	EC5 EC8c2	phoE ^e (348 bp)	Electrophorèse + sondes radioactives	-
Fricker et Fricker (1994)	Souches pures	URL-301 URR-432	uidR ^d (154 bp)	Electrophorèse	-
Juck <i>et al.</i> (1996)	Souches pures	uidA 858 uidA 1343 uidA 1047 uidA 1232	uidA ^d (486 bp) uidA ^d (186 bp)	Electrophorèse	2-20 cellules /100 mL (nested PCR)
Iqbal <i>et al.</i> (1997)	Souches pures et eaux de rivière polluées	UAL-1939 UAR-2105 URL-301 URR-432	uidA ^d (147 bp) uidR ^d (154 bp)	Electrophorèse + sondes radioactives	-
Tsen <i>et al.</i> (1998)	Souches pures	16E1 16E2 16E3	Régions V3 et V6 (584 bp)	Electrophorèse + sondes non-isotopiques	1-2 cellules /100 mL
<i>E. coli</i>					
Bayardelle et Zafarullah (2002)	Souche pure et isolats cliniques	ECA1 ECA2 RFFT17 RFFT18	wec A ^a (763 bp) wec F ^a (178 bp)	Electrophorèse + bromure d'éthidium	1,2 10 ² cellules mL ⁻¹
<i>Salmonella</i>					
Waage <i>et al.</i> (1999a)	Isolats environnementaux et cliniques	SAL-IF SAL-2R SAL-3F SAL-4R	ST14 (438 bp) ST11 (312 bp)	Electrophorèse	2 UFC (nested PCR)

^a gènes codant pour l'antigène commun des *Enterobacteriaceae* (ECA)^b gène responsable de la production de la β -D-galactosidase^c gène codant une protéine de surface reconnue spécifiquement par un bactériophage d'*E. coli*^d gènes codant la β -D-glucuronidase^e gène codant pour une protéine de la membrane externe d'*E. coli*II.1.2.3.3. Hybridation *in situ* avec des sondes fluorescentes (FISH)

Cette technique repose sur une des propriétés physico-chimiques des acides nucléiques : la complémentarité des bases constitutives de l'ADN et de l'ARN. Elle a pour but de localiser une séquence particulière de l'acide nucléique (cible) au sein de la cellule (*in situ*) par association

(hybridation) avec une sonde oligonucléotidique de séquence complémentaire. La sonde est marquée avec un fluorochrome permettant ainsi la détection au microscope en épifluorescence (Figure II.2). Généralement, les ARN ribosomaux, et notamment l'ARNr 16S, sont choisis comme cible idéale dans la méthodologie FISH car (i) ils reflètent la lente évolution des bactéries vers les différents phyla bactériens actuels de part leur grande stabilité génétique et offrent donc la possibilité de cibler un groupe phylogénétique particulier, et (ii) les bactéries contiennent des quantités importantes de ribosomes - entre 10^3 et 10^5 par cellule selon les espèces et l'état physiologique des cellules (Amann *et al.*, 1995 ; Delong *et al.*, 1989) - qui sont autant de sites de fixation pour les sondes et qui permettent ainsi d'avoir un signal suffisamment puissant pour visualiser les bactéries au microscope (Woese, 1987).

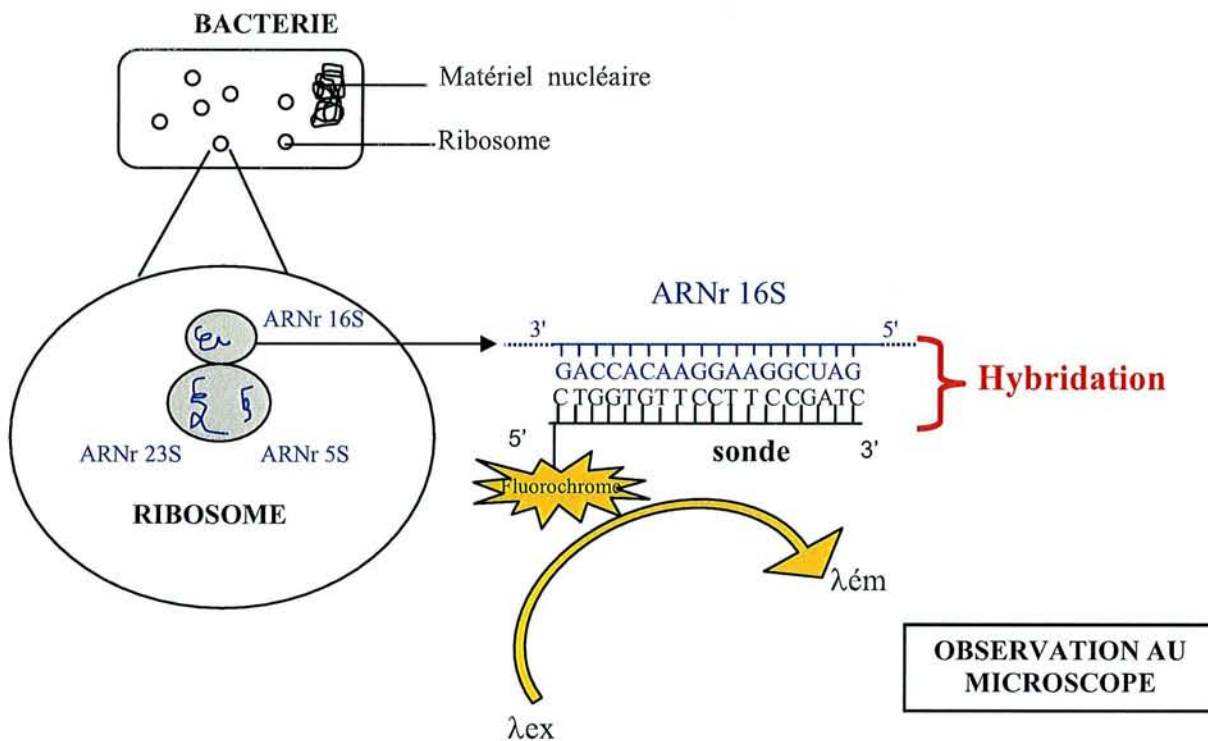


Figure II.2. Principe de la technique FISH (Fluorescent *In Situ* Hybridization).

En pratique, la technique FISH se déroule en cinq étapes successives : choix des sondes, prétraitements de l'échantillon (fixation et perméabilisation), hybridation entre l'ARN ou l'ADN et la sonde, lavage des sondes non spécifiquement hybridées et visualisation au microscope. A l'heure actuelle, plusieurs sondes, décrites au tableau II.5, ont été développées pour détecter spécifiquement les *Enterobacteriaceae*. Divers fluorochromes greffés à la sonde ont été utilisés ; les plus employés sont le TRITC (tetramethyl-rhodamine-isothiocyanate), le FITC (Fluorescein-isothiocyanate) (Amann *et al.*, 1990 ; Delong *et al.*, 1989 ; Manz *et al.*, 1992, 1993 ; Wagner *et al.*, 1994) et plus

récemment les carbocyanines (Cy3 et Cy5) qui ont montré une fluorescence plus intense, plus stable et plus spécifique que les autres fluorochromes (Glockner *et al.*, 1996 ; Kalmbach *et al.*, 1997a ; Ouverney et Fuhrman, 1999 ; Wessendorf et Brelje, 1992 ; Zarda *et al.*, 1997).

Tableau II.5. Principales sondes oligonucléotidiques utilisées pour la détection des *Enterobacteriaceae*. *PNA = peptide nucleic acid.

Sonde	Séquence de la sonde (5'-3')	Position sur l'ARNr	Spécificité théorique	Références
EC1531	CACCGTAGTGCTCGTCATCA	23S, 1531-1550	<i>E. coli</i>	Poulsen <i>et al.</i> (1994)
ENTERO	CATGAATCACAAAGTGGTAAGCGCC	16S, 1458-1482	<i>Enterobacteriaceae</i>	Mittelman <i>et al.</i> (1997)
ENT1	CCGCTTGCTCTCGCGAG	16S, 1273-1289	<i>Enterobacteriaceae</i>	Loge <i>et al.</i> (1999)
Sonde PNA*	GCAAAGCAGCAAGCTC	16S, 71-86	<i>E. coli</i>	Prescott et fricker (1999)
COLINSITU	GAGACTCAAGATTGCCAGTATCAG	16S, 637-660	<i>E. coli</i>	Regnault <i>et al.</i> (2000)
EBAC1790	CGTGTTTGCACAGTGCTG	23S, 1790-1807	<i>Enterobacteriaceae</i>	Bohnert <i>et al.</i> (2000)
-	CATCTGGGCACATCCGATGG	16S	<i>E. coli</i> et bactéries entériques	Tortorello et Reineke (2000)
Sonde PNA*	TCAATGAGCAAAGGT	16S	<i>E. coli</i>	Stender <i>et al.</i> (2001)
Sonde D	TGCTCTCGCGAGGTCGCTTCTCTT	16S, 1251-1274	<i>Enterobacteriaceae</i>	Ootsubo <i>et al.</i> (2002)

Certaines de ces sondes montrent malheureusement une spécificité partielle vis-à-vis des espèces ou des familles qu'elles ciblent. A titre d'exemple, la sonde EC1531 s'hybride non seulement à *E. coli* mais aussi à des espèces de *Shigella*, de *Salmonella* et de *Citrobacter* (Regnault *et al.*, 2000). De même, la sonde COLINSITU décrite par Regnault *et al.* (2000) et ayant pour but de cibler *E. coli* s'hybride également avec *E. fergusonii* et *Shigella spp.* Cependant, cette sonde a récemment été utilisée avec succès pour détecter *E. coli* dans des eaux potables (Delabre *et al.*, 2001). D'après la comparaison de séquences obtenue grâce à la base de données RDP (Ribosomal Database Project) (Maidak *et al.*, 1996), la sonde ENT1 semble montrer une meilleure spécificité vis-à-vis des *Enterobacteriaceae* que la sonde ENTERO (Rompré *et al.*, 2002). Loge *et al.* (1999) ont d'ailleurs testé la spécificité de la sonde ENT1 sur plus de 20 genres bactériens différents (*Enterobacteriaceae* et autres) sans observer d'hybridation non spécifique.

Bien que la méthode FISH puisse être une technique hautement spécifique, elle présente cependant une limite lorsqu'elle est appliquée à la détection de bactéries blessées ou carencées comme celles présentes dans les eaux potables. En effet, l'intensité de fluorescence dépend de la quantité de cibles dans les cellules, c'est-à-dire du nombre de copies d'ARNr. Or, le nombre de ribosomes par bactérie est directement corrélé avec le taux de croissance cellulaire (Amann *et al.*,

1995). Ainsi, il est possible d'être sous le seuil de détection de la méthode pour certaines bactéries contenant peu de ribosomes (Amann *et al.*, 1995 ; Lebaron *et al.*, 1997). Zarda *et al.* (1997) ont toutefois montré que des cellules dormantes (en état de survie suite à une carence nutritive dans un écosystème aquatique) ne contenant que 30 à 50% de leurs ribosomes étaient détectées par FISH.

Pour éviter ce problème de sensibilité due à une trop faible intensité de fluorescence, différents systèmes ont été développés pour amplifier le signal. Parmi eux, on peut citer l'utilisation de plusieurs sondes ayant la même spécificité taxonomique (permettant d'augmenter le nombre de sites de fixation à l'intérieur d'une même cellule) (Amann *et al.*, 1990), le marquage multiple de la sonde, le marquage des sondes à l'aide de systèmes d'amplification enzymatique tels que le complexe biotine-avidine et/ou la HRP (horseradish peroxydase) (Lebaron *et al.*, 1997 ; Schönhuber *et al.*, 1997). Prescott et Fricker (1999) ont proposé l'utilisation d'une sonde PNA (peptide nucleic acid), dans laquelle le pentose est remplacé par une unité peptidique (N-(2-aminoethyl)-glycine), pour détecter *E. coli* dans l'eau potable. Ces sondes PNA présentent plusieurs avantages : elles sont plus résistantes aux nucléases que les sondes ADN, leur hybridation n'est pas dépendante de la concentration en sel, et elles permettent un accrochage plus spécifique rendant possible l'utilisation de sondes plus petites tout en obtenant une meilleure sensibilité.

Même si le contenu d'ARNr est corrélé avec le taux de croissance des bactéries (DeLong *et al.*, 1989 ; Amann *et al.*, 1995), la méthode FISH ne peut pas être considérée comme une technique marqueur de viabilité. En effet, le contenu d'ARNr ne semble pas refléter complètement l'état physiologique des cellules puisque les molécules d'ARNr peuvent rester stables pendant une longue période après la mort de la cellule. A titre d'exemple, McKillip *et al.* (1998) ont montré que les ARNr d'*E. coli* et de *Staphylococcus aureus* étaient encore détectables 48 h après un stress UV ou chaleur. Tolkier-Nielsen *et al.* (1997) ont également montré que le contenu en ARNr évoluait différemment en fonction du stress subit (carence nutritive ou froid). De même, Prescott et Fricker (1999) ont exposé une souche d'*E. coli* à 1,5 mg L⁻¹ de chlore pendant 30 minutes et ont montré que la sonde PNA couplée à un système d'amplification (kit TSA, Perkin Elmer Life Science, Ontario, Canada) était encore capable de détecter les bactéries juste après la chloration alors qu'aucune cellule n'était mise en évidence par la culture sur gélose ou la méthode Colilert. Ceci peut être considéré comme un avantage (si l'on estime que les bactéries non cultivables sont détectées par la méthode FISH) ou comme un inconvénient si ce sont des cellules mortes qui sont mises en évidence.

Une voie possible permettant d'étudier la viabilité de bactéries marquées par la technique FISH a été récemment décrite : il s'agit de coupler la technique DVC (Direct Viable Count) décrite

par Kogure *et al.* (1979) à une détection par FISH (Nishimura *et al.*, 1993 ; Kalmbach *et al.*, 1997b). Cette méthode est basée sur la capacité des bactéries à synthétiser du matériel cellulaire (une des manifestations de la viabilité) mise en évidence par un allongement cellulaire (la division étant bloquée par la présence d'antibiotiques). Elle a été récemment appliquée à la détection d'*E. coli* dans les eaux potables par Delabre *et al.* (2001) qui ont montré la présence d'*E. coli* viables mais non cultivables dans tous les échantillons d'eau potable analysés. Des résultats similaires ont été obtenus par Baudart *et al.* (2002, 2005) qui ont utilisé la sonde ENT1 spécifique des *Enterobacteriaceae*.

En permettant de détecter spécifiquement telle ou telle espèce de bactéries, la technique FISH s'avère très intéressante d'autant qu'elle est facile à mettre en œuvre et qu'elle permet de fournir un résultat dans la journée. De part la possibilité de concentrer les échantillons par filtration sur membrane, des bactéries comme les *Enterobacteriaceae* souvent non cultivables et en quantité faible dans les eaux de distribution peuvent ainsi être détectées.

II.1.3. Origine des Entérobactéries dans les eaux de distribution

Puisque les Entérobactéries ne sont pas souhaitables dans l'eau de distribution compte tenu de leur pouvoir pathogène ou des problèmes de non-conformités vis-à-vis des indicateurs de contamination fécale (coliformes), les traitements de potabilisation visent notamment à éviter la présence de ces bactéries viables dans les eaux potables. Les traitements permettent d'une part d'éliminer une forte fraction des bactéries des eaux brutes (en terme de concentration) et d'autre part d'inhiber ces bactéries grâce à la désinfection. Cependant, malgré cela, des Entérobactéries sont quelquefois détectées dans les eaux de distribution sans que la cause soit forcément identifiée. Deux mécanismes principaux peuvent être responsables de l'introduction des Entérobactéries dans le système de distribution (Besner *et al.*, 2002) :

(i) Passage au travers des traitements

Les Entérobactéries, dont les bactéries coliformes, peuvent se retrouver dans l'eau traitée en passant au travers des traitements de potabilisation. La présence des Entérobactéries n'est que rarement rapportée dans les eaux traitées, cependant leur absence de détection ne signifie pas forcément que l'eau en sortie d'usine en soit exempte. D'une part, l'eau traitée n'est pas microbiologiquement contrôlée en continu, seule une petite fraction de l'effluent de l'usine est analysée et, d'autre part, les bactéries peuvent avoir été blessées par les traitements de désinfection

et ne pas être détectables par les méthodes de culture classiques. Plusieurs études ont en effet montré que l'utilisation de milieux de culture modifiés permettait de détecter les bactéries coliformes blessées (Bucklin *et al.*, 1991 ; Du Preez *et al.*, 1995 ; LeChevallier et McFeters, 1985a ; McFeters, 1990 ; McFeters *et al.*, 1986). A titre d'exemple, Craddock et Castle (1997) ont en moyenne détecté des coliformes blessés dans 10,4% des 173 échantillons d'eaux traitées étudiées (4 usines du Royaume Uni), alors que les tests bactériologiques classiques de routine ont indiqué que seulement 0,6 % des échantillons contenaient des coliformes (Tableau II.6). Ces bactéries blessées peuvent retrouver des conditions favorables et se multiplier en réseau ou simplement redevenir cultivables sur milieux classiques (Grimes and Colwell, 1986 ; Pommeypuy *et al.*, 1996).

Tableau II.6. Fréquences des coliformes isolés en utilisant deux types de milieux bactériologiques (d'après Craddock et Castle, 1997).

Lieu d'échantillonnage	Nombre total d'échantillons analysés	Echantillons contenant des coliformes (milieu MLS**)	Echantillons contenant des coliformes blessés (milieu m-T7*)	Significativité statistique de la différence entre les deux milieux
Sortie d'usine A	25	0 (0%)	0 (0%)	Non significatif
Eau partiellement traitée (usine B)	28	25 (89%)	26 (92,9%)	Non significatif
Sortie d'usine B	32	0 (0%)	4 (12,5%)	p<0,06
Sortie d'usine C	32	0 (0%)	4 (12,5%)	p<0,10
Aqueduc 1 - sortie d'usine D	42	1 (2,4%)	4 (9,5%)	p<0,16
Aqueduc 2 - sortie d'usine D	42	0 (0%)	6 (14,3%)	p<0,02
Système de distribution provenant de l'usine D	74	0 (0%)	2 (2,7%)	Non significatif

* milieu MLS = bouillon au lauryl sulphate (tests de routine pour la détection des coliformes)

** milieu m-T7 = gélose au tergitol 7 (pour la détection des coliformes blessés)

Les Entérobactéries peuvent également passer au travers des traitements grâce à la présence de particules (fines de charbon, invertébrés, protozoaires, nématodes et amphipodes...) qui vont les transporter le long de la filière, les protéger des désinfectants et empêcher leur détection (Besner *et al.*, 2002 ; Morin *et al.*, 1996). A titre d'exemple, Camper *et al.* (1986) ont rapporté que l'étude des particules relarguées par les filtres CAG (charbon actif en grain) montrait que jusqu'à 17% des échantillons contenaient des particules colonisées avec des bactéries coliformes. De même, Schoenen et Hoyer (2000) ont relié la détection de coliformes dans l'eau traitée d'une usine allemande à la présence de larves de moustiques sur les filtres ; ils ont mesuré jusqu'à $2 \cdot 10^7$ coliformes (UFC) par larve. Des études de laboratoire ont également montré que des Entérobactéries telles que *E. coli* ou *Enterobacter cloacae* pouvaient être ingérées par certains

protozoaires, nématodes ou amphitodes et ainsi être protégées de la désinfection (Ding *et al.*, 1995 ; King *et al.*, 1988 ; Levy *et al.*, 1986).

(ii) Pollution dans le réseau

Les Entérobactéries peuvent également être introduites dans l'eau de distribution par des sources extérieures telles que les ruptures d'intégrité du réseau, les interventions humaines (réparation), principalement au moment de contre-pressions transitoires dans les canalisations provoquées par l'arrêt ou le démarrage des pompes (LeChevallier *et al.*, 1999, 2003). Lévi (1995) a schématisé les différents endroits et situations dans lesquels des contaminations peuvent se produire (Figure II.3).

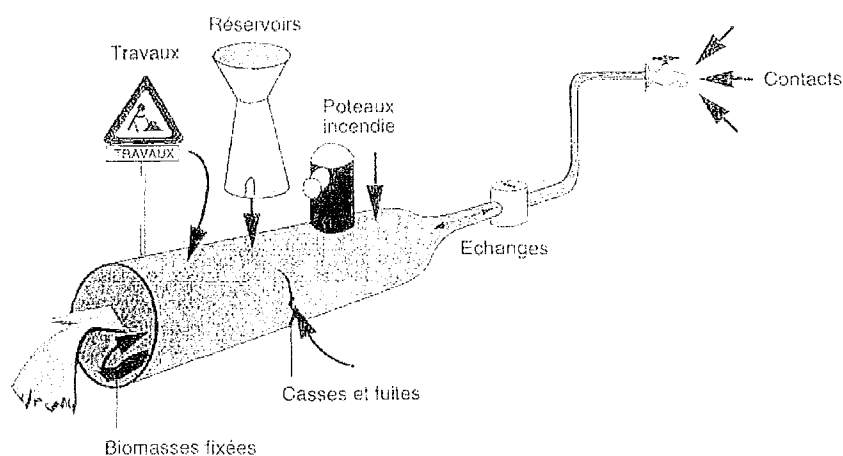


Figure II.3. Lieux de contaminations possibles au sein d'un réseau de distribution d'eau potable (d'après Lévi, 1995).

Parmi les travaux publiés concernant l'intrusion d'Entérobactéries dans les réseaux de distribution, on peut citer l'étude de Geildreich *et al.* (1992) dans laquelle deux ruptures de canalisations ont été suspectées comme source de contamination à l'origine d'une épidémie d'*E. coli* O157:H7 dans le Missouri, qui a causé 243 cas connus de diarrhées et 4 décès.

LeChevallier (1999) a noté que la vitesse du curage (nettoyage hydraulique) d'une canalisation ayant subi des réparations est généralement trop faible pour éliminer complètement la contamination. L'introduction de sédiments contaminés au cours d'une intervention sur une canalisation peut aussi être la cause de l'apparition de coliformes dans l'eau potable (Gauthier *et al.*, 1999b ; LeChevallier *et al.*, 2003).

Les raccordements transversaux (raccordement entre un système d'eau potable et une source non potable) peuvent également être à l'origine des ruptures d'intégrité du réseau (Herrick, 1997).

Les Entérobactéries peuvent être introduites dans les canalisations par refoulement d'eau à travers ces raccordements car une différence de pression est possible. La pénétration d'eaux superficielles ou même d'eaux résiduaires dans un captage, ou la communication entre le réseau d'eau potable et celui des eaux usées peut être source de contamination (Haslay, 1993 ; Lahti et Hiisvirta, 1995). Les tuyaux d'arrosage ainsi que les poteaux incendies ont aussi été cités comme sources fréquentes de contamination (Herrick, 1997 ; Besner *et al.*, 2002).

Enfin, les réservoirs, et particulièrement ceux qui ne sont pas couverts, représentent une source potentielle de contamination fécale des eaux potables par les oiseaux ou autres animaux. LeChevallier *et al.* (1996a) ont ainsi montré que plus il y avait de réservoirs de stockage sur le réseau de distribution, plus la fréquence de détection des coliformes était importante. Un départ d'épidémie de *Salmonella typhimurium* dans le Missouri a été relié à une contamination par des oiseaux d'un réservoir municipal (Clark *et al.*, 1996). Les ouvertures du réservoir étaient inappropriées et permettaient l'accès libre des oiseaux.

II.1.4. Occurrence des Entérobactéries dans les eaux de distribution

Pendant longtemps, on a cru que les Entérobactéries n'étaient présentes en eau potable qu'à la suite d'une contamination du réseau. Cependant, l'isolement sporadique de ces dernières en absence de tout épisode décelable de contamination externe laisse supposer que ces germes sont capables de survivre dans les réseaux de distribution et de se multiplier au sein du biofilm (Camper *et al.*, 1991 ; Fass *et al.*, 1996 ; LeChevallier *et al.*, 1987 ; LeChevallier, 1990 ; Sibille *et al.*, 1998). Ils ont en effet été observés tant en phase eau qu'en phase biofilm et plusieurs études ont montré que ces organismes étaient capables de se maintenir transitoirement en eau de distribution chlorée ou non chlorée (Herson *et al.*, 1987 ; Hudson *et al.*, 1983 ; LeChevallier, 1990 ; Wierenga, 1985). Par contre, une colonisation durable d'un réseau réel n'est pas rapportée. Cependant, il est possible que certains réseaux hébergent en permanence une population d'Entérobactéries essentiellement localisée dans le biofilm et que l'absence de détection systématique sur gélose nutritive soit liée à leur état physiologique, aux conditions d'échantillonnage et à la limitation des analyses à la phase eau. Les résultats de LeChevallier *et al.* (1987) et Kilb *et al.* (2003) suggèrent d'ailleurs que les coliformes trouvés dans l'eau de distribution proviendraient du biofilm.

Compte tenu des connaissances actuelles sur les niveaux d'Entérobactéries en réseau de distribution réel, il est impossible de donner un niveau moyen de contamination ou une fréquence moyenne, d'autant plus que ces valeurs changent de manière importante en fonction du type de

réseau étudié, de l'eau de ressource et de la saison. Dans cette partie, nous citerons donc quelques études reportant la présence d'Entérobactéries dans les eaux potables.

Après avoir étudié pendant 4 mois (mai-août 1986) un système de distribution Américain (New Jersey) ayant des problèmes fréquents de coliformes, LeChevallier *et al.* (1987) ont montré que plusieurs espèces d'Entérobactéries cultivables étaient régulièrement détectées. Des bactéries coliformes ont été isolées dans 193 échantillons sur 500 (38,6%) sur toute la période d'étude. Peu de coliformes ont été détectés en sortie d'usine (0,03 UFC/100 mL) alors que la densité la plus forte a été mesurée 1,1 km après l'usine (point de prélèvement n°1) avec une concentration moyenne sur les 4 mois de 0,64 UFC/100 mL (Figure II.4).

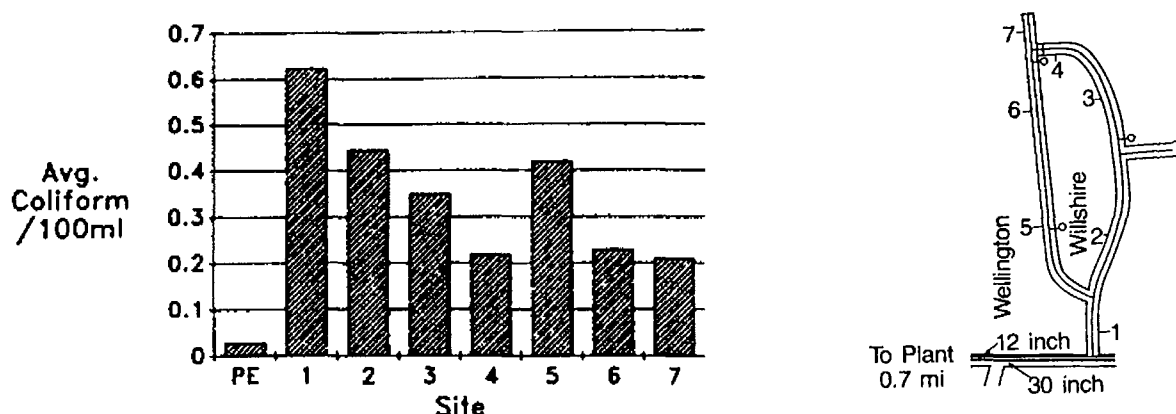


Figure II.4. Densités moyennes de coliformes aux différents endroits du réseau (à gauche) et représentation schématique des différents lieux de prélèvements sur le réseau de distribution (à droite). Chaque histogramme représente la moyenne d'au moins 59 échantillons. PE=effluent de l'usine (d'après LeChevallier *et al.*, 1987).

Cette étude a également montré une diversité importante des espèces d'Entérobactéries cultivables présentes dans l'eau. Les résultats présentés à la figure II.5 indiquent que la diversité augmente avec l'éloignement de l'usine. *Enterobacter agglomerans* a été l'organisme prépondérant (44,2%) et a été isolé à tous les points de prélèvement. *Enterobacter cloacae*, lui aussi détecté en chaque point, a représenté 24,4% des souches de coliformes isolées. Enfin, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca* et *E. coli* ont aussi été détectés mais en quantité moindre. Aucun coliforme n'a été détecté dans le biofilm récupéré à la surface des canalisations (sur 20 cm²). Par contre, les tubercules de corrosion contenaient de fortes densités de coliformes (> 160 UFC par gramme) dont *E. coli*, *Citrobacter freundii* et *Enterobacter agglomerans*. L'étude des sédiments présents dans le système (récupérés en augmentant la vitesse de l'eau) a également montré la présence de quelques coliformes (*Enterobacter agglomerans*) à un niveau plus faible (0,5 UFC par gramme).

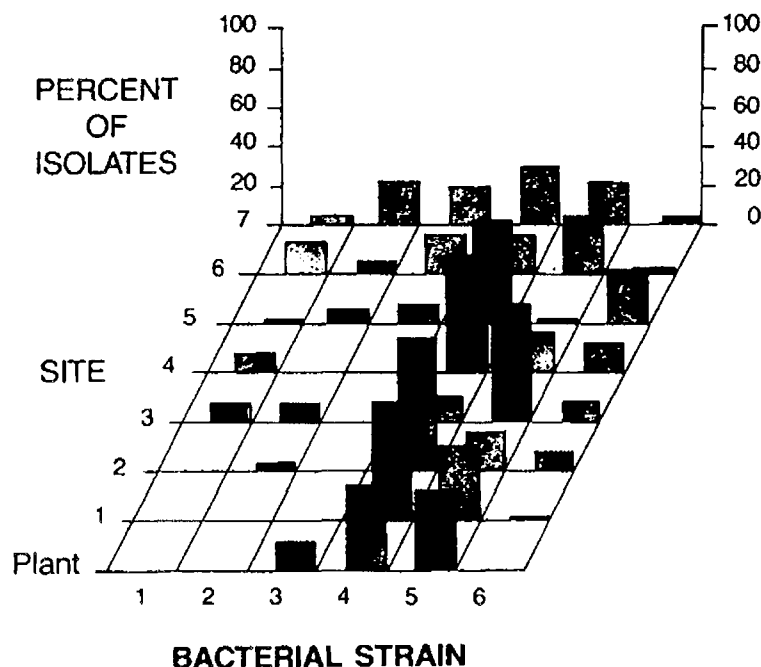


Figure II.5. Différentes espèces de coliformes retrouvées dans le réseau de distribution en fonction du site de prélèvement (d'après LeChevallier *et al.*, 1987). 1 : *E. coli* ; 2 : *Klebsiella pneumoniae* ; 3 : *K. oxytoca* ; 4 : *E. agglomerans* ; 5 : *E. cloacae* ; 6 : autres.

Comme le montre le tableau II.7, les espèces d'Entérobactéries isolées dans l'étude de LeChevallier *et al.* (1987) correspondent aux espèces les plus fréquemment détectées dans les réseaux de distribution d'eau potable. Parmi elles, on peut citer *Citrobacter freundii*, *Escherichia coli*, *Enterobacter agglomerans* et *Enterobacter cloacae* qui ont été retrouvées dans toutes les études citées.

Muyima et Ngcakani (1998) ont mesuré les concentrations en coliformes totaux et coliformes fécaux dans un système de distribution d'Afrique du sud divisé en trois réseaux alimentés par la même usine. Ils reportent des taux de contamination assez élevés (Tableau II.8) qui se retrouvent généralement aux quatre périodes de prélèvement (du 27/08/96 au 24/09/96) et qui sont généralement au-dessus de la limite autorisée par les instances sanitaires (0 coliformes/100 mL). Cependant, même si une légère augmentation est observée dans le réseau n°3 (le plus éloigné de la station de traitement), ils n'observent pas d'évolution importante des concentrations en coliformes totaux entre la sortie de l'usine et les trois points de prélèvement.

Ces données concernant les concentrations d'Entérobactéries trouvées en réseau de distribution sont cependant biaisées car les grandes campagnes de prélèvements effectuées en vue

de connaître l'occurrence des coliformes en eau potable sont généralement organisées sur des réseaux présentant initialement des problèmes de coliformes.

Tableau II.7. Différentes espèces d'*Enterobacteriaceae* cultivables trouvées dans des eaux potables.

	Edberg <i>et al.</i> (1988)	Geildreich (1996)	Evans <i>et al.</i> (1981)	Hübner <i>et al.</i> (1992)	LeChevallier <i>et al.</i> (1987)
<i>Klebsiella sp.</i>			X		
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	X	X			X
<i>Klebsiella oxytoca</i>	X	X			X
<i>Klebsiella rhinoscleromatis</i>		X			
<i>Klebsiella ozaenae</i>		X			
<i>Enterobacter agglomerans</i>	X	X	X	X	X
<i>Enterobacter cloacae</i>	X	X	X	X	X
<i>Enterobacter sp.</i>	X			X	
<i>Enterobacter aerogenes</i>	X	X	X	X	
<i>Enterobacter amnigenus</i>				X	
<i>Enterobacter adecarboxilata</i>				X	
<i>Citrobacter freundii</i>	X	X	X	X	X
<i>Citrobacter diversus</i>		X	X		
<i>Citrobacter amalonaticus</i>				X	
<i>Citrobacter sp.</i>				X	
<i>Escherichia coli</i>	X	X	X	X	X
<i>Escherichia vulneris</i>				X	
<i>Serratia plymthia</i>				X	
<i>Serratia plymuthica</i>	X				
<i>Serratia fonticola</i>	X			X	
<i>Serratia rubidaea</i>	X				
<i>Serratia odorifera</i>	X				
<i>Serratia liquefaciens</i>		X	X	X	
<i>Serratia marcescens</i>		X			
<i>Hafnia alvei</i>	X		X	X	
<i>Erwinia herbicola</i>		X			
<i>Yersinia enterocolitica</i>			X	X	
Entérobactéries non identifiées	X			X	X

Tableau II.8. Concentrations en coliformes fécaux (FC), blessés (IC) et totaux (TC), exprimées en UFC mL⁻¹, dans un système de distribution sud-africain en divers endroits du réseau (d'après Muyima et Ngcakani, 1998).

Date		Eau en sortie d'usine (chlorée)	Réservoir principal	Réseau 1	Réseau 2	Réseau 3
27/08/96	TC	4	4	4	-	-
	FC	1	1	1	-	-
	IC	4	4	5	7	-
10/09/96	TC	2	3	5	0	8
	FC	1	3	2	0	2
	IC	2	3	4	4	6
17/09/96	TC	8	5	5	7	7
	FC	2	4	1	0	2
	IC	3	2	5	4	6
24/09/96	TC	2	2	4	0	10
	FC	1	0	2	0	1
	IC	1	2	2	4	4

Grâce à l'émergence de nouvelles techniques, les Entérobactéries ont été mesurées dans les eaux potables sans forcément passer par une étape de culture, ce qui présente l'avantage de détecter les bactéries blessées et les bactéries non cultivables (Baudart *et al.*, 2001, 2002, 2005 ; Delabre *et al.*, 2001).

Baudart *et al.* (2001) ont utilisé la méthode FISH (fluorescent *in situ* hybridization) couplée à la méthode DVC (direct viable count) pour détecter les *Enterobacteriaceae* viables dans une eau traitée et dans l'eau brute correspondante, ainsi qu'à une étape intermédiaire du traitement, durant six semaines (Figure II.6). Dans les échantillons prélevés à la sortie de l'usine, juste après la chloration, aucune Entérobactérie n'est détectée que ce soit avec la méthode DVC-FISH qu'avec la méthode de culture. Pour les échantillons prélevés au sein du réseau de distribution, 3 échantillons sur 6 ont montré des Entérobactéries viables alors qu'aucune Entérobactérie cultivable n'est mise en évidence, suggérant la présence de bactéries dans un état viable non-cultivable. Cependant, l'intensité de fluorescence ainsi que la longueur des cellules ont montré une décroissance entre l'eau brute et l'eau distribuée, pouvant refléter une augmentation du niveau de stress des cellules à cause du traitement.

Delabre *et al.* (2001) ont montré des résultats similaires avec la même méthode mais en utilisant cette fois une sonde ciblant uniquement *E. coli* et non plus la famille entière des *Enterobacteriaceae*. Dans tous les échantillons d'eau potable analysés, ils ont montré la présence d'*E. coli* viables mais non cultivables (Figure II.7) à des concentrations de l'ordre de 1 à 10 *E. coli* pour 100 mL d'eau.

Ces résultats montrant la présence d'Entérobactéries viables dans l'eau potable ne donnent cependant aucune donnée sur la concentration d'Entérobactéries totales (vivantes et mortes). Ces études illustrent l'importance de ces nouvelles techniques pour étudier l'écosystème des réseaux d'eau particulièrement quand des bactéries stressées sont présentes.

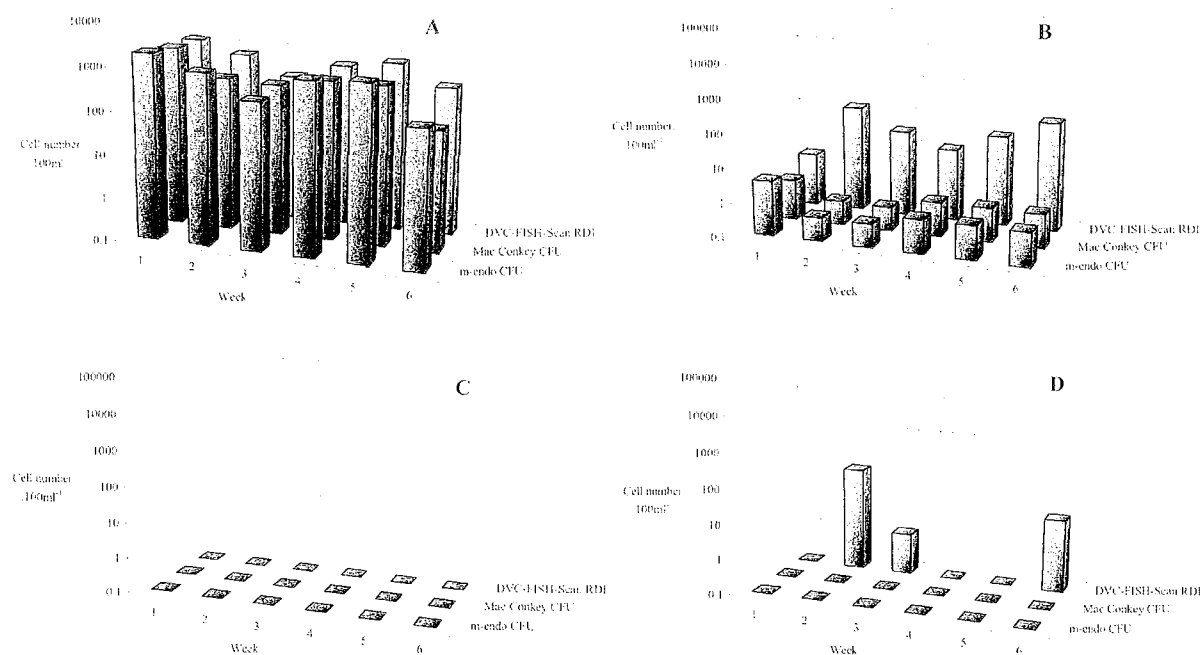


Figure II.6. Concentration en *Enterobacteriaceae* mesurée par la méthode DVC-FISH (sonde ENT1) et par la méthode de culture (deux milieux testés). A=eau brute, B=eau filtrée sur charbon actif biologique, C=eau chlorée (sortie usine), D=eau de distribution (d'après Baudart *et al.*, 2001).

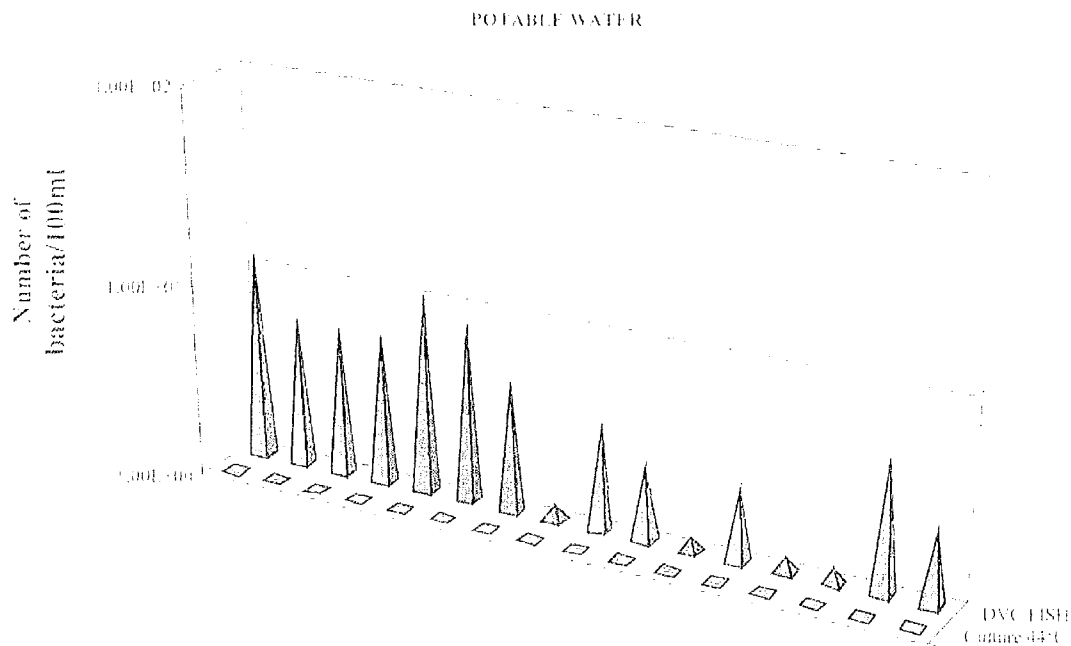


Figure II.7. Détection d'*E. coli* dans 16 échantillons d'eau potable par la méthode DVC-FISH (sonde Colinsitu) et par culture (d'après Delabre *et al.*, 2001).

II.1.5. Facteurs influençant la survie/croissance des Entérobactéries dans les eaux de distribution

Dans le but de prévenir et de contrôler l'apparition des Entérobactéries, dont les bactéries coliformes, et donc de limiter les événements de non conformité, il est important d'identifier les paramètres jouant un rôle dans l'occurrence de ces bactéries en réseau de distribution. Plusieurs auteurs ont tenté, à partir de données expérimentales acquises en réseau de distribution ou par des simulations dans des pilotes expérimentaux, de modéliser et de prédire l'apparition de coliformes en réseau de distribution (Gale *et al.*, 1997 ; Gatel *et al.*, 1995 ; LeChevallier *et al.*, 1996a ; Volk et Joret, 1994). Les principales interactions étudiées sont celles qui concernent la biomasse bactérienne totale (épifluorescence), le résiduel de désinfectant et la consommation de matière organique (COA et CODB). L'influence de la température, du pH et des conditions hydrauliques (diamètre de canalisation, vitesse de l'eau...) sont parfois pris en compte. Si l'intérêt de la modélisation n'est plus à prouver, la concordance des données expérimentales avec les prédictions des modèles reste discutable, peut-être parce ce qu'ils ne prennent jamais en compte la totalité des variables affectant la survie bactérienne. Pour cette raison, nous détaillons ci-après les principaux facteurs décrits dans la littérature comme pouvant influencer la survie et/ou la croissance des Entérobactéries en réseau. Les seules Entérobactéries étudiées en eau de distribution étant *E. coli* et les coliformes en général, nous présentons ici les résultats d'études concernant les paramètres affectant la survie de ce groupe de bactéries.

II.1.5.1. La température

La température de l'eau est sans doute un des facteurs les plus importants qui contrôle la croissance bactérienne en eau de distribution. En plus d'être difficilement contrôlable, elle influence en effet directement la dynamique bactérienne en réseau, en agissant sur le taux de croissance des bactéries, et indirectement en affectant l'efficacité globale des chaînes de traitements, l'efficacité de la désinfection (en eau froide), la dissipation du résiduel de désinfectant (en eau chaude), les phénomènes de corrosion, et même indirectement l'hydraulique du réseau, en modifiant la vitesse de l'eau (en réponse à une demande supérieure des consommateurs en période chaude) (LeChevallier, 1990).

Les Entérobactéries étant mésophiles (taux de croissance optimum vers 30-40°C), leur taux de croissance va augmenter avec la température de l'eau. Plus précisément, Fransolet *et al.* (1985) rapportent que les variations de température influencent le taux de croissance, la phase de latence et

le rendement cellulaire des bactéries. En laboratoire, ils ont montré que la croissance d'*E. coli* et d'*Enterobacter aerogenes* était très lente en dessous de 20°C (taux de croissance < 0,1 h⁻¹). De même, la plupart des études de terrain reportent une augmentation de l'occurrence des coliformes dans les réseaux de distribution durant les mois d'été (Colbourne *et al.*, 1991 ; Hudson *et al.*, 1983 ; LeChevallier *et al.*, 1996a ; Wieranga, 1985). Plusieurs auteurs ont associé la croissance des bactéries coliformes à des températures supérieures à 15°C (Figure II.8) (Besner *et al.*, 2001 ; Colbourne *et al.*, 1991 ; LeChevallier *et al.*, 1991a, 1996a ; Volk et Joret, 1994 ; Volk et LeChevallier, 2000) et certains soulignent que la détection des coliformes dans des eaux dont les températures sont comprises entre 0 et 5°C est 18 fois plus faible que dans des eaux dont la température est supérieure à 20°C (LeChevallier *et al.*, 1996a).

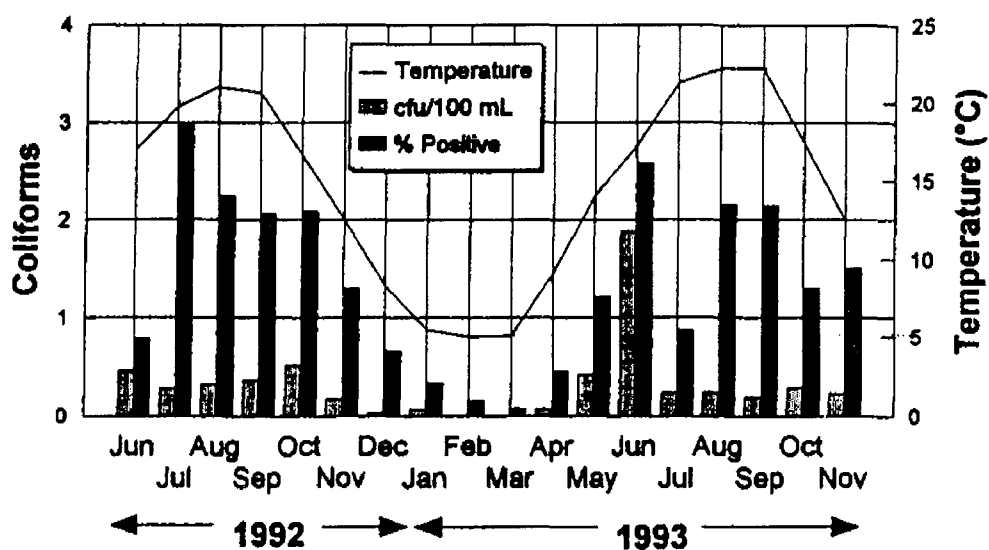


Figure II.8. Relation entre la température mensuelle moyenne de l'eau et l'occurrence de bactéries coliformes dans l'eau de distribution (d'après LeChevallier *et al.*, 1996a).

Cependant, Camper (1996) a suggéré que l'élévation du nombre de bactéries coliformes en période chaude pourrait être directement liée à l'augmentation des substrats carbonés disponibles (provenant des pluies et des blooms algaux) plutôt qu'à un effet direct de la température. Ceci rappelle que la survie bactérienne en eau potable est difficilement reliable à un seul paramètre puisque ceux-ci agissent en cascade les uns avec les autres.

II.1.5.2. Le pH et l'équilibre calco-carbonique

L'équilibre calco-carbonique des eaux de distribution, c'est-à-dire la relation entre les espèces du dioxyde de carbone et le calcium, est à l'origine des propriétés agressives (ou corrosives) et

incrustantes (ou entartrantes, ou calcifiantes) des eaux. Ces propriétés ayant un impact sur l'état d'usure des matériaux des canalisations du réseau (Legrand et Leroy, 1995) ainsi que sur la dynamique bactérienne (Martin *et al.*, 1982), la mise à l'équilibre de l'eau vis-à-vis du carbonate de calcium (par ajout de soude ou d'eau de chaux) avant son transport dans le réseau est indispensable. A l'heure actuelle, de rares informations sont disponibles quant à l'impact de l'équilibre calco-carbonique et de sa régulation sur les dynamiques bactériennes et en particulier sur celle des Entérobactéries dans les eaux de distribution.

Martin *et al.* (1982) ont mis en évidence que la capacité à cultiver de *Klebsiella pneumoniae* était influencée par les variations du pH d'une eau de distribution. En effet, dans leur étude, la régulation du pH d'une eau (6,8-7,2 à 8,5-9,0) par ajout de chaux a réduit le temps de survie des bactéries coliformes. Plus récemment, Grandjean (2004) a également montré que l'équilibre calco-carbonique pouvait avoir un effet sur la survie d'*Escherichia coli*. Cet effet peut être direct dû simplement au pH de l'eau et/ou indirect dû aux réactions à l'interface eau/matériau et en particulier à la formation de produits de corrosion (dans le cas d'eaux agressives). Dans son travail, il montre en effet qu'*E. coli* survit mieux lorsque le pH augmente (expériences menées en batch sur une gamme de pH de 7,4 à 8,2 correspondant à une eau de moins en moins agressive) quelque soit le produit ayant été utilisé pour ajuster le pH (eau de chaux ou soude) (Figure II.9). Il conclut que les eaux incrustantes permettent de réduire, par rapport aux eaux agressives, le temps durant lequel *E. coli* est capable de maintenir sa capacité à cultiver dans l'eau potable et explique principalement ce phénomène par la limitation de la formation de produits de corrosion en eau incrustante. L'influence des produits de corrosion est détaillée au paragraphe II.1.5.6.

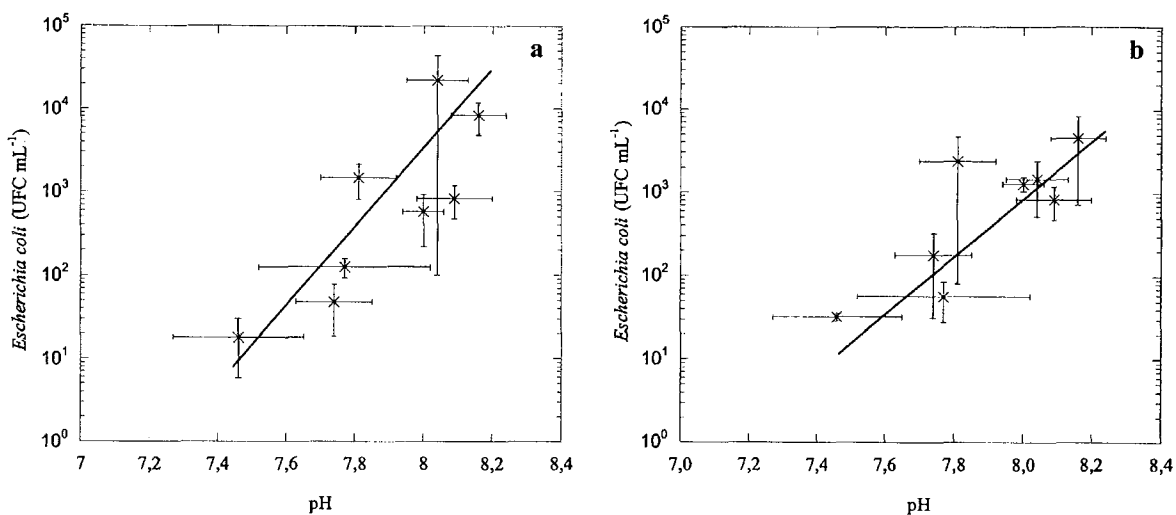


Figure II.9. Relation entre le pH et le nombre d'*Escherichia coli* cultivables après 20±5 jours d'incubation dans une eau de distribution non chlorée à 25°C. Le pH est ajusté par l'ajout de soude (a) ou par l'ajout d'eau de chaux (b) (d'après Grandjean, 2004).

Indirectement, le pH joue également un rôle important sur la répartition des formes du chlore résiduel libre. Ainsi, une augmentation de pH induit une baisse d'efficacité de l'action des agents chlorés par déplacement de l'équilibre de l'acide hypochloreux HOCl vers l'ion hypochlorite OCl⁻ moins actif (50% de chaque forme à pH 7,4) (Baudry, 1984).

II.1.5.3. Les nutriments bactériens

Les populations microbiennes des réseaux ne peuvent se multiplier si le contenu nutritif est un facteur limitant. Pour croître, les Entérobactéries, comme toutes bactéries hétérotrophes, requièrent la présence de différents éléments incluant le carbone, l'azote et le phosphore (LeChevallier, 1990). Les composés contenant du carbone servent de source d'énergie (donneur d'électron) et de carbone (pour l'anabolisme), alors que l'azote et le phosphore sont nécessaires pour la biosynthèse. Les bactéries hétérotrophes requièrent également un accepteur terminal d'électron, qui est généralement l'oxygène. Il est cependant possible pour les organismes fermentatifs tels que les coliformes d'utiliser des composés organiques internes en absence d'oxygène. Puisque les bactéries hétérotrophes requièrent ces trois éléments dans un ratio proche de 100/10/1, le carbone représente le terme limitant de la croissance bactérienne dans la majorité des réseaux de distribution d'eau potable, même si certaines études reportent une limitation de la croissance bactérienne due au phosphore (Miettinen *et al.*, 1997 ; Sathasivan *et al.*, 1997 ; Sathasivan et Ohgaki, 1999).

Le carbone :

Dans l'eau potable, le carbone utilisable par les bactéries est représenté par la fraction biodégradable de la matière organique dissoute. Plusieurs équipes ont développé des méthodes d'analyse permettant de mesurer le potentiel nutritif carboné en relation avec la prolifération bactérienne qu'il peut induire. Ce potentiel est généralement exprimé sous forme de COA (carbone organique assimilable) ou de CODB (carbone organique dissous biodégradable), reflétant deux types de procédures analytiques (Huck, 1990). Les concentrations en COA et en CODB de l'eau de distribution diminuent généralement avec le temps de résidence de l'eau dans le réseau (LeChevallier *et al.*, 1987 ; Servais *et al.*, 1992b, 1995b), suggérant une consommation du carbone par les bactéries du réseau. LeChevallier *et al.* (1996a) ont d'ailleurs montré que plus le COA de l'eau en sortie d'usine était élevé, plus le nombre de coliformes cultivables détectés dans le réseau augmentait (Tableau II.9).

Tableau II.9. Relation entre la concentration de COA dans l'eau traitée et l'occurrence des bactéries coliformes dans plusieurs réseaux de distribution (d'après LeChevallier *et al.*, 1996a).

Désinfectants utilisés dans les réseaux de distribution étudiés	COA ($\mu\text{g L}^{-1}$)	% d'échantillons contenant des coliformes	Nombre moyen de coliformes / 100 mL
Chlore (n=11)	120-189	1,24	1,077
	50-93	0,68	0,058
Chloramine (n=11)	101-166	0,87	0,022
	42-99	0,36	0,015

Boualam *et al.* (2002) ont également démontré que plus la quantité de carbone dans l'eau (COD) est importante, moins la capacité à cultiver des coliformes chute rapidement (Tableau II.10) et plus le COD biodégradé augmente. L'augmentation de la quantité de COD initiale de 0,5 à 1,5 mg C L^{-1} implique un ralentissement de la chute de cultivabilité des bactéries (Tableau II.10).

De même, certains lubrifiants ont été mis en cause dans la recroissance bactérienne en réseau à cause de leur capacité à relarguer du COA dans l'eau (Sidorowicz, 1996 ; White et LeChevallier, 1993). Les huiles utilisées pour lubrifier les pompes ont d'ailleurs été associées à l'occurrence des coliformes dans certains systèmes américains (White et LeChevallier, 1993).

Tableau II.10. Variation de la constante cinétique de déclin (K_d) de la capacité à cultiver de bactéries coliformes en fonction de la quantité initiale de carbone organique dissous (COD) et du COD biodégradé au cours de l'expérience (d'après Boualam *et al.*, 2002).

COD (mg C L^{-1})	COD biodégradé (mg C L^{-1})	K_d (h^{-1})
1,5	0,13	$-2,9 \cdot 10^{-2}$
1,1	0,10	$-2,4 \cdot 10^{-2}$
0,7	0,03	$-2,8 \cdot 10^{-2}$
0,5	<0,01	$-3,9 \cdot 10^{-2}$

Ainsi, la croissance des bactéries hétérotrophes et de fait celle des Entérobactéries, pourrait être limitée en abaissant les niveaux de matière organique biodégradable dans l'eau sortant de l'usine de traitement (Prévost *et al.*, 1998 ; Volk et LeChevallier, 1999). Des concentrations seuils de COA ou de CODB ont été proposées par différents auteurs pour obtenir une eau biologiquement stable : Van der Kooij (1992) a proposé un seuil de COA à $10 \mu\text{g L}^{-1}$, qui inhiberait durablement la prolifération microbienne hétérotrophe dans les systèmes de distribution non-chlorés. Niquette *et al.* (2001) ont suggéré un seuil de $0,25 \text{ mg L}^{-1}$ de CODB couplé à un résiduel de désinfectant significatif pour limiter la croissance dans le réseau de Bruxelles. Enfin, Servais *et al.* (1995b) et Mathieu *et al.* (1992) ont suggéré respectivement $150 \mu\text{g CODB L}^{-1}$ et $100 \mu\text{g CODB L}^{-1}$.

Pour contrôler spécifiquement la croissance des bactéries coliformes, les seuils proposés ont été : $50 \mu\text{g COA L}^{-1}$ (LeChevallier *et al.*, 1991a), $100 \mu\text{g COA L}^{-1}$ (Volk et LeChevallier, 2000 ; LeChevallier *et al.*, 1996b) et $150 \mu\text{g CODB consommé L}^{-1}$ (Volk et Joret, 1994). La disparité de

ces valeurs rappelle que la survie des Entérobactéries est multiparamétrique et que toute valeur seuil est spécifique d'un type d'eau.

Au-delà de la concentration des composés biodégradables, leur nature revêt une importance particulière. En effet, selon la nature des molécules présentes dans l'eau, certaines espèces seront plus favorisées que d'autres (Codony *et al.*, 2002) et le taux de croissance d'une même bactérie peut varier (Lendenmann et Egli, 1998). En ce qui concerne les Entérobactéries, certaines études ont rapporté que les hydrates de carbone et certains polyalcools leur étaient particulièrement favorables (Roberts *et al.*, 1992 ; Van der kooij et Hijnen, 1988). Dans une étude de Van der Kooij et Hijnen (1988), réalisée à 15°C dans des eaux filtrées sur sable, pasteurisées, supplémentées en azote puis dopées avec 25 µg C L⁻¹ de différents substrats testés individuellement, les taux de croissance de *Klebsiella pneumoniae* les plus forts ont été obtenus en présence de maltose et dérivés de maltose, d'arabinose ou de glucose. Les substrats organiques menant aux plus faibles taux de croissance étaient les acides aminés comme l'aspartate ou l'alanine (Figure II.10).

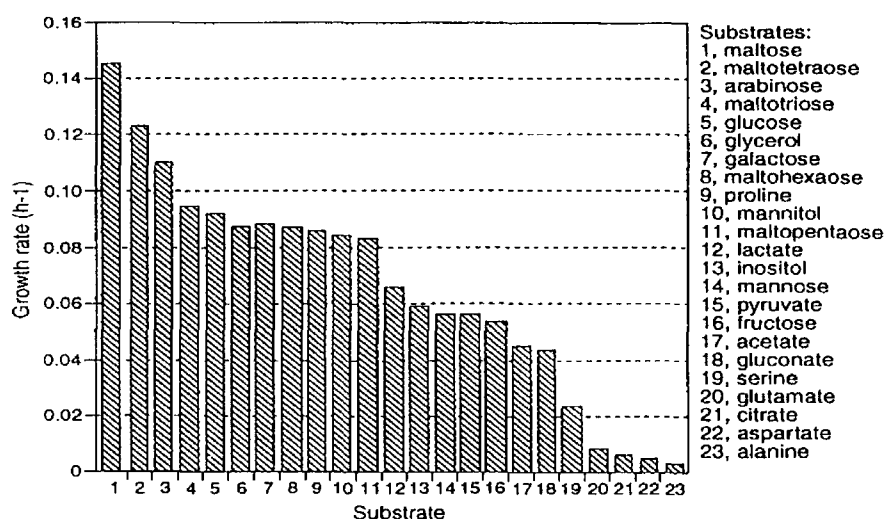


Figure II.10. Taux de croissance (doublements/h) de *Klebsiella pneumoniae* dans le filtrat de filtre à sable supplémenté avec 25 µg C L⁻¹ de différents substrats. Température d'incubation : 15°C (d'après Van der Kooij, 1997).

De même, Lendenmann et Egli (1998) rapportent des valeurs de $\mu_{\max}$ et K_s très variables d'un sucre à l'autre pour *E. coli* (Tableau II.11). Il est difficile de généraliser toutes ces données car l'affinité pour un substrat est spécifique de l'espèce d'Entérobactéries. Van der Kooij et Hijnen (1985) ont ainsi rapporté que *Citrobacter freundii* avait une constante d'affinité pour le glucose de 95 µg C L⁻¹ alors que celle d'*Enterobacter cloacae* était seulement de 60 µg C L⁻¹.

Tableau II.11. Paramètres cinétiques de la croissance d'*E. coli* en batch et en chemostat sur différents sucres (d'après Lendenmann et Egli, 1998).

Sucre	$\mu_{\max}$ (h ⁻¹)	K _s (µg L ⁻¹)
Glucose	0,92	73
Galactose	0,92	98
Maltose	0,87	100
Ribose	0,57	132
Arabinose	0,73	147
Fructose	0,70	125

L'azote :

Les études sur les concentrations d'azote en système de distribution reliées aux événements de recroissance bactérienne sont très limitées. Il est généralement admis que l'azote n'est pas limitant dans les systèmes de distribution d'eau potable (LeChevallier, 1990). Donlan et Pipes (1988) ont d'ailleurs indiqué qu'il n'y avait pas de corrélation entre l'azote organique, l'ammoniaque, les nitrates et nitrites et la densité de population microbienne fixée. Dans une autre étude, les concentrations d'azote dans l'eau, qui étaient suffisantes pour permettre la croissance microbienne, n'ont pas été modifiées pendant le transit de l'eau dans le système distribution, alors que le COA a diminué (LeChevallier *et al.*, 1987 ; Tuovinen *et al.*, 1980). Le rôle exact de l'azote dans la croissance des Entérobactéries en eau potable est peu clair, particulièrement parce que certaines souches comme *Klebsiella* sont capables de fixer l'azote moléculaire (Orskov, 1984).

Le phosphore :

Comme l'azote, le phosphore est présumé être non limitant de la croissance bactérienne dans les réseaux de distribution surtout quand l'eau provient d'eaux de surface (Donlan et Pipes, 1988 ; LeChevallier, 1990). Cependant, certaines études ont montré que de trop faibles concentrations en phosphore pourraient restreindre la croissance bactérienne dans certaines section du réseau (Herson *et al.*, 1984). De plus récentes études ont étudié l'effet d'ajout de phosphates, utilisés comme inhibiteurs de corrosion, sur la survie/croissance bactérienne. Les résultats obtenus sont variables d'une étude à l'autre. Chu *et al.* (2005) ont montré que l'ajout de phosphate ($\geq 0,01$ mg P L⁻¹) augmentait la densité des bactéries hétérotrophes cultivables dans le biofilm. Des résultats similaires ont été décrits par d'autres auteurs tant sur les bactéries fixées qu'en suspension (Lehtola *et al.*, 2002, 2004 ; Miettinen *et al.*, 1997 ; Sathasivan *et al.*, 1997, 1998 ; Sathasivan et Ohgaki, 1999). Cependant, l'interprétation de toutes ces études effectuées en laboratoire et non sur réseau réel est subjective puisque les eaux étudiées étaient considérées comme limitantes en phosphate. Au contraire, d'autres auteurs ont noté que l'ajout de phosphate ne favorisait pas la croissance bactérienne en réseau voire même limitait les densités totales de bactéries dans le biofilm, en agissant sur la corrosion (Abernathy et Camper, 1998 ; Appenzeller *et al.*, 2001 ; LeChevallier *et al.*,

1993 ; Rompré *et al.*, 2002 ; Volk *et al.*, 2000). Batté *et al.* (2003) ont montré que l'ajout de phosphate ne favorisait pas la croissance bactérienne mais engendrait une augmentation statistiquement significative de la proportion de γ -Protéobactéries (incluant les Entérobactéries) dans le biofilm.

En ce qui concerne spécifiquement les Entérobactéries, très peu de données sont disponibles. Cependant, dans une étude menée sur 31 usines américaines, LeChevallier *et al.* (1996b) ont trouvé que l'ajout de phosphates diminuait les niveaux de coliformes de 36% dans les systèmes de distribution chlorés ayant un niveau de phosphate $> 0,1 \text{ mg L}^{-1}$ par rapport aux réseaux avec des concentrations en phosphate plus basses. La réduction des occurrences de coliformes a été expliquée par le fait que les inhibiteurs de corrosion réduisent trois paramètres : (i) l'habitat microbien en réduisant la masse des produits de corrosion, (ii) la capacité d'adsorption des oxydes de fer, et (iii) la demande en désinfectant des produits de corrosion existants et des surfaces de canalisations (Abernathy et Camper, 1997).

II.1.5.4. Le type et la concentration de désinfectant

Le maintien d'un résiduel de désinfectant dans le système de distribution est généralement recommandé pour limiter la survie et la croissance bactérienne ainsi que l'occurrence des bactéries coliformes. Cependant, il existe plusieurs exemples où le maintien d'un résiduel de désinfectant n'a pas empêché l'apparition des coliformes dans les eaux de distribution (LeChevallier, 1990). Certaines études ont indiqué que les divers désinfectants utilisés (hypochlorite, monochloramine, dioxyde de chlore...) n'avaient pas la même capacité à interagir avec les bactéries et notamment celles du biofilm (Camper, 1994 ; De Beer *et al.*, 1994 ; LeChevallier *et al.*, 1988a ; LeChevallier *et al.*, 1990a ; LeChevallier *et al.*, 1993). Ici, seuls les effets du chlore et de la monochloramine seront abordés.

Le chlore

Si le chlore atteint efficacement les bactéries planctoniques, son action est nettement moins marquée sur les bactéries aggrégées, sorbées sur des particules ou organisées en biofilms (Berman *et al.*, 1988 ; Herson *et al.*, 1987 ; LeChevallier *et al.*, 1988a, 1988b ; Mathieu *et al.*, 1992 ; Paquin *et al.*, 1992 ; Parent *et al.*, 1996 ; Servais *et al.*, 1995b ; Van der Wende et Characklis, 1990). Cependant, des concentrations relativement faibles en chlore ($0,05$ à $0,5 \text{ mg L}^{-1}$) ont, dans certains cas, réussi à contrôler la présence de bactéries coliformes dans les systèmes de distribution (Besner *et al.*, 2001 ; LeChevallier *et al.*, 1996b ; Volk et Joret, 1994 ; Volk et LeChevallier, 2000). Lors d'une étude sur un système de distribution pilote, Parent *et al.* (1996) ont montré que tant que du

chlore était détecté dans le système ($>0,1 \text{ mg L}^{-1}$), les coliformes présents dans la phase eau (après injection massive) étaient inactivés. Le problème à l'heure actuelle est de savoir si la désinfection inactive réellement les coliformes ou s'ils restent viables mais juste non détectables (bactéries blessées) par les méthodes de culture classiques, au risque de redevenir cultivables lorsque les conditions redeviennent favorables.

De manière contradictoire, certains auteurs ont rapporté que de hautes doses de chlore (0,6 à $4,0 \text{ mg L}^{-1}$ de chlore résiduel) étaient inefficaces pour contrôler l'occurrence des bactéries coliformes en système de distribution (LeChevallier *et al.*, 1987 ; Martin *et al.*, 1982 ; Schreppel et Geiss, 1996 ; Wierenga, 1985). Même si l'augmentation du résiduel de chlore aide généralement à limiter l'occurrence des coliformes en réseau de distribution (Hudson *et al.*, 1983 ; LeChevallier, 1990), de telles élévations du résiduel de chlore sont impensables compte tenu de la formation de sous-produits de désinfection potentiellement carcinogènes tels que les trihalométhanes (LeChevallier, 1990).

La disparité de ces résultats montre que l'efficacité de la désinfection au chlore est spécifique de chaque système de distribution. Les caractéristiques du réseau telles que le matériau des canalisations, la corrosion ou le régime hydraulique jouent probablement un rôle très important dans l'efficacité de désinfection. L'influence de ces paramètres est étudiée dans les paragraphes suivants.

La monochloramine

L'utilisation de la monochloramine a prouvé dans certains cas qu'elle était plus efficace que le chlore libre pour contrôler la croissance des coliformes dans les eaux de distribution (Momba *et al.*, 1999 ; Norton et LeChevallier, 1997 ; LeChevallier *et al.*, 1996a et b). A titre d'exemple, LeChevallier *et al.* (1996a) ont ainsi montré que 1% des 33196 échantillons testés provenant d'eaux chlorées contenaient des coliformes cultivables contre seulement 0,5% des 35159 échantillons provenant d'eaux monochloraminées. La densité moyenne de bactéries coliformes était 35 fois plus haute dans les systèmes utilisant la chloration ($0,6 \text{ UFC/100 mL}$) par rapport aux systèmes employant la monochloramine ($0,02 \text{ UFC/100 mL}$). De même, Momba *et al.* (1999) ont montré que la monochloramine limite davantage l'implantation dans les biofilms de bactéries indésirables telles qu'*E. coli* que le chlore.

Cependant, LeChevallier *et al.* (1990a) ont observé que, même si la monochloramine est plus efficace pour lutter contre les biomasses fixées (compte tenu de sa plus faible réactivité, elle pénètre plus efficacement le biofilm que le chlore qui est vite consommé), son efficacité s'avère plus faible que le chlore sur les bactéries en suspension. Baudry (1984) observe qu'à 4°C , 3 mg L^{-1} de

monochloramine doivent être appliqués pour supprimer 99% des coliformes fécaux en 30 minutes. Or dans les mêmes conditions (4°C, 30 min.), l'auteur reporte qu'une application de 0,005 mg L⁻¹ de chlore (HOCl ; pH=6) ou 0,3 mg L⁻¹ de ClO⁻ (pH=10) suffisent pour engendrer un abattement de coliformes cultivables de 99%.

L'utilisation de la monochloramine ne représente donc pas une solution parfaite pour résoudre les problèmes de coliformes en réseau de distribution. Pour des concentrations équivalentes en chlore libre et en chloramine (1 mg L⁻¹), Snead *et al.* (1980), en simulant en laboratoire une contamination par des eaux usées d'un système de distribution, ont montré qu'un temps de contact beaucoup plus long était nécessaire pour inactiver les bactéries par la chloramine que par le chlore. Le chlore s'avère ainsi sans doute meilleur pour contrôler une contamination soudaine du réseau.

II.1.5.5. Le régime hydraulique

Le régime hydraulique est influencé par l'utilisation de l'eau par les consommateurs qui varie au cours de la journée et des saisons. De fortes fluctuations journalières peuvent apparaître entre les pics d'utilisation (matin et soir) et la nuit. Des débits faibles peuvent mener à une dissipation du résiduel de désinfectant et à une limitation du transport des nutriments. Au contraire, des débits importants peuvent contribuer à augmenter le transport des nutriments vers les organismes fixés, mais également augmenter les flux de désinfectants et provoquer des phénomènes de décrochage au niveau des surfaces (LeChevallier, 1990). L'association entre débit de l'eau et recroissances en réseau est difficile à établir, bien qu'une étude ait montré une relation inverse entre le débit et la densité du biofilm (Donlan et Pipes, 1988). Les variations brutales de flux hydrauliques, conduisant à des phénomènes de décrochage de biomasses fixées ou de dépôts, participent à la remise en suspension de populations bactériennes qui sont alors distribuées avec l'eau (Goshko *et al.*, 1983). Puisque nous avons vu au § II.1.4 que les Entérobactéries pouvaient être présentes dans le biofilm, elles peuvent faire partie de la fraction de bactéries qui se retrouveront dans l'eau distribuée lors des décrochages.

Le temps de résidence de l'eau dans le système de distribution est un facteur important car il influence la période pendant laquelle les réactions biologiques et chimiques peuvent avoir lieu au sein des canalisations. Lorsque le temps de résidence augmente, ceci mène généralement à une diminution du résiduel de désinfectant et à une augmentation de la corrosion qui favorise la croissance bactérienne (LeChevallier *et al.*, 1987 ; Carter *et al.*, 1997). Power et Nagy (1999) ont mesuré, au sein du système de distribution de Sydney, une élévation des concentrations en

coliformes totaux, *Klebsiella oxytoca* et *Aeromonas hydrophila* lorsque la distance entre l'usine et le point de prélèvement augmentait. Ceci ne résulterait pas directement de « l'âge » de l'eau mais plutôt des interactions avec la surface des canalisations, les dépôts et le biofilm, qui auraient pour conséquence de dégrader la qualité de l'eau au cours de son transport dans le réseau.

Ainsi, le stockage de l'eau au cours de la distribution (réservoirs) peut de la même manière dégrader la qualité des eaux distribuées. LeChevallier *et al.* (1996a) ont montré que plus il y avait de réservoirs de stockage sur le réseau de distribution, plus la fréquence de détection des coliformes était importante. Ces sites sont des zones particulières dans lesquelles l'eau est en contact avec l'air, parfois éclairée, et peut subir des temps de séjour très élevés en contact avec des sédiments qui s'y déposent. Non seulement les réservoirs non couverts fournissent une opportunité de contamination fécale de l'eau par les oiseaux et d'autres animaux, mais en plus, des blooms algaux peuvent aussi se produire et augmenter les niveaux de COA de l'eau qui sont susceptibles de soutenir la croissance des Entérobactéries (LeChevallier *et al.*, 1996a).

II.1.5.6. Le matériau des canalisations et la corrosion

La colonisation bactérienne au niveau des canalisations (biofilm) est influencée par les caractéristiques du matériau lui-même : Niquette *et al.* (2000) ont montré que la quantité de biomasse fixée est variable selon la nature du matériau constituant la canalisation (Figure II.11). A titre d'exemple, Lehtola *et al.* (2004b) ont montré que la proportion de bactéries viables et de bactéries gram négatives, parmi lesquelles se trouvent les Entérobactéries, est plus importante dans le biofilm formé à la surface des canalisations en polyéthylène (PE) que sur celles en cuivre. Les matériaux à base de fer interagissent avec les désinfectants et forment ainsi des produits et des tubercules de corrosion. LeChevallier *et al.* (1993) ont montré que la corrosion avait un impact majeur sur la persistance du biofilm dans des systèmes de distribution chlorés et que le type et le taux de corrosion affectaient la capacité du chlore à inactiver les bactéries du biofilm, dont les Entérobactéries. Une relation positive a d'ailleurs été trouvée entre la longueur des canalisations en fonte et l'occurrence des coliformes dans un réseau chloré (LeChevallier *et al.*, 1996b).

De nombreuses études ont montré la présence de coliformes dans des tubercules de corrosion (Clement *et al.*, 1998 ; Emde *et al.*, 1992 ; LeChevallier *et al.*, 1987 ; Martin *et al.*, 1982). A titre d'exemple, Emde *et al.* (1992) ont isolé plusieurs espèces d'Entérobactéries dans les tubercules de corrosion d'un système de distribution canadien. Parmi les espèces isolées, ils ont identifié *E. coli*, *Enterobacter aerogenes* et *Klebsiella sp.* De même, LeChevallier *et al.* (1987) ont détecté de fortes

densités de coliformes (>160 UFC par gramme) dans des tubercules de corrosion dont *E. coli*, *Citrobacter freundii* et *Enterobacter agglomerans*. A l'échelle du laboratoire, Camper (1996) a montré que des réacteurs en acier étaient plus susceptibles de favoriser les bactéries coliformes que des réacteurs en polycarbonate, même en présence d'un résiduel de désinfectant.

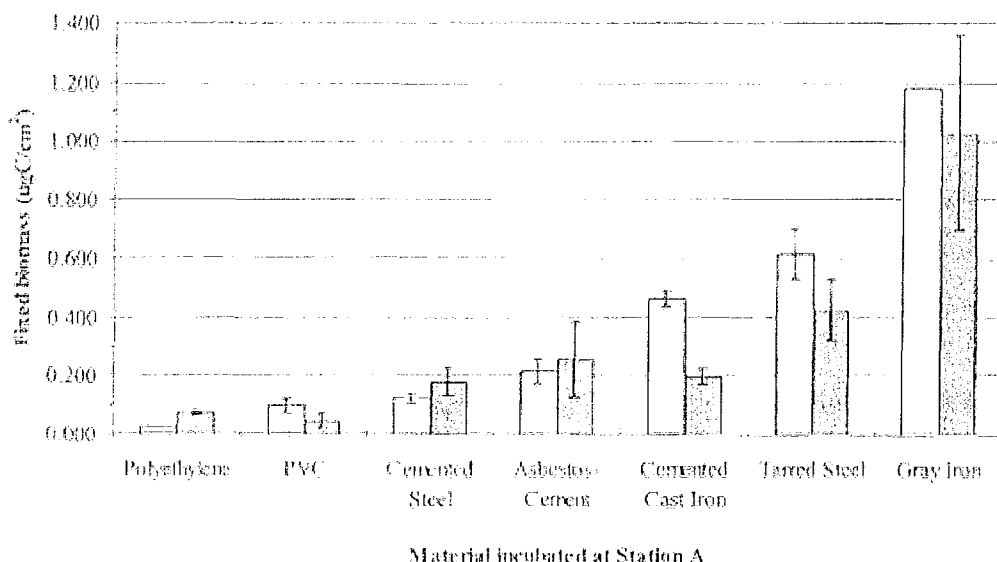


Figure II.11. Densité de bactéries fixées à la surface de différents matériaux de canalisation (Niquette *et al.*, 2000).

II.1.5.7. Le biofilm et l'accumulation de sédiments dans les canalisations

La présence du biofilm représente un habitat pour les croissances bactériennes et pour la protection contre les désinfectants. L'activité bactéricide des désinfectants est en effet moins efficace contre les bactéries du biofilm que les bactéries en suspension (LeChevallier *et al.*, 1988a ; Mathieu *et al.*, 1992 ; Parent *et al.*, 1996 ; Ryu et Beuchat, 2005 ; Servais *et al.*, 1995a ; Van der Wende et Characklis, 1990). A titre d'exemple, DeBeer *et al.* (1994) observent que la concentration en chlore à la surface du biofilm est égale à 20 à 30% de celle dans la phase eau, du fait de l'existence de la couche limite. LeChevallier *et al.* (1988a) ont d'ailleurs observé que la résistance à la chloration de *Klebsiella pneumoniae* fixées sur lame de verre peut atteindre 150 fois celle des bactéries libres.

Comme le biofilm, l'accumulation de sédiments et de débris à la surface des canalisations représente des niches écologiques caractérisées par l'absence de désinfectant. Il peut s'y développer des proliférations de bactéries de la corrosion et parfois des coliformes (Lévi, 1995). Les sédiments

s'accumulent principalement dans les endroits où le débit est faible (bras morts ou réservoirs) et dans les canalisations de faible diamètre (Besner *et al.*, 2002). La présence de coliformes à ce niveau a été rapporté dans plusieurs études (Gauthier *et al.*, 1999a ; Oliver et Harbour, 1995 ; Schreiber et Schoenen, 1994). Oliver et Harbour (1995) ont isolé des coliformes dans 88% des échantillons contenant des sédiments récupérés par curage dans une zone contenant des canalisations en fonte. Les sédiments agiraient comme substrat pour la croissance des coliformes (Martin *et al.*, 1982 ; Herson *et al.*, 1991). La resuspension de ces dépôts dans l'eau (par exemple suite à une variation de débit) pourrait provoquer une contamination microbienne de l'eau et influencer les occurrences de coliformes dans les réseaux de distribution.

Les curages unidirectionnels du système de distribution se sont généralement avérés efficaces pour contrôler la qualité de l'eau et diminuer les occurrences de coliformes (Antoun *et al.*, 1999).

II.1.5.8. La présence d'autres microorganismes

L'influence de la présence d'autres microorganismes dans les eaux de distribution sur la survie et/ou la croissance des Entérobactéries n'a été que très peu étudiée. Cependant, on peut citer deux études concernant (i) l'effet de la population hétérotrophe autochtone des eaux potables sur une population de bactéries coliformes et (ii) l'effet des protozoaires sur la survie d'*E. coli*.

LeChevallier et McFeters (1985b) ont étudié les interactions entre les bactéries hétérotrophes totales et les bactéries coliformes. Ils ont inoculé une souche d'*E. coli* dans des échantillons d'eau potable déchlorée et ont mesuré sa survie pendant 8 jours. Ils ont montré que la présence des bactéries hétérotrophes autochtones de l'eau potable réduisait les densités de coliformes cultivables de plus de 3 log (Figure II.12). Certaines bactéries telles que plusieurs espèces de *Pseudomonas* (espèces dominantes dans les essais) sont capables d'inhiber la population de coliformes. Une corrélation significative a été observée entre le niveau initial de bactéries hétérotrophes autochtones et la vitesse de décroissance des coliformes. Des résultats similaires ont été rapportés par LeChevallier *et al.* (1980) ainsi que par Ducluzeau *et al.* (1984) et Ramalho *et al.* (2001) dans des eaux minérales. Les auteurs expliquent ce phénomène par la synthèse de substances inhibitrices par les bactéries autochtones et/ou par une compétition vis-à-vis des nutriments.

L'activité des protozoaires a également été suggérée par Sibille *et al.* (1998) comme pouvant diminuer les concentrations bactériennes dans l'eau de distribution. Ils ont comparé la survie d'*E. coli* dans deux types d'eaux : une eau prélevée en sortie de filtre CAG (COD=2,3 mg L⁻¹, CODB=0,7 mg L⁻¹) et une eau nanofiltrée (COD=0,21 mg L⁻¹, CODB<0,1 mg L⁻¹). Malgré un

contenu nutritif beaucoup plus important, *E. coli* survit moins bien dans l'eau CAG (Figure II.13). Les auteurs ont expliqué cette différence de comportement par l'activité des protozoaires (par broutage) présents dans l'eau CAG et absents dans l'eau nanofiltrée.

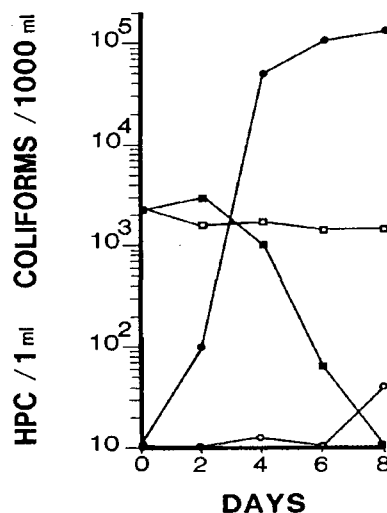


Figure II.12. Evolution de la cultivabilité d'*E. coli* injecté dans une eau de robinet déchlorée en présence ou en absence des bactéries autochtones de l'eau □ = *E. coli* dans l'eau potable déchlorée sans autres bactéries (les bactéries autochtones de l'eau potable ont été inactivées par chloration avant inoculation), ■ = *E. coli* dans l'eau potable déchlorée avec autochtones, ○ = HPC dans l'eau potable déchlorée dans laquelle les bactéries ont été inactivées par chloration avant le test, ● = HPC dans l'eau potable déchlorée (*P. cepacia* a été identifiée comme espèce dominante). HPC=heterotrophic plate count (d'après LeChevallier et McFeters, 1985b).

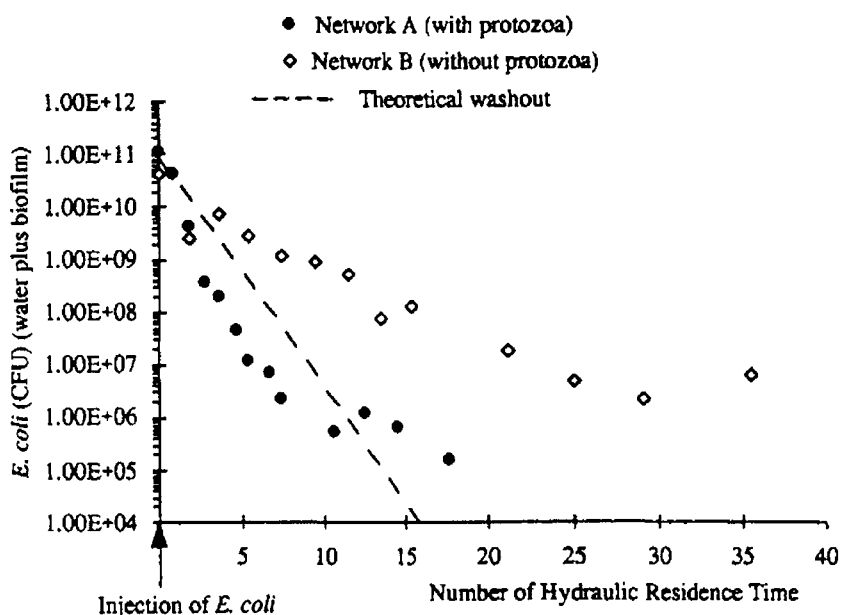


Figure II.13. Densité d'*E. coli* dans le réseau expérimental alimenté avec de l'eau CAG (Network A) ou alimenté avec de l'eau nanofiltrée (Network B) (D'après Sibille *et al.*, 1998).

II.1.5.9. Les précipitations

Les évènements pluvieux ont été suggérés par plusieurs auteurs comme étant un catalyseur de la croissance des coliformes en réseau (LeChevallier, 1990, LeChevallier *et al.*, 1991a ; Lowther et Moser, 1984). Plusieurs mécanismes ont été suggérés pour expliquer l'influence des précipitations sur l'occurrence des coliformes en réseau : (i) les épisodes de pluies peuvent directement introduire des bactéries coliformes dans l'eau de distribution à cause de fuites (ruptures d'intégrité du réseau), (ii) ils peuvent agir en lessivant les nutriments dissous du bassin-versant et ainsi augmenter les niveaux de COT (carbone organique total), et (iii) les pluies acides peuvent baisser l'alcalinité de l'eau et stimuler la corrosion (LeChevallier *et al.*, 1996a).

Lowther et Moser (1984) ont ainsi mesuré que les niveaux de COT (carbone organique total) dans l'eau brute étaient plus forts quand la turbidité de l'eau augmentait après des précipitations. LeChevallier (1990) a observé un décalage de 7 jours entre les évènements de précipitations et l'apparition de bactéries coliformes dans l'eau de distribution (Figure II.14). Après une période de transit par la filière et une phase de latence, les éléments nutritifs lessivés par les pluies résultent en une augmentation des densités bactériennes.

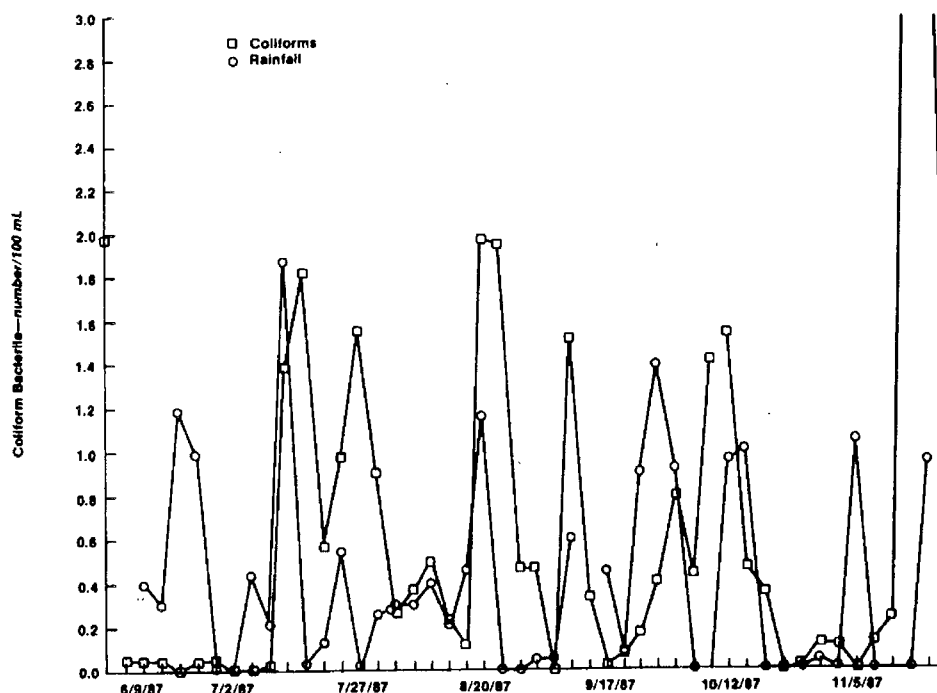


Figure II.14. Relation entre les précipitations et le nombre de bactéries coliformes dans le système de distribution 7 jours après (d'après LeChevallier, 1990).

Cependant les résultats observés par LeChevallier *et al.* (1996a) indiquent un effet mixte des précipitations sur l'occurrence des bactéries coliformes. Les données présentées dans le tableau II.12 montrent que l'occurrence des coliformes augmentent de 66% dans les systèmes chloraminés

quand le niveau de pluies passe de 0 à plus de 3 pouces (1 pouce = 2,54 cm) et de 38% dans les systèmes chlorés quand les précipitations passent de 0,5 à plus de 3 pouces (LeChevallier *et al.*, 1996a).

Tableau II.12. Relation entre les épisodes de pluies et l'occurrence des bactéries coliformes dans le réseau de distribution (d'après LeChevallier *et al.*, 1996a).

Type de système de distribution étudié	Quantité de pluies (pouces)	Nombre d'échantillons collectés	% d'échantillons contenant des coliformes
Systèmes chlorés	0-0,5	14659	1,637
	0,5-1	5741	0,418
	1-2	7433	0,498
	2-3	5589	0,555
	>3	5375	0,577
Systèmes chloraminés	0-1	11027	0,426
	1-2	9972	0,511
	2-3	7320	0,683
	>3	4950	0,707

Pour conclure, il paraît évident que tous les facteurs influençant la croissance/survie des Entérobactéries en eau de distribution s'entrecroisent et agissent en cascade. Agir sur un seul paramètre semble être inutile et c'est sans doute la raison pour laquelle, malgré l'amélioration des traitements actuels, des épisodes de non conformités concernant les Entérobactéries sont encore détectés.

II.2. La matière organique des eaux de distribution

Comme nous l'avons vu précédemment, la matière organique des eaux de distribution, et particulièrement la matière organique biodégradable, joue un rôle très important dans la stabilité microbiologique des eaux potables en fournissant une source de carbone et d'énergie aux bactéries hétérotrophes (Mathieu *et al.*, 1992, 1995 ; Servais *et al.*, 1992b, 1995b ; Volk et LeChevallier, 1999). En plus de conséquences sur la conformité sanitaire des eaux, la matière organique est à l'origine de la formation de couleurs, de goûts et d'odeurs indésirables qui dégradent les qualités organoleptiques des eaux potables (Astier *et al.*, 1995 ; Lloyd *et al.*, 1998 ; McGuire, 1995). Enfin, en réagissant avec le chlore, (i) elle forme des sous-produits organo-halogénés potentiellement toxiques dont les trihalométhanes (Gallard et Gunten, 2002 ; LeChevallier *et al.*, 1991b), et (ii) elle augmente la demande en chlore des eaux potables, induisant ainsi une décroissance rapide des concentrations en chlore résiduel dans le réseau. Pour ces raisons, cette partie a donc pour but de faire un état des lieux des connaissances actuelles sur la matière organique des eaux de distribution.

II.2.1 Origine de la matière organique des eaux de distribution

La matière organique (MO) des eaux de distribution a pour origine la MO résiduelle des eaux brutes après traitements de potabilisation. En effet, les traitements physico-chimiques et biologiques traditionnels utilisés pour rendre une eau potable n'éliminent pas complètement la MO des eaux brutes. Dans cette partie, nous reviendrons donc en premier lieu sur la MO des eaux brutes, son origine et sa composition, puis nous décrirons l'effet des traitements de potabilisation sur cette MO.

II.2.1.1. La matière organique des eaux brutes

II.2.1.1.1. Origine

La matière organique des eaux brutes présente trois origines distinctes : deux origines naturelles (autochtone et allochtone) et une origine anthropique. La fraction autochtone est issue de l'activité des organismes animaux et végétaux au sein du milieu aquatique. Les composés provenant de la production et de la décomposition phytoplanctonique sont quantitativement majoritaires dans les eaux de surface, notamment pendant les épisodes de floraison algale ou « bloom », essentiellement observables au printemps ou au début de l'automne (Münster et Chróst, 1990). La fraction allochtone de la MO des eaux brutes provient de l'écosystème terrestre. Le ruissellement des eaux de pluies sur le couvert végétatif puis sur les sols des bassins versants et/ou la percolation des eaux au travers des sols, entraînent les composés organiques, mais aussi les sels nutritifs azotés et phosphorés, vers la ressource en eau (Münster et Chróst, 1990). Enfin, la fraction anthropique provient des activités humaines telles que les rejets industriels, urbains ou agricoles (hydrocarbures, pesticides, solvants...) (Legube, 1991 ; Leenheer et Croué, 2003).

La contribution relative de ces trois types de matières organiques, de même que la concentration totale dans les eaux brutes varient saisonnièrement et dépendent des conditions géologiques et hydrologiques du milieu ainsi que de la végétation des bassins versants (Martin-Mousset *et al.*, 1997 ; Münster et Chróst, 1990 ; Thurman, 1985). Meili (1992) observe que la fraction allochtone constitue entre 50 et plus de 90 % du carbone organique respectivement présent dans des lacs d'eau douce ou des lacs riches en substances humiques.

II.2.1.1.2. Composition

L'origine de la matière organique conditionne sa signature moléculaire et ses caractéristiques chimiques. Bruchet *et al.* (1990) rapportent que la présence de matière organique d'origine

allochtone est caractérisée par la prédominance de structures polyhydroxyaromatiques, alors que la matière organique d'origine autochtone implique la présence d'hydrates de carbone, de protéines et de glycoprotéines essentiellement d'origine algale. Cependant, la MO des eaux naturelles représente un milieu complexe constitué d'une grande diversité de composés. Pour quantifier et qualifier la MO, des méthodes analytiques spécifiques d'un composé ou d'une classe de composés ainsi que des méthodes globales comme la mesure du carbone organique ont été utilisées.

Le dosage du carbone organique total (COT) est la mesure la plus globale pour quantifier la présence de MO dans les systèmes aquatiques. Le COT est divisé arbitrairement en deux fractions : le carbone organique dissous (COD) correspondant aux composés $<0,45 \mu\text{m}$ et le carbone organique particulaire (COP) $>0,45 \mu\text{m}$. Si la teneur en COT des eaux de surface destinées à la production d'eau potable varie en moyenne de 2 à 12 mg L^{-1} , elle peut être bien inférieure à 2 mg L^{-1} dans les eaux souterraines ou atteindre plus de 30 mg L^{-1} dans certaines eaux marécageuses, comme le montre le tableau II.13 (Thurman, 1985).

Tableau II.13. Concentrations approximatives du COT dans les eaux naturelles (d'après Thurman, 1985).

	COD (mg L^{-1})	COP (mg L^{-1})	COT (mg L^{-1})
Eau de mer	0,5	$<0,1$	0,5
Eau souterraine	0,7	$<0,1$	0,7
Précipitations	1	0,1	1,1
Lac oligotrophique	2	0,2	2,2
Rivière	5	2	7
Lac eutrophique	10	2	12
Marais	15	2	17
Marécage	35	3	38

Le COP représente généralement la fraction minoritaire ($<10\%$) du COT des eaux naturelles (Thurman, 1985). Il est principalement représenté par le zooplancton, le phytoplancton et les bactéries et sa fraction augmente avec la taille de la rivière et le débit. Le COD est constitué d'une grande variété de composés. Parmi eux, on distingue généralement les composés caractérisés par une technique d'extraction et de séparation de ceux qui font l'objet d'analyses spécifiques. La quantité et la qualité du COD dépendent de la nature du bassin versant mais aussi des variations saisonnières et d'événements ponctuels tels que les pluies ou les blooms algaux (Münster et Chrost, 1990 ; Leenheer et Croué, 2003).

Une faible proportion du COD des eaux naturelles (environ 20 %), peut actuellement être caractérisée par des techniques analytiques classiques. Des hydrates de carbone, des acides carboxyliques, des acides aminés, des hydrocarbures et des composés à l'état de trace ont ainsi été mis en évidence dans des eaux naturelles (Figure II.15) (Legube, 1991 ; Thurman, 1985 ; Volk *et al.*,

1997). Mais, la fraction majoritaire du COD est constituée de structures macromoléculaires, essentiellement polymériques, de nature acide, ne pouvant être analysées directement.

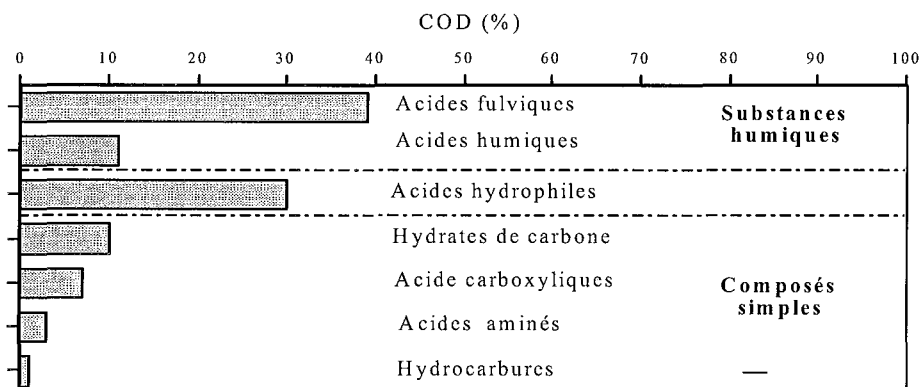


Figure II.15. Répartition moyenne du COD dans une eau de rivière dont la concentration en COD est de 5 mg L⁻¹ (d'après Thurman, 1985).

Les molécules constituant la MO ont ainsi été divisées en deux groupes : (i) des molécules complexes que sont les substances humiques et (ii) des composés simples regroupés sous le terme de substances non humiques.

- Les substances humiques représentent la fraction des molécules adsorbables sur résine macroporeuse XAD 8 à pH acide et éluée avec NaOH (Lefebvre et Croué, 1995). Ce sont des macromolécules hydrophobes de masses moléculaires apparentes majoritairement inférieures à 10000 Da (Aiken, 1984 ; Lefebvre, 1995 ; Peuravuori and Pihlaja, 1998 ; Thurman, 1985). Leur structure développée n'est pas connue mais les structures aromatiques représentent jusqu'à 30% du carbone organique. La partie aliphatique majoritaire contiendrait essentiellement des protéines, des acides aminés et des hydrates de carbone (Thurman, 1985). Schulten et Gleixner (1999) ont rapporté la présence d'acides gras volatiles, de peptides, d'hydrates de carbone, de stérols, de phénols, de monomères et dimères de lignine et de composés aromatiques alkylés. Les substances humiques représentent 30 à 60% du COD d'une eau de rivière (Dossier-Berne *et al.*, 1996 ; Legube *et al.*, 1990 ; Martin-Mousset *et al.*, 1997 ; Thurman, 1985). Elles peuvent être séparées en acides fulviques ($\approx 90\%$) et acides humiques ($\approx 10\%$). Les acides fulviques se distinguent des acides humiques par leur teneur supérieure en groupements fonctionnels acides -COOH et -OH et par leur plus faible masse moléculaire apparente (500-2000 Da contre 2000-5000 Da) (Thurman et Malcolm, 1983).

- Les substances non humiques (ou hydrophiles) représentent la fraction des molécules non adsorbables sur résine XAD 8 à pH acide (Lefebvre et Croué, 1995). Elles sont mal caractérisées et sont représentées pour moitié par des acides hydrophiles (retenus sur résine XAD 4) qui sont composés de sucres, d'acides aromatiques et d'acides aminés (Aiken, 1984 ; Leenheer, 1981). Les concentrations des divers composés varient en fonction de l'origine de l'eau et des méthodes analytiques utilisées (Tableau II.14).

Tableau II.14. Contribution au COD des principales classes de composés analysables des eaux de surface (nd : non mesuré).

	Thurman (1985)	Subra <i>et al.</i> (1989)
Acides carboxyliques	5 à 8%	1,7%
Acides aliphatiques		
Acides gras volatils	2%	nd
Acides gras non volatils	4%	nd
Acides hydroxycarboxyliques et dicarboxyliques	1 à 2%	nd
Acides aromatiques	1%	nd
Acides aminés	2 à 3%	20%
Acides aminés libres	0,5%	3,3%
Acides aminés combinés	2 à 3%	16,7%
Hydrates de carbone	5 à 10%	
Monosaccharides	1%	
Saccharides combinés	7%	3 à 66,7%
Sucres acides	1%	
Aminosucres et autres	1%	0,7%
Hydrocarbures	<1%	1,7%
Composés à l'état de traces	<1%	0,002 à 3%
Aldéhydes, stérols, bases organiques, composés soufrés, alcools, éthers, cétones, chlorophylles et autres pigments		

La composition de la MO des eaux brutes peut également être abordée d'un point de vue biologique, en terme de biodégradabilité. Cette caractéristique nous intéresse plus particulièrement puisqu'elle reflète le potentiel que possède un composé organique à être utilisé par les bactéries. Pour évaluer ce potentiel, il existe des tests comme (i) le dosage du carbone organique dissous biodégradable (CODB), basé sur la mesure du COD bioassimilé et (ii) le dosage du carbone organique assimilable (COA) basé sur la mesure d'une production cellulaire.

Une grande partie de la MO des eaux naturelles est considérée comme réfractaire à la biodégradation, c'est-à-dire non utilisable par les bactéries. La MOD des eaux peut être scindée arbitrairement en trois fractions (Münster et Chrost, 1990 ; Ogura, 1975) :

- une fraction labile (environ 20%) qui correspond à la MO éliminée selon une cinétique rapide, de l'ordre de l'heure ou de la journée. Les molécules représentatives de ce pool présentent généralement une faible masse moléculaire apparente (<1000 Da) permettant une diffusion au

travers des membranes bactériennes. Ce sont essentiellement des acides aminés, des polypeptides, des oses simples et des acides organiques issus de l'activité phytoplanctonique ou de l'hydrolyse exoenzymatique de composés de plus grande taille ;

- une fraction réfractaire (ou lentement hydrolysable) qui correspond à la MO éliminée selon une cinétique lente (semaines, mois). Ce sont typiquement des macromolécules de forte masse moléculaire apparente qui doivent être hydrolysées par les enzymes bactériennes avant de pouvoir franchir les membranes cellulaires (Chrost *et al.*, 1986). Les substances humiques font partie de ces composés et s'il est généralement admis que ces composés sont plutôt réfractaires à la biodégradation, il a néanmoins été rapporté que la croissance de bactéries à partir de substances humiques isolées d'eaux brutes était possible (Moran et Hodson, 1990);
- une fraction non hydrolysable principalement représentée par le corps récalcitrant des substances humiques.

Différentes études ont montré que les concentrations en CODB des eaux naturelles étaient très variables selon le type d'eau, le site, la saison... A titre d'exemple, Servais *et al.* (1987) ont montré que le CODB représentait 10 à 60% du COD de diverses eaux. De même, Dossier-Berne *et al.* (1996), en mesurant le COD et le CODB de l'eau de l'Oise durant un an, ont observé des concentrations en CODB variant de 31 à 63% du COD selon la période de prélèvement.

II.2.1.2. Effets des traitements sur la matière organique des eaux brutes

Comme nous l'avons dit précédemment, la MO des eaux traitées provient de la MO des eaux brutes après traitement de potabilisation. L'objet de cette partie est donc de décrire l'effet de ces traitements sur la MO afin d'évaluer les modifications qualitatives et quantitatives des composés organiques.

Les chaînes de traitements biologiques emploient classiquement trois étapes :

(i) la clarification (coagulation-floculation-décantation) qui permet d'éliminer les fractions particulaires et une partie de la fraction organique dissoute.

(ii) l'affinage dont l'objectif est de parfaire l'élimination de la MOD et surtout d'optimiser l'élimination de la fraction biodégradable.

(iii) la désinfection (chlore et ozone) visant à atteindre l'intégrité des microorganismes (bactéries, virus, protistes...).

II.2.1.2.1. La coagulation-floculation-décantation

La coagulation-floculation-décantation est la première étape physique du traitement de l'eau. Elle est basée sur l'addition de complexants métalliques et, si la finalité première de cette étape était d'éliminer les particules et la turbidité, elle a rapidement été utilisée pour réduire les teneurs en matières organiques des eaux brutes.

L'ajout de coagulants dans les eaux brutes permet de former des floes qui peuvent alors être éliminés par les traitements appliqués en aval. Les coagulants les plus fréquemment employés sont les sels d'aluminium ou de fer et les polyélectrolytes organiques. L'efficacité de la coagulation dans l'élimination de la MO dépend du pH et de la température de l'eau, de la nature et de la dose du coagulant, de la charge, de la solubilité, de la concentration en MO et de sa nature (Dennett *et al.*, 1996 ; Lefebvre et Croué, 1995 ; Sinsabaugh *et al.*, 1986). Ceci explique pourquoi les rendements d'élimination de la MO par coagulation varient largement d'une eau à une autre. A titre d'exemple, des taux d'élimination variant de 10 à 90% du COT ont été rapportés par Randtke (1988) et de 15 à 85% du carbone non-particulaire par Dennet *et al.* (1996).

D'un point de vue qualitatif, la coagulation agit préférentiellement sur les composés de haut poids moléculaire par rapport aux composés de faible poids moléculaire, les composés ioniques par rapport aux composés neutres et les composés hydrophobes par rapport aux composés hydrophiles (Lefebvre et Croué, 1995 ; Sinsabaugh *et al.*, 1986). Volk *et al.* (2000) dans une étude visant à optimiser l'élimination de la MOD d'eaux de surface par coagulation rapportent des rendements d'épuration de 43 % pour le COD, 38 % pour le CODB et l'absence d'élimination nette du COA probablement parce que cette fraction est constituée de composés de faible poids moléculaire, peu affectés par ce procédé de traitement. Charnock et Kjonno (2000) signalent des taux d'épuration par coagulation filtration/flottation de 52 % pour le COD, 32 % pour le COA et 59 % pour le CODB. L'élimination plus importante des fractions biodégradables et assimilables du COD peut être imputée à l'étape de filtration capable d'atteindre les composés de faible poids moléculaire.

De part sa préférence pour l'élimination des composés de hautes masses moléculaires, la coagulation-floculation-décantation fait apparaître une « redistribution » des masses moléculaires : Owen *et al.* (1990) ont d'ailleurs démontré que la fraction de molécules de masse <500 Da était augmentée au détriment des fractions de molécules de masses supérieures (Tableau II.15).

Tableau II.15. Distribution des masses moléculaires de la MO de l'eau brute (rivière) avant et après coagulation. Les contributions de chacune des fractions sont exprimées en % (d'après Owen *et al.*, 1990).

	> 5000 Da	1000-5000 Da	500-1000 Da	< 500 Da	Abattement total
Eau brute	30	22	24	24	
Eau coagulée	19	36	5	32	
Δ %	- 11	+ 14	- 19	+ 8	- 8

II.2.1.2.2. La filtration

L'étape de filtration correspond au passage de l'eau à une vitesse donnée (quelques mètres par heure) au travers de supports granulaires dont les plus couramment utilisés sont le sable et le charbon actif en grains (CAG).

Le rôle premier des filtres à sable est de retenir les microflocs issus de l'étape de coagulation-floculation n'ayant pas été éliminés par la décantation, et de fait d'améliorer la turbidité des eaux. Ils sont peu étudiés en ce qui concerne leur action sur l'élimination de la MO. Cependant, Dossier-Berne *et al.* (1996) ont montré l'évolution de la MO sur la filière de Méry-sur-Oise à deux périodes différentes (décembre 1992 et août 1993) (Tableau II.16). Lors de la première campagne, ils ont observé une diminution des concentrations en COD (-9%), CODB (-40%) et acides aminés dissous totaux (-19%) après l'étape de filtration sur sable. Même si une fraction plus importante du COD a été éliminée (-17%) durant la deuxième campagne, aucune évolution du CODB n'a été mise en évidence.

Tableau II.16. Concentrations en COD, CODB et acides aminés dissous totaux dans l'eau brute, l'eau décantée et l'eau filtrée sur sable sur la filière de Méry-sur-Oise à deux périodes différentes (d'après Dossier-Berne *et al.*, 1996).

	Décembre 1992			Août 1993		
	COD (mg L ⁻¹)	CODB (mg L ⁻¹)	Acides aminés (μ g C L ⁻¹)	COD (mg L ⁻¹)	CODB (mg L ⁻¹)	Acides aminés (μ g C L ⁻¹)
Eau brute	4,2	1,7	131	3,1	1,5	263
Eau décantée	4,3	1,0	91	2,9	0,8	nd
Eau filtrée sur sable	3,9	0,6	74	2,4	0,8	100

Si les filtres à sable ont essentiellement été pensés pour avoir un effet mécanique, les filtres à charbon actif en grains (CAG) ont initialement été utilisés pour éliminer la MOD des eaux en cours de traitement, par adsorption. Puis, ils se sont avérés être de bons supports pour la fixation des bactéries et le développement de biofilms (10^6 à 10^8 bactéries par gramme de CAG) et ils ont donc été utilisés en qualité de filtre biologique. Ce traitement est souvent placé après l'étape d'ozonation puisqu'il permet d'éliminer la MO des eaux et en particulier la fraction dissoute biodégradable. Il

fournit également l'avantage de réduire les sous-produits d'ozonation et de chloration, les goûts, odeurs et couleurs indésirables (Bablon *et al.*, 1987).

Le procédé fait intervenir deux mécanismes distincts : une action physico-chimique par adsorption des molécules organiques sur la forte surface spécifique du CAG et une action biologique par assimilation et minéralisation des molécules par la biomasse hétérotrophe colonisant le CAG (Bonnet *et al.*, 1991 ; Servais *et al.*, 1991). La contribution relative de chaque phénomène varie en fonction de l'âge des filtres : durant la phase de colonisation du support par la biomasse (environ 3 mois pour atteindre un équilibre), l'élimination est essentiellement liée à l'adsorption, puis progressivement la part de l'épuration liée à l'activité biologique augmente et devient majoritaire (Bouillot *et al.*, 1992).

L'efficacité des filtres CAG est fonction de nombreux paramètres : le temps de résidence de l'eau dans le CAG, la température, la concentration et la nature de la matière organique à éliminer, la qualité du CAG, la diversité bactérienne... (Bouillot *et al.*, 1992 ; Lefebvre et Croué, 1995 ; Servais *et al.*, 1992a ; Van der Kooij *et al.*, 1989).

Selon les auteurs, des abattements de 10 à 50% du COD et de 20 à 90% du COD biodégradable ont été mis en évidence suite à la filtration sur CAG (Bablon *et al.*, 1987 ; Bonnet *et al.*, 1991 ; Capellier *et al.*, 1992 ; Cauchi *et al.*, 1993 ; Lehtola *et al.*, 2002 ; Matilainen *et al.*, 2002 ; Merlet *et al.*, 1992b ; Ribas *et al.*, 1997 ; Servais *et al.*, 1991 ; 1992a). L'importante disparité des données résulte de conditions opératoires différentes dont :

- le mode de fonctionnement du filtre : adsorption ou biodégradation ;
- la température de l'eau qui peut freiner l'activité bactérienne : Merlet *et al.* (1992b) ont d'ailleurs montré qu'en hiver, l'abattement du COD varie de 0 à 15% contre 25 à 30% en période estivale ;
- le temps de contact eau/support : plus le temps est élevé, plus l'élimination du COD et du CODB est importante (Servais *et al.*, 1992a). Merlet *et al.* (1992b) ont ainsi montré qu'un temps de contact dans le filtre de 5 minutes occasionne 7% d'élimination du COD contre 15% après 20 minutes ;
- la diversité des espèces microbiennes présentes dans le filtre et leur affinité pour les substrats organiques à épurer.

Certaines études ont montré que la filtration sur CAG affectait légèrement la distribution hydrophobe/hydrophile du COD en augmentant faiblement la part relative de la fraction hydrophobe (d'autant plus que l'âge du filtre est grand) et de fait, la répartition des masses moléculaires apparentes est peu modifiée (Lefebvre et Croué, 1995 ; Merlet *et al.*, 1992b).

II.2.1.2.3. L'oxydation

Les oxydants, dont les deux principaux employés sont le chlore et l'ozone, sont utilisés pour améliorer la qualité bactériologique des eaux potables. En plus de leur action bactéricide, ils « attaquent » chimiquement la matrice organique. Il en résulte des modifications structurales des composés présents dans l'eau. D'après Doré (1989), les réactions les plus courantes mises en jeu sont :

- des substitutions, des additions, des oxydations lors du traitement au chlore,
- la création de radicaux libres ($\text{OH}\cdot$) extrêmement oxydants, des attaques électrophiles conduisant à la formation de structures cycliques (type quinones), suivies de l'ouverture du cycle aromatique générant des composés aliphatiques (cétones, aldéhydes, alcools, acides), caractéristiques des eaux ozonées.

L'action de ces deux oxydants ne modifie pas ou peu la concentration de la matrice organique mais modifie la structure des molécules organiques.

La chloration

Le chlore est utilisé comme désinfectant. Toutefois, son utilisation crée en parallèle divers problèmes. En effet, hormis les phénomènes de corrosion liés à la chloration (Lee *et al.*, 1980), des augmentations de la concentration en MO, et principalement de sa fraction biodégradable, sont observées ponctuellement sans être explicables (Fass *et al.*, 2003 ; Joret *et al.*, 1989 ; Ribas *et al.*, 1997 ; Van der Kooij, 1986). Mais, le problème majeur lié à l'usage du chlore réside dans la formation de micropolluants organiques halogénés indésirables dans les eaux potables car potentiellement mutagènes voire cancérogènes. Ces composés organohalogénés (TOX), sont principalement générés à partir de composés organiques hydrophobes possédant des groupements carboxyliques (Chang *et al.*, 2001 ; Collins *et al.*, 1986).

Les précurseurs de ces sous-produits de chloration tels que les trihalométhanes (THM) ont été identifiés comme étant des substances humiques (Rook, 1977) ou encore des acides aminés (Trehly *et al.*, 1986). Des relations linéaires ont ainsi pu être mises en évidence entre THM et matière organique (LeChevallier *et al.*, 1991b). Hureiki *et al.* (1996) ont ainsi montré que les acides aminés totaux subissaient un abattement de plus de 60% lors d'une chloration en fin de traitement, confirmant leur très grande réactivité avec le chlore.

D'autre part, Lefebvre et Croué (1995) ont montré que l'action du chlore modifie de manière peu marquée la distribution hydrophobe/hydrophile du COD en diminuant la fraction hydrophobe (-14,5%) et en augmentant les hydrophiles non retenus. Ceci est en accord avec le mode d'action du

chlore puisqu'il conduit à une baisse des masses moléculaires de la matière organique et à la formation de molécules de type acides aromatiques et aliphatiques.

De plus, la chloration entraîne une diminution de l'adsorption UV expliquée par le fait que le chlore agit sur les sites insaturés des composés organiques entraînant une altération des groupements aromatiques (Korshin *et al.*, 1998 ; Westerhoff *et al.*, 2004). Ceci corrobore le fait que l'aromaticité joue un rôle prépondérant dans la consommation du chlore et la formation des sous-produits organohalogénés.

L'ozonation

L'ozone est un oxydant puissant qui permet, lorsqu'il est utilisé en couplage avec la filtration biologique sur CAG, l'élimination de la MOD des eaux brutes et notamment des trihalométhanes (Langlais et Bablon, 1990). L'ozone réagit avec la MO via deux processus : soit directement sous forme moléculaire O₃, soit indirectement sous forme radicalaire (Doré, 1989). Sa réactivité dépend de la quantité et de la structure des composés à oxyder (Hoigné, 1997 ; Westerhoff *et al.*, 1999). L'ozone moléculaire réagit préférentiellement avec les espèces riches en électrons (structures oléfiniques, alcools aromatiques) tandis que les radicaux hydroxyles agissent de manière moins sélective (Hoigné et Bader, 1983a et b ; Westerhoff *et al.*, 1999).

L'ozone n'agit pas ou peu sur la quantité de MO (Galapate *et al.*, 2001 ; Ribas *et al.*, 1997). Elle agit essentiellement sur sa nature en augmentant notamment la proportion de molécules de faible masse moléculaire apparente (Miettinen *et al.*, 1998 ; Miltner *et al.*, 1992 ; Owen *et al.*, 1995). Elle a donc pour conséquence d'augmenter la fraction de matière organique biodégradable (CODB ou COA) au détriment de la fraction réfractaire (Bonnet *et al.*, 1992 ; DeLaat *et al.*, 1991 ; Lefebvre et Croué, 1995 ; Lehtola *et al.*, 2002 ; Merlet *et al.*, 1992a ; Miettinen *et al.*, 1998 ; Ribas *et al.*, 1997 ; Yavich *et al.*, 2004 ; Zacheus *et al.*, 2000). Les acides humiques par exemple, peu ou pas biodégradables sont ainsi transformés en sous-produits – alcanes, aldéhydes, cétones, acides gras – beaucoup plus aisément éliminés par les traitements biologiques (Killops, 1986 ; Lawrence *et al.*, 1980 ; Miltner *et al.*, 1992).

Une étude intéressante sur l'influence de l'ozonation sur les modifications chimiques de la MO excrétée par des algues (filtrat d'une culture d'algues) a été réalisée par Widrig *et al.* (1996). Ils ont montré, grâce à l'utilisation de la pyrolyse couplée à la chromatographie gazeuse et à la spectrométrie de masse (Py-GC-MS), des différences importantes dans le profil des spectres obtenus avant et après ozonation des extraits de MO algale alors qu'ils n'ont montré aucun changement significatif de la concentration en COD (Figure II.16) : l'échantillon ozoné produit un

spectre de profil beaucoup plus simple composé de fragments plus petits et moins nombreux dominé par l'acétonitrile, le méthanol et la pyrimidine. Ces résultats confirment que l'ozone dégrade les macromolécules en unités plus petites. La diminution du pic du pyrrole et de la pyrimidine suggère que l'ozone a converti les composés azotés aromatiques en composés azotés aliphatiques.

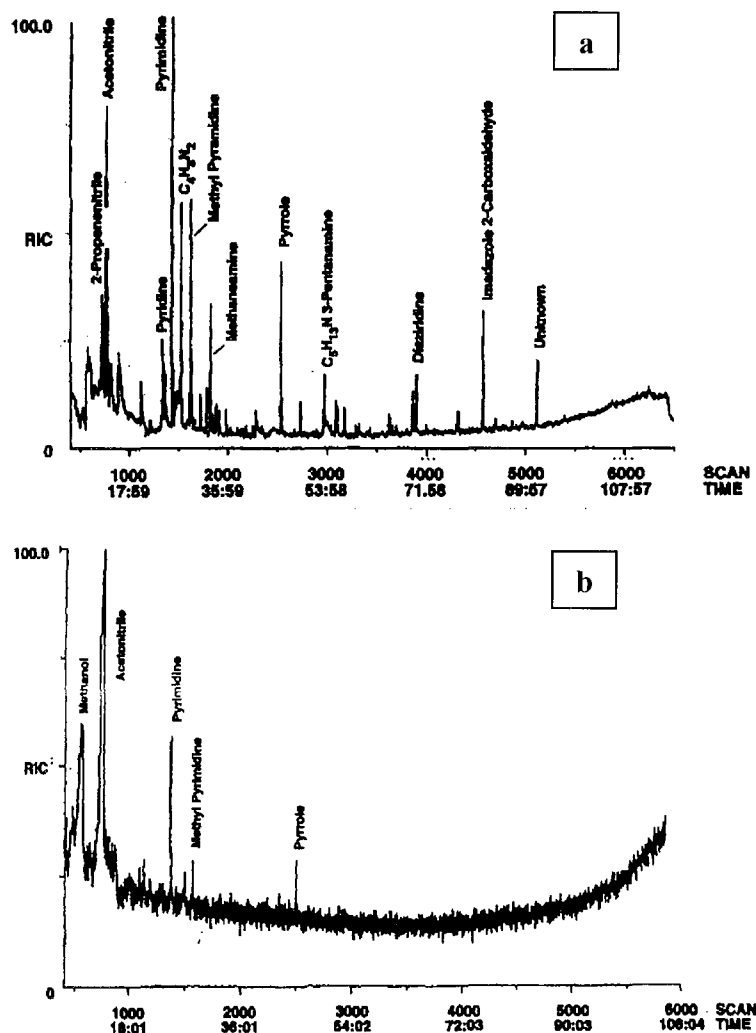


Figure II.16. Pyrochromatogrammes de la matière organique dissoute excrétée par *Scenedesmus quadricauda* avant (a) et après ozonation (b) (d'après Widrig *et al.*, 1996).

L'ozone agit également sur la distribution hydrophobe/hydrophile du COD en augmentant la fraction hydrophile (molécules de faible masse moléculaire apparente) au détriment de la fraction hydrophobe (Figure II.17) (Galapate *et al.*, 2001 ; Lefebvre et Croué, 1995). L'importance de ces modifications est fonction de la dose d'ozone : la fraction hydrophile du COD augmente au détriment de la fraction hydrophobe lorsque le taux d'ozone appliqué en traitement, croît à partir de valeurs proches de $0,5 \text{ mgO}_3 \text{ mgCOD}^{-1}$ (Lefebvre et Croué, 1995). D'autre part, l'action de l'ozone dépend des caractéristiques de l'eau qui influencent les réactions chimiques mises en jeu. Les

paramètres les plus importants sont la nature et la concentration en matière organique, le pH et l'alcalinité (Laplanche *et al.*, 1995 ; Westerhoff *et al.* 1999).

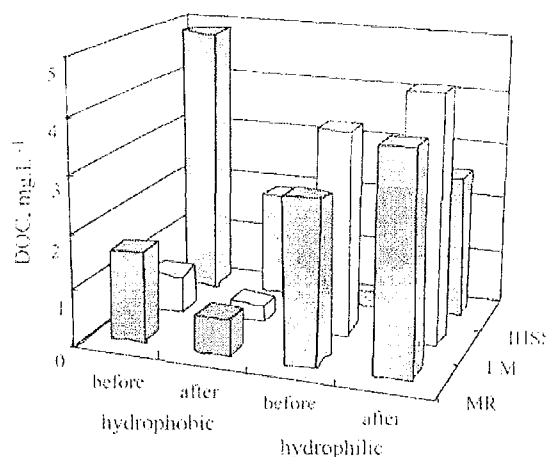


Figure II.17. Distribution des fractions hydrophobe et hydrophile du COD de trois types de matière organique avant et après ozonation (3 mg O₃ / mg COD) (Galapate *et al.*, 2001). IHSS=Acide fulvique modèle extrait de la rivière Suwannee, LM=matières organiques extraites d'humus, MR=eau de réservoir Minaga (Japon).

II.2.2. Composition de la matière organique des eaux potables

La matière organique résiduelle des eaux de distribution est le pool organique non éliminé par les traitements de potabilisation. La composition de la matière organique des eaux potables est relativement mal connue compte tenu des difficultés d'analyse rencontrées. En effet bien que ces eaux ne contiennent que de faibles teneurs en carbone organique (quelques mg L⁻¹), elles englobent plusieurs milliers de composés spécifiques d'origine naturelle (composés humiques, acides aminés, peptides, protéines...) ou anthropique (pesticides, hydrocarbures...). Considérant cette diversité et l'absence de connaissance *a priori* des molécules à analyser, une évaluation exhaustive du pool organique des eaux traitées semble difficilement réalisable. D'autant qu'à ces contraintes s'ajoutent des problèmes techniques liés aux faibles concentrations des composés et de la présence des solutés inorganiques parfois difficilement séparables de la fraction organique à mesurer.

De plus, la qualité de la MO d'une eau potable est sujette à de multiples variations dues aux importants changements (notamment saisonniers) de la MO des eaux brutes (Bonnet *et al.*, 1991 ; Dossier-Berne *et al.*, 1996) dont une fraction sera retrouvée dans l'eau traitée. La figure II.18 montre l'évolution parallèle du COD et du CODB de l'eau en entrée et en sortie de l'usine de traitement de Méry sur Oise suivie sur une période de un an (Dossier-Berne *et al.*, 1996). Il apparaît clairement que l'eau brute conditionne la qualité de l'eau traitée. En ce sens, des événements ponctuels tels que les proliférations algales, les périodes de fortes précipitations, les crues vont

modifier transitoirement la matrice organique de l'eau de ressource et ainsi amener des composés de nature différente dans l'eau traitée. Par exemple, les blooms algaux apporteront essentiellement des hydrates de carbone, des acides aminés, des peptides... (Hellebust, 1967; Sundh, 1989, 1992) fortement biodégradables alors que les fortes pluies amèneront plutôt des composés réfractaires à la biodégradation telles que les substances humiques issues de l'écosystème terrestre (*via* le lessivage des sols) (Münster et Chróst, 1990).

Enfin, la composition de la MO des eaux potables évolue également dans le réseau de distribution (une baisse du CODB est généralement observée signe d'une consommation par les bactéries) ; pour cette raison, nous ne traiterons ici que de la MO présente dans l'eau à la sortie de l'usine de potabilisation.

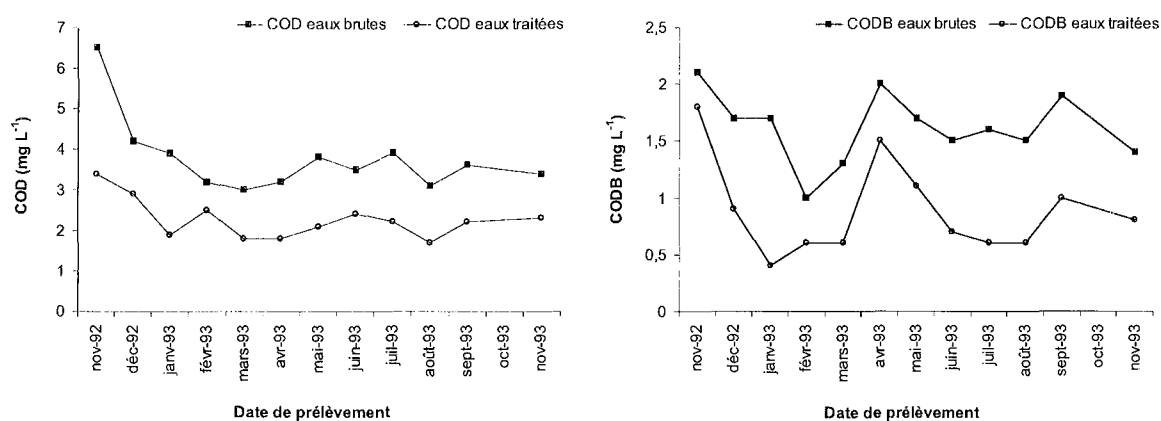


Figure II.18. Evolution des concentrations en COD et CODB de l'eau en entrée et en sortie d'usine de potabilisation de Méry sur Oise (France) (d'après Dossier-Berne *et al.*, 1996).

Malgré ces difficultés d'analyse, quelques données sont disponibles notamment grâce au développement de techniques chromatographiques (CLHP, CPG-SM) permettant de mesurer dans des eaux peu chargées en COD, les concentrations de composés spécifiques comme les acides aminés, certains aldéhydes, acides gras, acides aromatiques (Agbekodo et Legube, 1995 ; Agbekodo *et al.*, 1994, 1996 ; Dossier-Berne *et al.*, 1994, 1996 ; Hureiki *et al.* 1996). Le tableau II.17 résume quelques résultats d'analyses effectuées en sortie de différentes filières de traitements. Même si les valeurs moyennes de COD, CODB et acides aminés recueillies par ces études restent proches, elles ne peuvent en aucun cas être considérées comme une généralité. En effet, lorsqu'elles sont connues, les valeurs minimales et maximales reportées entre parenthèses dans le tableau montrent clairement des variations très importantes au sein même de chaque étude. Les résultats rapportés par Mathieu *et al.* (1992, 1995) montrent ainsi l'importance de la saison sur la qualité organique des eaux potables.

Tableau II.17. Concentration en COD, CODB et acides aminés dissous totaux (AADT) dans différentes eaux traitées. Toutes les usines ainsi que le pilote sont alimentés par une eau de rivière.

Origine de l'eau traitée	COD (mg L ⁻¹)	CODB (mg L ⁻¹)	$\frac{\text{CODB}}{\text{COD}}$ (%)	AADT (μg L ⁻¹)	$\frac{\text{AADT}}{\text{COD}}$ (%)	Référence bibliographique
Usine de Méry s/oise (France) →Fév. 1991 - Fév. 1992 (n=50)	2,55 (1,99-3,66)	0,86 (0,37-1,34)	34	nd	nd	Volk et Joret (1994)
Usine de Méry s/oise (France) →Déc. 1992 - Août 1993 (n=13)	2,4 (1,7-3,5)	0,88 (0,4-1,8)	39 (21-83)	173 (56-153)	4,8 (1,5-7)	Dossier-Berne <i>et al.</i> (1996)
Usines Chomedey et Sainte Rose (Canada) →Août 1993 - Mars 1994	nd	nd	nd	nd	(1-3)	Hureiki <i>et al.</i> (1994)
Système pilote (taille industrielle) →Fév. 1991 - Fév. 1992 (n=6)	1,65 (0,8-1,3) ^{été} (1,6-2,6) ^{hiver}	0,48	29	nd	nd	Mathieu <i>et al.</i> (1992)
Usine de Metz (France) →Été 1989 (n=9) →Hiver 1990 (n=11)	2,4 1,93	0,55 0,35	23 18	nd	nd	Mathieu <i>et al.</i> (1995)

Grâce à l'avancée des techniques, Agbekodo et Legube (1995) ont réussi à déterminer la composition du COD (0,15 mg L⁻¹) et du CODB (< 0,1 mg L⁻¹) d'un perméat de nanofiltration (Tableau II.18). Ils soulignent la proportion majoritaire d'acides aminés totaux (60 et 63 % respectivement) généralement décrits comme des composés fortement biodégradables (Connolly *et al.*, 1994).

Tableau II.18. Caractéristiques moléculaires du COD et du CODB d'un perméat de nanofiltration (d'après Agbekodo et Legube, 1995).

%	COD (0,15 mg L ⁻¹)	CODB (< 0,1 mg L ⁻¹)
Acides aminés totaux	60	63
Aldéhydes	7	5
Acides gras et aromatiques	15	10
Hydrates de carbone et autres	18	22

Bien que très riches en potentiel d'investigation, ces techniques demeurent coûteuses, requièrent du temps et surtout une compétence technique forte. Pour cette raison, la mesure de la biodégradabilité de la MO (CODB et COA) reste un outil de choix pour apprécier la qualité organique d'une eau de distribution. Même si elle reste une méthode d'analyse globale, elle possède l'avantage de fournir une information réelle sur la quantité de substrat utilisable par les bactéries de l'eau alors que la connaissance spécifique des molécules chimiques présentes ne fait que la suggérer.

II.3. Cas particulier de la matière organique d'origine algale (MOA)

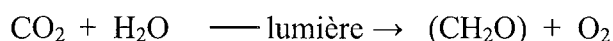
Comme nous l'avons vu précédemment, la matière organique, et particulièrement la matière organique dissoute biodégradable, joue un rôle prépondérant dans la stabilité biologique des eaux puisqu'elle fournit les éléments nécessaires indispensables à la croissance des bactéries. De plus, nous avons également montré que la matière organique des eaux potables provenait principalement de l'eau de ressource. En ce sens, toute modification de la composition de la matière organique des eaux brutes va se répercuter sur la qualité organique des eaux potables. Or, certains épisodes saisonniers ponctuels, tels que les crues, les blooms algaux, les fortes précipitations..., peuvent modifier cette matrice organique des eaux brutes (Hellebust, 1965 ; LeChevallier, 1990 ; Sundh, 1989, 1992), et donc des eaux traitées. Nous avons choisi de nous intéresser plus particulièrement à la matière organique issue des algues (MOA) car certaines études ont suggéré un lien fort entre la prolifération d'algues dans l'eau de ressource et l'apparition de bactéries coliformes dans le réseau de distribution (Lake *et al.*, 2001). L'hypothèse formulée par les auteurs pour expliquer cette relation est la présence d'un haut niveau de COT dans l'eau traitée, principalement composé de MOA facilement assimilable, qui fournirait une excellente source nutritionnelle pour la recroissance des coliformes dans le réseau, même en présence de désinfectant.

II.3.1. Origine de la MOA

Les organismes photosynthétiques, incluant les algues et les cyanobactéries (algues bleues-vertes), génèrent du matériel organique dans les systèmes aquatiques (rivières, lacs, réservoirs...). Cette matière organique peut avoir deux origines différentes (Becquevort *et al.*, 2002) : soit elle est produite directement par sécrétion phytoplanctonique (phénomène naturel lié au métabolisme), soit elle est produite indirectement après lyse cellulaire en réponse à des conditions de stress (lyse virale, stress nutritif ou oxydant...).

II.3.1.1. Sécrétion due au métabolisme

Comme tous les autotrophes, les algues utilisent des éléments minéraux (carbone, azote, phosphore...) pour leur synthèse cellulaire ; lors de la photosynthèse et grâce à l'énergie lumineuse, elles transforment ces éléments minéraux en oxygène et en molécules organiques : ce sont des producteurs. L'équation générale de la photosynthèse s'écrit ainsi (Bougis, 1974) :



Elles fabriquent en effet des produits de dégradation à partir de molécules utilisées pour leurs besoins énergétiques (appelés aussi produits du catabolisme ou catabolites), ou des produits issus de leur activité synthétique (produits de l'anabolisme ou anabolites). Ces produits sont regroupés sous le terme de métabolites. Certains de ces métabolites sont des substances extracellulaires, émises hors de la cellule algale et libérées dans le milieu aqueux. Ce processus est souvent appelé « excrétion », « exudation », ou « relargage extracellulaire » de COD produit photosynthétiquement (Sundh, 1989). D'autres substances, endocellulaires, ne se retrouvent dans l'eau qu'à la mort de l'algue, après la lyse des cellules.

Même s'il est maintenant généralement accepté que le relargage est issu de cellules phytoplanctoniques vivantes en phase active de croissance, des doutes sérieux ont été exprimés en ce qui concerne l'évidence de ce processus chez les cellules saines, certains auteurs supposant que le relargage était principalement dû à la dégénérescence des cellules (Baynes and Pace, 1991). Cependant, une discussion initiée en 1977 a conclu que l'excrétion phytoplanctonique était bien un processus normal pour les algues saines (Aaronson, 1978 ; Fogg, 1977, 1983 ; Mague *et al.*, 1980 ; Sharp, 1977). Myklestad *et al.* (1989) ont de plus montré que le taux de relargage pendant la phase exponentielle de croissance était aussi fort voire supérieur à celui de la phase stationnaire. L'exudation peut donc avoir lieu pendant toutes les phases de croissance et n'est pas forcément une conséquence de la mort des cellules ou d'un stress environnemental. A titre d'exemple, la figure II.19 montre, qu'en parallèle de la prolifération d'une algue verte, la concentration en matière organique dissoute (exprimée par la teneur en polysaccharides) dans le milieu de culture augmente fortement (Lewin, 1956).

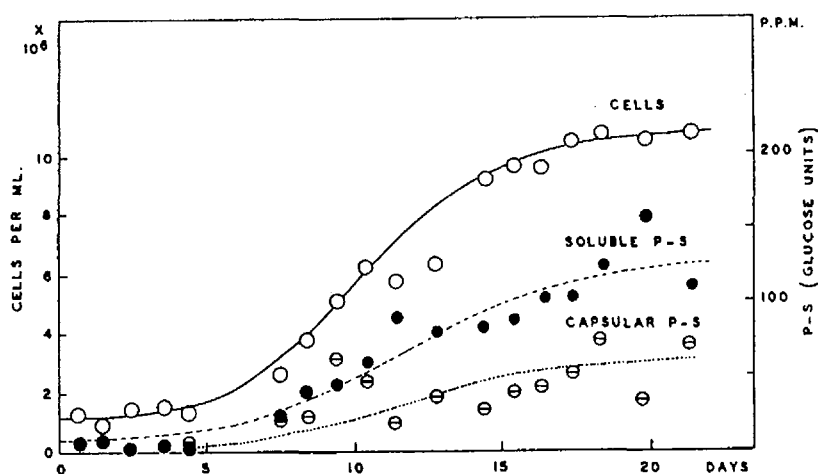


Figure II.19. Multiplication cellulaire de l'algue *Chlamydomonas parvula* en parallèle d'une production de matière organique exprimée dans cette étude en terme de polysaccharides (selon Lewin, 1956).

Plusieurs études ont montré que ce relargage de carbone organique par des cellules autotrophes saines avait lieu dans les cultures d'algues de laboratoire (Mague *et al.*, 1980 ; Malinsky-Rushansky et Legrand, 1996) mais également dans les environnements naturels tels que les eaux douces et les eaux marines (Sundh, 1989, 1992 ; Lignell, 1990).

Ainsi, en période de bloom algal, les algues, qui sont présentes en grande quantité dans les eaux de surface (rivières, lacs, réservoirs...), vont naturellement excréter de la matière organique dissoute dont une fraction est susceptible de se retrouver dans l'eau traitée puisque les traitements conventionnels de potabilisation n'éliminent pas la totalité des composés organiques des eaux brutes.

II.3.1.2. Relargage dû à un stress

En plus de sécréter naturellement de la matière organique au cours de leur croissance, les algues peuvent également relarguer des composés organiques lorsqu'elles sont soumises à des conditions de stress. En ce qui concerne la problématique eau potable, plusieurs études ont en effet montré que l'utilisation des composés chimiques employés lors des traitements de potabilisation (chlore, ozone, sulfate de cuivre...) est accompagnée d'un relargage de composants cellulaires algaux, mesuré par l'accumulation de COD dans le milieu (Plummer et Edzwald, 1998 ; Peterson *et al.*, 1995 ; Betzer and Kott, 1969 ; Echelberger *et al.*, 1971 ; Sukenik *et al.*, 1987).

A titre d'exemple, Peterson *et al.* (1995) ont montré qu'une suspension d'*Aphanizomenon flos-aquae* (cyanobactéries) relarguait une quantité massive de COD lorsque celle-ci subissait différents traitements tels que le chlore, le permanganate de potassium, l'hydroxyde de calcium, le peroxyde d'hydrogène et le sulfate de cuivre (Figure II.20). Dans cette étude, ils ont montré que le relargage de COD augmentait avec la dose du traitement et qu'il pouvait atteindre 20 mg COD L⁻¹ dans le cas du chlore (1 à 1,5 mg Cl₂ L⁻¹) pour une suspension d'algues de l'ordre de 5 10⁹ cellules L⁻¹. D'autres auteurs ont montré des résultats similaires sur l'algue *Scenedesmus* (algue verte) subissant une ozonation (Plummer et Edzwald, 1998 ; Sukenik *et al.*, 1987).

Ce phénomène de relargage de matière organique dissoute par les algues après traitement chimique a pour origine un phénomène de toxicité physiologique (mis en évidence par l'inhibition de la fixation de l'azote) et plus particulièrement une altération de la membrane cellulaire. Peterson *et al.* (1995) ont en effet montré que le stress entraîne un relargage de potassium par la cellule, preuve d'une atteinte membranaire.

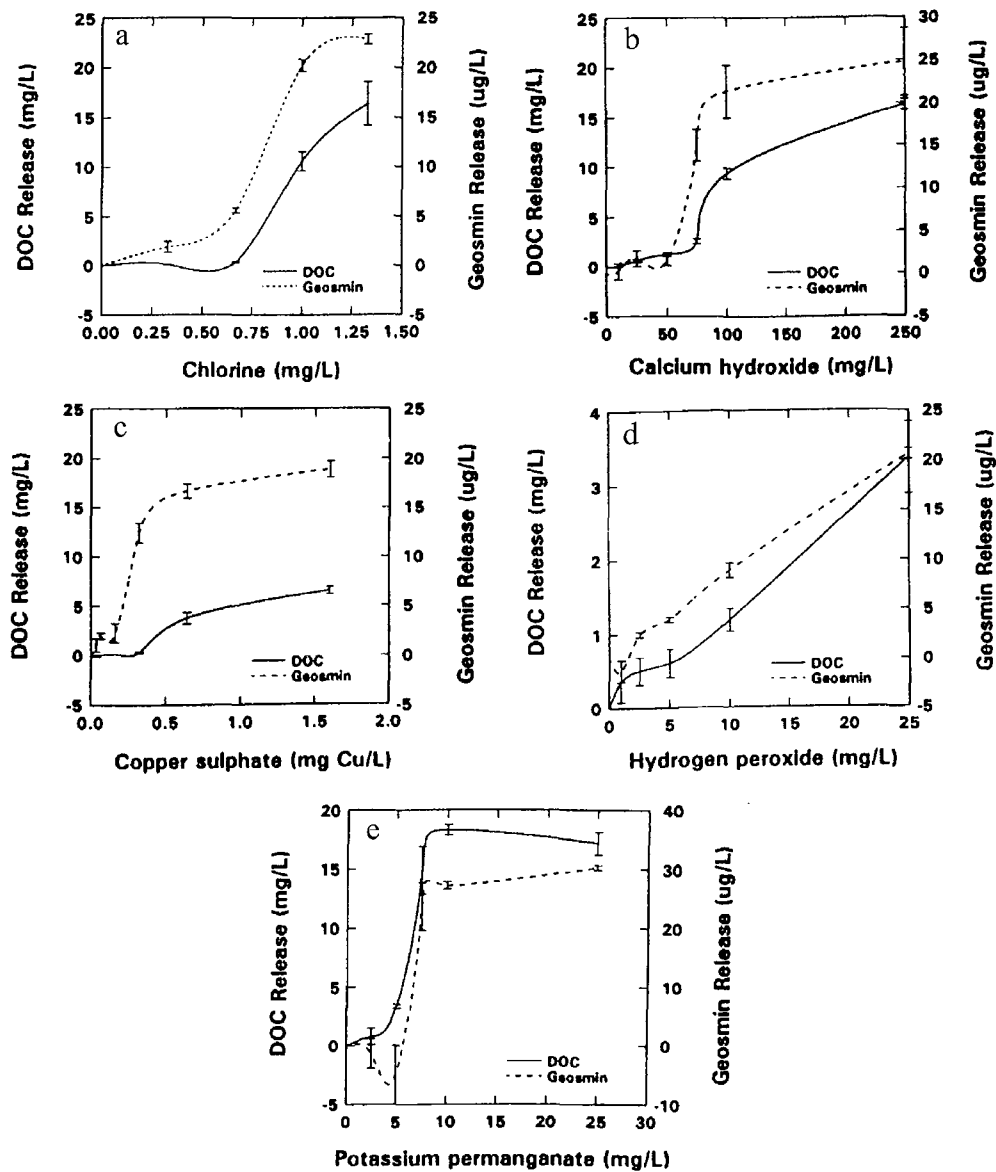


Figure II.20. Effet du chlore (a), de l'hydroxyde de calcium (b), du sulfate de cuivre (c), du peroxyde d'hydrogène (d) et du permanganate de potassium (e) sur le relargage de DOC par *Aphanizomenon flos-aquae* ($5 \cdot 10^9$ cellules L^{-1}) (D'après Peterson *et al.*, 1995).

D'ailleurs, les photographies en microscopie électronique à balayage (MEB) réalisées par Plummer et Edzwald (2000) sur des cellules ozonées (1 à $8 \text{ mg } L^{-1}$) ou chlorées montrent une altération de la morphologie des algues et plus particulièrement des parois (Figure II.21). Ces modifications montrent que l'oxydation a attaqué les structures de l'enveloppe cellulaire et les composants intracellulaires (oxydation, choc osmotique), pouvant avoir pour conséquence le relargage de matière organique dans le milieu (morceaux de paroi, efflux du contenu intracellulaire...) (Plummer et Edzwald, 2000 ; Sukenik *et al.*, 1987). De plus, plus l'oxydation est appliquée à forte dose, plus les structures cellulaires sont altérées : pour de faibles doses d'ozone (1

à 3 mg O₃ L⁻¹), seule la paroi algale semble touchée. Par contre, pour des doses appliquées plus forte (8 mg O₃ L⁻¹ ou 3 mg Cl₂ L⁻¹), des perforations de la cellule sont observables.

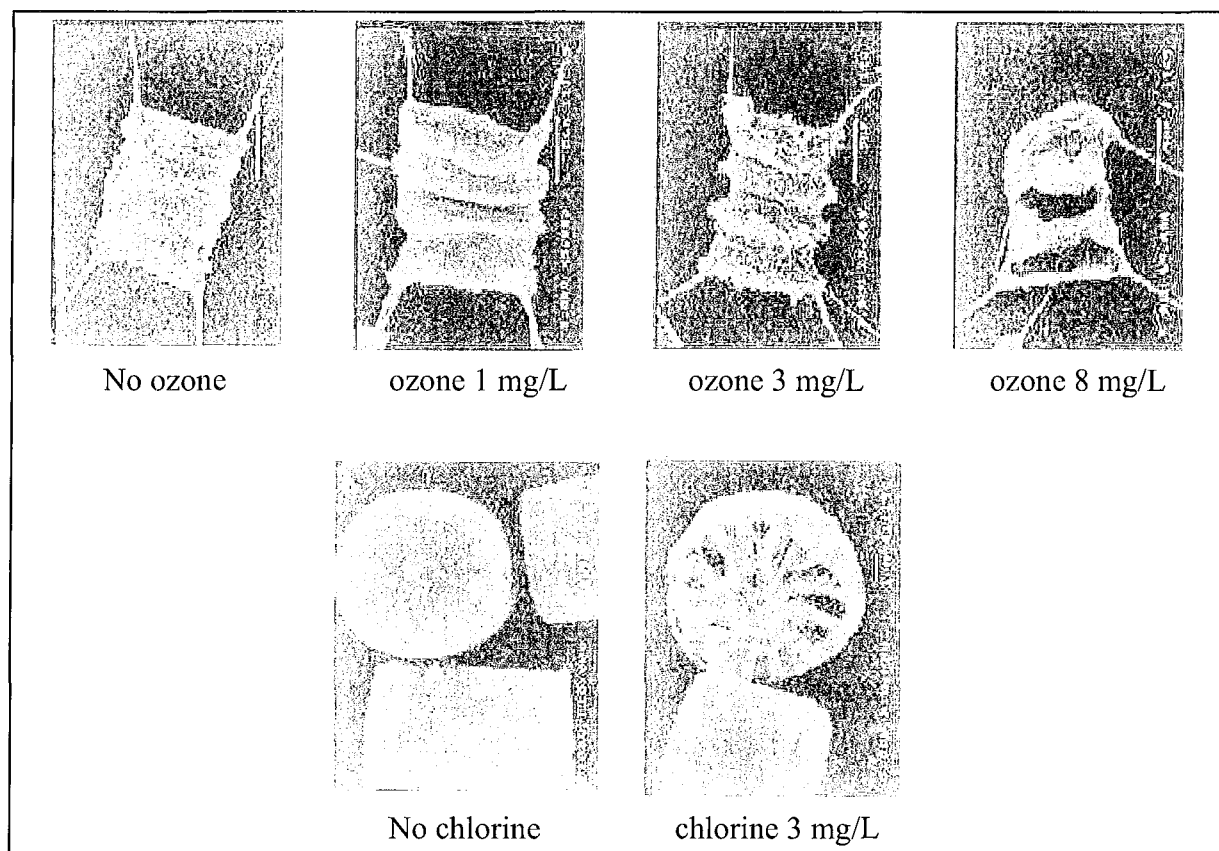


Figure II.21. Photographies en microscopie électronique à balayage de l'algue *Scenedesmus* avant et après ozonation et de l'algue *Cyclotella* avant et après chloration (Plummer et Edzwald, 2000).

II.3.2. Composition chimique de la MOA

II.3.2.1. MOA naturellement sécrétée au cours de la croissance

Peu de choses sont connues en ce qui concerne la composition chimique de la MOA bien qu'un grand nombre de composés ait été détecté dans le filtrat de cultures algales. Cependant, la majorité des études date de plus de vingt ans et les techniques analytiques ne permettaient pas une caractérisation fine des composés. Hellebust en 1965 concluait ainsi que 90% des composés organiques sécrétés étaient inconnus. Depuis, les connaissances sur la MOA n'ont que très peu évolué et seules des grandes classes de composés ont été identifiées. Les informations disponibles sur la composition de la MOA indiquent que les algues libèrent des composés très hétérogènes. Ainsi, une grande variété de composés organiques monomériques et polymériques, tels que des hydrates de carbone, des protéines, des peptides, des acides aminés, des acides organiques dont

l'acide glycolique, des acides nucléiques, des lipides, des composés phosphorylés, des substances phénoliques, des composés volatiles, des vitamines, des toxines, des polyphénols, des enzymes...ont été identifiés (Fogg, 1983 ; Hellebust, 1965, 1974 ; Münster and Chrost, 1990 ; Sundh, 1989, 1992). La quantité et la qualité de la MOA dépendent de la composition des espèces d'algues, de l'état physiologique des cellules et des conditions environnementales (cf § II.3.3). Etant donné qu'une liste exhaustive des composés excrétés par les algues serait impossible à réaliser compte tenu de la diversité, seuls quelques exemples seront illustrés.

Beaucoup d'auteurs ont montré que les hydrates de carbone, et notamment les polysaccharides extracellulaires, étaient la fraction majoritaire de la production photosynthétique (Myklestad *et al.*, 1989 ; Myklestad, 1977, 1995 ; Goldman *et al.*, 1992 ; Lancelot, 1984 ; Sundh, 1992). Myklestad en 1977 l'a d'abord montré sur une culture de diatomées (*Chaetoceros affinis*) en phase stationnaire de croissance. Puis, Myklestad *et al.* (1989) l'ont confirmé en mesurant qu'environ 80% de la sécrétion totale étaient représentés par des polysaccharides. La plupart de ces polymères sont composés de 4 monosaccharides : un hexose (glucose, galactose, fucose ou rhamnose), un pentose (arabinose, xylose ou ribose), un acide uronique (acide glucuronique) et un pentose méthylé (Moore et Tischer, 1964). Ceci est également en accord avec les résultats d'une étude menée par Lancelot (1984) en mer du Nord (espèces dominantes : diatomées et *Phaeocystis pouchettii*) qui a montré qu'en moyenne 77% du matériel excrété par les algues correspondaient à des macromolécules (sans doute principalement des polysaccharides) et 23% à des petites molécules de type monosaccharides, acides aminés et acides organiques incluant l'acide glycolique.

Par comparaison, les protéines, les peptides et les acides aminés représentent généralement une part beaucoup plus faible (<10%) de l'excrétion phytoplanctonique (Myklestad *et al.*, 1972, 1989 ; Mague *et al.*, 1980 ; Hellebust, 1965). A titre d'exemple, Mague *et al.* (1980) ont mesuré que 7% de l'excrétion de *Skeletonema costatum* (diatomée) étaient des acides aminés tandis que Myklestad *et al.* (1989) trouvaient que 4% des composés azotés synthétisés étaient excrétés sous forme d'acides aminés. Les cyanobacéries semblent libérer une fraction plus importante de substances azotées dans le milieu : *Anabaena cylindrica* excrète environ 30% de composés azotés dans des cultures en phase de croissance rapide (Hellebust, 1974).

Les lipides, quant à eux sont très peu étudiés. Pourtant, Billmire et Aaronson (1976) ont montré qu'ils pouvaient représenter 25% de l'excrétion totale de MOA en eau douce, dont deux tiers sont des lipides neutres et un tiers des lipides complexes. Hellebust (1965) a mesuré que la

fraction soluble dans le chloroforme d'extraits de cultures d'algues marines contient de 2 à 10% du matériel excrété, indiquant la présence de quelques composés lipidiques.

Même s'ils sont présents en quantité beaucoup plus faible, certains composés revêtent une importance particulière : ce sont les molécules qui possèdent une activité biologique. Il s'agit des antibiotiques, des toxines ou encore des régulateurs de croissance des plantes. Les toxines, et particulièrement celles des cyanophycées (bactéries longtemps considérées comme des algues car capables de photosynthèse), ont largement fait parler d'elles car elles posent un problème de santé publique. Si des cas mortels ou graves d'intoxication sont connus chez les animaux, par ingestion simultanée d'eau et des algues qu'elle contient, ceux concernant les humains, par consommation d'eau de distribution, sont rares : seuls quelques cas sont d'origine à peu près certaine (Falconer, 1999). Par contre, aucune certitude n'existe sur les éventuelles toxicités chroniques et les effets d'accumulation, à des doses trop faibles pour provoquer des troubles aigus. Des dommages irréversibles du foie et des reins ont été évoqués (AFSSA, 2003 ; Hindman *et al.*, 1975). Les espèces sécrétant des toxines sont listées dans le Tableau II.19.

Tableau II.19. Principales espèces d'algues et de cyanobactéries identifiées comme sécrétant des toxines (AFSSA, 2003 ; Codd, 2000 ; Falconer, 1999 ; Metting and Pyne, 1986).

Microalgue	Toxine	Microalgue	Toxine
Dinophyceae :		Cyanophyceae :	
<i>Protogonyaulax catenella</i>	Saxitoxine, Neosaxitoxine, Gonyautoxines 1-5	<i>Microcystis</i>	Microcystine, Microcystis-type-c, Microcystine-like
<i>P. acatenella</i>	Saxitoxine, autres	<i>Aphanizomenon</i>	Aphantoxines, Neosaxitoxine, Saxitoxine, Icthyotoxine, anatoxine a, cylindrospermopsine
<i>P. tamarensis</i>	Saxitoxine, autres	<i>Anabaena</i>	Anatoxines-a, b, c et d, Saxitoxine, Microcystine
<i>P. monilata</i>	?	<i>Schizothrix calcicola</i>	Aplysiatoxines
<i>P. polyedra</i>	?	<i>Lyngbya gracilis</i>	Debromoaplysiatoxine
<i>Goniodoma sp.</i>	Goniodomine	<i>L. majuscula</i>	Debromoaplysiatoxine, Lygbyatoxine
<i>Dinophysis fortii</i>	Dinophysitoxine-1	<i>Cylindrospermopsis</i>	Cylindrospermopsine, Saxitoxine
<i>Ptychodiscus brevis</i>	2 neurotoxines/1 haemolysine	<i>Oscillatoria nigroviridis</i>	Aplysiatoxine, Anatoxine a, Microcystine
<i>Peridinium polonicum</i>	Glenodine	<i>Calothrix crustacea</i>	Aplysiatoxine
<i>Pyrridinium phoneus</i>	?	<i>Nostoc muscorum</i>	Aplysiatoxine
<i>Noctiluca scintillans</i>	?	<i>Sumplora hydroides</i>	?
<i>Gymnodinium veneficum</i>	Neurotoxine soluble dans l'eau	<i>S. muscorum</i>	Aplysiatoxine
<i>Prorocentrum minimum</i>	Venerupine	<i>Tolypothrix byssoidea</i>	Tubercidine
<i>Amphidinium spp.</i>	Choline esters	<i>Nodularia</i>	Nodularine
<i>Gambierdiscus toxicus</i>	Ciguatoxine + 2 autres		
Haptophyceae :			
<i>Prymnesium parvum</i>	Prymnesine glycolipide		

Outre l'étude des grandes classes de composés organiques, la MOA a également été caractérisée en terme de poids moléculaire. Les études basées sur le fractionnement en fonction du poids moléculaire ont montré que la MOA consiste en une mosaïque de différents composés de faible (<1 kDa) et fort (> 100 kDa) poids moléculaires (Münster and Chrost, 1990). Cependant, les auteurs s'accordent à dire que la plupart des sécrétions phytoplanctoniques est composée de faible

poids moléculaire (<0,5-2 kDa) (Jensen, 1983 ; Lancelot, 1984 ; Maurin *et al.*, 1997 ; Sondergaard et Schierup, 1982), bien que la présence de quelques molécules de haut poids moléculaire ait été rapportée (>50 kDa) (Hoyt, 1970). Le tableau II.20 montre la part importante des molécules de faible poids moléculaire parmi les composés algaux excrétés. Les résultats obtenus pour des cultures de laboratoire sont conformes aux résultats obtenus directement sur des échantillons environnementaux (algues prélevées en eau de surface et mises à incuber le temps que l'excrétion soit mesurable) bien que les techniques pour obtenir la MOA et les méthodes d'analyse soient différentes. Les composés de faible poids moléculaire sont représentés par les acides aminés, les acides organiques et les hydrates de carbone, tandis que les composés de fort poids moléculaire correspondent aux polysaccharides et aux protéines. (Sundh, 1992).

Cette forte proportion de molécules de petite taille fait de la MOA un substrat facilement assimilable par les bactéries (Maurin *et al.*, 1997 ; Sondergaard and Schierup, 1982 ; Sundh, 1992). Même si aucune donnée de la littérature n'a mesuré le potentiel biodégradable des composés algaux (en terme de COA ou de CODB), la MOA peut représenter une source importante de carbone pour les organismes hétérotrophes dans les milieux aquatiques. L'utilisation des composés algaux par les bactéries sera décrite au paragraphe II.3.5

Tableau II.20. Répartition des composés organiques algaux sécrétés en fonction de leur poids moléculaire (PM) dans des cultures de laboratoire et dans des échantillons environnementaux.

Echantillon	Résultats obtenus				Méthode	Référence
	% du COD					
	<2000 Da		>2000 Da			
Filtrat de cultures (phase exponentielle) :					Ultrafiltration sur cartouche	Loyer <i>et al.</i> (1985)
<i>Scenedesmus</i>	64		36			
<i>Chlorella</i>	64		36			
<i>Pseudanabaena</i>	83		17			
<i>Synechocystis</i>	91		9			
	% du COD					
	<3000 Da		3000-10000 Da	>10000 Da		
Filtrat de culture (fin de phase exponentielle) :					Ultrafiltration sur membrane	Plummer and Edzwald (2000)
<i>Scenedesmus</i>	56		24	20		
	% de composés radioactifs (14C)					
Filtrat d'eau de lac incubée 6h :	<700 Da	700-1500 Da	1500-10000 Da	>10000 Da	Chromatographie sur colonne Séphadex	Maurin <i>et al.</i> (1997)
Prélevée à 1 m	59	23	12	3		
Prélevée à 10 m	51	9	12	2		
Prélevée à 15 m	22	15	11	7		

II.3.2.2. MOA relarguée après un stress oxydant

Comme nous l'avons vu au paragraphe II.3.1, la MOA relarguée après un stress oxydant résulte d'altérations structurales de la cellule et non pas d'une sécrétion naturelle due au métabolisme telle que la photosynthèse. Becquevort *et al.* (2002) ont d'ailleurs suggéré que contrairement à la sécrétion naturelle des algues au cours de leur croissance, la lyse du

phytoplancton relarguait essentiellement des molécules de haut poids moléculaire provenant sans doute de la dégénérescence des structures algales. En ce sens, la composition de cette MOA est susceptible d'être différente de celle que nous venons de décrire. Or, à notre connaissance, aucune étude ne s'est attachée à décrire la nature de cette MOA issue du relargage après traitement oxydant.

Cependant, prenant en compte le mode d'action des oxydants et surtout les altérations des cellules algales visibles en microscopie (Figure II.21), nous pouvons supposer qu'une partie des composés relargués correspond à des molécules constitutives de la paroi et/ou à des molécules intracellulaires qui se retrouvent dans le milieu suite à la lyse (perforation) de la cellule algale. Ainsi, les composés susceptibles de se retrouver dans la MOA relarguée après oxydation sont :

- les molécules d'origine pariétale : on peut citer les protéines mais surtout les polysaccharides (cellulose, pectine, mannane, xylane, galactane...) et les sucres simples dont les acides uroniques (Bourelly, 1966 ; Gayral, 1975).

- les molécules d'origine intracellulaire tels que les produits finaux de l'activité photosynthétique (cités au § II.3.2.1), les pigments, et les substances de réserve (polymères du glucose tels que amidon et laminarines) (Bourelly, 1966 ; Gayral, 1975).

Cependant, on ne peut pas occulter que les oxydants, après avoir attaqué la cellule, peuvent également réagir avec la MOA relarguée au cours des premiers temps d'oxydation et ainsi provoquer des modifications chimiques. Par exemple, par analogie aux connaissances sur l'action des oxydants sur les composés organiques des eaux, il est envisageable que l'ozonation de cellules algales engendre de la MOA très biodégradable en cassant des liaisons, des cycles aromatiques..., et en augmentant ainsi la fraction des petits poids moléculaires, plus facilement assimilables par les bactéries (DeLaat *et al.*, 1991 ; Doré, 1989 ; Lefebvre et Croué, 1995 ; Merlet *et al.*, 1992a ; Miettinen *et al.*, 1998 ; Owen *et al.*, 1995 ; Ribas *et al.*, 1997 ; Widrig *et al.* 1996).

II.3.3. Facteurs influençant l'excrétion de MOA

L'excrétion de MOA par les algues est sujette à de nombreuses variations tant qualitatives que quantitatives. Parmi les paramètres qui influencent la production phytoplanctonique, nous pouvons citer les conditions physiologiques et environnementales (intensité lumineuse, statut nutritif, phases de croissance...) ainsi que le type d'algues.

II.3.3.1. Conditions physiologiques et environnementales

Plusieurs études relativement anciennes ont noté l'importance de la composition du milieu et du statut nutritif dans le relargage de composés organiques par les algues (Bratbak, 1987 ; Hellebust, 1974 ; Ignatiades and Fogg, 1973 ; Wangersky, 1978). Myklestad and Haug (1972), en réalisant une étude sur la diatomée marine *Chaetoceros affinis*, ont en effet montré que la phase exponentielle de croissance favorisait l'excrétion des protéines alors que les polysaccharides extracellulaires étaient principalement produits durant la phase stationnaire, lorsqu'il ne reste plus d'azote ni de phosphore dans le milieu. Ceci semble biochimiquement possible puisque l'azote et le phosphore ne sont pas incorporés dans les polysaccharides. Dans cette même étude, ils ont montré qu'une limitation sévère en phosphore augmentait la production de polysaccharides tout en empêchant celle des lipides.

Les données concernant la sécrétion de MO en fonction des différentes phases de croissance des algues sont cependant très variables. Plusieurs études ont montré que le taux spécifique de relargage était plus fort lors de la phase exponentielle par rapport à la phase stationnaire de croissance (Hellebust, 1974 ; Moore et Tischer, 1964). Myklestad *et al.* (1989) ont mesuré le relargage spécifique d'hydrates de carbone et d'acides aminés dans des cultures de *Chaetoceros affinis*. Le tableau II.21 montre que ces deux classes de composés sont relarguées à un taux plus important durant la phase exponentielle de croissance de ces algues. Ces données sont en contradiction avec d'autres données plus anciennes (Hellebust, 1974 ; Sharp, 1977). A titre d'exemple, Ramus and Robins (1975) ont fait une découverte intéressante : ils ont montré que des cellules de *Porphyridium aerugineum* (algue rouge) en phase exponentielle synthétisaient des polysaccharides trois fois plus vite qu'en phase stationnaire ; cependant, en étudiant l'appareil de Golgi (lieu de la synthèse polysaccharidique), ils ont montré qu'une partie des polysaccharides étaient stockés pendant la phase exponentielle puis relargués pendant la phase stationnaire, provoquant ainsi un relargage plus important durant cette phase.

Tableau II.21. Taux de relargage extracellulaire d'hydrates de carbone et de protéines par cellule dans une culture de *Chaetoceros affinis* (diatomée) pour différentes phases de croissance (d'après Myklestad *et al.*, 1989).

	Taux de relargage extracellulaire	
	Hydrates de carbone (pg cellule ⁻¹ j ⁻¹)	Acides aminés (pmol cellule ⁻¹ j ⁻¹)
Phase exponentielle	42	0,038
Phase de transition	18	0,025
Phase stationnaire	20	0,026

Il existe peu d'études en ce qui concerne l'effet de l'intensité lumineuse sur l'excrétion algale. Cependant, en intervenant dans la photosynthèse, il paraît logique que la lumière puisse jouer un rôle important. Hellebust (1965) a montré que la proportion de carbone sécrété par rapport au carbone assimilé n'était pas affectée par l'intensité lumineuse pour des valeurs intermédiaires de 3000 à 25000 lux (Tableau II.22). Par contre, des algues exposées à la lumière directe du soleil (120000 lux) ont montré des taux d'excrétion beaucoup plus importants (jusqu'à 11 fois supérieurs), résultant probablement de dommages cellulaires dus à des phénomènes de photooxydation. Mague *et al.* (1980), en marquant les cellules au ^{14}C , ont clairement montré qu'un accroissement fort ($\times 10$) de l'intensité lumineuse provoquait une augmentation de l'excrétion alors que l'assimilation du ^{14}C dans les cellules algales était simultanément fortement inhibée.

En ce qui concerne la composition de la matière organique excrétée, la synthèse des hydrates de carbone prédomine lorsque les conditions lumineuses sont optimales, alors que les algues produisent principalement du matériel protéique lorsque la lumière n'est pas optimale pour la photosynthèse, ou pendant la nuit (Münster and Chrost, 1990).

Tableau II.22. Influence de l'intensité lumineuse sur l'excrétion phytoplanktonique mesurée par la technique d'incorporation du C^{14} (d'après Hellebust, 1965).

Espèce d'algue	% de carbone excrété*		
	3000 lux ^a	25000 lux ^a	120000 lux ^b
<i>Desmokiaceae</i>			
<i>Exuviella</i> sp.	2,4	7,7	9
<i>Bacillariophyceae</i>			
<i>Chaetoceros simplex</i>	22	24	18
<i>Skeletonema costatum</i>	6,2	5,6	38
<i>Thalassiosira fluviatis</i>	4,9	3,6	13
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	7,7	5,4	43
<i>Chlorophyceae</i>			
<i>Pyramimonas</i> sp.	5	7,8	20

* par rapport au carbone assimilé ^a 4 jours à 20°C ^b 5 h à la lumière directe du soleil (120000 lux) à 18°C

II.3.3.2. Espèces d'algues

L'excrétion phytoplanktonique peut également être variable selon l'espèce d'algue considérée. Toutes les algues ne réagissent pas de la même manière et notamment en ce qui concerne l'effet de la limitation en nutriments. A titre d'exemple, les résultats d'une étude menée par Moore et Tischer (1964), illustrée au tableau II.23, ont montré que toutes les espèces d'algues étudiées relarguaient des polysaccharides extracellulaires dans le milieu de culture mais que la nature des monomères composant ces polysaccharides était variable selon l'espèce.

Tableau II.23. Monosaccharides détectés dans l'hydrolysat des polysaccharides extracellulaires de différentes cultures d'algues monospécies (D'après Moore et Tischer, 1964). * X : indique la présence du monosaccharide.

Espèces algales	Glucose	Galactose	Arabinose	Xylose	Ribose	Acide glucuronique	Fucose	Rhamnose
<i>Chlamydomonas sp.</i>	X*			X			X	
<i>Nostoc sp.</i>	X		X			X	X	
<i>Chlorella ellipsoidea</i>	X		X			X		X
<i>C. vulgaris</i>	X			X		X		X
<i>Palmella mucosa</i>	X		X			X	X	
<i>Oocystis sp.</i>		X	X			X	X	
<i>Chlorella sp.</i>	X		X			X		X
<i>Anabaena flos-aquae</i>	X			X	X	X		

De même, Hellebust (1965), en étudiant 22 espèces différentes d'algues unicellulaires marines (culture de laboratoire), a également noté plusieurs différences inter-espèces en terme de taux spécifique de relargage.

Enfin, dans une étude plus récente, Widrig *et al.* (1996) ont mis en évidence des différences dans la composition de la matière organique sécrétée par *Dictyosphaerium pulchellum* et *Scenedesmus quadricauda* (algues vertes), malgré des conditions de culture identiques. Les pyrochromatogrammes du matériel organique extracellulaire des deux espèces d'algues (obtenus par pyrolyse-GC-MS) sont rapportés à la figure II.22. Le profil de *Dictyosphaerium pulchellum* est dominé par des composés azotés, la plupart de nature aliphatique et d'origine protéique, et par des acides carboxyliques à longues chaînes dérivés des lipides. Au contraire, la pyrimidine, un composé aromatique azoté, représente le pic majeur dans le profil de *Scenedesmus quadricauda* et très peu d'acides carboxyliques sont détectés. Lancelot et Billen (1985) reportent que ces différences inter-espèces sont certainement aussi importantes dans les environnements naturels.

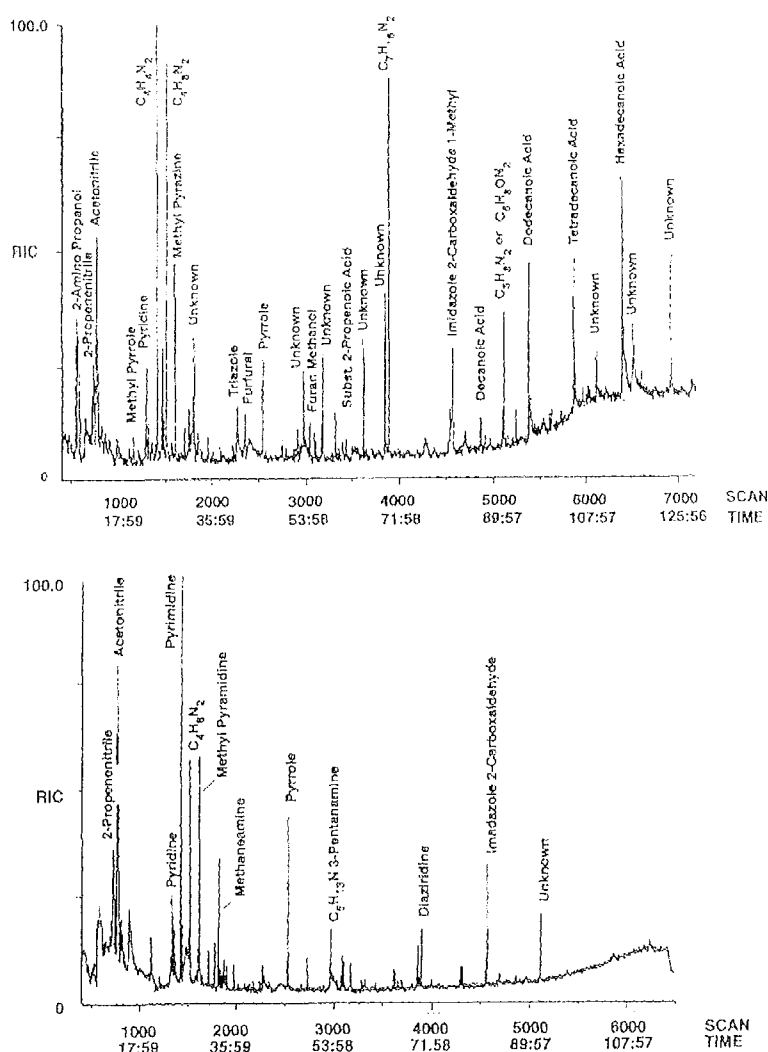


Figure II.22. Pyrochromatogrammes du matériel extracellulaire de deux algues vertes : *Dictyosphaerium pulchellum* (en haut) et *Scenedesmus quadricauda* (en bas) (d'après Widrig *et al.*, 1996).

II.3.4. Mécanismes d'excrétion de la MOA

Peu de choses sont connues en ce qui concerne les mécanismes d'excrétion par les algues phytoplanctoniques bien qu'il soit de plus en plus évident que les petites molécules telles que les sucres, les acides aminés et les acides organiques soient transportées par simple diffusion à travers la membrane cellulaire (Hellebust, 1974).

Comme chez les bactéries, le taux de relargage va dépendre du coefficient de perméabilité membranaire (correspondant à la vitesse de diffusion d'un composé à travers la membrane) pour une substance donnée (Figure II.23) et du gradient de concentration de part et d'autre de la membrane (Hellebust, 1974). A titre d'exemple, quand le glycérol est le produit extracellulaire le plus abondant chez *Dunaliella tertiolecta* (chlorophycée), il est également le métabolite intracellulaire le plus abondant (Hellebust, 1965). Mague *et al.* (1980) ont suggéré que tant qu'il y a

une quantité importante de petites molécules dans le pool soluble intracellulaire, une fraction de ces molécules diffusera toujours à travers le plasmalemmes vers le milieu extérieur.

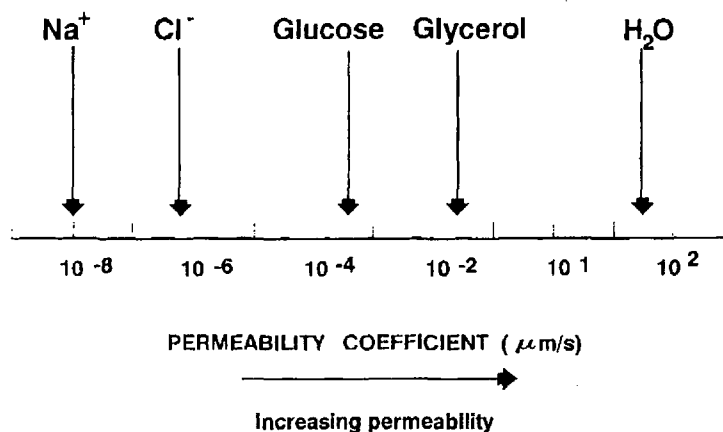


Figure II.23. Coefficient de perméabilité de la bicouche lipidique membranaire (d'après Stryer, 1988).

Bjornsen (1988) a calculé que la diffusion passive expliquait à elle seule 5% du relargage par jour, avec une exudation continue durant toute la nuit. A partir d'études effectuées dans la mer Baltique, Lignell (1990) a conclu que l'exudation de la plupart des composés organiques à travers la membrane cellulaire se faisait via des transporteurs actifs parce que les molécules avaient des masses moléculaires de 300 à 600 daltons ou plus. Le taux de diffusion de telles molécules serait négligeable sans ce type de transporteurs. Les macromolécules telles que les protéines et les polysaccharides sont excrétées par des mécanismes plus complexes, mais les étapes spécifiques ne sont pas connues chez les algues. La translocation des protéines a été largement étudiée chez les bactéries et le procédé biochimique est connu pour certaines protéines (Verner and Schatz, 1988). Il a été proposé que, chez les algues, l'appareil de Golgi synthétise des vésicules remplies de polysaccharides qui sont ensuite transportées vers la membrane cellulaire. Les vésicules fusionnent alors avec la membrane et leur contenu est relargué en dehors de la cellule par exocytose. Un procédé similaire a été suggéré par Ramus and Robins (1975) sur la base d'une étude en microscopie électronique avec l'algue rouge unicellulaire *Porphyridium aerugineum*.

II.3.5. Relation MOA-bactéries

Connaissant la nature des composés sécrétés par les algues, il paraît évident que certaines de ces substances sont assimilables par les bactéries (glucides, acides aminés...) (Keil et Kirchman, 1991). Ce phénomène va dépendre de la biodégradabilité de la MOA qui est reliée d'une part à la composition chimique et moléculaire des composés organiques mais aussi à la capacité

enzymatique des bactéries. Quelques études environnementales ont indiqué que l'assimilation de la MOA par les bactéries dépendait de sa composition en poids moléculaire (PM) (Münster et Chrost, 1990). Les composés de PM inférieur à 1000 Da sont préférentiellement utilisés, et le pourcentage d'assimilation par les bactéries diminue lorsque la taille des molécules augmente.

A titre d'exemple, Maurin *et al.* (1997) ont étudié l'assimilation des substances organiques algales par les bactéries. Pour suivre le devenir des substances organiques, une technique de radiomarquage a été utilisée. Du bicarbonate de sodium marqué au carbone 14 ($\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$) est ajouté dans les cultures d'algues. Le carbone assimilé par les algues est incorporé dans les molécules organiques synthétisées par le processus de la photosynthèse. Dans cette étude, les différentes molécules marquées sécrétées par les algues ont été séparées selon leur taille et non selon leur classe. Les résultats font apparaître que les molécules de faible PM (<1500 Da) sont à plus de 90% assimilées par les bactéries tandis que les molécules supérieures à 1500 Da sont faiblement assimilées (9%). Ces dernières nécessitent une hydrolyse par des enzymes exocellulaires avant de pouvoir être utilisées par les bactéries hétérotrophes (Becquevort *et al.*, 2002). Des résultats semblables ont été obtenus par Jensen (1983) et Sundh et Bell (1992).

De même, une étude menée par Chrost et Faust (1983) a montré que la composition de la MOA après 24 heures d'incubation avec une population bactérienne naturelle changeait significativement (Figure II.24) en parallèle de l'augmentation du nombre de bactéries dans l'échantillon : en effet, au début de l'expérience, les composés de faible PM (<500 Da) constituaient environ 35% du COT, alors qu'après 12 et 24 heures d'incubation avec les bactéries, ils ne représentaient plus que 11 et 5% respectivement. Parallèlement, une augmentation de la participation des composés de fort PM (>300000 Da) est observée parmi la MOA résiduelle.

A l'heure actuelle, une seule étude s'est attachée à décrire l'influence de la MOA sur le comportement d'une population d'Entérobactéries (coliformes) en eau de distribution : Boualam (2001) a travaillé sur une eau potable enrichie ou non avec un surnageant de culture d'algues ou une eau de rivière (COD équivalent) et a comparé le comportement de coliformes inoculés dans ces eaux en présence des bactéries autochtones de l'eau de distribution. Il a montré que des bactéries coliformes inoculées (10 souches) dans le milieu contenant la MOA étaient capables de se multiplier et de survivre plus longtemps que dans les deux autres eaux testées (eau de rivière et eau potable) (Figure II.25). Il a expliqué ce comportement par le pourcentage de COD consommé dans les différentes eaux : 32% pour la MOA, 20% pour l'eau de rivière et seulement 6% pour l'eau potable.

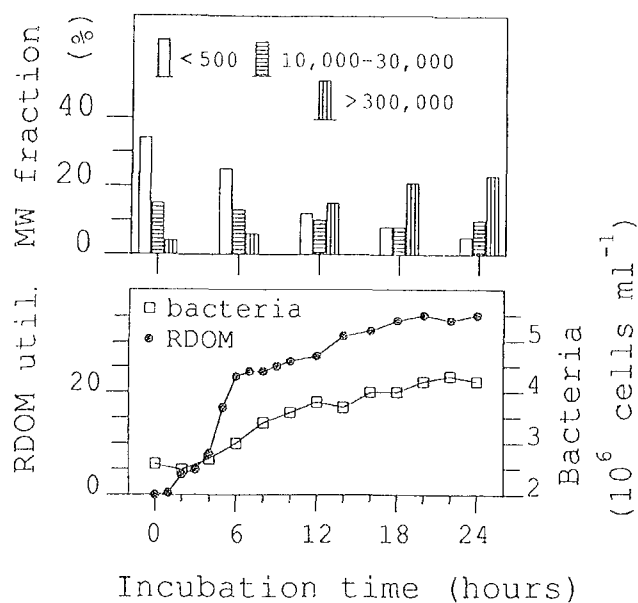


Figure II.24. Croissance bactérienne et utilisation des fractions de faible et fort poids moléculaire de la matière organique dissoute relarguée par les algues (RDOM) dans l'estuaire de la rivière Rhode (d'après Chrost and Faust, 1983).

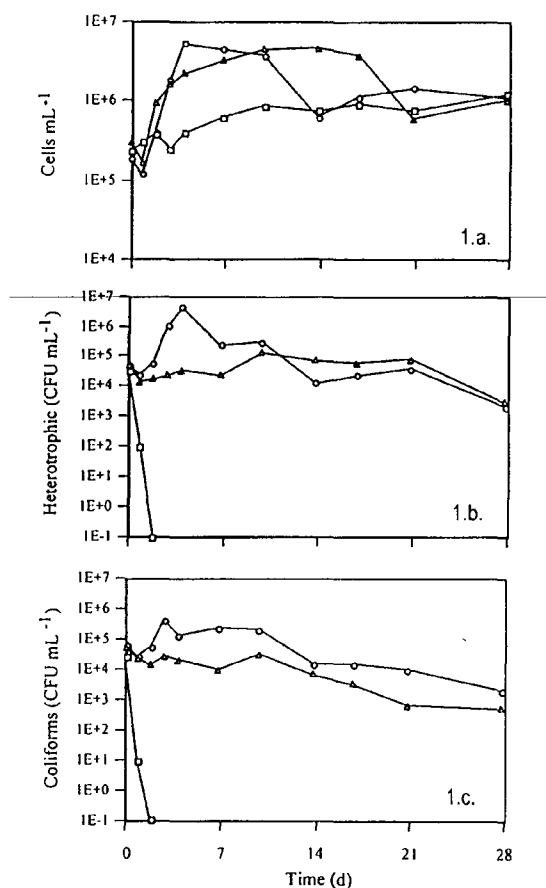


Figure II.25. Evolution du nombre de bactéries totales (1.a.), de bactéries hétérotrophes cultivables (1.b.) et de coliformes cultivables (1.c.) dans trois types d'eau pendant 28 jours à 20°C. I=eau potable (COD=1,6 mg L⁻¹), Δ=eau potable+eau de rivière (COD=1,8 mg L⁻¹), O=eau potable+surnageant algal (COD=1,8 mg L⁻¹) (d'après Boualam, 2001).

Même si ces études démontrent que la MOA est un substrat privilégié pour les bactéries, certains auteurs reportent qu'elle pourrait également inhiber la croissance bactérienne de part la présence d'antibiotiques relargués en parallèle. Cependant, ces études montrent souvent des résultats contradictoires. A titre d'exemple, les travaux de Jorgensen et Nielsen (1961) ont étudié l'effet de filtrats de différentes cultures d'algues unicellulaires (principalement la chlorophycée *Chlorella vulgaris*) sur la croissance de *Staphylococcus aureus*. Selon les cas, ils ont observé soit une diminution, soit une augmentation de la croissance de la bactérie (Figure II.26). Des substances activant la croissance ou l'inhibant ont été mises en évidence dans les filtrats sans pour autant les identifier. De plus, les auteurs suggèrent que les concentrations de ces substances sont très variables même pour la même espèce d'algue cultivée dans les mêmes conditions.

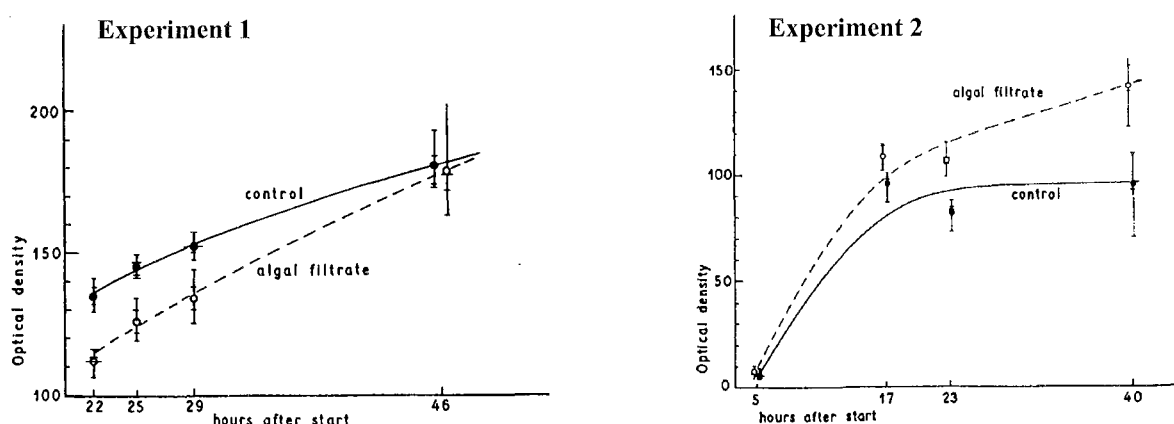


Figure II.26. Croissance de *Staphylococcus aureus* en bouillon supplémenté avec le milieu de culture algale frais (control) ou avec le filtrat d'une culture de *Chlorella vulgaris* de 1 mois (chaque point correspond à la moyenne de 4 mesures) (d'après Jorgensen et Nielsen, 1961).

Compte tenu des connaissances bibliographiques, la MOA représente sans doute une matrice organique particulière qui semble capable de promouvoir la croissance bactérienne. Les rares études, plutôt anciennes, qui ont décrit la relation MOA-bactéries ont été appliquées aux bactéries issues de milieux environnementaux tels que les rivières ou les lacs. A l'exception de l'étude de Boualam (2001), aucune donnée n'est disponible sur l'effet de la MOA sur les bactéries des eaux potables et particulièrement sur des sous-populations telles que les Entérobactéries.

Chapitre III - Matériel et méthodes

III.1. Matériel et verrerie.....	79
III.2. Culture d'algues.....	79
III.2.1. Milieu de culture.....	79
III.2.2. Inoculum algal.....	79
III.2.3. Mise en culture.....	79
III.3. Dénombrement des algues.....	80
III.4. Oxydation des algues ou de la MOA.....	80
III.4.1. Solution d'hypochlorite de sodium.....	80
III.4.2. Dosage du chlore en solution.....	80
III.4.3. Production d'ozone.....	81
III.5. Inoculum d' <i>Escherichia coli</i>	82
III.6. Milieux de culture gélosés bactériens.....	82
III.6.1. Gélose CASO.....	82
III.6.2. Gélose lactosée au TTC-tergitol.....	83
III.6.3. Gélose non sélective PCA (Plate Count Agar).....	83
III.7. Méthodes de dénombrement bactérien.....	83
III.7.1. Dénombrement des bactéries cultivables sur gélose non sélective (PCA).....	83
III.7.2. Dénombrement des bactéries cultivables sur gélose sélective (TTC-tergitol).....	83
III.7.3. Dénombrement des bactéries totales après marquage au DAPI.....	84
III.7.4. Dénombrement des bactéries par mesure d'intégrité membranaire.....	84
III.7.5. Dénombrement des bactéries par hybridation <i>in situ</i> (FISH).....	86
III.7.6. Dénombrement des Entérobactéries viables par la méthode DVC-FISH.....	87
III.8. Détermination microscopique de la taille des bactéries.....	88
III.9. Méthodes de caractérisation de la matière organique dissoute (MOD).....	88
III.9.1. Carbone Organique Dissous (COD).....	88
III.9.2. Carbone Organique Dissous Biodégradable (CODB).....	89
III.9.3. Sucres totaux.....	89
III.9.4. Protéines totales.....	89
III.9.5. Acides aminés.....	90
III.9.6. Fluorescence.....	91
III.9.7. Absorbance UV.....	91
III.9.8. Mesure des trihalométhanes (THM) et autres composés organohalogénés.....	91
III.9.9. Dosage des précurseurs de trihalométhanes (pTHM).....	92
III.9.10. Chromatographie d'exclusion de taille.....	92
III.9.11. Pyrolyse CG/SM.....	93
III.9.12. Ultrafiltration.....	94
III.10. Caractérisation minérale des eaux.....	95
III.10.1. Dosage de l'azote et du phosphore.....	95
III.10.2. Mesures du pH et de la conductivité.....	95
III.11. Réacteurs Propella™.....	96
III.11.1. Caractéristiques des réacteurs.....	96
III.11.2. Calcul de la droite de lessivage théorique.....	97
III.11.3. Méthode de prélèvement des échantillons.....	97
III.12. Analyses statistiques.....	98
III.12.1. Tests non paramétriques.....	98
III.12.2. Analyse en composante principale (ACP).....	98

III.1. Matériel et verrerie

Toute la verrerie utilisée est lavée avec un détergent (Franklab S.A., réf. TFD7PF), rincée à l'eau déminéralisée puis passée au four à 550°C pendant 4 heures afin d'éliminer les traces de matière organique. La verrerie ne supportant pas la chaleur (fioles) est traitée dans un bain d'acide nitrique à 30% pendant une nuit puis rincée abondamment avec de l'eau milliQ. Toutes les solutions préparées sont stérilisées par filtration sur membrane en nitrocellulose de diamètre de pore 0,2 µm (Millipore, réf. SLGS025OS) ou par autoclavage pendant 15 minutes à 121°C. Les pipettes à usage unique et les filtres utilisés sont préalablement rincés à l'eau milliQ stérile afin de limiter tout relargage de matière organique.

III.2. Culture d'algues

III.2.1. Milieu de culture

Le milieu de culture pour algues utilisé est le milieu LC (Lefebvre-Czarda) modifié dont la composition est la suivante (pour un litre d'eau milliQ) : 40 mg $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 100 mg KNO_3 , 30 mg $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 40 mg K_2HPO_4 , 15 µg $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 30 µg $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 30 µg $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 30 µg $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 30 µg $\text{Mn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 30 µg $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 30 µg H_3BO_3 , 812,5 µg $\text{C}_6\text{H}_5\text{FeO}_7 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 312,5 µg $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 312,5 µg $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Le milieu est stérilisé par autoclavage pendant 15 minutes à 121°C puis conservé à 4-10°C pendant un mois maximum. Le pH est de $7,1 \pm 0,1$.

III.2.2. Inoculum algal

Les algues utilisées proviennent d'une eau de rivière (Moselle, Sept. 2001). Elles sont récupérées par filtration sur membrane en polycarbonate de diamètre de pore 2 µm (Millipore, réf. TTTP04700) et sont ensuite désorbées de la membrane par ultrasons dans 10 mL de milieu de culture LC. Cette suspension, constituant l'inoculum algal, contenait 26% de diatomées, 53% de chlorophycées et 1% de cyanophycées (détermination par comparaison à une planche).

III.2.3. Mise en culture

L'inoculum algal ainsi obtenu (§ III.2.2) sert à ensemercer le milieu de culture LC. La quantité en algues initiale est d'environ 10^7 algues L^{-1} . La culture est placée à $25 \pm 2^\circ\text{C}$ sous agitation (35 rpm) avec un photopériodisme de 16h par 24h (environ 5000 lux). La culture est aérée par bullage CO_2/air (2%). Lorsque la concentration en COD sécrétée atteint un plateau, le surnageant de la culture est filtré sur 0,2 µm afin de récupérer uniquement la matière organique dissoute (MOA-

NS) et de stériliser le milieu. En parallèle, les algues sont remises en culture et diluées (1/4) avec du milieu LC dès l'atteinte de la phase stationnaire de croissance afin de renouveler les éléments minéraux. La culture utilisée dans les essais d'oxydation de cellules algales est entretenue de cette manière depuis 9 mois et est composée (au moment de l'utilisation) à plus de 99% du seul genre *Chlorella* (pression de sélection dans le milieu).

III.3. Dénombrement des algues

Les algues sont dénombrées à l'aide d'une cellule de Nageotte : 2 à 3 gouttes de suspension d'algues sont déposées dans la cellule et le comptage se fait au microscope photonique au grossissement x40. Les algues sont comptées dans les 40 bandes de la cellule, représentant un volume total de 50 μL . Cependant, si la concentration est très importante, le comptage est effectué sur 8 bandes (une toutes les cinq). Les résultats sont exprimés en nombre total d'algues rapporté à 1 litre selon le calcul suivant : $A = 20 \times a \times 1000$, où a est le nombre d'algues dans les 50 μL examinés (40 bandes) et 20 le nombre de volume de 50 μL dans 1 mL.

III.4. Oxydation des algues ou de la MOA

III.4.1. Solution d'hypochlorite de sodium

Une solution commerciale concentrée de javel à 36° chlorométrique ($\approx 112 \text{ g L}^{-1}$) est titrée systématiquement avant chaque expérience. Toutes les dilutions sont réalisées avec de l'eau distillée apyrogène (Braun-Fandre). Le stockage de la solution mère se fait à 4-10°C à l'abri de la lumière. La solution d'hypochlorite de sodium servant à l'étape de chloration est préparée quelques minutes avant utilisation.

III.4.2. Dosage du chlore en solution

La concentration en chlore dans l'eau est déterminée par la méthode du DPD (N, N-diéthyl-p-phénylènediamine). Cette méthode est basée sur la réactivité du DPD avec le chlore libre pour former un complexe de couleur rose. 20 mL d'échantillon sont ainsi dosés avec 2 pastilles de DPD 1N pour mesurer le chlore libre suivies de deux pastilles de DPD 3N pour le chlore total. La concentration en chlore est donnée directement par un photocalorimètre (CIFEC, PCM1-V1-19) calibré à 520 nm. La limite de détection est de 0,01 $\text{mg Cl}_2 \text{ L}^{-1}$.

III.4.3. Production d'ozone

La production d'ozone s'effectue grâce à un ozoneur (Trailgaz, LABO-LO) fonctionnant à partir d'oxygène pur selon le dispositif détaillé à la figure III.1. La dose d'ozone est variée soit en changeant la production de l'ozoneur, soit en modifiant la durée d'ozonation. Le débit gazeux ($O_2 + O_3$) reste constant ($10L\ h^{-1}$). L'ozone à la sortie de l'ozoneur ainsi que l'ozone à l'évent du barboteur sont introduits séparément dans des solutions d'iodure de potassium (KI) à 2% et la dose d'ozone transférée à l'échantillon est calculée comme la différence entre la quantité d'ozone introduite dans l'échantillon (dose appliquée) et la quantité d'ozone à l'évent du réacteur.

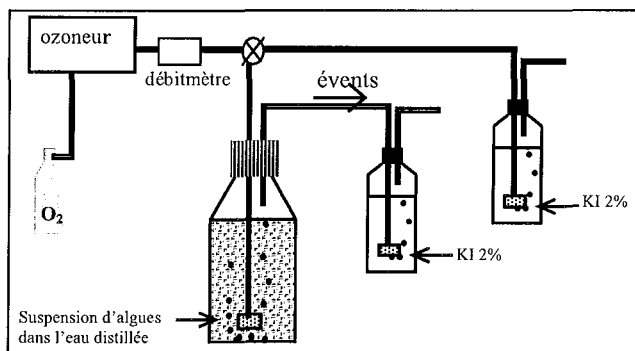
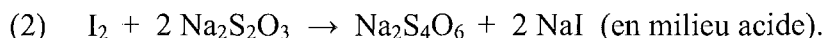
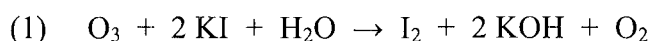


Figure III.1. Dispositif d'ozonation

III.4.3.1. Dosage de l'ozone dans l'air

Le dosage de l'ozone dans l'oxygène ozoné est effectué par la méthode iodométrique (APHA, 1998). Le principe est le suivant : l'ozone est absorbé par une solution neutre ou alcaline d'iodure de potassium. Après absorption, la solution est acidifiée et l'iode libéré est titré par le thiosulfate de sodium. Les réactions intéressées s'écrivent :



En pratique, l'oxygène ozoné est envoyé vers une solution de KI à 2% pendant 15 minutes avec un débit de $10L\ h^{-1}$. La solution de KI est alors acidifiée avec de l'acide sulfurique 1N puis l'iode (couleur jaune-brun) est titré avec du thiosulfate 0,05 N jusqu'à décoloration complète de la solution. Cette méthode est exacte à $\pm 1\%$ près, pour des concentrations de 2 à $160\ mg\ O_3\ L^{-1}$. La concentration d'ozone est alors obtenue par la formule suivante : $[O_3] = \text{normalité du thiosulfate} \times \text{volume de thiosulfate versé} \times 24 / \text{volume de gaz envoyé pour le dosage}$.

III.4.3.2. Dosage de l'ozone en solution

La concentration d'ozone en solution est déterminée par la méthode du DPD (N, N-diéthyl-p-phénylènediamine). Cette méthode est basée sur la réactivité du DPD avec l'ozone pour former un complexe de couleur rose. 20 mL d'échantillon sont ainsi dosés avec 1 pastille de DPD 4N. La

concentration en ozone est donnée directement par un photocalorimètre (CIFEC, PCM1-V1-19) calibré à une longueur d'onde de 520 nm. La limite de détection est de 0,01 mg O₃ L⁻¹.

III.4.4. Neutralisation des oxydants résiduels

Après oxydation, le chlore ou l'ozone résiduel en solution est neutralisé à l'aide d'une solution de thiosulfate de sodium 1% (Sigma, réf. S-8503). Celle-ci est préalablement stérilisée par filtration sur membrane en nitrocellulose de diamètre de pore 0,2 µm. Cette solution est stockée à 4-10°C à l'abri de la lumière avant utilisation. Deux moles de thiosulfate de sodium sont utilisées pour neutraliser 1 mole de chlore libre ou 1 mole d'ozone.

III.5. Inoculum d'*Escherichia coli*

La souche bactérienne utilisée est une souche d'*Escherichia coli* 1 isolée d'un réseau de distribution d'eau potable. Cette souche a été conservée à -80°C et son identité a été confirmée par identification sur galerie enzymatique Api20E (BioMérieux, réf. 20100).

Au moment de l'utilisation, la souche est décongelée pendant 18-24h à 37±1°C. Elle est ensuite passée sur gélose CASO (§ III.6.1.) pendant 18-24h à 37±1°C. Quelques colonies sont alors remises en suspension dans de l'eau potable déchlorée stérilisée par filtration et autoclavage afin d'obtenir une concentration voisine de 10⁹ bactéries mL⁻¹. Cette suspension est lavée par centrifugation (2 fois 10 min à 10000 g) afin de limiter l'apport de nutriments issus de la gélose. Le culot est remis en suspension dans de l'eau potable déchlorée stérile puis incubé à 20±2°C pendant 18-24h de façon à « acclimater » la souche. La suspension est à nouveau lavée par centrifugation (2 fois 10 min à 10000 g) puis stockée au maximum 2 heures à 4-10°C avant utilisation.

III.6. Milieux de culture gélosés bactériens

III.6.1. Gélose CASO

Cette gélose (Merk, réf. 1.05458) est utilisée pour le repiquage de la souche d'*E. coli*. Elle est constituée pour un litre d'eau déminéralisée de 15 g de peptone de caséine, 5 g de peptone de farine de soja, 5 g de NaCl et 15 g d'agar agar. La gélose est stérilisée par autoclavage (120°C, 15 min). Le pH après stérilisation est de 7,3±0,1. La gélose est alors répartie dans des boîtes de pétri de 90 cm de diamètre et stockée à 4-10°C pendant 15 jours maximum.

III.6.2. Gélose lactosée au TTC-tergitol

Cette gélose est utilisée pour le dénombrement sélectif des bactéries coliformes dont *E. coli*. La préparation du milieu se fait en mélangeant 54 g de milieu déshydraté (AES, réf. 151452) avec 1 L d'eau déminéralisée. Le milieu est alors autoclavé 15 minutes à 121°C. Ensuite, 300 mL de ce milieu sont mélangés aseptiquement à 15 mL de Tergitol 7 à 0,2% (OSI, réf. 56014) et 15 mL de TTC à 0,05% (Merck, réf. 1.08380). Le pH est régulé à $7,2 \pm 0,2$ si nécessaire avec de la soude 1 N stérile. TTC et tergitol 7 sont préalablement stérilisés par filtration sur membrane de diamètre de pore 0,2 μm . La gélose est répartie dans des boîtes de pétri de 55 cm de diamètre et stockée à 4-10°C pendant 15 jours maximum.

III.6.3. Gélose non sélective PCA (Plate Count Agar)

Cette gélose est utilisée pour le dénombrement non sélectif des bactéries hétérotrophes. Elle est constituée pour un litre d'eau déminéralisée de 5 g de peptone, 2,5 g d'extrait de levure, 1 g de glucose et 15 g d'agar-agar. La préparation du milieu se fait en mélangeant 23,5 g de milieu déshydraté (Merck, réf. 1.05463) avec 1 L d'eau déminéralisée. La gélose est stérilisée par autoclavage (121°C, 15 min). Le pH après stérilisation doit être de $7,2 \pm 0,2$. La gélose est alors conservée 6 mois à 4-10°C en flacons et 15 jours lorsqu'elle est coulée en boîte de Pétri.

III.7. Méthodes de dénombrement bactérien**III.7.1. Dénombrement des bactéries cultivables sur gélose non sélective (PCA)**

Un mL de chaque dilution décimale (effectuée dans de l'eau peptonée) de l'échantillon est ensemencé par incorporation dans la gélose PCA (§ III.6.3.) dans des boîtes de pétri de 90 mm de diamètre. Les boîtes sont placées à l'étuve à $22 \pm 2^\circ\text{C}$ pendant 15 jours. Les colonies sont dénombrées après 3 et 15 jours d'incubation et les résultats sont exprimés en UFC mL^{-1} . La limite de lisibilité est de 300 colonies par boîte.

III.7.2. Dénombrement des bactéries cultivables sur gélose sélective (TTC-tergitol)

Un mL de chaque dilution décimale (effectuée dans de l'eau peptonée) de l'échantillon est filtré sur membrane stérile en acétate de cellulose de 0,45 μm de diamètre de pore et de 47 mm de diamètre (Millipore, réf. HAWG047S1), puis la membrane est déposée sur la gélose lactosée au TTC et tergitol 7 (§ III.6.2.) dans des boîtes de pétri de 55 mm de diamètre. Les boîtes sont placées à l'étuve à $37 \pm 1^\circ\text{C}$ pendant 18-24 h puis les colonies typiques des coliformes sont dénombrées et les résultats sont exprimés en UFC mL^{-1} . Les coliformes apparaissent colorés en jaune-orangé sur la gélose lactosée au TTC-tergitol 7. La limite de lisibilité est de 100 colonies par boîte.

III.7.3. Dénombrement des bactéries totales après marquage au DAPI

Le fluorochrome DAPI (4', 6 diamidino-2-phenylindole) se fixe principalement à l'ADN et émet une fluorescence bleue (émission 465 nm) lorsqu'il est excité sous lumière UV (345 nm). Le dénombrement total des bactéries (vivantes et mortes) est déterminé par un comptage direct des cellules après marquage au DAPI (Saby *et al.*, 1997). En pratique, 9 mL d'échantillon pur ou dilué sont ajoutés à 1 mL de DAPI à 0,5 µg mL⁻¹ (sigma, réf. D-95421) et 1 mL de Triton x100 (Merck, réf. 1.008603) à 1% afin de dissocier les éventuels agrégats bactériens. Le mélange est homogénéisé au vortex puis, après un temps de contact de 10 minutes, filtré sur une membrane noire en polycarbonate de diamètre de pore 0,2 µm et de 25 mm de diamètre (Millipore, réf. GTBP02500). La membrane est ensuite rincée 2 fois par 50 mL d'eau distillée apyrogène (Braun-Fandre, réf. 610277) puis séchée à l'étuve à 37±1°C et réhydratée avec de la glycérine tamponnée et montée entre lame et lamelle. Les lames peuvent être stockées à 4-10°C pendant 15 jours avant observation. L'observation et le comptage des bactéries fluorescentes se font à l'aide d'un microscope en épifluorescence (Olympus, BX40) équipé d'un objectif x100 à l'immersion et d'un cube U-MNU2 (Tableau III.1).

Le nombre de champs comptés par membrane est fonction du nombre de cellules présentes ($n < 30$: 30 champs ; $30 < n < 70$: 20 champs ; $n < 70$: 10 champs). La concentration bactérienne est déterminée par la formule suivante : $N = N' \times F1 \times F2 \times V$, où N est le nombre de bactéries par mL, N' le nombre moyen de bactéries par champ, F1 la surface de filtration (cm²), F2 l'inverse de la surface d'un champ (cm⁻²) et V le volume filtré (mL). F1 et F2 dépendent du matériel utilisé : ici, $F1 = 2,84 \text{ cm}^2$ et $F2 = 10^5 / 7 \text{ cm}^{-2}$. La limite de détection de cette méthode dépend du volume filtré. Par exemple, pour 1 mL filtré, le seuil de détection est de $1,4 \cdot 10^3$ cellules par mL.

Tableau III.1. Cubes utilisés pour l'observation au microscope en épifluorescence (Olympus, BX-40) des bactéries marqués au DAPI, au Cy3 (hybridation *in situ*) et au syto9/PI (Kit BacLight).

	DAPI	Cy3	Syto 9 / PI
Référence	U-MNU2	U-MWG2	U-MNB2
Filtre d'excitation (nm)	360-370	510-550	470-490
Miroir dichroïque (nm)	400	570	500
Filtre d'arrêt (nm)	BA420	BA590	BA515

III.7.4. Dénombrement des bactéries par mesure d'intégrité membranaire

Le nombre total de bactéries ainsi que le nombre de bactéries présentant une membrane intègre sont déterminés à l'aide du kit Live/Dead® BacLight™ (Molecular Probes, réf. L-7012). Le principe de ce kit est basé sur l'utilisation simultanée de deux fluorochromes : le syto 9 et l'iodure de propidium (PI). Le syto 9 pénètre dans toutes les cellules (de part sa petite taille) alors que le PI

pénètre seulement dans celles présentant une membrane endommagée (de part sa taille plus élevée). Sous excitation en lumière bleue, le syto 9 émet une fluorescence verte tandis que l'association syto 9/PI émet une fluorescence rouge, permettant de différencier les bactéries possédant une membrane intègre de celles endommagées (figure III.2).

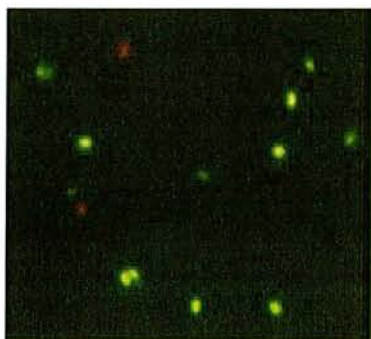


Figure III.2. Illustration de l'observation microscopique d'*E. coli* sous lumière bleue après marquage au syto 9 et à l'iodure de propidium (en vert : cellules possédant une membrane intègre ; en rouge : cellules présentant une membrane endommagée) (objectif x100).

III.7.4.1. Solution de Syto9 et d'iodure de propidium (PI)

La préparation des deux fluorochromes est basée sur celle décrite par Boulos *et al.* (1999) : 300 μL de Syto9 à 3,34 mM sont ajoutés à 300 μL de PI à 20 mM. Le mélange est dilué au 10^{ème} dans une solution de NaCl à 0,085% de manière à obtenir une concentration finale de 0,17 mM en syto9 et 1 mM en PI. Cette solution est stockée à raison de 30 μL par tube à -20°C à l'abri de la lumière. Lors de l'utilisation, un microtube est décongelé à température ambiante (20-25°C) par échantillon.

III.7.4.2. Marquage des bactéries par le Syto9 et l'iodure de propidium

Le protocole de marquage s'effectue selon les résultats publiés par Boulos *et al.* (1999) : 30 μL de la solution de PI et de Syto9 (§ III.7.4.1.) sont ajoutés à 1ml d'échantillon (dilué ou non) et laissés en contact pendant 15 minutes à l'abri de la lumière et à température ambiante (20-25°C). L'échantillon est alors filtré sur une membrane noire (25 mm de diamètre, 0,22 μm de porosité, Millipore, réf. GTBP02500) et rincé avec 15 mL de PBS pH 7,4 (Sigma, réf. P-4417) puis le filtre est séché à l'étuve à 37 $\pm$ 1°C. Le filtre est monté entre lame et lamelle avec l'huile fournie dans le kit. Les lames peuvent être stockées à 4-10°C pendant deux semaines avant observation. L'observation est effectuée avec un microscope en épifluorescence (BX40, Olympus) équipé d'un objectif à l'immersion x100 et d'un cube U-MNB2 (Tableau III.1). La totalité des cellules marquées (fluorescence verte ou rouge) sont dénombrées et représentent le nombre total de bactéries dans l'échantillon. Seules les cellules ayant une fluorescence verte sont dénombrées comme étant des bactéries possédant une membrane intègre. La méthode de calcul de la concentration bactérienne est identique à celle citée dans le § III.7.3. La limite de détection de cette méthode dépend du volume filtré. Pour 1 mL, le seuil est de 1,35.10³ cellules mL⁻¹.

III.7.5. Dénombrement des bactéries par hybridation *in situ* (FISH)

III.7.5.1. Solutions pour l'hybridation *in situ*

- solutions de sondes oligonucléotidiques : la sonde EUB338 (5'-GCTGCCTCCCGTAGGAGT-3', Eurogentec), spécifique de l'ARNr 16S de toutes les *Eubacteria* (Amann, 1995 ; Manz *et al.*, 1992), a été utilisée pour estimer le nombre de cellules détectables par FISH dans les conditions opératoires définies. La sonde ENT1 (5'-CCGCTTGCTCTCGCGAG-3', Eurogentec), spécifique de l'ARNr 16S de la famille des *Enterobacteriaceae* (Loge *et al.*, 1999), a été utilisée pour détecter spécifiquement *Escherichia coli* et les Entérobactéries. Sa spécificité a été vérifiée par Loge *et al.* (1999) et évaluée dans cette étude en comparant sa séquence avec celle des ARNr des bactéries présentes dans la base de données RDP (Ribosomal Database Project, <http://rdp8.cme.msu.edu>). Les 2 sondes sont marquées en 5' par le Cy3 (carbocyanine). Elles sont fournies sous forme lyophilisée et reprises au laboratoire dans du tampon Tris-EDTA à pH 8 stérile (Sigma, T-9285) puis réparties dans des microtubes stériles à raison de 50 µL à 50 ng/µL. Les tubes sont stockés à -20°C. Au moment de l'utilisation, après décongélation à température ambiante (20-25°C), la solution de sonde est diluée avec la solution d'hybridation (§ suivant) jusqu'à obtenir la concentration voulue.
- solution d'hybridation : elle est composée de 20% de formamide (Sigma, réf. F-9037), 0,9 M NaCl (Sigma, Réf. S-9625), 0,1% SDS (Sigma, réf. L-4522) et 20 mM Tris-HCl pH 7,2 (Sigma, Réf. T-2538).
- solution de lavage : elle est composée de 215 mM de NaCl, 0,1% de SDS et 20 mM de Tris-HCl pH 7,2.

Tous les réactifs des solutions sont préalablement stérilisés par filtration sur membrane en nitrocellulose de diamètre de pore 0,2 µm (Millipore, réf. SLGS025 0S). Les solutions sont stockées maximum un mois à 4-10°C.

III.7.5.2. Hybridation *in situ*

La technique d'hybridation *in situ* avec des sondes fluorescentes s'effectue en cinq étapes successives détaillées ci-après.

- Filtration : l'échantillon bactérien (volume variable selon la densité des bactéries ciblées) est filtré sur une membrane blanche en polycarbonate de diamètre 25 mm et de diamètre de pore 0,2µm (Millipore, réf. GTTP02500).
- Fixation : 5 mL de formaldéhyde 3,7% stérile (Prolabo, réf. 20913.294) sont ajoutés sur la membrane directement sur la rampe de filtration. Après un temps de contact de 30 minutes, la membrane est rincée par deux fois 10 mL de PBS pH 7,4 (Sigma, réf. P-4417) puis déposée dans

une boîte de Pétri stérile et séchée à l'étuve à $37\pm1^{\circ}\text{C}$. La membrane est déshydratée à l'éthanol 50, 80 et 95% (3 minutes chaque bain) puis séchée à l'étuve à $37\pm1^{\circ}\text{C}$.

- **Hybridation** : la membrane est montée sur lame de verre en mettant 15 μL de solution d'hybridation sous la membrane et 50 μL de solution d'hybridation additionnée de la sonde à une concentration de 1 ng μL^{-1} . Une lamelle est positionnée sur la goutte pour éviter le dessèchement. La lame est incubée en chambre humide à $46\pm1^{\circ}\text{C}$ pendant 2 h à l'obscurité.
- **Lavage** : la membrane est ensuite lavée 2 fois dans 30 mL de solution de lavage préchauffée à $46\pm1^{\circ}\text{C}$ (15 minutes chaque bain). La membrane est rincée avec 2 mL d'eau distillée apyrogène, séchée à l'étuve à $37\pm1^{\circ}\text{C}$ et montée entre lame et lamelle avec du citifluor (Ted Pella, INC., réf. 19476-A). Les lames peuvent être stockées à $4-10^{\circ}\text{C}$ pendant deux semaines avant observation.
- **Visualisation** : l'observation est effectuée à l'immersion à l'objectif x100 au microscope en épifluorescence équipé d'un cube U-MWG2 (Tableau III.1). L'observation et le comptage des bactéries marquées par la sonde sont identiques à ceux cités dans le § III.7.3 sauf pour la détection des Entérobactéries naturellement présentes dans l'eau potable où la limite de détection a dû être augmentée. Dans ce cas, 100 champs microscopiques ont été comptés (pour un volume d'échantillon de 100 mL filtré) permettant d'obtenir un seuil de détection de 4,06 cellules mL^{-1} . Le coefficient de variation, calculé sur 15 réplicats, a été estimé à 20% pour chaque échantillon.

III.7.6. Dénombrement des Entérobactéries viables par la méthode DVC-FISH

L'estimation de la viabilité des Entérobactéries des eaux potables détectées par FISH est mesurée grâce à la méthode DVC (Direct Viable Count) décrite par Kogure *et al.* (1979). Cette technique inclut une étape de revivification du métabolisme bactérien en présence d'un inhibiteur de la gyrase bactérienne (un antibiotique) qui va bloquer la division cellulaire et ainsi provoquer un allongement des cellules et une augmentation du contenu en ARNr des cellules si celles-ci sont viables.

III.7.6.1. Réactifs utilisés pour le DVC

Le bouillon nutritif utilisé comme milieu de croissance est composé de 70% de tampon phosphate (pH 7,4) (Sigma, réf. P4417), de 0,036% d'extrait de levure (Difco, réf. 212750) et de 0,36% d'acides casaminés (Difco, réf. 223120) (Baudart *et al.*, 2002).

L'antibiotique utilisé pour bloquer la division cellulaire est l'acide nalidixique (Sigma, réf. N3143). Une solution mère à 1mg mL^{-1} est obtenue en reconstituant l'antibiotique (15 mg) avec 15 mL d'eau distillée stérile additionnée de 75 μL de NaOH 1M filtrée sur 0,2 μm . Cette solution mère est stérilisée par filtration sur 0,2 μm puis stockée au frigo (4°C) à l'obscurité.

III.7.6.2. Technique DVC

Le protocole utilisé est basé sur celui développé par Baudart *et al.* (2002) : l'échantillon est filtré sur membrane blanche (25 mm de diamètre, 0,22 μm de porosité, Millipore, réf. GTTP02500) puis chaque membrane est placée individuellement dans une boîte multipuits (Fischer, réf. A1391060) sur un pad en cellulose (25 mm de diamètre, Millipore, réf. AP1002500) sur lequel 650 μL de bouillon nutritif contenant l'acide nalidixique à une concentration finale de 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Sigma, réf. N3143) ont été préalablement déposés. L'échantillon est alors incubé à $37 \pm 1^\circ\text{C}$ pendant 4 h en chambre humide. Ensuite, la membrane est récupérée puis remplacée sur la rampe de filtration pour subir les différentes étapes du FISH décrites au § III.7.5 (à partir de l'étape de fixation).

III.8. Détermination microscopique de la taille des bactéries

Les mesures de taille bactérienne sont effectuées à l'aide du logiciel de traitement d'image DP-SOFT version 3.2 (Olympus) durant l'observation des échantillons au microscope en épifluorescence. Lorsque la concentration en bactéries est suffisante, cent bactéries par échantillon sont mesurées au hasard sur la lame grâce à un pointeur calibré. Si la concentration est insuffisante, la totalité des bactéries détectées est mesurée. Dans nos essais, seule la longueur de la bactérie a été prise en compte.

III.9. Méthodes de caractérisation de la matière organique dissoute (MOD)

III.9.1. Carbone Organique Dissous (COD)

50 mL d'échantillon sont filtrés sur membrane en PVDF de diamètre de pore 0,45 μm (Millipore, réf. SLHV025NB). Le filtrat contenant le carbone organique dissous peut être stocké 2 jours au maximum à $4-10^\circ\text{C}$ s'il est acidifié à pH 2 avec de l'acide orthophosphorique 5%. Il est ensuite dosé à l'aide d'un COTmètre (O.I. corporation-Model 700 TOC analyser) calibré avec une solution de phtalate de potassium (Merck, réf. 4874) à 5 mg L^{-1} . Le carbone inorganique est éliminé par de l'acide phosphorique (Merck, réf. 100573) et par bullage d'azote. Le carbone organique dissous est oxydé à chaud (100°C) avec du persulfate de sodium (Merck, réf. 6609). Le CO_2 formé est conduit avec un gaz vecteur (azote) jusqu'au détecteur infrarouge (Dohrmann, réf. DC180). Les résultats sont exprimés en mg C L^{-1} . Les seuils de détection et de sensibilité sont respectivement de 0,1 et 0,05 mg C L^{-1} .

III.9.2. Carbone Organique Dissous Biodégradable (CODB)

La mesure du CODB est effectuée selon la norme AFNOR XP T90-318 (AFNOR, 1995a) par la méthode des bactéries en suspension. A 200 mL d'échantillon soumis à l'essai sont ajoutés 4 mL d'eau de surface (Rivière, Moselle) filtrée sur membrane de 2 μm de diamètre de pore afin de limiter la présence de protistes. Les flacons sont bouchés puis incubés pendant 28 jours à l'abri de la lumière dans une enceinte exempte de toute contamination carbonée et maintenue à une température constante de $20\pm 2^\circ\text{C}$. Le carbone organique dissous de l'échantillon est mesuré au début de l'essai puis régulièrement jusqu'à ce que le COD atteigne une valeur minimale. La quantité de CODB est obtenue par différence entre le COD initial et le COD minimal atteint au cours de l'essai. En parallèle, des témoins sont effectués afin de contrôler l'activité de l'inoculum bactérien (acétate + inoculum).

III.9.3. Sucres totaux

Le dosage des sucres se fait selon la méthode de Dubois (1956). Il s'agit d'une méthode colorimétrique qui met en évidence les sucres simples et leurs dérivés méthylés, ainsi que les sucres complexes (oligosaccharides et polysaccharides) grâce à la présence de phénol et d'acide sulfurique. En pratique, 2 mL d'échantillon (filtré sur 0,2 μm afin de récupérer uniquement le carbone organique dissous) sont mélangés à 1 mL de phénol 5% (m/v) (Merck, réf. K2840306) puis 5 mL d'acide sulfurique concentré (Prolabo, réf. 20685.295). Après homogénéisation, l'échantillon est incubé au bain-marie à $30\pm 1^\circ\text{C}$ pendant 20 minutes puis l'absorbance est lue au spectrophotomètre à 490 nm. La concentration en glucides exprimée en mg d'équivalent glucose par litre (mg éq glc L^{-1}) est obtenue à l'aide d'une gamme étalon (0 à 200 mg L^{-1}) d'une solution de glucose (Sigma, réf. G-7528). Puisque la formule chimique précise des hydrates de carbones détectés n'est pas connue, le pourcentage de COD représenté par des sucres est estimé en considérant que le carbone représente 40% de la molécule (valeur dérivée de la formule chimique du glucose, $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$).

III.9.4. Protéines totales

La quantification des protéines totales est réalisée à l'aide du Kit NanoOrange (Molecular Probes, réf. N-6666). Ce kit contient un réactif non fluorescent en solution aqueuse qui devient fortement fluorescent après réaction avec les protéines (aucune information sur la réaction n'est fournie par le fabricant). A 1,25 mL d'échantillon est ajouté 1,25 mL de solution de travail NanoOrange. Les échantillons sont mis à incuber pendant 10 min. à 93°C puis laissés à refroidir pendant 20 min. à température ambiante, à l'abri de la lumière. Chaque échantillon est ensuite transféré dans une cuve et la fluorescence émise est mesurée à 590 nm avec une excitation à 490 nm. La limite de sensibilité de la méthode est estimée à 0,3 mg L^{-1} . Une gamme étalon de 0 à 10 mg L^{-1} ,

réalisée avec de la BSA (Bovine Serum Albumin ; Sigma, réf. A-2153) permet de quantifier les protéines dans l'échantillon exprimées en mg d'équivalent BSA par litre (mg éq. BSA L⁻¹). Puisque la formule chimique précise des protéines détectées n'est pas connue, le pourcentage de COD représenté par des protéines est estimé en considérant que le carbone représente 54,5% de la molécule (valeur dérivée de la formule chimique générale des protéines, C₁₆H₂₄O₅N₄) (Aquino et Stuckey, 2004).

III.9.5. Acides aminés

Le protocole utilisé a été développé par Dossier-Berne *et al.* (1994). Il permet le dosage par chromatographie liquide haute performance (CLHP) des acides aminés totaux après hydrolyse des formes combinées (polypeptides, protéines) en milieu acide.

III.9.5.1. Préparation des échantillons

Les échantillons d'eau sont disposés par fraction de 100 µL dans des tubes à hydrolyse, séchés sous pression réduite, puis hydrolysés par l'acide chlorhydrique 6 N à 120°C pendant 3 heures dans un module Picotag (WATERS). Après hydrolyse, l'excès d'acide est évaporé sous pression réduite, puis le résidu sec est redissous dans 100 µL d'eau ultrapure.

III.9.5.2. Analyse chromatographique

Avant injection de l'échantillon, une dérivation précolonne à l'orthophtaldialdéhyde (OPA) des acides aminés est réalisée par l'injecteur automatique (AS 4000 MERCK). Il est couplé à une pompe à gradient d'élution (system controller 600 E WATERS) et à un détecteur spectrofluorimétrique (F1050 MERCK) réglé à une longueur d'onde d'excitation de 335 nm et d'émission de 425 nm. La séparation est assurée par une colonne C18 (Delta Pack WATERS C18, 5µm, 100 Å, 3,9x150 mm), à l'aide d'un gradient d'élution entre deux éluants : un tampon acétate / monohydrogénophosphate (50 mM, pH = 7,4) et un mélange méthanol / eau (75/25 en volume). Un ajout de tétrahydrofurane au premier éluant permet d'améliorer la séparation des pics de glycine et de thréonine.

Les solutions étalons sont préparées à partir d'une solution standard d'acides aminés contenant 15 acides aminés (Asp, Glu, Ser, His, Arg, Gly, Thr, Ala, Tyr, Met, Val, Phe, Ile, Leu et Lys) à une concentration unitaire de 2,5 mol L⁻¹. L'ornithine est ajouté au mélange. La gamme d'étalonnage réalisée à partir de cette solution standard s'étend de 25 à 1250 nmol L⁻¹.

III.9.5.3. Acquisition et traitement des données

L'acquisition et le traitement des données sont réalisés à l'aide du logiciel MILLENIUM (WATERS). En raison des faibles teneurs présentes et des limites de détection obtenues, 5 ou 6

mesures sont réalisées pour chaque échantillon. La limite de détection de la méthode de dosage pour chacun des acides aminés est proche de 10 nmol L⁻¹.

III.9.6. Fluorescence

Le spectre de fluorescence nous renseigne sur le caractère aromatique des composés organiques ainsi que sur leur poids moléculaire : plus le maximum d'intensité d'absorption se décale vers les longueurs d'ondes élevées, plus le caractère aromatique est marqué et plus le poids moléculaire est grand (Croué *et al.*, 2000). L'échantillon est préalablement filtré sur membrane de diamètre de pore 0,45 µm afin de récupérer uniquement la matière organique dissoute. Le spectre de fluorescence est mesuré dans des cuves en quartz 4 faces de 1 cm de trajet optique, grâce à un spectrofluorimètre Hitachi F-4500 pour des longueurs d'onde d'émission allant de 390 à 600 nm et une longueur d'onde d'excitation fixée à 370 nm.

III.9.7. Absorbance UV

La matière organique dissoute absorbe dans le domaine UV-visible sans présenter de bandes d'absorption caractéristiques. Cette absorption est due à la teneur en sites insaturés des composés organiques et surtout leur teneur en sites aromatiques. L'absorbance UV à 254 et 270 nm nous renseigne donc sur la structure des composés organiques en terme de degré d'aromaticité (Thurmann, 1985). L'échantillon est préalablement filtré sur membrane de diamètre de pore 0,45 µm afin de récupérer uniquement la matière organique dissoute. Les mesures d'absorbance dans l'UV sont réalisées à l'aide d'un spectrophotomètre UVIKON. Des cuves en quartz de trajet optique 1 cm sont utilisées pour la mesure à 254 nm. Des spectres sont également réalisés entre 200 et 400 nm.

III.9.8. Mesure des trihalométhanes (THM) et autres composés organohalogénés volatiles

Le dosage s'effectue selon la norme NF EN ISO 10301 (AFNOR, 1997b) par la méthode de « tête statique ». Les composés recherchés sont le 1-1 dichloroéthylène, le dichloroéthylène cis, le dichlorométhane, le 1-1 dichloroéthane, le chloroforme, le 1-1-1 trichloroéthane, le 1-2 dichloroéthane, le tétrachlorure de carbone, le trichloréthylène, le dichloromonobromométhane, le dibromomonochlorométhane, le 1-1-2-2 tétrachloroéthylène et le bromoforme. Des solutions étalons de ces divers composés sont préparées dans du méthanol afin de pouvoir identifier et quantifier les composés présents.

En pratique, 3,5 mL d'échantillon à analyser sont transférés dans un flacon type pénicilline (flacon Head space) immédiatement serti. Les échantillons peuvent être stockés maximum 48 h dans une enceinte réfrigérée à l'obscurité avant d'être analysés.

Les flacons contenant les échantillons et les solutions d'étalonnage sont alors placés au bain-marie à 50°C pendant au moins 30 minutes afin de se placer dans des conditions d'équilibre déterminés. L'injection de la phase gazeuse se fait ensuite de façon automatique. L'analyse se fait à l'aide d'un chromatographe en phase gazeuse (HP 5890 série II) équipé d'un détecteur à capture d'électrons, d'un système Head space et muni de colonnes adéquates (Chrompack-Megabore WCOT ou équivalente 25 m x 0,53 ID). La température d'injection est de 275°C et la température du détecteur est de 300°C. La programmation de la température du four se fait de la manière suivante : 40°C pendant 12 minutes puis 120°C pendant 2 minutes (6°C par minute). Les composés sont identifiés d'après leur temps de rétention et les pics sont quantifiés à partir des courbes d'étalonnage des différents composés analysés. Les résultats sont exprimés en $\mu\text{g L}^{-1}$. La limite de détection de la méthode dépend du composé recherché (Tableau III.2).

Tableau III.2. Limites de détection des différents trihalométhanes (THM) et autres composés organohalogénés volatiles dosés par la méthode de « tête statique » (AFNOR 1997b).

	Composés	Limites de détection ($\mu\text{g L}^{-1}$)
Composés organohalogénés volatiles	1-1 dichloroéthylène	10
	dichloroéthylène cis	50
	dichlorométhane	50
	1-1 dichloroéthane	100
	1-1-1 trichloroéthane	0,1
	1-2 dichloroéthane	100
	tétrachlorure de carbone	0,1
	trichloréthylène	0,2
	1-1-2-2 tétrachloroéthylène	0,2
	dichloromonobromométhane	0,2
THM	dibromomonochlorométhane	0,3
	chloroforme	0,3
	bromoforme	3

III.9.9. Dosage des précurseurs de trihalométhanes (pTHM)

Le dosage des pTHM est effectué comme suit : un volume de 3,5 mL d'échantillon est placé dans un flacon type pénicilline immédiatement serti puis chloré à 5mg L^{-1} et chauffé à 60°C pendant 1h30. Après refroidissement, le chlore résiduel est neutralisé au thiosulfate de sodium. Les THM formés sont dosés selon la méthode décrite au § III.9.8. Les pTHM sont calculés selon la formule suivante : THM précurseurs = THM formés – THM initiaux. Les résultats sont exprimés en $\mu\text{g L}^{-1}$.

III.9.10. Chromatographie d'exclusion de taille

La technique HPSEC (High performance Size Exclusion Chromatography) a été effectuée au laboratoire de Chimie de l'Eau et de l'Environnement (Poitiers) et à l'Université Technique de

Berlin (TUB) dans le cadre d'un échange avec le Pr Croué. Deux techniques utilisant des détecteurs différents ont été utilisées : la HPSEC-UV-Fluorescence et la HPSEC-UV-COT.

HPSEC-UV-Fluorescence (réalisée par le laboratoire de Chimie de l'Eau et de l'Environnement) :

L'analyse HPSEC-UV-Fluorescence a été réalisée avec un équipement constitué d'une pompe à piston (modèle 600E de Waters), et de deux détecteurs montés en série. La détection UV se fait par un détecteur à barrettes de diodes à une longueur d'onde de 260 nm (Photodiode, WatersTM 996). La détection de l'émission de fluorescence se fait à une longueur d'onde d'émission de 315nm alors que la longueur d'onde d'excitation est à 278nm (Scanning Fluorescence Detector, WatersTM 474). La séparation chromatographique a été effectuée en utilisant la colonne Protein-PakTM 125 en silice (Waters, dimension 300*7,8 mm, gamme du poids moléculaire 2000-80000, taille des particules 10 µm). Le polystyrène sulfonate (PSS) (1,8 kDa ; 4,6 kDa) et l'acétone ont été utilisés pour calibrer la colonne. La phase mobile est une solution de dihydrogénophosphate de sodium (NaH₂PO₄) à 20 mM ajustée avec la soude à un pH de 6,8 avec une force ionique de 0,1 M en utilisant du NaCl. Le débit de phase mobile est de 1 mL/min et le volume d'échantillon injecté est de 150 µL. L'acquisition et le traitement des données sont réalisés grâce au logiciel MILLENIUM (Waters).

HPSEC-UV-COT (réalisée par l'Université Technique de Berlin, Pr Jekel)

Le principe de cette technique est identique au précédent sauf que la détection est effectuée grâce à un détecteur UV (254 nm) et un analyseur de carbone. La séparation chromatographique a été effectuée avec la colonne HW-50S (Grom Analytik + HPLC GmbH, diamètre de pores 125 Å, gamme de poids moléculaire 100-80000, taille des particules 20-40 µm). La phase mobile est un tampon phosphate (20mM, pH 6,58). Le COT de l'échantillon est oxydé par une lampe UV (185 nm) sous atmosphère d'azote. Le CO₂ formé est détecté par un détecteur infrarouge non dispersif.

III.9.11. Pyrolyse CG/SM

La pyrolyse couplée à la chromatographie en phase gazeuse et à la spectrométrie de masse (pyrolyse CG/SM) a été réalisée par le laboratoire de Chimie de l'Eau et de l'Environnement (Poitiers) dans le cadre d'un échange avec le Pr Croué.

La pyrolyse est un outil analytique puissant pour la caractérisation des macromolécules organiques, et notamment de celles qui ne peuvent pas être étudiées en chromatographie. La pyrolyse analytique consiste en une dégradation thermique (650 à 750°C) des MO en absence d'oxygène. En plus de coupures de liaisons, la pyrolyse peut entraîner des déshydratations, des réarrangements ou des formations de liaisons. Les composés produits, de faibles poids moléculaires, sont séparés par chromatographie gazeuse et identifiés par spectrométrie de masse. Chaque

fragment peut être attribué à une classe de polymères organiques, un même fragment pouvant avoir plusieurs origines. L'origine des fragments est déterminée à partir de la bibliographie ou par comparaison avec la pyrolyse d'étalons.

Dans cette étude, la méthode utilisée consiste à introduire 1 à 1,5 mg de l'extrait lyophilisé de MOA recueilli dans un tube en quartz. De petits morceaux de laine de quartz servent à le maintenir dans le tube. Les pyrolyses sont effectuées à 400 ou 650°C sous courant d'hélium (1 mL min⁻¹) dans une unité de pyrolyse Pyroprobe 2000 (Chemical Data Systems, Oxford, Pa). L'unité de pyrolyse est connectée à un chromatographe G1800A (Hewlett Packard) couplé à un détecteur à ionisation d'électrons. La chambre de pyrolyse est préchauffée jusqu'à 200°C. La montée en température du filament de platine est conduite à raison de 20°C ms⁻¹ (pyrolyse flash) jusqu'à obtention de la valeur désirée (400 ou 650°C), température maintenue pendant 20s. Les produits de pyrolyse sont séparés sur colonne capillaire AT-WAX (Alltech) (dimension 30 m*0,25 mm ; diamètre interne 1 µm), en programmation de température de 30 à 220°C à 3°C min⁻¹.

L'identification des pics obtenus se fait grâce à une librairie de pyrochromatogrammes obtenus par pyrolyse des composés purs. L'expression des résultats se fait en normalisant les hauteurs de pics par rapport à celle du pic dominant.

III.9.12. Ultrafiltration

L'ultrafiltration est utilisée pour séparer la MOA en plusieurs fractions de poids moléculaire différent. L'échantillon de MOA (dilué si nécessaire avec de l'eau distillée stérile de manière à approcher 5 mg COD L⁻¹) est ultrafiltré en cascade à l'aide de 4 cellules à agitation de 400 mL de capacité (Millipore, Amicon, modèle 8400, réf. 5124) fonctionnant sous pression d'azote (4,7 bars), par passage sur des membranes possédant des seuils de coupure variables (Millipore, Amicon) : 30000 Da (polyéthersulfone, réf. PBTK07610), 10000 Da (polyéthersulfone, réf. PBGC07610), 3000 Da (cellulose régénérée, réf. 13442AM) et 500 Da (acétate de cellulose, réf. 13042). Avant utilisation, les membranes sont abondamment rincées à l'eau distillée stérile afin d'éliminer leur couche de glycérine protectrice (3 bains de 20 minutes chacun). Une fois la membrane placée dans la cellule d'ultrafiltration, celle-ci est à nouveau lavée en ultrafiltrant 400 mL d'eau distillée stérile (3 bars). Suite à cette opération, les 20 premiers millilitres d'échantillon passés au travers de la membrane ne sont pas recueillis pour éviter toute dilution de l'ultrafiltrat. De plus, les travaux publiés par certains chercheurs (Ogura, 1974 ; Alken, 1984) ayant montré que l'augmentation progressive de la concentration en carbone organique dans le rétentat entraînait le passage de molécules de masse théoriquement supérieure au seuil de coupure de la membrane, l'ultrafiltration est stoppée avant le passage de la totalité de l'échantillon (soit environ 20 mL restant dans la cellule). La teneur en matière organique de chaque ultrafiltrat (correspondant à 5 fractions : <500

Da, 500-3000 Da, 3000-10000 Da, 10000-30000 Da et >30000 Da) est déterminée par dosage du COD.

III.10. Caractérisation minérale des eaux

III.10.1. Dosage de l'azote et du phosphore

Le dosage de l'azote et du phosphore est réalisé par un laboratoire indépendant accrédité COFRAC (IRH, Vandoeuvre-lès-Nancy).

La concentration en ammonium (NH_4) est déterminée selon la norme NF T90 015-2 (AFNOR, 2000b) par la méthode spectrophotométrique au bleu d'indophénol. Le principe de la technique est basé sur la formation, en milieu alcalin ($10,4 < \text{pH} < 11,5$), d'un composé type indophénol par réaction des ions ammonium avec du phénol et de l'hypochlorite, en présence de nitroprussiate comme catalyseur. L'absorbance de la coloration obtenue est effectuée à une longueur d'onde voisine de 630 nm et comparée à une gamme étalon de NH_4 . Les résultats sont exprimés en $\text{mg NH}_4 \text{ L}^{-1}$.

Les nitrites et les nitrates (NO_2 et NO_3) sont déterminés selon la norme NF EN ISO 10304-1 (AFNOR, 1995b) par chromatographie des ions en phase liquide. Le principe de la technique est basé sur la séparation des anions par chromatographie en phase liquide sur colonne par utilisation d'un échangeur d'ions à faible facteur de capacité comme phase stationnaire et, en général, de solutions aqueuses de sels de mono- ou diacides faibles comme phase mobile. La détection des anions est effectuée par conductimétrie par comparaison à des solutions étalons de NO_2 et NO_3 . Les résultats sont exprimés en mg NO_2 ou $\text{NO}_3 \text{ L}^{-1}$.

La concentration en phosphore total est déterminée selon la norme NF EN 1189 (AFNOR, 1997a) par dosage après digestion à l'acide sulfurique-acide nitrique. Le principe de cette méthode est basé sur la réaction des ions orthophosphates avec une solution acide contenant des ions molybdate et de l'acide ascorbique, développant une coloration bleue. L'absorbance est alors mesurée à 880 nm pour déterminer la concentration en orthophosphates présents. Les résultats sont exprimés en mg P L^{-1} .

III.10.2. Mesures du pH et de la conductivité

La mesure du pH est effectuée à $25^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ à l'aide d'un pHmètre (HI 9025, HANNA Instruments) muni d'une électrode en verre (HI 1053B, HANNA Instruments).

La conductivité est mesurée à l'aide d'un conductimètre (HI 9033, HANNA Instruments) muni d'une sonde (HI 70302, HANNA Instruments).

III.11. Réacteurs Propella™

III.11.1. Caractéristiques des réacteurs

Les réacteurs Propella™ ont été utilisés dans cette étude pour estimer l'influence d'un ajout de MOA sur le comportement d'une population d'*E. coli* libres dans la phase eau et fixée aux parois au sein d'un système dynamique (par opposition aux essais en batchs). Les réacteurs Propella™ sont construits de façon à reproduire à l'échelle du laboratoire un système où les flux hydrauliques existants sont proches de ceux observés dans un réseau de distribution d'eau potable. Ils sont constitués d'un corps externe et d'un corps interne (Figure III.3). Le corps externe du réacteur est généralement usiné dans des matériaux utilisés dans les réseaux de distribution (PVC, PE, fonte habillée ciment, fonte nue, fonte corrodée...). Dans notre étude, le matériau utilisé est du PE. Ce corps est pourvu d'un système de prélèvement (coupon, Figure III.3) qui permet de suivre la formation et l'évolution du biofilm. Chaque Propella™ est muni de 20 coupons amovibles qui affleurent à la surface, facilitant ainsi le prélèvement du biofilm qui se développe à la surface interne de la canalisation. Le corps interne généralement en inox permet à la fois de contrôler la température de l'ensemble et de recréer la circulation de l'eau dans une canalisation d'un point de vue hydraulique. La propulsion de l'eau par le propeller dans le corps interne associé à des lames permet de créer un flux hydraulique parallèle aux parois.

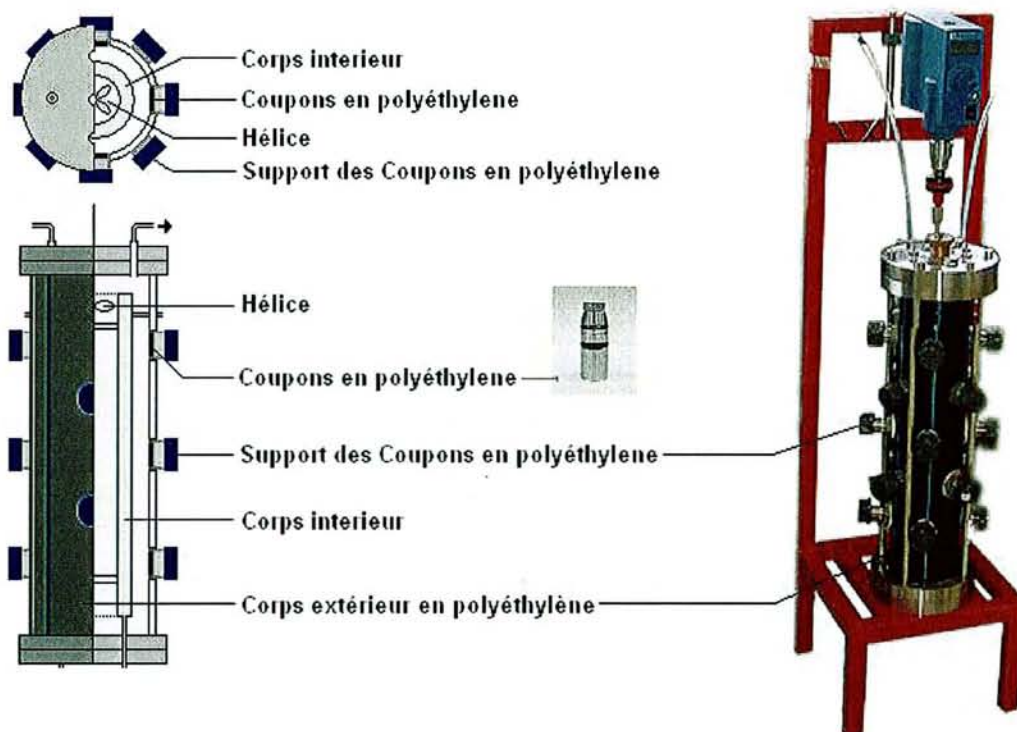


Figure III.3. Réacteur Propella™ : photographie et représentations schématiques.

Dans cette étude, les 2 Propella™ utilisés sont alimentés en continu à un débit moyen de 80 ± 4 mL h⁻¹ par de l'eau de réseau disposée dans des réservoirs d'une capacité de 2,3 litres, qui assurent une réserve en eau d'environ 24 h. Le temps de séjour moyen est de 24 h. Les 2 Propella™ disposent de leur propre réservoir, qui sont lavés et réalimentés tous les jours. Ces réservoirs sont maintenus dans la glace ($\pm 10^\circ\text{C}$) pour limiter le développement bactérien pendant les 24 h de temps de séjour. Des essais préliminaires ont permis de vérifier la stabilité biologique de l'eau dans les réservoirs en entrée de réacteur (Annexe X.3.2, Figure X.1). La vitesse de l'hélice interne est ajustée pour obtenir une vélocité du flux interne de 2 m s^{-1} .

III.11.2. Calcul de la droite de lessivage théorique

La droite de lessivage théorique correspond au comportement d'une particule inerte injectée dans le réacteur. Il existe une équation générale qui permet de calculer l'évolution de la concentration théorique d'un élément au cours du temps dans un réacteur Propella™. Cette équation s'écrit : $C_t = C_i e^{-Dt}$, avec C_t =concentration en bactéries dans le réacteur au temps t , C_i =concentration en bactéries dans le réacteur juste après injection, D =taux de dilution (débit/volume : l j^{-1}) et, t =temps (j).

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

III.11.3. Méthode de prélèvement des échantillons

III.11.3.1. Prélèvement d'eau

L'eau des Propella™ est prélevée en sortie du réacteur. Pour les analyses bactériologiques, l'eau est prélevée dans des flacons plastiques stériles de 250 mL contenant 5 mg de thiosulfate. Elle est conservée à $4-10^\circ\text{C}$ jusqu'à analyse (maximum 24 h). Le débit de sortie n'est pas modifié pendant le prélèvement, ce qui impose une durée de prélèvement d'environ 2h30.

III.11.3.2. Prélèvement de biofilm

Les éprouvettes de matériaux (coupons) sont retirées du Propella™ et la pastille de polyéthylène est récupérée stérilement avec son support et déposée dans un récipient stérile

contenant 25 mL d'eau d'Evian thiosulfatée à 20 mg L⁻¹ et préalablement stérilisée par filtration (0,22 µm). Le choix des coupons pour les prélèvements de biofilm est réalisé aléatoirement sur chaque Propella™ en respectant toutefois le même niveau de coupons pour tous les Propella™. Le décrochage des bactéries se fait par l'action des ultrasons à l'aide d'un sonicateur équipé d'une sonde conique placée à 1 cm de la surface de la pastille pendant 2 minutes.

III.12. Analyses statistiques

III.12.1. Tests non paramétriques

L'analyse statistique des résultats a été effectuée en utilisant des tests non paramétriques puisque la normalité des données ne pouvait généralement pas être vérifiée compte tenu de la petite taille des échantillons. Le test U de Mann-Whitney et le test H de Kruskal-Wallis ont été employés pour comparer deux séries de données, ou plus de deux séries, respectivement. L'analyse a été effectuée grâce au logiciel Statview 5.0 (SAS institute Inc., Cary, NC). Généralement, un seuil de significativité $p < 0,05$ a été choisi pour conclure sur la différence statistique entre les échantillons testés.

III.12.2. Analyse en composante principale (ACP)

L'analyse en composante principale (ACP) a été réalisée grâce aux logiciels Statgraphics Plus version 5.1 et Uniwin Plus version 5.0. Elle a été appliquée aux données collectées dans le cas de l'oxydation directe des cellules algales. Elle vise à présenter, sous forme graphique interprétable, le maximum de l'information contenue dans un tableau de données constitué par des individus disposés en ligne (dans notre cas tous les échantillons de MOA obtenue par oxydation à différentes doses de chlore ou d'ozone), pour lesquels sont mesurées des variables quantitatives disposées en colonne (dans notre cas les paramètres de caractérisation de la MOA).

L'ACP est une analyse factorielle qui permet de voir sur des graphiques plans parfaitement accessibles à notre perception, des nuages de points situés dans un espace à p dimensions. La technique consiste à trouver le(s) plan(s) qui visualise(nt) le mieux les individus considérés. Les axes factoriels constituant ce(s) plan(s) sont choisis de telle sorte qu'ils représentent le mieux possible les distances entre variables. Dans la pratique, les individus sont centrés et réduits, c'est-à-dire que l'on a opéré sur chaque variable la transformation linéaire ramenant sa moyenne à zéro et sa variance à l'unité afin de rendre l'interprétation indépendante des unités de mesure choisies.

Le traitement par ACP permet d'établir des droites définies par des combinaisons linéaires des variables initiales, formant des variables synthétiques. L'ACP cherche ainsi l'indice qui permet de « voir » au mieux les individus, c'est-à-dire celui pour lequel la variance pour les individus est

maximale ; cet indice est appelé 1^{ère} composante principale ou 1^{er} axe principal. Ensuite, une 2^{ème} composante principale est recherchée de manière à avoir (i) une corrélation linéaire nulle avec la 1^{ère} composante principale, et (ii) la variance la plus élevée. Le processus se répète jusqu'à l'obtention de la p^{ième} composante principale.

L'analyse présente deux aspects :

- (a) une analyse de la structure des variables à partir des corrélations avec les axes principaux. Les variables sont analysées à partir du cercle des corrélations. Chaque variable est représentée par un point dont les coordonnées sont les coefficients de corrélation linéaire de cette variable avec les deux premiers axes. La proximité entre les points représentatifs de deux variables, lorsqu'ils sont situés près du cercle des corrélations, traduit une corrélation linéaire positive élevée entre ces deux variables ; deux points diamétralement opposés indiquent par contre une corrélation linéaire négative élevée ; ceci doit être précisé par la lecture de la matrice de corrélation.
- (b) une répartition des individus à partir de leurs coordonnées sur les deux axes principaux. La projection du nuage des individus, sur le plan des deux premiers axes principaux, est établie pour faire une classification des individus, c'est-à-dire constituer des groupes d'individus ayant des caractéristiques bien définies que l'on doit expliciter.

Chapitre IV - Caractérisation de la Matière Organique Algale (MOA) susceptible d'être présente dans l'eau de distribution lors d'un bloom algal

IV.1.	Introduction.....	101
IV.2.	MOA naturellement sécrétée par les algues (MOA-NS).....	102
IV.2.1.	Protocole expérimental	102
IV.2.2.	Résultats.....	103
IV.3.	MOA naturellement sécrétée par les algues puis oxydée (MOA-NS-ox)	109
IV.3.1.	Protocole expérimental	110
IV.3.2.	Résultats.....	110
IV.4.	MOA issue de l'oxydation d'algues (MOA-ox).....	114
IV.4.1.	Protocole expérimental	115
IV.4.2.	Résultats.....	115
IV.5.	Discussion.....	129
IV.5.1.	Composition des trois origines de MOA.....	129
IV.5.2.	Effet des traitements d'oxydation sur la MOA-NS.....	133
IV.5.3.	Estimation de la quantité de MOA retrouvée en eau traitée lors d'un bloom algal.....	134

IV.1. Introduction

La matière organique, et particulièrement la matière organique dissoute biodégradable, joue un rôle prépondérant dans la stabilité des eaux de distribution en fournissant les éléments indispensables à la croissance des bactéries (cf § II.1.5.3). Or certains épisodes saisonniers comme les blooms algaux apparaissant principalement en période chaude peuvent transitoirement modifier (qualitativement et quantitativement) la matrice organique des eaux brutes et amener des composés de nature différente dans l'eau traitée (Hellebust, 1965 ; Münster et Chrost, 1990 ; Sundh, 1989, 1992). En effet, les algues génèrent du matériel organique dont l'origine peut être double : soit directement par sécrétion phytoplanctonique (phénomène naturel lié au métabolisme de photosynthèse), soit indirectement après lyse cellulaire en réponse à des conditions de stress (lyse virale, stress nutritif ou oxydant...) (Becquevort *et al.*, 2002).

Ainsi, en période de bloom algal, les algues, qui sont présentes en grande quantité dans les eaux de surface (rivières, lacs, réservoirs...) (Nakache *et al.*, 2001), vont naturellement sécréter de la matière organique dissoute dans les eaux brutes (Sundh, 1989, 1992 ; Lignell, 1990), dont une fraction est susceptible de se retrouver dans l'eau traitée puisque les traitements conventionnels de potabilisation n'éliminent pas la totalité des composés organiques des eaux brutes.

En plus de sécréter naturellement de la matière organique au cours de leur croissance, les algues peuvent également relarguer des composés organiques lorsqu'elles franchissent la filière de traitement. En effet, l'utilisation d'oxydants chimiques, dont certains sont employés lors des traitements de potabilisation (chlore, ozone...), sur des suspensions algales s'accompagne d'un relargage de COD (Plummer et Edzwald, 1998 ; Peterson *et al.*, 1995 ; Betzer et Kott, 1969 ; Echelberger *et al.*, 1971 ; Sukenik *et al.*, 1987). Cette matière organique algale (MOA) est susceptible d'être retrouvée dans l'eau traitée si la filière de traitement utilise la préoxydation en période de bloom algal (étape où les algues ne sont pas encore éliminées).

Concernant la MOA naturellement sécrétée par les algues au cours de leur croissance (que nous appellerons « MOA-NS »), de nombreuses informations, relativement anciennes, sont disponibles quant à sa composition : une grande variété de composés organiques tels que des hydrates de carbone, des protéines, des peptides, des acides aminés, des acides nucléiques, des vitamines, des lipides, des toxines... a été rapportée (Hellebust, 1965, 1974 ; Fogg, 1983 ; Münster et Chrost, 1990 ; Sundh, 1989, 1992). Cependant, aucune donnée de la littérature n'a mesuré le potentiel biodégradable de ces composés algaux (en terme de COA ou de CODB), ce qui nous intéresse plus particulièrement dans notre étude. De plus, contrairement à la MOA-NS, aucune

étude à notre connaissance ne s'est attachée à décrire la nature de la MOA relarguée par les algues après une oxydation (que nous nommerons « MOA-ox »).

Dans ce contexte, l'objet de cette phase d'étude était : (i) d'estimer la composition de la MOA susceptible d'être présente en eau traitée et de représenter un substrat pour les bactéries hétérotrophes lors des blooms algaux, et (ii) de comparer la nature des composés organiques issus de la sécrétion naturelle des algues (MOA-NS) ou du relargage des algues après un stress oxydant (MOA-ox). Pour ce faire, nous avons simulé un bloom algal en laboratoire à partir d'algues prélevées en eau de rivière et mises en culture dans un milieu minéral, puis à partir de cette culture, la MOA naturellement sécrétée au cours de la croissance a été récupérée ainsi que les cellules algales sur lesquelles des essais d'oxydation ont été réalisés.

Ce chapitre s'organise en quatre parties. Dans un premier temps, les caractéristiques de la MOA naturellement sécrétée par les algues au cours de leur croissance (MOA-NS) sont détaillées. Puis, dans un deuxième temps, la MOA-NS étant susceptible de subir des étapes d'oxydation en passant par la filière de traitement, nous avons estimé les changements quantitatifs et qualitatifs de cette MOA après chloration ou ozonation. La troisième partie présente les caractéristiques de la MOA relarguée par les algues suite à un stress oxydant (chlore et ozone) appliqué directement sur les cellules algales. Enfin, une discussion générale des résultats obtenus est présentée. Le matériel et les méthodes utilisées sont détaillés dans le chapitre III.

IV.2. MOA naturellement sécrétée par les algues (MOA-NS)

L'objectif de cette partie est de caractériser la composition de la MOA naturellement sécrétée par des algues (MOA-NS). Elle correspond à la matière organique dissoute excrétée par des algues au cours de leur croissance (mécanisme de photosynthèse ou lyse cellulaire) dans un milieu de culture initialement minéral. Après avoir présenté comment cette MOA a été obtenue en laboratoire, ses caractéristiques chimiques (COD, CODB, sucres, acides aminés...) et physiques (estimation des masses moléculaires, absorbance UV, émission de fluorescence) seront décrites.

IV.2.1. Protocole expérimental

Des algues d'eau de rivière (Moselle) ont été mises en culture dans un milieu minéral ($\text{COD} < 0,3 \text{ mg L}^{-1}$) ; les conditions détaillées de l'étape de culture sont décrites au § III.2.

Au cours de la croissance algale, qui a mené à la sélection d'un seul genre de *Chlorophyceae* (*Chlorella* à plus de 99%), la sécrétion de matière organique par les algues a été estimée par mesure du COD dans le milieu. Après atteinte de la phase stationnaire (stabilisation des concentrations en algues et en COD) après environ 3 mois, la culture a été centrifugée (10 min., 2000g) puis le surnageant a été filtré sur 0,2 μm (Whatman, réf. 6705-3602) de manière à ne récupérer que la matière organique dissoute et à stériliser le milieu pour éviter toute biodégradation bactérienne. Ce filtrat, contenant la MOA naturellement sécrétée par les algues au cours de leur croissance, a ensuite été stocké sous forme d'aliquots (100 à 300 mL) au congélateur à -20°C de manière à pouvoir travailler sur la même matrice pendant toute l'étude. A chaque utilisation, un aliquot a été décongelé pendant 48 h à $4-10^{\circ}\text{C}$. Pour caractériser cette MOA-NS, les concentrations en COD, CODB, sucres, protéines, acides aminés, azote et phosphore ont été mesurées. Des mesures d'émission de fluorescence, d'absorbance UV, de fractionnement par ultrafiltration, de chromatographie d'exclusion de taille et de pyrolyse GC/MS ont également été effectuées. Toutes les techniques de caractérisation de la MOA sont détaillées au paragraphe III.9.

IV.2.2. Résultats

Composition chimique de la MOA-NS

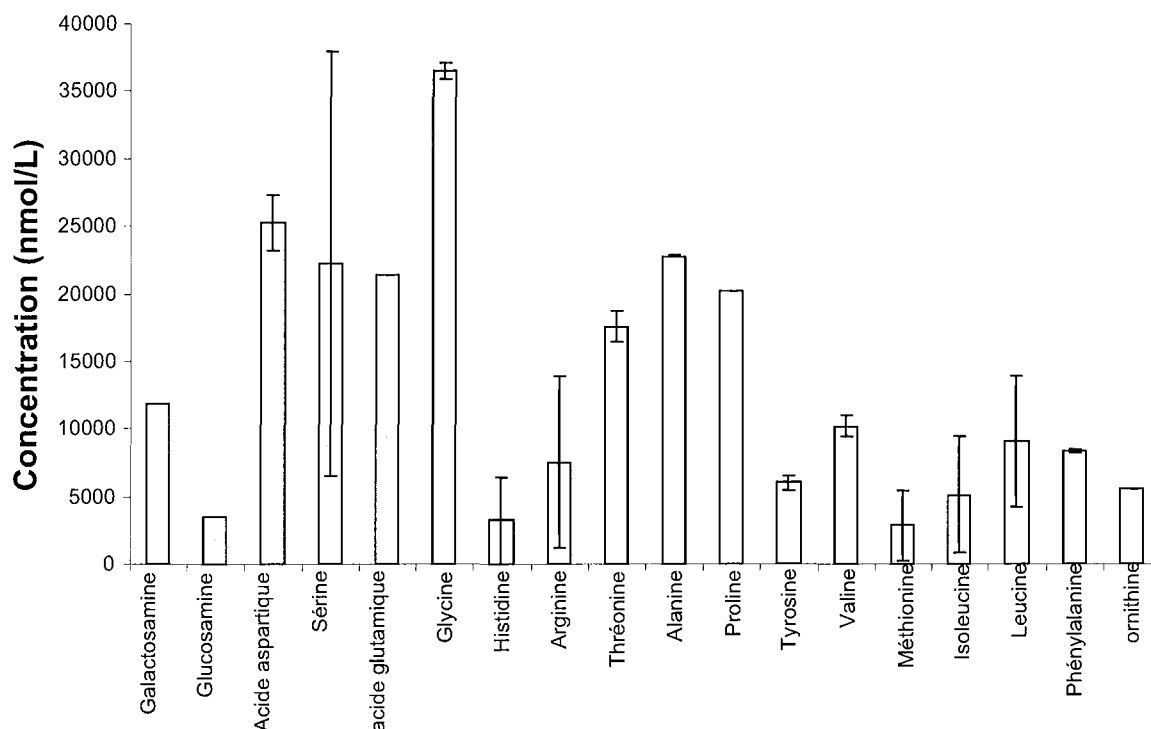
La MOA-NS dissoute récupérée à partir de la culture d'algues réalisée en laboratoire contient de l'ordre de $136 \pm 9 \text{ mg L}^{-1}$ de COD dont une fraction très importante est biodégradable puisque le CODB représente plus de 80% du COD (Tableau IV.1). La MOA-NS est essentiellement de nature glucidique et non protéique. En effet, les sucres représentent en moyenne 71% du COD tandis que les concentrations en protéines totales se situent à la limite de détection de la méthode utilisée (0,3 mg éq BSA L^{-1}) et ne correspondent ainsi qu'à 0,1% du COD. Par contre, l'analyse de 18 acides aminés a révélé la présence de ces composés parmi la MOA-NS. Au total, les acides aminés représentent en moyenne 7,8% du COD, en accord avec les données de la littérature qui montrent que les acides aminés représentent généralement moins de 10% de la sécrétion algale.

L'analyse chromatographique a permis de déterminer la nature des acides aminés détectés (Figure IV.1) ainsi que la présence de sucres aminés en faible quantité (glucosamine et galactosamine à une concentration de 242 et 814 nmol L^{-1} respectivement). Les acides aminés majoritaires sont la glycine (16,3%), l'acide aspartique (11,3%), l'alanine (10,2%), la sérine (9,9%), l'acide glutamique (9,6%), la proline (9%) et la thréonine (7,9%). Tous les autres représentent moins de 5% des acides aminés totaux.

Tableau IV.1. Caractérisation chimique moyenne ($\pm$ écart type) du filtrat de la culture d'algues contenant la MOA-NS (glc=glucose ; BSA=Albumine de sérum bovin). LD = 0,01 mg N-NO₃ L⁻¹.

Paramètres	Unités	Moyennes $\pm$ écart types	Nombre de mesures
COD	mg C L ⁻¹	136,3 $\pm$ 9,2	12
CODB	mg C L ⁻¹	106,1 $\pm$ 14,2	5
	% du COD	80,6 $\pm$ 10,8	
Sucres totaux	mg éq glc L ⁻¹	247,5 $\pm$ 49,7	5
	mg C L ⁻¹ *	99,0 $\pm$ 19,9	
	% du COD	70,8 $\pm$ 8,2	
Protéines totales	mg éq BSA L ⁻¹	0,3 $\pm$ 0	2
	mg C L ⁻¹ **	0,2 $\pm$ 0	
	% du COD	0,1 $\pm$ 0,004	
Acides aminés totaux	mg L ⁻¹	25,0 $\pm$ 4,7	2
	mg C L ⁻¹ ***	10,7 $\pm$ 1,8	
	% du COD	7,7 $\pm$ 0,6	
Ammonium	mg N L ⁻¹	0,38	1
Nitrate	mg N L ⁻¹	<LD	1
Nitrite	mg N L ⁻¹	0,01	1
Phosphore total	mg P L ⁻¹	0,18	1

* Les concentrations en sucres sont transformées en mg C L⁻¹ en considérant que le carbone représente 40% de la molécule de glucose. ** Les concentrations en protéines sont transformées en mg C L⁻¹ en considérant que le carbone représente 54,5% de la molécule (valeur dérivée de la formule chimique générale des protéines) (Aquino et Stuckey, 2004). *** Les concentrations en acides aminés sont transformées en mg C L⁻¹ en prenant en compte le pourcentage de carbone présent dans chaque acide aminé pris individuellement.


Figure IV.1. Concentrations en acides aminés et sucres aminés dans la MOA-NS non diluée (n=2, COD=136 mg C L⁻¹).

Dans le filtrat de la culture d'algues contenant la MOA naturellement sécrétée, de l'azote et du phosphore sont également mesurés : $0,39 \text{ mg-N L}^{-1}$ et $0,18 \text{ mg-P L}^{-1}$. Ces éléments minéraux provenant sans doute du milieu minéral de culture (malgré l'appauvrissement de ce milieu au cours de la croissance des algues) sont cependant minoritaires par rapport au carbone puisque le rapport C/N/P calculé à partir des concentrations mesurées en COD, N et P est de 100/0,24/0,05 montrant l'importance de l'élément carbone dans cette solution.

L'analyse par pyrolyse GC/MS a permis de confirmer les résultats obtenus par des mesures plus globales telles que le dosage des protéines ou des sucres totaux. Le pyrochromatogramme (Figure IV.2) révèle en effet l'abondance des polysaccharides (fragments en bleu) dans la composition de la MOA-NS dissoute. On note également la présence moins nombreuse de fragments (en noir) caractéristiques de la pyrolyse de structures de type protéiques ou polyhydroxyaromatiques. Selon les données acquises dans la littérature, le phénol et le crésol peuvent en effet provenir de la pyrolyse de la tyrosine alors que le toluène aurait plutôt pour origine la phénylalanine. L'acétamide (en rouge) est caractéristique de la pyrolyse de sucres aminés dont la présence a été vérifiée par chromatographie liquide (Figure IV.1).

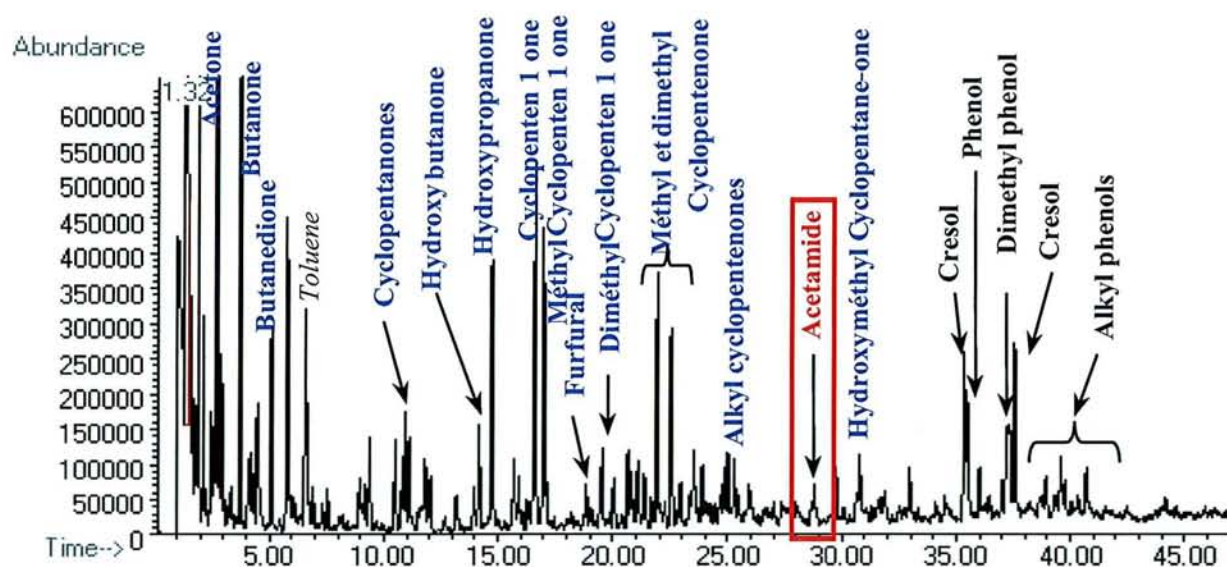


Figure IV.2. Chromatogramme obtenu par pyrolyse GC/MS de la solution de MOA-NS non diluée ($136 \text{ mg COD L}^{-1}$).

Caractéristiques spectrales (absorbance UV et émission de fluorescence) de la MOA-NS

Les spectres d'absorbance UV et d'émission de fluorescence de la MOA-NS montrent des profils classiques des matières organiques des eaux naturelles (Figure IV.3) :

- le signal en fluorescence ($\lambda_{ex}=370$ nm) est caractérisé par une bande d'émission large et sans particularité avec un maximum à 470 nm ;
- le spectre d'absorbance UV entre 200 et 400 nm ne montre pas non plus de bande d'absorption spécifique et traduit une augmentation progressive de la densité optique entre 400 et 200 nm.

Le fait que certains composés absorbent dans l'UV et émettent une fluorescence (profil non plat) révèle la présence de molécules aromatiques dans la MOA-NS. Parmi les composés de la MOA-NS identifiés au paragraphe précédent, les acides aminés aromatiques sont susceptibles d'être mis en évidence par ces deux techniques. Cependant, le calcul de l'absorbance UV spécifique à 254 nm ($SUVA_{254}$), couramment utilisé comme indicateur de la teneur en carbone aromatique d'un échantillon, montre une valeur très faible ($0,1696 \text{ m}^{-1} \text{ L mg}^{-1}$), indiquant que les composés aromatiques présents dans la MOA-NS représentent une très faible fraction des composés organiques totaux. Ce résultat est en accord avec les fortes proportions de sucres (71%) et de CODB (80%) mesurées dans la MOA-NS, les sucres et les molécules composant le CODB étant décrites comme des structures n'induisant pas ou peu de réponse en UV et en fluorescence.

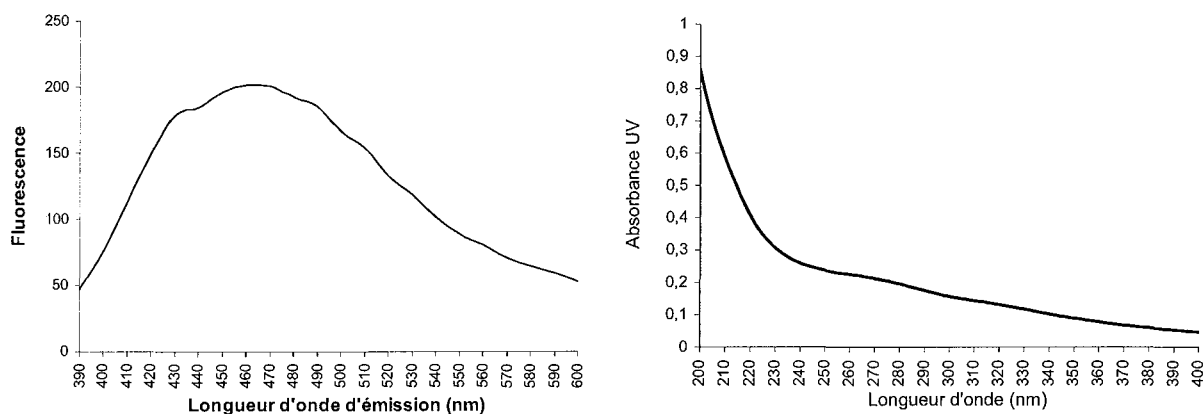


Figure IV.3. Spectres d'émission de fluorescence ($\lambda_{ex}=370$ nm, $\lambda_{ém}=390-600$ nm) et d'absorbance UV (200-400 nm) de la MOA-NS non diluée ($136 \text{ mg COD L}^{-1}$).

Répartition des masses moléculaires de la MOA-NS

L'estimation de la masse moléculaire des composés organiques de la MOA-NS a été effectuée grâce à l'utilisation de deux techniques : (i) la chromatographie d'exclusion de taille (HPSEC) couplée à divers détecteurs (UV, fluorescence ou COD) et (ii) le fractionnement par ultrafiltration.

La figure IV.4 présente les résultats obtenus par chromatographie d'exclusion. Les chromatogrammes obtenus avec une détection par UV ou fluorescence (Figure IV.4 A et B) présentent des profils relativement similaires faisant apparaître dans les deux cas que la MOA-NS (rappelons qu'elle a été filtrée sur 0,22 μm) présente une distribution de tailles relativement hétérogène. En effet, on trouve à la fois :

- (i) des structures de hautes masses moléculaires (bande 1) présentant le temps de rétention le plus faible vers 6 min (de l'ordre de 40000 Da) et qui pourraient correspondre selon la littérature à des structures de types polysaccharides et protéines,
- (ii) des structures de faibles masses moléculaires (bande 2) présentant un temps de rétention vers 11-12 min (<500 Da), constituées sans doute de petites molécules organiques telles que des petits acides organiques, des structures azotées (peptides, acides aminés...).

Les masses moléculaires données ici ne sont que des valeurs indicatives par comparaison aux étalons internes utilisés pour calibrer la colonne.

L'empreinte chromatographique obtenue en utilisant une détection par dosage du COD (Figure IV.4 C) ne présente pas de profil bien défini puisque les pics n'apparaissent pas nettement séparés (les temps de rétention très différents de ceux obtenus pour les chromatogrammes A et B sont dûs à l'utilisation d'un autre type de colonne). Ce profil confirme ainsi la grande diversité de tailles moléculaires parmi la MOA-NS, avec toutefois une prédominance des structures de hautes masses moléculaires (temps de rétention les plus faibles). La différence de profil entre les chromatogrammes obtenus par HPSEC/UV-Fluo et celui obtenu par HPSEC/COD n'est cependant pas contradictoire et peut simplement refléter la présence de molécules organiques ayant une réponse faible en UV et en fluorescence. En effet, certaines molécules, comme les sucres ou les acides aliphatiques par exemple (représentant souvent les molécules responsables du CODB), absorbent très peu dans l'UV (de part l'absence de groupement aromatique) ou n'émettent pas de fluorescence (absence de fluorophore), alors qu'ils sont mis en évidence par dosage du COD (moins sélectif). Cette observation est à rapprocher au fort pourcentage de CODB (80%) et de sucres (71%) parmi la MOA-NS.

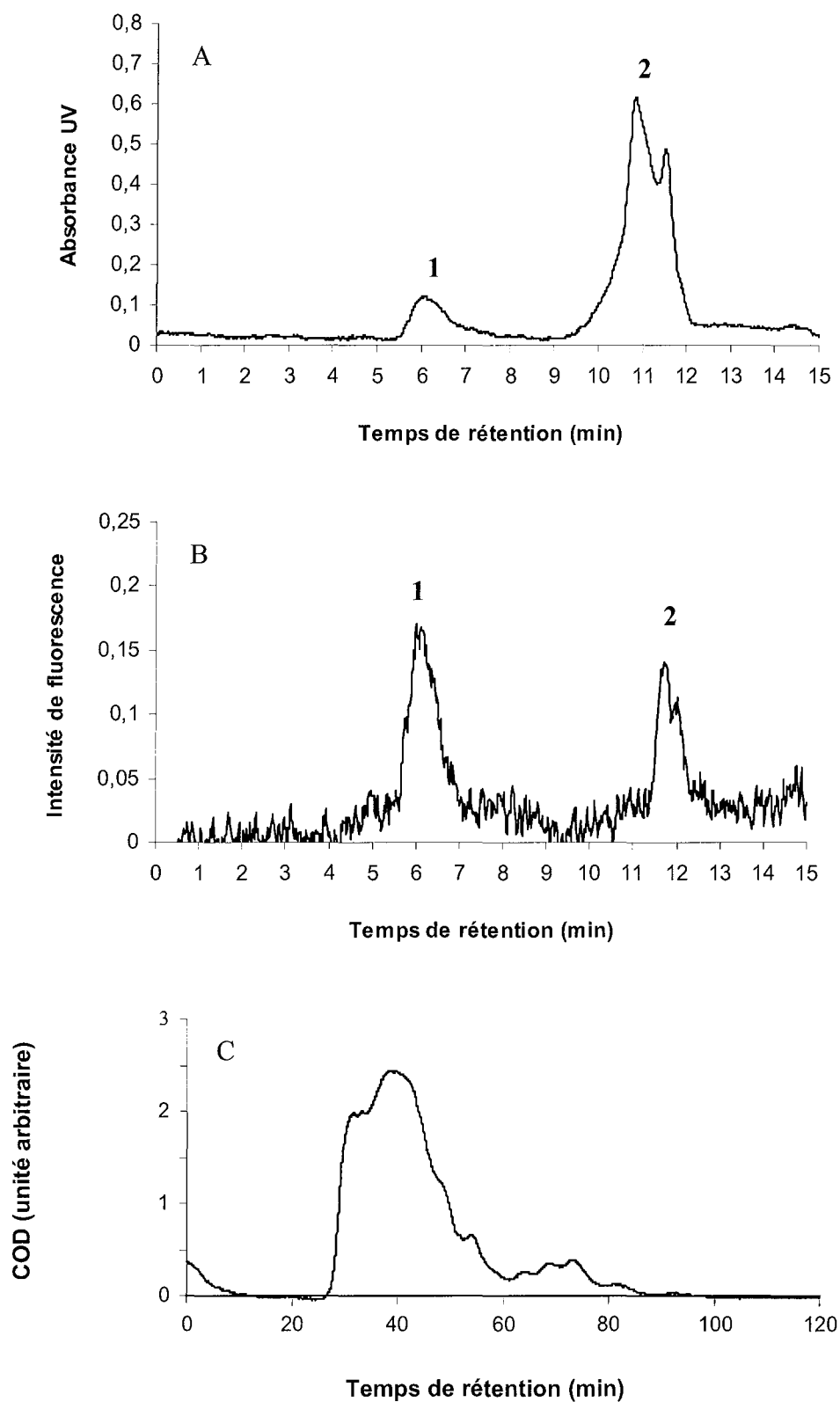


Figure IV.4. (A) HPSEC/UV ($\lambda=260$ nm), (B) HPSEC/Fluorescence ($\lambda_{ex}=278$ nm, $\lambda_{ém}=315$ nm, et (C) HPSEC/COD de la solution de MOA-NS diluée à $8,9$ mg COD L^{-1} .

Les résultats obtenus par la technique de fractionnement par ultrafiltration, présentés à la figure IV.5, confirment ceux obtenus par chromatographie d'exclusion. En effet, toutes les catégories de masse moléculaire apparente (MMA) testées (<0,5 à >30 kDa) sont représentées parmi la MOA-NS dissoute. Cependant, les deux classes extrêmes sont les plus représentées avec 77% des composés organiques >30 kDa et 17% <0,5 kDa. Les classes intermédiaires (30-0,5 kDa) ne représentent ainsi au total que 6% du COD de la MOA-NS.

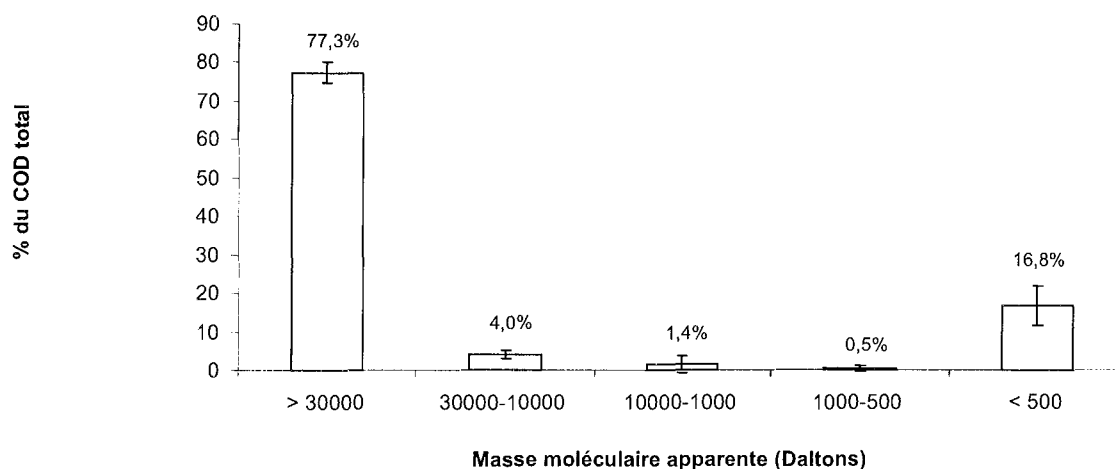


Figure IV.5. Pourcentage du COD total de la MOA-NS (diluée à $4,2 \pm 1,6$ mg COD L⁻¹) des différentes fractions isolées par ultrafiltration (n=2).

En récapitulatif, les résultats présentés dans cette partie ont permis de montrer que la MOA-NS contient une forte majorité de sucres (71%), quelques acides et sucres aminés (8%) mais très peu de protéines (0,1%) et de composés aromatiques (SUVA₂₅₄ très faible). Cette composition chimique de la MOA-NS lui confère un potentiel biodégradable très important puisque le CODB représente 80% du COD, et ceci malgré la présence majoritaire de molécules de hautes masse moléculaire (77% du COD > 30000 Da).

IV.3. MOA naturellement sécrétée par les algues puis oxydée (MOA-NS-ox)

L'objectif général de ce chapitre étant d'estimer la composition de la MOA susceptible d'être présente en eau traitée, il est apparu intéressant d'évaluer si la composition de la MOA-NS (présentée précédemment) subissait des modifications qualitatives et quantitatives, lorsque celle-ci franchissait la filière de traitement. Parmi les traitements utilisés en potabilisation, nous avons choisi de nous intéresser particulièrement aux étapes d'oxydation chimiques (chlore et ozone). Ainsi, après avoir diluée la MOA-NS pour atteindre une concentration en MOD comparable à celle

des eaux brutes, la MOA-NS a été soit chlorée (MOA-NS-Cl₂), soit ozonée (MOA-NS-O₃) puis caractérisée. Le protocole expérimental et les résultats obtenus sont détaillés dans les deux paragraphes suivants.

IV.3.1. Protocole expérimental

Le surnageant de culture d'algues contenant la MOA-NS, obtenu comme décrit au § III.2., est décongelé 48 h à 4-10°C puis dilué dans de l'eau de réseau déchlorée (agitation pendant 18-24 h à température ambiante puis neutralisation du chlore résiduel par ajout de thiosulfate de sodium) et stérile (filtration sur membrane de 0,2 µm de porosité) de manière à obtenir une concentration voisine de 5 mg C-MOA L⁻¹. Il est ensuite réparti dans 6 flacons (traités à 500°C) dont 2 servent de témoins non oxydés, 2 sont chlorés (4,92±0,17 mg Cl₂ L⁻¹ appliqué) et 2 sont ozonés (10 mg O₃ L⁻¹ appliqué). Ces doses d'oxydants ont été choisies pour être représentatives des taux appliqués en usine (1 mg d'oxydant / mg COD) ; pour l'ozone, la dose appliquée a été augmentée compte tenu du système expérimental utilisé (§ III.4.3) ne permettant pas un transfert total d'ozone à l'échantillon (présence d'événements). Après un temps de contact de 45 minutes pour le chlore (essais en batch, à l'obscurité, sans agitation) et de 15 minutes pour l'ozone (système en semi-continu décrit au § III.4.3), les oxydants résiduels sont neutralisés à l'aide de thiosulfate de sodium en excès (III.4.6), y compris dans les témoins non oxydés. La MOA est ensuite filtrée sur 0,2 µm puis caractérisée (COD, CODB, sucres et protéines totaux, acides aminés, fluorescence, absorbance, UV, pH, conductivité) comme décrit aux § III.9 et III.10. En parallèle, l'eau de réseau déchlorée stérile utilisée pour diluer la MOA-NS est elle aussi chlorée et ozonée dans les mêmes conditions de manière à estimer la consommation d'oxydant attribuable aux molécules algales et non à l'eau de réseau.

IV.3.2. Résultats

Caractéristiques de la MOA-NS diluée avant oxydation

Après dilution dans l'eau de réseau stérile déchlorée, la MOA-NS présente un pH de 7,9 et une conductivité de 450 µS cm⁻¹. La concentration mesurée en COD est de 6,2 mg L⁻¹ dont 4,3 mg CODB L⁻¹ (soit 69% du COD). Les sucres représentent 50% du COD (7,8 mg éq glucose L⁻¹ correspondant à 3,1 mg C L⁻¹). Aucune protéine n'est détectée (<0,3 mg éq BSA L⁻¹). Les acides aminés n'ont pas été mesurés sur la MOA-NS diluée avant oxydation.

Réactivité de la MOA-NS avec les oxydants

Après oxydation, 28% du chlore et 24% de l’ozone sont consommés par la MOA-NS diluée dans l’eau de réseau, correspondant respectivement à une demande en oxydant apparente de 0,2 mg Cl₂/mg COD et 0,4 mg O₃/mg COD (Tableau IV.2). Les concentrations d’oxydant consommées dans l’eau de réseau (diluant) montrent des valeurs 3 et 6 fois plus faibles (pour le chlore et l’ozone respectivement) que celles mesurées dans la MOA-NS, ce qui suggère que les composés algaux réagissent avec les oxydants : en d’autres termes, la consommation d’oxydant dans la MOA-NS diluée n’est pas uniquement attribuable aux molécules présentes dans l’eau de dilution. Cette dernière contribue ainsi à 18 à 29% de la consommation d’oxydant.

Tableau IV.2. Concentrations en oxydant (chlore ou ozone) appliquées, résiduelles en solution, dans les événements (pour l’ozone seulement) et consommées par la MOA-NS diluée (6,2 mg COD L⁻¹) et par l’eau de dilution seule (1,9 mg COD L⁻¹). Temps de contact = 15 min. pour l’ozone et 45 min. pour le chlore.

	Concentration en oxydant (mg L ⁻¹)			
	appliquée	dans les événements	résiduelle	consommée
Eau de dilution chlorée (n=1)	5,24	-	4,84	0,40
Eau de dilution ozonée (n=1)	7,50	6,86	0,22	0,42
MOA-NS chlorée (n=2)	4,92 ±0,17	-	3,56 ±0	1,36 ±0,17
MOA-NS ozonée (n=2)	10 ±0	7,61 ±0,58	0,04 ±0	2,35 ±0,58

Effets des oxydations sur la composition de la MOA-NS

Dans nos conditions d’expérience, les concentrations en COD, CODB, sucres, protéines et acides aminés totaux ne montrent pas de différence significative après chloration ou ozonation (p=0,15 à 0,65) de la MOA-NS par rapport au témoin non oxydé (Tableau IV.3). Le pourcentage de CODB reste compris entre 58 et 61%, celui des sucres entre 69 et 75% du COD.

Tableau IV.3. Concentrations en COD, CODB, sucres et protéines de l’eau de dilution et de la MOA-NS non traitée, chlorée et ozonée après ajout de thiosulfate (AAT=acides aminés totaux, BSA=Albumine de sérum bovin, glc=glucose); ^aLD=0,3mg éq BSA L⁻¹; ^bLD=1 mg éq glc L⁻¹. nd=non déterminé.

	COD (mg L ⁻¹)	CODB (mg L ⁻¹)	AAT (mg L ⁻¹)	Protéines (mg éq BSA L ⁻¹)	Sucres (mg éq glc L ⁻¹)
MOA-NS non traitée (n=2)	6,16 ±0,01	3,7 ±0,2	0,28 ±0,063	<LD ^a	10,70 ±0,19
MOA-NS chlorée (n=2)	6,16 ±0,01	3,6 ±0,2	0,24 ±0,004	<LD ^a	11,48 ±0,22
MOA-NS ozonée (n=2)	6,11 ±0,03	3,7 ±0,4	0,18 ±0,020	<LD ^a	10,96 ±0,76
Eau dilution non traitée (n=1)	1,89	0,5	nd	<LD ^a	<LD ^b
Eau dilution chlorée (n=1)	2,25	0,9	nd	<LD ^a	<LD ^b
Eau dilution ozonée (n=1)	1,84	0,7	nd	<LD ^a	<LD ^b

Malgré l'absence de significativité, une tendance à la diminution des concentrations en acides aminés totaux après oxydation est observée et correspond à un pourcentage moyen d'abattement de 14% après chloration et de 36% après ozonation (Tableau IV.3). Si la concentration de chaque acide aminé est observée individuellement avant et après oxydation (Figure IV.6), il apparaît que le chlore provoque soit une augmentation, soit une diminution de la quantité d'acides aminés, alors que l'ozone induit dans tous les cas un abattement des concentrations. Dans le cas d'une chloration, les acides aminés montrant l'abattement le plus fort sont : la lysine (-57%), la tyrosine (-53%) et l'histidine (-41%). Dans le cas de l'ozonation, la lysine subit l'abattement le plus important (-75%) ; plusieurs autres acides aminés montrent une diminution située entre 38 et 40% (acide glutamique, thréonine, tyrosine, leucine).

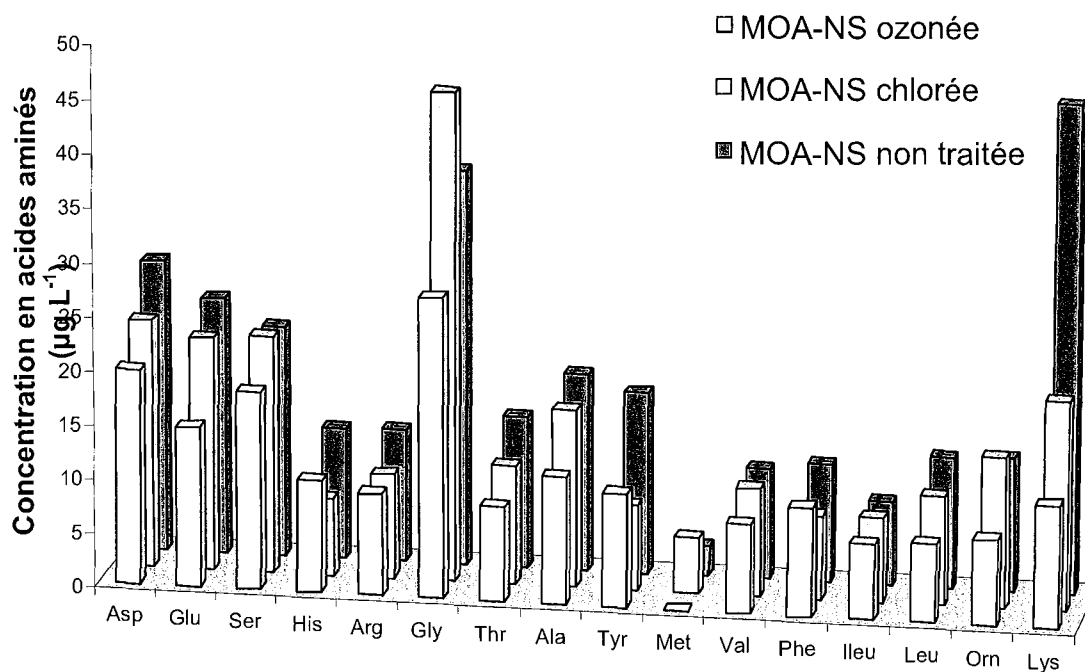


Figure IV.6. Concentrations de chaque acide aminé mesurées dans la MOA-NS diluée non traitée, chlorée et ozonée ($n=2$, COD compris entre 6,11 et 6,16 mg C L^{-1}).

Alors que l'oxydation affecte très peu les mesures globales de la MOA-NS, les spectres d'émission de fluorescence présentés à la figure IV.7 montrent que l'étape d'oxydation abaisse l'intensité de fluorescence émise sur la plage de longueur d'onde 390-600 nm, quel que soit l'oxydant utilisé. Deux zones sont remarquables sur ces spectres : un pic vers 424 nm et un épaulement autour de 470 nm. Après chloration, la fluorescence à 424 et 470 nm diminue respectivement de 4% et 16% par rapport à la MOA-NS non traitée. Après ozonation, les signaux sont plus marqués avec 23% et 57% de baisse aux mêmes longueurs d'onde.

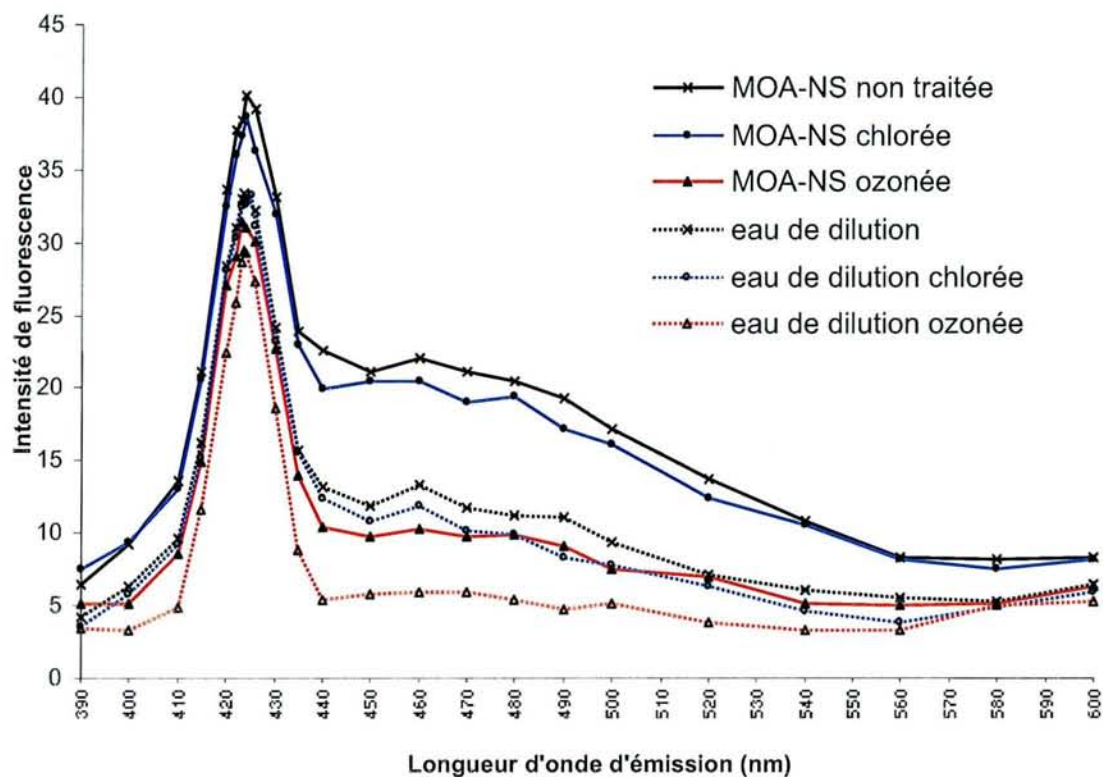


Figure IV.7. Spectres d'émission de fluorescence ($\lambda_{ex}=370\text{nm}$) de l'eau de dilution ($n=1$) et de la MOA-NS diluée ($n=2$) non traitées, chlorées et ozonées.

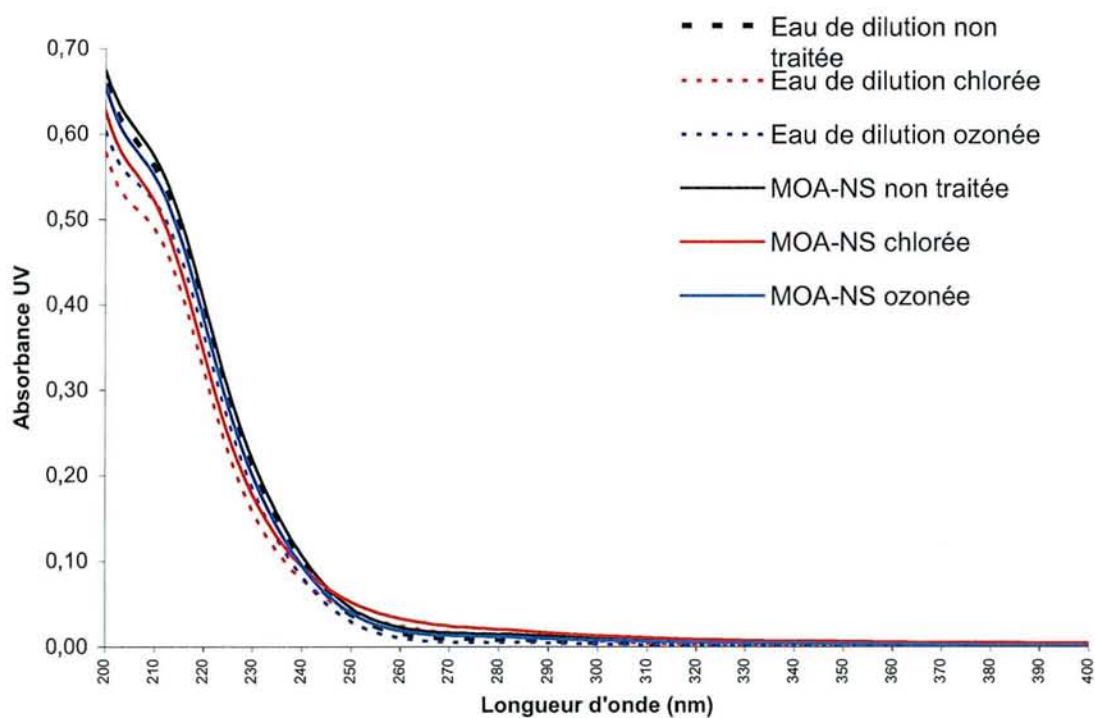


Figure IV.8. Spectres d'absorbance UV (200-400 nm) de l'eau de dilution ($n=1$) et de la MOA-NS diluée ($n=2$) non traitées, chlorées et ozonées.

Cette baisse de fluorescence qui suggère une diminution des composés cycliques et aromatiques, déjà présents initialement en faible quantité dans la MOA-NS (cf § IV.2), peut être reliée à la diminution de la concentration en certains acides aminés et notamment la tyrosine, la phénylalanine et l'histidine. Elle est également observée dans l'eau de dilution mais à un niveau plus faible puisque l'abattement observé respectivement à 424 et 470 nm est de 1 et 13% après chloration et de 11 et 50% après ozonation.

Contrairement à la fluorescence, les mesures d'absorbances UV n'ont pas permis de montrer d'effet significatif de l'étape d'oxydation sur la MOA-NS (Figure IV.8), sans doute à cause des niveaux très faibles de molécules aromatiques dans la MOA-NS, l'absorbance UV étant moins sensible que la fluorescence.

En récapitulatif,

- L'oxydation de la MOA-NS dissoute (diluée dans de l'eau de réseau déchlorée et stérile) ne provoque pas de modification significative des concentrations en COD, CODB et sucres, phénomène sans doute lié à la faible réactivité des oxydants avec les sucres, composés majoritaires de la MOA-NS.
- Malgré l'absence de significativité statistique ($n=2$), un abattement des concentrations en acides aminés de 36% après ozonation et de 14% après chloration est mesuré, en accord avec la forte réactivité de ces composés avec les oxydants.
- Les mesures d'émission de fluorescence ont montré une baisse de l'aromaticité de la MOA-NS après oxydation.

IV.4. MOA issue de l'oxydation d'algues (MOA-ox)

Les essais précédents ont permis de caractériser la composition de la MOA naturellement sécrétée par les algues au cours de leur croissance. Dans cette section, nous nous intéressons à une autre origine de MOA susceptible d'être présente en eau de distribution, à savoir celle relarguée par les algues suite à un stress oxydant au chlore et à l'ozone (MOA-ox). Les essais présentés ici ont pour but (i) de caractériser ce phénomène de relargage de MOA lors de l'oxydation d'algues (relations dose-effet), (ii) d'apprécier la nature des composés relargués, et (iii) de comparer l'action du chlore et de l'ozone. Les résultats bruts sont présentés en annexe X.1.

IV.4.1. Protocole expérimental

La culture d'algues (§ III.2), en phase stationnaire de croissance et principalement composée de la chlorophycée *Chlorella* (>99%), est lavée par centrifugation 2 fois 10 min. à 2000 g dans de l'eau distillée stérile afin d'éliminer le milieu minéral de culture et la matière organique dissoute provenant de la sécrétion naturelle des algues (MOA-NS). Le culot d'algues est repris dans de l'eau distillée stérile à la concentration voulue ($4 \cdot 10^4$ à 10^{10} L⁻¹). Cette suspension d'algues (pH=6,03±0,47 ; conductivité=65±37 µS cm⁻¹) est alors oxydée par le chlore ou l'ozone : (i) les chloration sont effectuées en batch, sans agitation, à l'obscurité à 22±2°C avec une solution commerciale d'eau de javel (§ III.4.1). Les concentrations en chlore total appliquées varient selon les essais de 0,9 à 7,9 mg L⁻¹ ; (ii) les ozonations sont effectuées dans un système semi-continu à 22±2°C décrit au § III.4.3. Les concentrations d'ozone appliquées varient selon les essais de 0,3 à 16,9 mg O₃ L⁻¹ correspondant à des concentrations transférées (O₃ envoyée dans l'échantillon – O₃ dans les événements) de 0,1 à 6,3 mg O₃ L⁻¹. Après un temps de contact de 45 min. pour le chlore et de 1 à 45 min. pour l'ozone, les oxydants résiduels sont neutralisés au thiosulfate de sodium puis la matière organique dissoute relarguée par les algues (MOA-ox) est récupérée par filtration sur 0,2 µm. Des prélèvements sont effectués avant et après oxydation afin de quantifier la concentration en algues, le pH, la conductivité, l'absorbance UV, la fluorescence, les protéines et les sucres totaux, les acides aminés, le COD et le CODB (§ III.). Les MOA relarguées par les algues après chloration et ozonation sont dénommées MOA-Cl₂ et MOA-O₃ respectivement.

IV.4.2. Résultats

Choix de la concentration en algues utilisée dans les essais

Des essais préliminaires effectués avec une dose de chlore ($5,6 \pm 0,4$ mg Cl₂ L⁻¹) et différentes concentrations en algues *Chlorella* ont montré que le relargage de matière organique dissoute augmentait linéairement ($R^2=0,91$) avec la quantité initiale en algues (Figure IV.9). En moyenne, $2 \cdot 10^{-9}$ mg de COD sont relargués par cellule algale. De ce fait, tous les essais ont été réalisés par la suite à une concentration en algues fixe et voisine de $5 \cdot 10^9$ cellules L⁻¹. Cette concentration a été choisie pour deux raisons principales : (i) elle permet d'obtenir des concentrations en COD relargué suffisamment importantes pour pouvoir réaliser les futurs essais avec *E. coli*, et (ii) elle peut parfaitement correspondre aux concentrations algales trouvées en eau de ressource lors des blooms algaux.

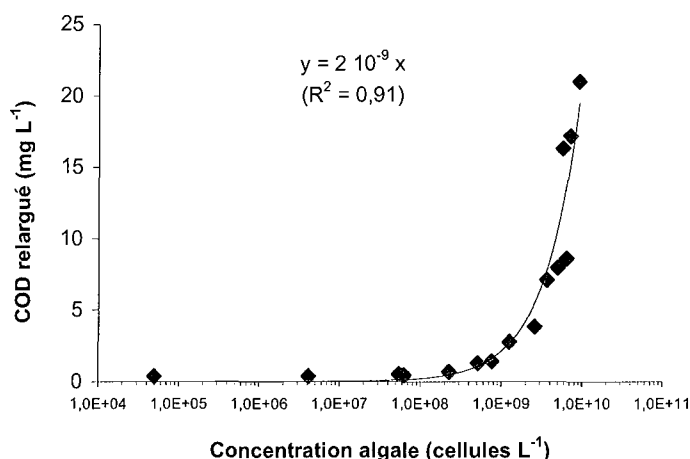


Figure IV.9. COD relargué par différentes concentrations en algues *Chlorella* (échelle logarithmique) après une chloration à $5,6 \pm 0,4$ mg Cl₂ L⁻¹ (temps de contact = 45 minutes) (n=15).

Réactivité des algues vis-à-vis des oxydants

Les résultats obtenus pour une concentration d'algues de $5 \cdot 10^9$ cellules L⁻¹ montrent que la concentration d'oxydant transférée à l'échantillon (ozone) ou consommée par l'échantillon (chlore) est proportionnelle à la dose d'oxydant appliquée (Figure IV.10.a) : en moyenne, 70% du chlore est consommé pendant les 45 minutes de temps de contact ($R^2=0,94$) contre 37% d'ozone transféré pendant les 1 à 45 minutes d'ozonation ($R^2=0,91$). La différence est sans doute due aux dispositifs utilisés : un système en batch pour les chlurations (système fermé) et un système semi-continu avec possibilité d'événements pour les ozonations. Cependant, dans nos conditions d'essais, le pourcentage d'ozone transféré à l'échantillon n'est pas fonction du temps de contact appliqué (Figure IV.10.b).

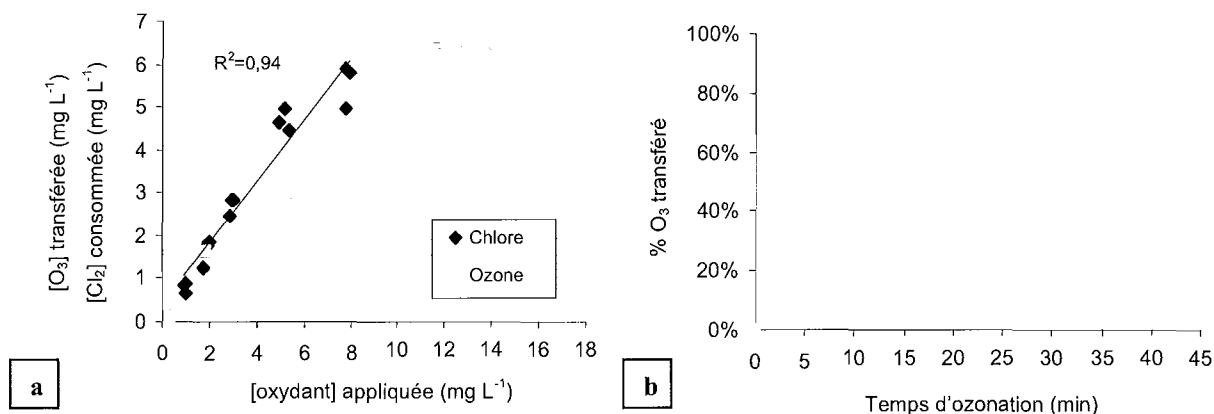


Figure IV.10. (a) Concentration d'ozone transférée à l'échantillon et concentration de chlore consommée par l'échantillon en fonction de la dose d'oxydant appliquée. (b) Pourcentage d'ozone transféré à l'échantillon en fonction du temps d'ozonation appliqué.

Concentration de MOA relarguée par les algues *Chlorella* en fonction de la dose d'oxydant

L'oxydation des cellules algales *Chlorella* ($\approx 5 \cdot 10^9$ algues L^{-1}), que ce soit par le chlore ou l'ozone, mène à un relargage massif de MOD (jusqu'à $20 \text{ mg COD } L^{-1}$). Ce relargage dépend de la dose d'oxydant appliquée (Figure IV.11). Dans nos conditions expérimentales, l'oxydation des algues provoque un relargage de COD qui augmente avec la dose d'oxydant appliquée selon une relation de type logarithmique ($R=0,94$ pour le chlore et $0,87$ pour l'ozone) : pour des concentrations d'oxydant $<30 \mu\text{mol } L^{-1}$ ($\approx 1 \text{ mg } O_3 \text{ } L^{-1}$ et $2 \text{ mg } Cl_2 \text{ } L^{-1}$), l'ozone conduit à un relargage important de COD, supérieur à celui obtenu par le chlore (jusqu'à $8 \text{ mg COD } L^{-1}$) tandis que pour des concentrations $>30 \mu\text{mol } L^{-1}$, la tendance s'inverse avec l'atteinte plus rapide d'un plateau pour l'ozone. Le maximum de COD relargué sur la plage des doses d'oxydant appliquées est de $10,8 \text{ mg COD } L^{-1}$ pour l'ozone et de $19,8 \text{ mg COD } L^{-1}$ pour le chlore.

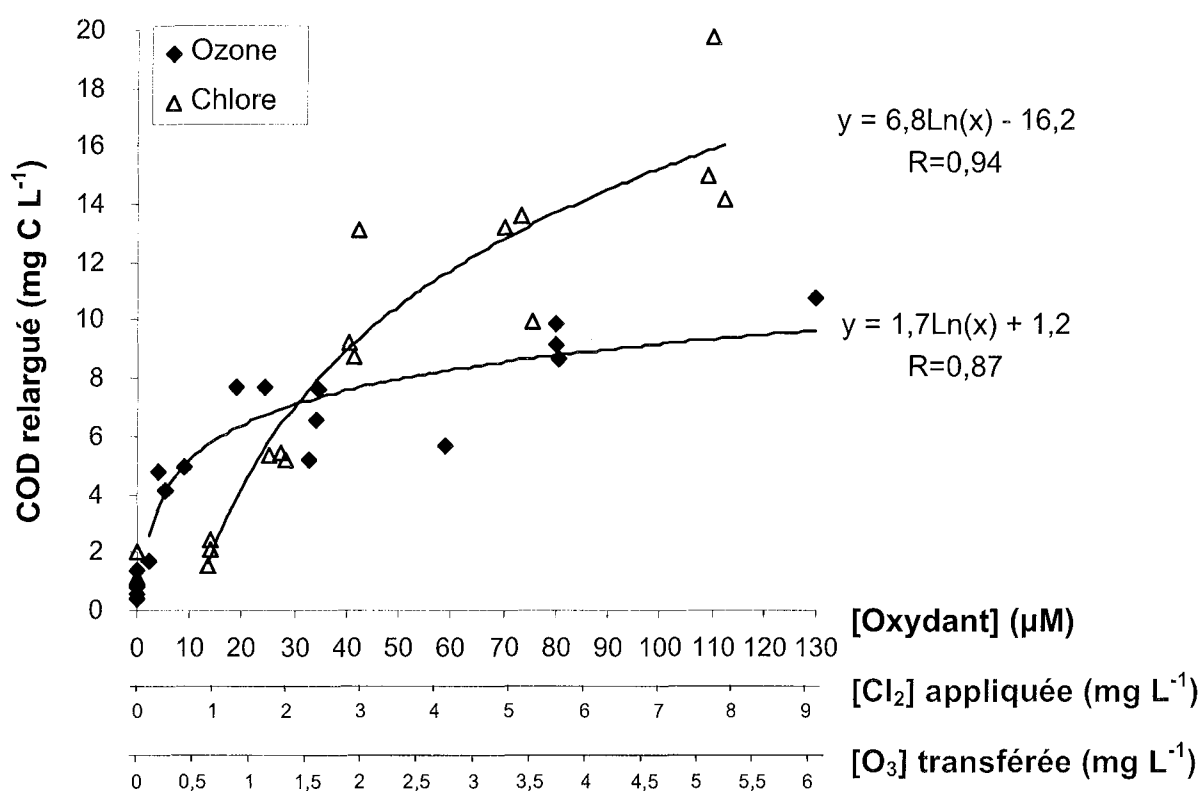


Figure IV.11. Concentration de COD relargué par les algues *Chlorella* ($5 \cdot 10^9$ cellules L^{-1}) en fonction de la concentration d'oxydant utilisée. Les concentrations d'oxydant sont exprimées avec 2 unités ($\mu\text{mol } L^{-1}$ et $\text{mg } L^{-1}$) pour le chlore ($n=18$) ou l'ozone ($n=19$).

Pour expliquer ce relargage de MOD par les algues, des photographies des algues *Chlorella* avant et après oxydation ont été effectuées au microscope électronique à balayage (Figure IV.12). Ces photos illustrent l'effet des oxydants sur la structure des cellules et particulièrement sur la paroi cellulaire. En effet, après oxydation, un grand nombre de cellules sont endommagées. Ces altérations sont caractéristiques d'une plasmolyse des cellules algales signe d'une fuite du contenu

intracellulaire, sans doute à cause d'altérations de la paroi. A titre d'exemple, le nombre de cellules montrant des dommages cellulaires après une ozonation ($1,2 \text{ mg O}_3 \text{ L}^{-1}$ pendant 15 min) ou après une chloration ($2,9 \text{ mg Cl}_2 \text{ L}^{-1}$ pendant 45 min) augmente de 20 et 24% respectivement, par comparaison à la suspension algale non traitée.

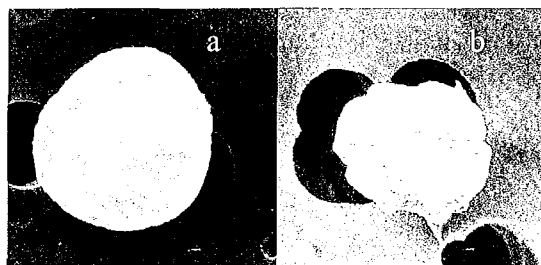


Figure IV.12. Photographies au microscope électronique à balayage d'une cellule de *Chlorella* non endommagée (a) et d'une cellule de *Chlorella* endommagée (b) après $7,8 \text{ mg Cl}_2 \text{ L}^{-1}$ pendant 45 minutes.

Composition chimique de la MOA relarguée par les algues *Chlorella* après oxydation

Afin de connaître la composition de la MOA relarguée par les algues *Chlorella* suite à l'oxydation, des analyses plus spécifiques ont été réalisées. Les caractéristiques moyennes des deux MOA (MOA- Cl_2 et MOA- O_3), toutes doses d'oxydant confondues, sont présentées au tableau IV.4. Quel que soit l'oxydant utilisé, la MOA relarguée par les algues *Chlorella* après oxydation contient une forte proportion de sucres : en moyenne, 47% après ozonation et 65% après chloration. Malgré l'absence de protéines mesurables, les deux MOA-ox contiennent quelques acides aminés puisqu'ils représentent en moyenne 2 et 8% du COD dans la MOA- Cl_2 et la MOA- O_3 respectivement.

Tableau IV.4. Caractéristiques moyennes ($\pm$ écart type) de la MOA- O_3 et de la MOA- Cl_2 toutes doses d'oxydant confondues. Les chiffres entre parenthèses correspondent aux minima et maxima observés (* : LD = $0,3 \text{ mg éq BSA L}^{-1}$).

	Témoins non oxydés ^a (n=8)	MOA- O_3 (n=14)	MOA- Cl_2 (n=15)
pH	$6,61 \pm 0,83$ (5,23 - 7,71)	$6,28 \pm 0,56$ (5,45 - 7,3)	$6,20 \pm 0,24$ (5,74 - 6,67)
Conductivité ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	$65,14 \pm 37,77$ (30,4 - 122,3)	$83,68 \pm 46,55$ (38,5 - 127,7)	$46,44 \pm 10,48$ (32,7 - 69,4)
COD (mg L^{-1})	$1,05 \pm 0,51$ (0,42 - 2,04)	$1,71 \pm 10,79$ (1,71 - 10,79)	$1,53 \pm 19,76$ (1,53 - 19,76)
SUVA ₂₅₄ ($\text{L mg}^{-1} \text{ m}^{-1}$)	$6,02 \pm 4,87$ (1,67 - 11,80)	$1,84 \pm 0,51$ (1,45 - 3,33)	$0,80 \pm 0,53$ (0,25 - 2,45)
% sucres / COD	28 ± 45 (0 - 100)	47 ± 17 (33 - 98)	65 ± 19 (36 - 99)
% CODB / COD (après 28 j de test)	48 ± 16 (29 - 66)	74 ± 10 (44 - 87)	54 ± 19 (29 - 95)
% acides aminés / COD	$4,8 \pm 1,3$ (3,6 - 7,3)	$7,9 \pm 3,5$ (3,3 - 14,3)	$2,1 \pm 1,0$ (0,8 - 4,2)
Protéines (mg éq BSA L^{-1})	< LD*	< LD*	< LD*

^a : suspensions d'algues mises dans les mêmes conditions opératoires que les suspensions oxydées.

^b : concentrations en COD variables selon la dose d'oxydant appliquée (Figure IV.11).

La fraction biodégradable diffère significativement selon l'oxydant utilisé (Man Withney, $p=0,0072$) : la MOA- O_3 montre une biodégradation plus importante et plus rapide : 74% du COD est biodégradable dans les échantillons ozonés contre 54% dans les échantillons chlorés ; de plus, les cinétiques de biodégradation montrent que la quasi-totalité du CODB des échantillons ozonés (99%) est biodégradée dès 14 jours de test correspondant à 73% de CODB contre seulement 38% pour la MOA- Cl_2 (Figure IV.13). Cet écart de CODB entre la MOA- Cl_2 et la MOA- O_3 suggère que (i) la MOD relarguée par les algues est de nature différente selon l'oxydant utilisé, et/ou (ii) la MOA relarguée par les algues au cours des premiers temps d'oxydation réagit à son tour avec l'oxydant et subit des modifications chimiques (l'ozone rendant les molécules plus biodégradables).

Les très faibles valeurs de $SUVA_{254}$ mesurées dans les deux MOA-ox (3 à 8 fois inférieures à celles du témoin non oxydé) indiquent qu'elles contiennent une fraction négligeable de composés aromatiques par rapport aux composés organiques dissous totaux.

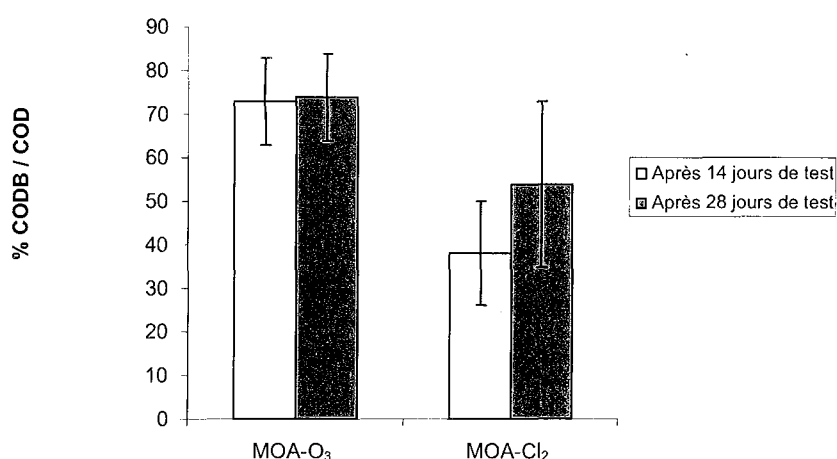


Figure IV.13. Pourcentage de CODB mesuré dans la MOA- O_3 et dans la MOA- Cl_2 après 14 et 28 jours de test standard de biodégradation (inoculum microbien diversifié, en suspension, 22°C).

Afin d'évaluer si des sous-produits d'oxydation sont générés durant l'étape de chloration ou d'ozonation des cellules algales, les composés organohalogénés et les THM (trihalométhanés) ont été dosés sur un échantillon chloré (5,2 mg Cl_2 appliqué L^{-1}) et un échantillon ozoné (5,3 mg O_3 appliqué L^{-1}) ainsi que sur la suspension algale non oxydée. Les résultats sont présentés dans le tableau IV.5. Malgré une forte consommation des oxydants, les concentrations en THM sont faibles. Seule la chloration d'algues conduit à la formation de 4,8 $\mu g L^{-1}$ de chloroforme, niveau très largement inférieur aux limites acceptées en eau potable (100 $\mu g L^{-1}$). De même, les concentrations en composés précurseurs de THM sont inférieures dans la MOA- O_3 que dans la MOA- Cl_2 . Ces

faibles niveaux de THM sont en accord avec le faible contenu aromatique et la forte proportion de sucres dans la MOA-ox (Tableau IV.4).

Tableau IV.5. Concentrations en composés organohalogénés volatils, trihalométhanes (THM) et précurseurs de trihalométhanes (pTHM) dans la MOA-Cl₂ (5,2 mg Cl₂ appliqué L⁻¹), la MOA-O₃ (5,3 mg O₃ appliqué L⁻¹) et le témoin non oxydé.

		Témoin non oxydé (0,8 mg COD L ⁻¹)	MOA-Cl ₂ (14,9 mg COD L ⁻¹)	MOA-O ₃ (7,7 mg COD L ⁻¹)
Composés organohalogénés volatils		<LD*	<LD*	<LD*
THM	dichloromonobromométhane	<LD*	<LD*	<LD*
	dibromomonochlorométhane	<LD*	<LD*	<LD*
	chloroforme	<LD*	4,8	<LD*
	bromoforme	<LD*	<LD*	<LD*
pTHM	Précurseurs de chloroforme	20	44	1,4
	Précurseurs de dichloromonobromométhane	0,3	1,7	<LD*
	Précurseur de dibromomonochlorométhane	<LD*	<LD*	<LD*
	Précurseurs de bromoforme	<LD*	<LD*	<LD*

* Les limites de détection (LD) pour chaque composé sont présentées au § III.9.8 du « Matériel et méthodes ».

Masses moléculaires de la MOA relarguée par les algues *Chlorella* après oxydation

Quatre échantillons de MOA-O₃ et de MOA-Cl₂ ont été fractionnés par ultrafiltration de manière à estimer la masse moléculaire apparente (MMA) des molécules organiques composant ces deux MOA (Figure IV.14) et d'estimer si la dose d'oxydant appliquée a une influence sur la répartition des MMA. Les résultats présentés à la figure IV.14 montrent que les 5 classes de MMA testées (>30 kDa, 30-10 kDa, 10-1 kDa, 1-0,5 kDa et <0,5 kDa) sont représentées parmi la MOA-ox. Cependant, des variations sont observées selon l'oxydant utilisé et selon la dose d'oxydant appliquée.

Globalement,

- (i) dans le cas du chlore : plus la dose appliquée est forte, plus la fraction de composés >30 kDa augmente en parallèle de la diminution de la fraction des composés de MMA<0,5 kDa ;
- (ii) dans le cas de l'ozone, plus la dose appliquée est forte, plus le pourcentage de molécules de grosses MMA (>30 kDa) diminue en faveur des petites MMA (fraction <0,5 kDa).

La MOA-O₃ semble ainsi être composée de molécules de plus petite MMA que la MOA-Cl₂. A titre d'exemple, dans la MOA-Cl₂ subissant la plus forte chloration (112 µM), 64% du COD correspond à des composés de MMA>30000 Da contre 19% à des MMA<500 Da. Au contraire, dans la MOA-O₃ subissant la plus forte ozonation (130 µM), 85% du COD est représenté par des molécules de MMA<500 Da et 13% seulement par des composés de MMA>30000 Da.

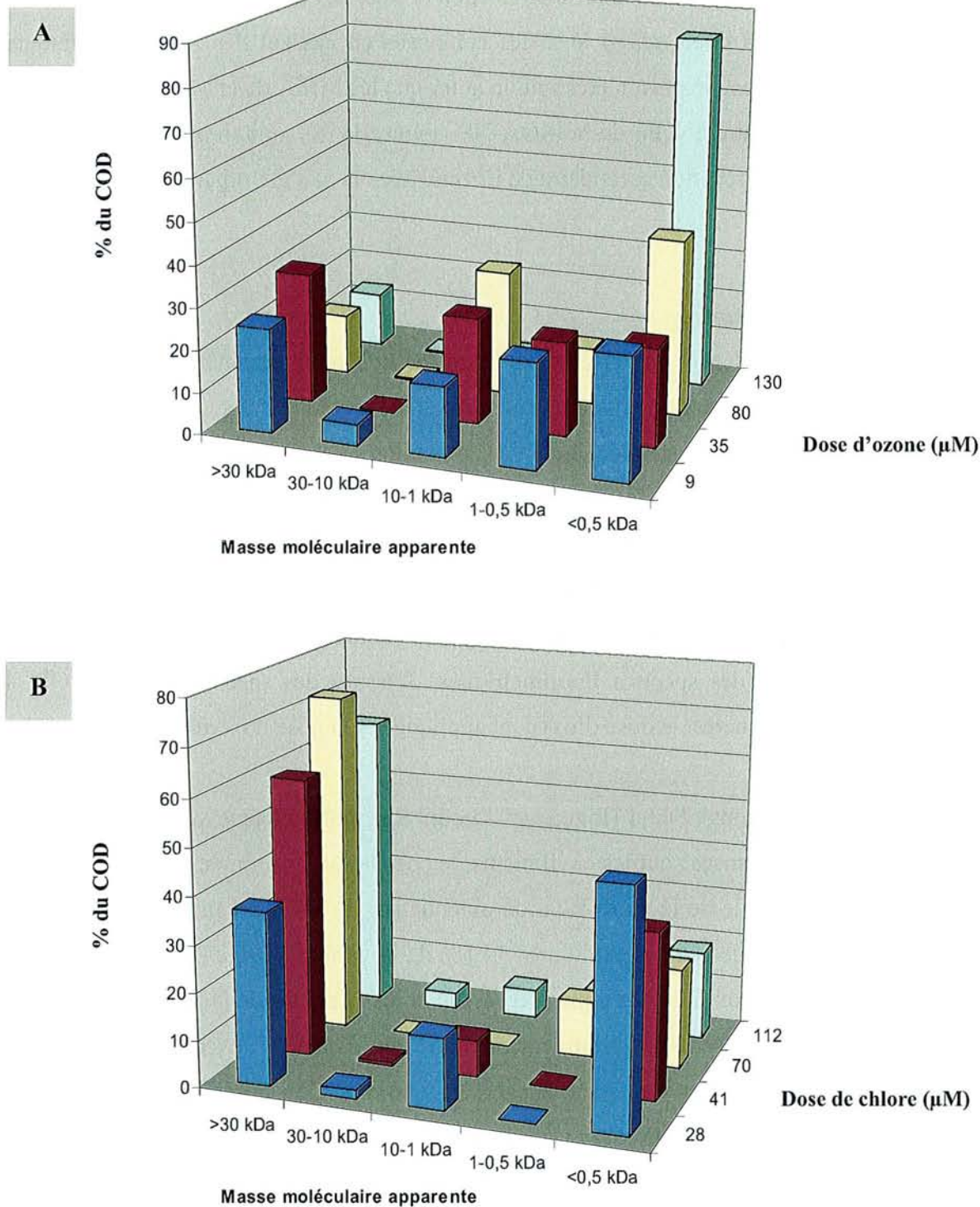


Figure IV.14. Pourcentage du COD total de la MOA-O₃ (A) et de la MOA-Cl₂ (B) en fonction des différentes fractions isolées par ultrafiltration et de la dose d'oxydant appliquée.

Alors que la diminution des MMA était attendue pour des doses d'ozone croissantes, l'augmentation des MMA dans le cas du chlore est plus surprenante. Elle suggère que lorsque la dose d'oxydant augmente, des molécules de plus en plus grosses sont relarguées (signaux confirmés par les spectres de fluorescence présentés plus loin). Nous supposons que le chlore a peu d'affinité

avec la MOA relarguée compte tenu de la forte proportion de sucres, contrairement à l'ozone qui est moins sélectif et qui a sans doute réagit avec les composés en cassant des liaisons chimiques, abaissant ainsi les MMA. Il est de plus intéressant de noter que les MMA de la MOA-Cl₂ présentent un profil relativement similaire à celui de la MOA-NS (Figure IV.5) contrairement à la MOA-O₃ (appuyant l'hypothèse d'une réaction secondaire de l'ozone avec la matière organique relarguée).

Analyse en composante principale

Afin de mettre en évidence les corrélations entre les différents paramètres analysés sur la MOA-Cl₂ et la MOA-O₃, une analyse en composante principale a été effectuée. L'avantage de cette analyse est de pouvoir représenter graphiquement et de manière globale tous les résultats obtenus, sans être obligés de traiter chaque variable mesurée l'une après l'autre. Néanmoins, ce type d'analyse statistique reste purement descriptif.

L'ACP a été réalisée à partir de 35 observations complètes (2 échantillons pour lesquels toutes les variables n'ont pas pu être mesurées ont été éliminés du traitement) et pour 10 variables de base (2 issues des spectres fluorimétriques, 3 issues des spectres UV, le COD, le CODB, la concentration en sucres, la dose d'oxydant appliquée et la dose d'oxydant consommée).

Le cercle des corrélations obtenu (Figure IV.15) fait apparaître chaque variable représentée par un point dont les coordonnées sont les coefficients de corrélation linéaire de cette variable avec chaque axe. La qualité globale de la représentation obtenue sur les deux premiers axes principaux est relativement bonne puisque ceux-ci expliquent 74,5% de la variance totale (56,3% pour l'axe 1 et 18,3% pour l'axe 2). La proximité des points représentant les variables de la périphérie du cercle de corrélation traduit une représentation relativement bonne par le plan 1-2, exceptés le SUVA₂₅₄ et la fluorescence à 424 nm qui en sont plus éloignés. La somme des carrés des coefficients de corrélation renforce ce fait (Tableau IV.6) puisqu'ils sont compris entre 71,7 et 92% pour la plupart des variables. Seules la fluorescence à 424 nm et le SUVA₂₅₄ montrent des valeurs plus faibles ($\sum r^2 = 57,1\%$ et $34,4\%$ respectivement) confirmant que ces variables ne sont pas très bien représentées par ce plan 1-2. Le cercle de corrélation (Figure IV.15) montre que toutes les variables (excepté le SUVA₂₅₄) présentent des coordonnées positives sur l'axe 1 indiquant qu'il n'existe pas d'opposition entre les variables.

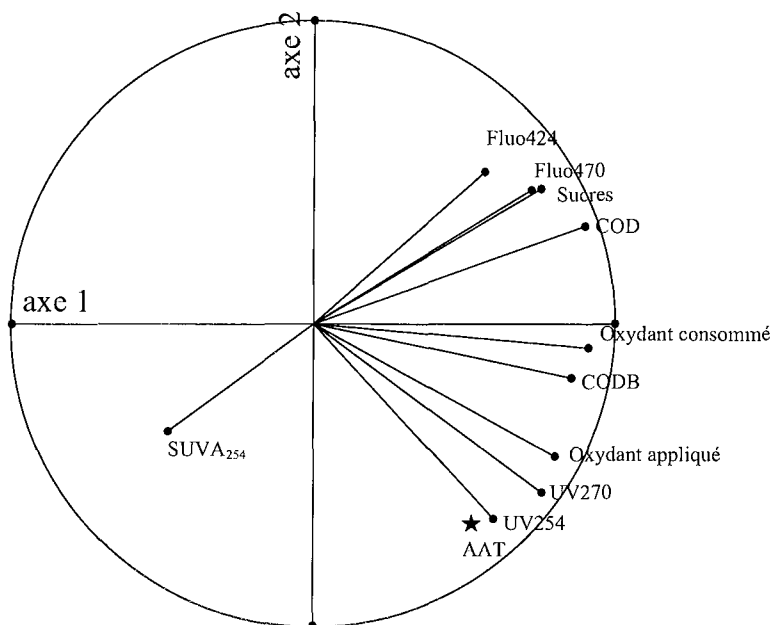


Figure IV.15. Cercle des corrélations des 10 variables de base. La variable AAT, non prise en compte dans les calculs (car non mesurée sur tous les échantillons), est représentée sur le cercle pour avoir une estimation de son positionnement par rapport aux autres variables (coordonnées approximatives obtenues si l'ACP avait pris en compte cette variable).

L'examen des corrélations entre les variables et les axes principaux permet d'estimer la part de variation des variables expliquées par l'axe. Ainsi le tableau IV.6 suggère que l'axe 1 est préférentiellement représenté par le COD (82,2%) et la concentration d'oxydant consommé (83,8%) ; l'axe 2 est principalement expliqué par l'absorbance UV à 270 nm (31,2%) et 254 nm (41,7%) bien que les variables soient relativement mal représentées par cet axe ($r^2 < 42\%$).

La proximité des points COD, fluorescence et sucres d'une part et absorbance UV et AAT d'autre part témoigne de fortes relations linéaires. Ces observations sont corroborées par l'analyse de la matrice des corrélations (Tableau IV.7). La plupart des variables sont significativement corrélées entre elles. Particulièrement, la concentration en oxydant consommé montre des corrélations significatives avec toutes les autres variables. De telles corrélations corroborent les données décrites précédemment : plus la dose d'oxydant appliqué (et donc la dose d'oxydant consommé) augmente, plus la concentration en MOA relarguée est importante. Ainsi, le COD est très fortement lié aux concentrations en sucres ($r=0,89$), en accord avec la prédominance de ces composés parmi la MOA-ox.

Tableau IV.6. Coefficient de corrélation élevé au carré des 10 variables de base avec les deux axes principaux (Σ = somme).

Variables	Coefficient de corrélation au carré (r^2)		Σr^2
	axe 1	axe 2	
COD	0,822	0,102	0,920
UV ₂₇₀	0,579	0,312	0,891
oxydant consommé	0,838	0,006	0,844
oxydant appliqué	0,648	0,194	0,842
UV ₂₅₄	0,359	0,417	0,776
CODB	0,737	0,033	0,769
Sucres	0,573	0,195	0,768
fluo ₄₇₀	0,524	0,193	0,717
fluo ₄₂₄	0,322	0,249	0,571
SUVA ₂₅₄	0,231	0,113	0,344

Tableau IV.7. Matrice des corrélations entre les 10 variables de base. Les chiffres soulignés indiquent une corrélation significative à 95% (—) et à 99% (=) (n=35 ; $\alpha_{0,05}=0,33$; $\alpha_{0,01}=0,42$).

	ox appl	ox cons	COD	sucres	fluo ₄₂₄	fluo ₄₇₀	CODB	UV ₂₅₄	UV ₂₇₀	SUVA ₂₅₄
oxydant appliqué	1									
oxydant consommé	<u>0,87</u>	1								
COD	<u>0,56</u>	<u>0,81</u>	1							
sucres	0,31	<u>0,65</u>	<u>0,89</u>	1						
fluo ₄₂₄	0,3	<u>0,43</u>	<u>0,58</u>	<u>0,52</u>	1					
fluo ₄₇₀	<u>0,36</u>	<u>0,57</u>	<u>0,73</u>	<u>0,64</u>	<u>0,78</u>	1				
CODB	<u>0,72</u>	<u>0,79</u>	<u>0,80</u>	<u>0,56</u>	0,20	<u>0,47</u>	1			
UV ₂₅₄	<u>0,65</u>	<u>0,5</u>	0,29	0,23	0,15	0,28	<u>0,53</u>	1		
UV ₂₇₀	<u>0,82</u>	<u>0,65</u>	<u>0,48</u>	<u>0,33</u>	0,2	0,32	<u>0,70</u>	<u>0,85</u>	1	
SUVA ₂₅₄	-0,26	-0,38	<u>-0,51</u>	<u>-0,48</u>	-0,19	-0,3	<u>-0,44</u>	0,09	-0,25	1

Le lien fort entre COD et CODB ($r=0,8$) est également facilement explicable, le CODB étant obtenu par différence de 2 COD. Cependant, si les relations entre le COD et le CODB sont observées pour chaque MOA-ox individuellement, il apparaît que la fraction de CODB est très stable et homogène dans le cas de la MOA-O₃ quelle que soit la quantité de COD relarguée alors qu'elle est plus hétérogène pour la MOA-Cl₂ (Figure IV.16). Ceci traduit des capacités oxydantes différentes entre les deux oxydants. Compte tenu des connaissances acquises sur l'action des deux oxydants, l'hypothèse la plus probable pour expliquer cette observation est que le COD relargué par les algues après oxydation réagit à son tour avec les oxydants durant le temps de contact fixé ; cette réaction ayant pour conséquence, dans le cas de l'ozone, de transformer des molécules réfractaires à la biodégradation en molécules biodégradables (par abaissement des MMA), contrairement au chlore. Les résultats présentés précédemment ont d'ailleurs montré que d'une part le pourcentage moyen de CODB était plus élevé dans la MOA-O₃ que dans la MOA-Cl₂ et d'autre part que les cinétiques de biodégradation étaient plus rapides.

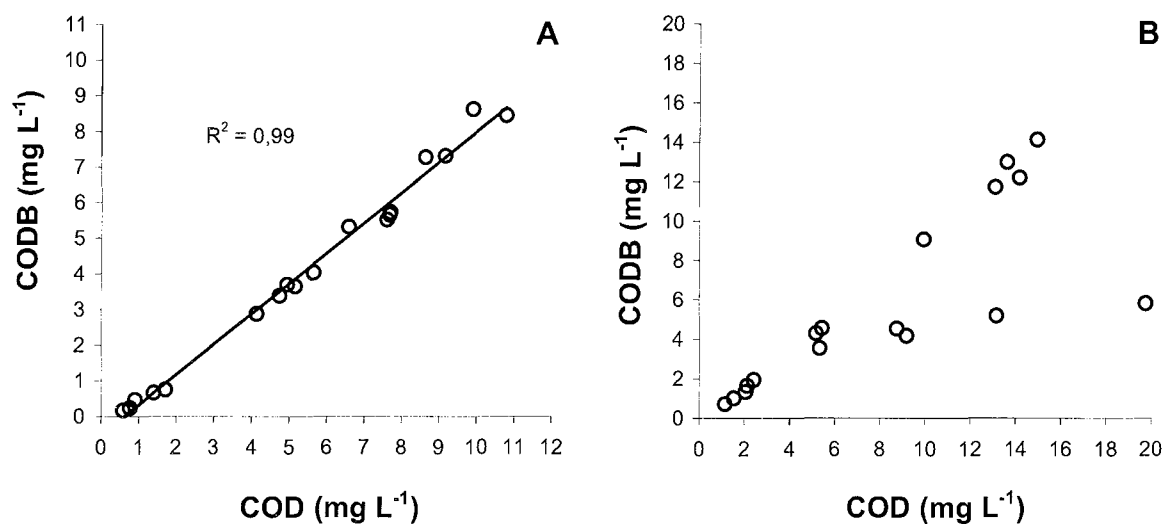


Figure IV.16. Relation entre le CODB et le COD des échantillons (A) de MOA-O₃ (n=18) et (B) de MOA-Cl₂ (n=17).

Le COD montre par ailleurs une corrélation faible ($r=0,33$) avec l'absorbance UV à 270 nm et non significative avec l'absorbance UV à 254 nm (Tableau IV.7). La faiblesse statistique de ces relations est due aux niveaux d'intensité UV mesurés qui sont supérieurs dans la MOA-O₃ que dans la MOA-Cl₂. Si on prend individuellement chaque MOA-ox, les mesures d'absorbances UV à 254 et 270 nm sont au contraire très bien corrélées au COD (Figure IV.17) : plus la quantité de COD relarguée est importante, plus l'absorbance à 254 et 270 nm est forte. L'absorbance UV est donc un bon indicateur de la quantité de COD relarguée par les cellules algales suite à l'oxydation, même si les molécules aromatiques représentent une faible fraction du COD. La proximité des points UV et AAT sur le cercle des corrélations suggère que la mesure de l'absorbance UV serait principalement associée dans nos essais à la présence d'acides aminés dans la MOA.

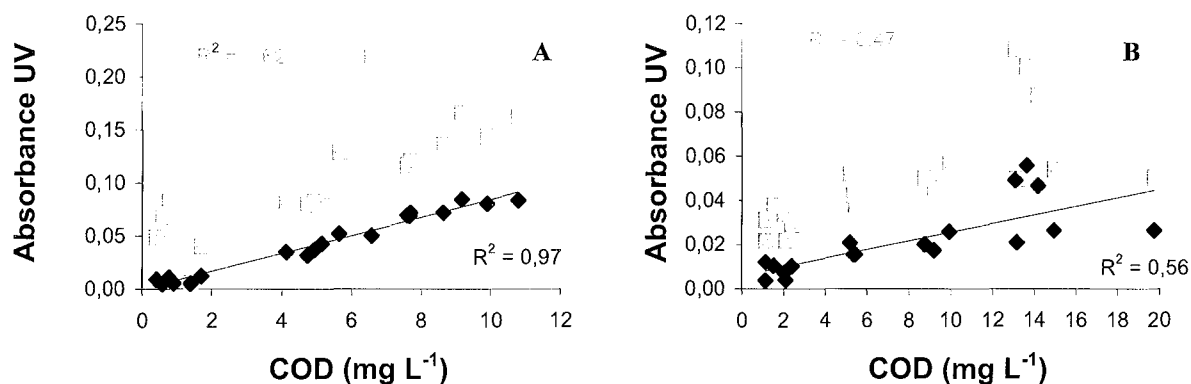


Figure IV.17. Relation entre l'absorbance UV à 254 nm (□) et 270 nm (♦) et le COD relargué par une suspension d'algues *Chlorella* ($5 \cdot 10^9$ cellules L⁻¹) exposées à une oxydation (A) à l'ozone (n=19) ou (B) au chlore (n=18).

Le COD montre également une corrélation significative avec la fluorescence à 424 et 470 nm ($r=0,58$ et $0,73$). Cette relation n'est en fait significative que dans le cas du chlore, et est illustrée à la figure IV.18. Les spectres d'émission de fluorescence (entre 390 et 600 nm pour une longueur d'onde d'excitation fixe de 370 nm) effectués sur la MOA-Cl₂ indiquent en effet une hiérarchie au niveau de l'intensité de fluorescence à 424 et 470 nm en fonction de la quantité de matière organique présente, relation non observée pour la MOA-O₃.

Ces résultats indiquent que la chloration conduit à des variations quantitatives et qualitatives de la matière organique relarguée par les cellules algales, puisque l'augmentation de l'intensité des pics reflète l'accroissement de la quantité de molécules aromatiques dans la MOA et que l'apparition d'un épaulement à des longueurs d'onde plus élevées (470 nm) indique la présence de nouveaux composés ayant un poids moléculaire plus grand. Il semblerait donc que lorsque la dose de chlore augmente, des molécules de plus gros poids moléculaires soient relarguées par les algues, phénomène déjà observé au niveau des mesures de MMA (Figure IV.14). Ce phénomène n'est pas observé dans le cas de l'ozone et n'est pas étonnant compte tenu des hypothèses déjà formulées sur l'action secondaire de l'ozone sur la MOA-O₃.

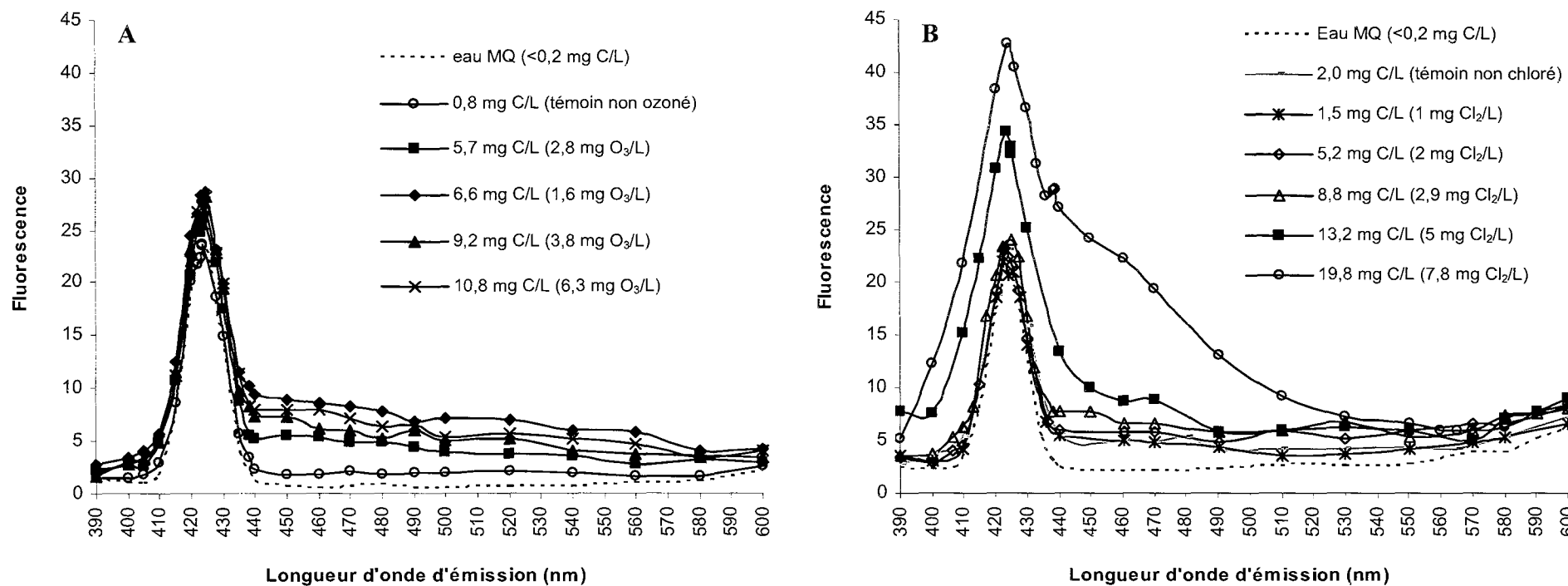


Figure IV.18. Spectres d'émission de fluorescence (390-600 nm pour une longueur d'onde d'excitation fixe de 370 nm) de l'eau milliQ, de la MOA-O₃ (A) et de la MOA-Cl₂ (B) obtenue par oxydation d'algues *Chlorella* au sein d'un même essai.

Le diagramme des individus (= chaque échantillon de MOA) dans le plan 1-2 montre que, en faisant apparaître les zones contenant les échantillons provenant (i) des algues non oxydées, (ii) des algues chlorées et (iii) des algues ozonées, il apparaît que ces trois types d'échantillons peuvent être différenciés (Figure IV.19). La MOA-Cl₂ et la MOA-O₃ sont ainsi différenciables par l'axe 2 : la MOA-Cl₂ présente des coordonnées positives sur cet axe tandis que la MOA-O₃ présente des coordonnées négatives. Ceci permet de supposer que ces deux natures de MOA se différencient par les variables représentant au mieux l'axe 2, c'est-à-dire l'absorbance UV. Compte tenu de la proximité des points représentant l'absorbance UV et les AAT sur le cercle factoriel, il est possible de déduire que la MOA issue d'une ozonation est plutôt représentée par les AAT, le CODB et l'UV tandis que la MOA issue d'une chloration est plutôt représentée par les sucres et la fluorescence. Ceci peut être rapproché des résultats décrits précédemment qui montrent que la MOA-O₃ contient moins de sucres (47%) que la MOA-Cl₂ (65%) et inversement pour les AAT (8% pour la MOA-O₃ et 2% pour la MOA-Cl₂).

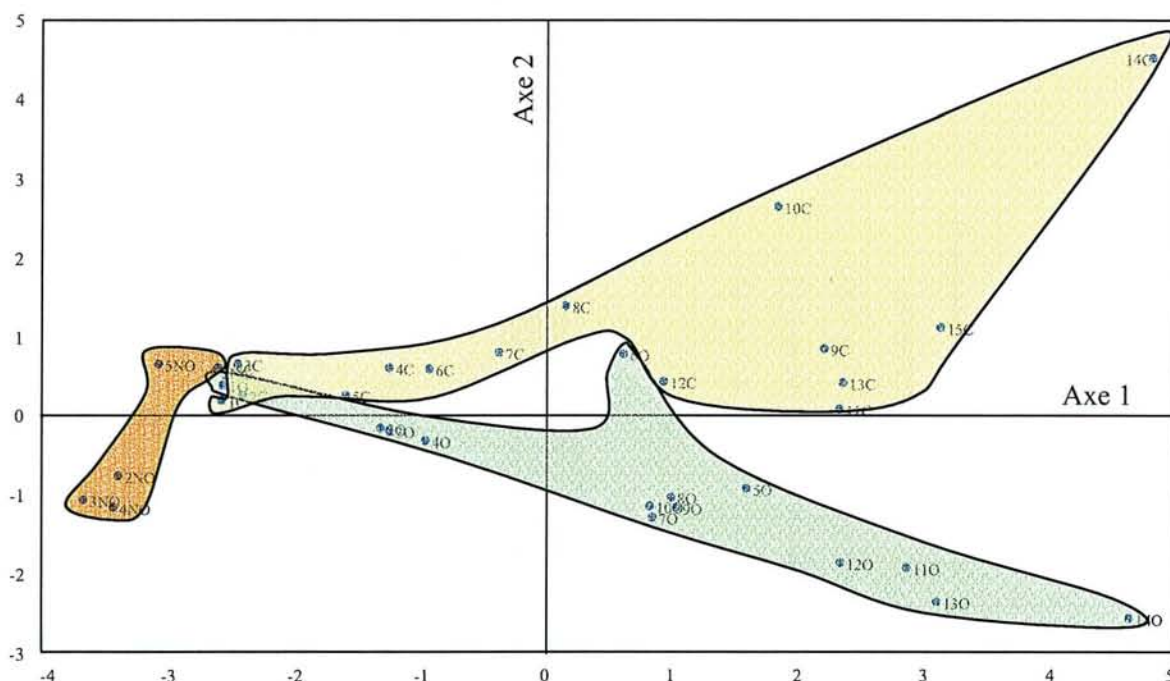


Figure IV.19. Diagramme des individus. Les individus portant la lettre « C » correspondent aux échantillons de MOA-Cl₂, ceux portant la lettre « O » aux échantillons de MOA-O₃ et ceux portant la lettre « NO » ou « NC » correspondent aux échantillons non oxydés. Plus le chiffre porté par les individus est grand plus il correspond à des échantillons fortement traités par les oxydants.

En conclusion,

- l'oxydation de cellules algales conduisant à une plasmolyse des cellules provoque un relargage de matière organique dissoute,
- Le relargage augmente avec la concentration d'algues et la dose d'oxydant (relation de type logarithmique),
- la MOA relarguée contient une forte proportion de sucres (47-65%) et de CODB (54-74%) mais peu d'acides aminés (2-8%) et de molécules aromatiques et pas de protéines,
- selon l'oxydant utilisé, les caractéristiques de la MOA sont différentes avec des composés plus biodégradables et de MMA plus faibles dans le cas de l'ozone.

IV.5. Discussion

Les résultats obtenus dans cette première phase d'étude ont permis de montrer que des cellules algales (issues du milieu naturel et mises en culture en laboratoire) sécrètent des composés organiques, que ce soit par un phénomène naturel lors de leur croissance ou que ce soit en réponse à un stress oxydant (chlore ou ozone). Dans cette partie, nous discutons tout d'abord de la nature des molécules organiques composant la MOA obtenue dans ces essais en insistant sur la comparaison des similitudes et des différences entre les trois origines de MOA (MOA-NS, MOA-Cl₂ et MOA-O₃). Dans un deuxième temps, nous discutons des modifications que provoquent les traitements d'oxydation chimique sur la MOA-NS. Enfin, nous terminons en essayant d'estimer la part de MOA pouvant être retrouvée en période de bloom algal dans l'eau de distribution.

IV.5.1. Composition des trois origines de MOA

D'un point de vue global, quelle que soit son origine, la MOA contient beaucoup de sucres, quelques acides aminés, peu de composés aromatiques et très peu voire pas de protéines (Tableau IV.8). Les MMA des composés organiques apparaissent diversifiée (de >30 à <0,5 kDa). Compte tenu de l'origine de la MOA (métabolisme et structure algale), cette composition ne paraît pas surprenante. La MOA-NS provient principalement de l'activité photosynthétique mais également de la lyse de certaines cellules au sein de la culture (culture asynchrone) (Aaronson, 1978 ; Becquevort *et al.*, 2002 ; Fogg, 1977, 1983 ; Mague *et al.*, 1989 ; Malinsky-Rushansky et Legrand, 1996 ; Sharp, 1977 ; Sundh, 1989, 1992). La MOA-ox provient quant à elle des structures algales et de la lyse des cellules suite aux atteintes membranaires (Peterson *et al.*, 1995 ; Plummer et Edzwald, 2000 ;

Sukenik *et al.*, 1987), origine suggérée par les altérations cellulaires que nous avons mises en évidence grâce à la microscopie électronique à balayage.

Tableau IV.8. Caractéristiques moyennes des trois origines de MOA (*LD=0,3 mg éq BSA L⁻¹).

	MOA-NS	MOA-Cl ₂	MOA-O ₃
% sucres	71%	65%	47%
% protéines	0,1%	<LD*	<LD*
% AAT	8%	2%	8%
% CODB	81%	54%	74%
SUVA ₂₅₄ (L mg ⁻¹ cm ⁻¹)	0,0017	0,0080	0,0184

Sur ces bases, il paraît cohérent de retrouver les molécules décrites dans la littérature comme étant sécrétées lors de la photosynthèse, ainsi que les molécules constituant les parois et le contenu intracellulaire telles que les réserves. En effet, selon la littérature, les algues sécrètent, au cours de leur croissance, des hydrates de carbone (monosaccharides et polysaccharides), des protéines, des peptides, des acides aminés, des acides organiques, des lipides... (Fogg, 1983 ; Hellebust, 1965, 1974 ; Münster et Chrost, 1990 ; Sundh, 1989, 1992). La paroi algale est composée de protéines mais surtout d'hydrates de carbone dont des acides uroniques (cellulose, pectine, mannane, xylane, galactane) (Bourrelly, 1966 ; Gayral, 1975). Les substances de réserves sont toujours composées de polysaccharides tels que des laminarines ou de l'amidon (Bourrelly, 1966 ; Gayral, 1975). Ainsi, les composés organiques identifiés dans les trois origines de MOA testées sont en accord avec ce que nous pouvions attendre compte tenu des données de la littérature. Le fort pourcentage de sucres mesuré dans la MOA (47-71%) est également en accord avec de nombreuses études qui ont montré que les hydrates de carbone, et notamment les polysaccharides extracellulaires, étaient la fraction majoritaire de la production photosynthétique (Goldman *et al.*, 1992 ; Lancelot, 1984 ; Mykkestad *et al.*, 1989 ; Mykkestad, 1977, 1995 ; Sundh, 1992). Cette composition majoritairement saccharidique est en accord avec les faibles valeurs d'absorbance UV mesurées dans les trois MOA. Par comparaison, les protéines, les peptides et les acides aminés sont connus pour représenter généralement une part beaucoup plus faible (<10%) de l'excrétion phytoplanctonique (Hellebust, 1965 ; Mague *et al.*, 1980 ; Mykkestad *et al.* 1972, 1989). Compte tenu de cette composition, il n'apparaît pas étonnant que les trois MOA étudiées présentent un fort potentiel biodégradable (CODB=54-81% du COD).

Malgré une composition globale relativement similaire entre les trois MOA (contenu aromatique, sucres, acides aminés et protéines), des différences notables ont été mises en évidence au niveau du CODB, de la fluorescence et des MMA. Les différences observées entre la MOA-NS et la MOA-ox peuvent paraître logiques puisque la MOA-NS vient a priori d'un mécanisme différent de la MOA-ox (un phénomène naturel effectué par des algues en phase de croissance contre un phénomène provoqué par un stress oxydant). Par contre, les différences existantes entre MOA-Cl₂ et MOA-O₃ sont uniquement imputables à l'action même des deux oxydants.

L'hypothèse la plus probable pour expliquer l'écart significatif entre la fraction biodégradable de la MOA-O₃ (74%) et celle de la MOA-Cl₂ (54%) est que la MOD relarguée par les algues au cours des premiers temps d'oxydation réagit à son tour avec l'oxydant pendant la durée d'ozonation (1-45 minutes) ou de chloration (45 minutes) et subit des modifications chimiques. Il est en effet clairement démontré que l'ozone rend la MOD plus biodégradable en cassant des liaisons, des cycles aromatiques..., augmentant la fraction des petits poids moléculaires, plus facilement assimilables par les bactéries (Doré, 1989 ; Miettinen *et al.*, 1998 ; Owen *et al.*, 1995 ; DeLaat *et al.*, 1991 ; Lefebvre et Croué, 1995 ; Merlet *et al.*, 1992a ; Ribas *et al.*, 1997). Cette hypothèse est confirmée par les résultats d'ultrafiltration qui ont montré que la fraction de composés de forte MMA (>30000 Da) diminuait en faveur des petites MMA (<500 Da) lorsque la dose d'ozone augmentait.

Au contraire de l'ozonation, la chloration pourrait entraîner une baisse du CODB comme le suggère Ribas *et al.* (1997) qui ont mesuré des diminutions allant de 35 à 50% ; l'hypothèse qu'ils énoncent pour expliquer ce phénomène est la présence de sous-produits de chloration pouvant stresser les bactéries utilisées comme inoculum du test CODB. Des sous-produits de chloration (THM) ont d'ailleurs été mesurés dans la MOA-Cl₂ au contraire de la MOA-O₃. Le plus faible potentiel biodégradable de la MOA-Cl₂ par rapport à la MOA-O₃ est en accord avec les MMA des composés organiques qui semblent plus élevées après chloration qu'après ozonation. L'apparition d'un épaulement à des longueurs d'onde plus élevées (470 nm) sur les spectres de fluorescence de la MOA-Cl₂ témoigne en effet de la présence de composés de plus forte MMA lorsque la dose de chlore augmente, phénomène non observé dans le cas de l'ozone. Ceci est également en accord avec les cinétiques de biodégradation qui sont beaucoup plus lentes dans la MOA-Cl₂ que la MOA-O₃ (Figure IV.20), confirmant la plus grande facilité d'assimilation par les bactéries des composés issus de l'ozonation.

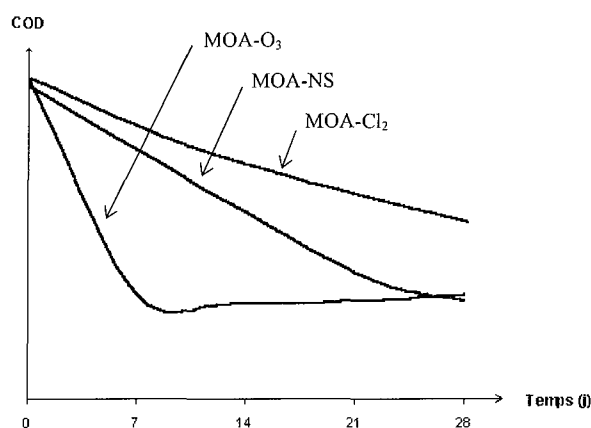


Figure IV.20. Cinétiques de biodégradation caractéristiques de la MOA-NS, MOA-O₃ et MOA-Cl₂.

Quant à la MOA-NS, même si elle présente un potentiel biodégradable plus fort (80%) que la MOA-ox, les cinétiques de biodégradation sont plus lentes (Figure IV.20) ce qui sous-entend que les composés organiques présents sont moins rapidement assimilables et nécessitent peut-être une hydrolyse enzymatique avant d'être utilisés par les bactéries (Billen et Servais, 1989 ; Münster et Chrost, 1990 ; Ogura, 1975). L'analyse des MMA confirme cette hypothèse puisque près de 80% du COD de la MOA-NS est composé par des molécules de forte MMA (>30 kDa).

Ce dernier point semble cependant en désaccord avec les données bibliographiques. En effet, la majorité des composés sécrétés par les algues durant leur croissance est plutôt décrite comme présentant des MMA < 3 kDa (Loyer *et al.*, 1985 ; Maurin *et al.*, 1997 ; Plummer et Edzwald, 2000). Pour autant, nos résultats peuvent s'expliquer par au moins trois observations :

- la MOA-NS a été récupérée alors que la culture d'algues était déjà en phase stationnaire ; or, certains auteurs ont montré que ce sont surtout des structures polysaccharidiques qui sont excrétées par les algues au cours de cette phase (but : faire des réserves pour survivre alors que les conditions deviennent défavorables) (Myklestad et Haug, 1972 ; Ramus et Robins, 1975)
- la culture d'algues n'étant pas stérile, les bactéries présentes sont susceptibles d'avoir consommé une partie des composés les plus facilement assimilables, à savoir ceux présentant de faibles masses moléculaires.
- selon les techniques de fractionnement utilisées pour déterminer la masse moléculaire de la matière organique, les résultats obtenus peuvent varier de manière importante (Alken, 1984 ; Leenher, 1981 ; Egeberg *et al.*, 2002).

IV.5.2. Effet des traitements d'oxydation sur la MOA-NS

La prolifération d'algues dans l'eau de ressource amène des composés organiques qui vont transiter dans la filière de traitement d'eau potable et donc subir des traitements physico-chimiques susceptibles d'induire des modifications de cette matrice organique. Nos travaux se sont particulièrement portés sur l'étude des changements quantitatifs et qualitatifs de la MOA-NS suite à une chloration (4,9 mg Cl₂ L⁻¹ appliqué) ou une ozonation (2,5 mg O₃ L⁻¹ transféré) après dilution de cette MOA-NS dans de l'eau de réseau déchlorée stérile de manière à atteindre une concentration en matière organique comparable à celle des eaux brutes (5 mg MOA L⁻¹).

Les résultats ont montré que l'oxydation n'affectait pas la concentration en COD de la MOA-NS. Ceci est en accord avec la littérature et n'est pas surprenant dans la mesure où l'application d'oxydant ne conduit qu'à des modifications structurales des molécules (Doré, 1989 ; Joret et Lévi, 1986). Les concentrations en sucres et CODB n'ont pas non plus montré d'évolution significative suite à l'oxydation. Par contre, la concentration en acides aminés totaux (AAT) est diminuée par l'oxydation (14 à 36 % d'abattement), ce qui est explicable par la haute réactivité des acides aminés avec les oxydants (Hureiki, 1993 ; Jadas-Hécart, 1989). Cependant, même si les concentrations globales d'AAT ont baissé, certains des acides aminés analysés (5 sur 18) ont montré une concentration plus forte après chloration. Ce phénomène, pouvant paraître surprenant dans la mesure où certains acides aminés sont détruits par l'oxydation (Hureiki *et al.*, 1994), a déjà été observé par d'autres chercheurs avec l'ozone (Dossier-Berne *et al.*, 1996 ; Jadas-Hécart, 1989), et pourrait résulter d'une décomplexation de structures complexes contenant des acides aminés, ce qui conduirait à les rendre accessibles à l'hydrolyse et donc à l'analyse.

D'après la littérature, une augmentation du CODB était attendue suite à l'ozonation : de nombreux auteurs ont en effet montré que l'ozone augmente la fraction biodégradable au dépend de la fraction réfractaire de la matière organique (6 à 60% d'augmentation selon les études) (Miettinen *et al.*, 1998 ; Ribas *et al.*, 1997 ; Lefebvre et Croué, 1995 ; Merlet *et al.*, 1992a ; Bablon *et al.*, 1987) en accroissant la proportion de molécules de faible masse moléculaire. La forte proportion de sucres dans le surnageant algal (71%) pourrait expliquer l'absence de signaux significatifs en terme de CODB puisque les hydrates de carbone sont connus pour être peu réactifs avec l'ozone (Doré, 1989). De plus, dans nos essais, la dose d'ozone transférée à l'échantillon (2,5 mg O₃ L⁻¹ correspondant à 0,4 mg O₃ / mg COD) n'est peut-être pas suffisante pour obtenir un signal significatif.

Par contre, l'oxydation a modifié la composition moléculaire de la MOA-NS puisque les spectres d'émission de fluorescence de la MOA-NS après oxydation sont différents de ceux de la MOA-NS non oxydée. En accord avec la littérature, une baisse de l'intensité de fluorescence, beaucoup plus marquée dans le cas de l'ozone, a été mesurée après oxydation suggérant une altération des cycles aromatiques (Doré, 1989 ; DeLaat *et al.*, 1991) et sans doute une diminution des masses moléculaires (Lefebvre et Croué, 1995 ; Widrig *et al.*, 1996). L'oxydation a donc agi sur les composés aromatiques déjà présents en très faibles proportions dans la MOA avant oxydation (SUVA₂₅₄ très faible). Ces signaux n'ont pas été visibles en terme d'absorbance UV, sans doute parce que la spectroscopie en fluorescence est plus sensible que l'absorbance UV (Pennanen et Mannio, 1987 ; Brun et Milburn, 1977).

IV.5.3. Estimation de la quantité de MOA retrouvée en eau traitée lors d'un bloom algal

Etant donné la forte biodégradabilité de la MOA, il paraît important d'estimer la fraction de MOA susceptible de se retrouver dans l'eau potable lors d'un bloom algal et potentiellement utilisable comme substrat par les bactéries ; en effet, ceci permettrait d'évaluer si cet apport de MOD est suffisant pour favoriser la survie bactérienne en eau de distribution.

Il est impossible de quantifier la concentration de MOA-NS retrouvée en eau traitée car de nombreux facteurs vont influencer sur ce paramètre (nature des algues présentes, nature des composés relargués, efficacité du traitement, durée du bloom...). Cependant, en faisant plusieurs hypothèses, il est possible d'estimer la quantité de MOA-ox susceptible de se retrouver dans l'eau traitée en se basant sur les résultats obtenus dans cette étude. En effet, en remplaçant ces résultats dans le contexte d'une filière de traitement d'eau potable, une simulation a été réalisée selon le scénario suivant :

- 1) L'eau brute contient 10^9 algues L^{-1} .
- 2) Une préoxydation est réalisée sur l'eau brute : pour l'ozone, la concentration maximale de COD relargué a été utilisée pour les calculs (correspondant à $9 \text{ mg O}_3 L^{-1}$ appliquée et $3,9 \text{ mg O}_3 L^{-1}$ transféré). Pour le chlore, une dose de $5 \text{ mg Cl}_2 L^{-1}$ a été utilisée.
- 3) Le relargage de COD et CODB est proportionnel à la concentration en algues.
- 4) L'abattement du COD et du CODB entre l'eau brute et l'eau traitée est de 40 et 50% respectivement, valeurs tirées d'une étude menée sur 12 mois sur la filière de Méry s/Oise (Dossier Berne *et al.*, 1996).

Dans ces conditions, le relargage de MOD par les algues apporterait de l'ordre du milligramme de COD supplémentaire en plus de ce qui existe déjà dans l'eau traitée (Tableau IV.9). Cet apport correspondrait à un ajout de matière organique biodégradable non négligeable (0,4 à 0,7 mg CODB

L⁻¹) qui pourrait tripler le CODB d'une eau de réseau et ainsi représenter un risque pour la stabilité biologique de l'eau. Ces conditions sont toutefois maximisantes du fait que l'oxydant n'a eu, dans nos essais, que les cellules algales pour réagir (pas d'autre matière organique présente) surestimant sans doute le COD relargué par les algues.

Tableau IV.9. Simulation de la quantité de MOD apportée par les algues lors d'une préoxydation en période de bloom algal.

	Apport de COD (mg L ⁻¹)	Apport de CODB (mg L ⁻¹)
Préoxydation au chlore	+1,2	+0,4
Préoxydation à l'ozone	+1,1	+0,7

En conclusion, les résultats présentés dans cette partie ont permis de montrer que des cellules algales sécrètent des composés organiques fortement biodégradables, que ce soit par un phénomène naturel lors de leur croissance ou en réponse à un stress oxydant. Une partie de ce travail fait l'objet d'une publication en cours de préparation destinée à *Water Research* sous le titre : « Characterization of dissolved organic matter by *Chlorella* algae after exposure to chlorine and ozone ».

Puisque les traitements conventionnels de potabilisation n'éliminent pas totalement la matière organique des eaux brutes, une fraction de la MOA est susceptible de se retrouver dans l'eau de distribution ; les chapitres suivants s'attachent donc à étudier l'effet de cette MOA sur les Entérobactéries en eau potable.

Chapitre V - Influence de la MOA sur le comportement d'*E. coli* dans l'eau potable en absence de bactéries autochtones

V.1.	Introduction.....	137
V.2.	<i>Escherichia coli</i> behavior in the presence of organic matter released by algae exposed to water treatment chemicals	138
V.3.	Essais complémentaires concernant l'effet de la MOA-Cl ₂ sur <i>E. coli</i>	147
	V.3.1. Objectifs.....	147
	V.3.2. Protocole expérimental	147
	V.3.3. Résultats.....	148
V.4.	Comportement d' <i>E. coli</i> en présence de MOA-NS traitée ou non par oxydation	150
	V.4.1. Protocole expérimental	150
	V.4.2. Caractéristiques initiales des échantillons	151
	V.4.3. Effet de la MOA-NS traitée ou non par oxydation sur la croissance d' <i>E. coli</i>	154
	V.4.4. Effet de la MOA-NS traitée ou non par oxydation sur la cultivabilité d' <i>E. coli</i>	156
	V.4.5. Effet de la MOA-NS traitée ou non par oxydation sur d'autres activités physiologiques d' <i>E. coli</i>	158
V.5.	Discussion.....	159

V.1. Introduction

Malgré les procédés de désinfection, des proliférations bactériennes peuvent se produire dans les réseaux de distribution d'eau potable (LeChevallier *et al.*, 1996a ; Mathieu *et al.*, 1995 ; Servais, 1996 ; Volk et Joret, 1994) démontrant que certaines populations bactériennes sont capables de s'adapter, transitoirement ou non, aux conditions oligotrophiques d'un réseau de distribution (LeChevallier, 1990 ; LeChevallier *et al.*, 1987). Ce phénomène peut toucher des bactéries recherchées en contrôle sanitaire et notamment les indicateurs de contamination fécale des eaux telles que *Escherichia coli* (LeChevallier, 1990), et provoquer des événements de non conformités.

Bien que de nombreux facteurs influencent ces phénomènes de croissance et/ou survie microbienne, la matière organique des eaux traitées, et principalement sa fraction biodégradable, joue un rôle déterminant puisqu'elle fournit une source de carbone et d'énergie nécessaire à la croissance des bactéries hétérotrophes, dont les *Enterobacteriaceae* (LeChevallier, 1990 ; LeChevallier *et al.*, 1991a ; Mathieu *et al.*, 1992 ; Servais *et al.*, 1987, Servais *et al.*, 1992a ; Volk et Joret, 1994). Des épisodes saisonniers ponctuels (bloom algal, fortes pluies...) pouvant modifier la qualité de la matière organique des eaux brutes et traitées ont été suggérés comme étant un catalyseur de la croissance bactérienne (Boualam *et al.*, 2002 ; LeChevallier *et al.*, 1990b ; Lowther et Moser, 1984). Lake *et al.* (2001) ont d'ailleurs mis en évidence un lien fort entre la fin d'un bloom algal et la présence de bactéries coliformes (dont *E. coli*) dans le système de distribution, menant à une situation incompatible avec les exigences des instances sanitaires. La présence dans l'eau traitée des produits excrétés par les algues a été suspectée comme représentant une source nutritionnelle supplémentaire expliquant la recroissance bactérienne en réseau. En effet, en plus de la capacité naturelle des algues à sécréter des composés organiques au cours de leur croissance, une arrivée massive d'algues en entrée de filière de traitement utilisant la préoxydation peut mener à une lyse des cellules algales et à un relargage d'une grande quantité de matière organique dissoute (Becquevort *et al.*, 2002 ; Peterson *et al.*, 1995 ; Plummer et Edzwald, 2000), dont une fraction risque de se retrouver en partie dans l'eau de distribution puisque les traitements conventionnels actuels de potabilisation n'éliminent pas totalement la matière organique des eaux brutes.

Dans ce contexte, cette partie a pour but d'étudier l'influence de diverses origines de matière organique algale (MOA), décrites au chapitre précédent, sur la survie d'*E. coli* (pris comme modèle d'*Enterobacteriaceae*) dans une eau de distribution. Les matières organiques dissoutes testées dans ce chapitre sont :

- la MOA relarguée par les algues *Chlorella* après chloration directe des cellules (MOA-Cl₂)
- la MOA relarguée par les algues *Chlorella* après ozonation directe des cellules (MOA-O₃)

- la MOA naturellement sécrétée par les algues *Chlorella* (MOA-NS)
- la MOA naturellement sécrétée par les algues *Chlorella* puis chlorée (MOA-NS-Cl₂)
- la MOA naturellement sécrétée par les algues *Chlorella* puis ozonée (MOA-NS-O₃)
- l'acétate, choisi comme référence facilement assimilable par les bactéries (Brenner, 1984 ; Merlet *et al.*, 1992a).

Cette étude compare donc le comportement d'*E. coli* (croissance, cultivabilité, intégrité membranaire et capacité à s'hybrider avec une sonde) inoculé dans une eau de distribution déchlorée stérile supplémentée avec ces différents substrats organiques. L'idée étant de travailler sur la nature et/ou l'origine des composés organiques, l'eau de réseau a été supplémentée de manière à ajouter +0,2 mg L⁻¹ de matière organique biodégradable (CODB) de chacune des matières organiques testées.

Dans un premier temps, le comportement d'*E. coli* en présence de MOA relarguée par des algues après oxydation directe (MOA-Cl₂, MOA-O₃) est étudié (§ V.2). Cette partie est présentée sous la forme d'une publication parue dans la revue *Applied and Environmental Microbiology* (Vol. 71, n°2, pp. 734-740) sous le titre « *Escherichia coli* behavior in the presence of organic matter released by algae exposed to water treatment chemicals ».

Dans un deuxième temps, les résultats d'un essai complémentaire expliquant le comportement d'*E. coli* en présence de MOA-Cl₂ spécifiquement sont présentés (§ V.3). Puis, l'influence de la MOA naturellement sécrétée par les algues et ayant été oxydée ou non (MOA-NS, MOA-NS-Cl₂, MOA-NS-O₃) est appréciée (§ V.4). Enfin, la dernière partie (§ V.5) consiste en une discussion générale des résultats présentés dans ce chapitre. Le matériel et les méthodes utilisées sont détaillés dans le chapitre III. Les caractéristiques détaillées de chaque MOA sont décrites au chapitre IV.

V.2. *Escherichia coli* behavior in the presence of organic matter released by algae exposed to water treatment chemicals

L'oxydation de cellules algales conduit à un relargage de matière organique dissoute dont la nature majoritairement glucidique et biodégradable (§ IV.4.) peut représenter une source de nutriments pour la croissance des bactéries hétérotrophes dont les Entérobactéries. L'objectif de cette partie est donc d'apprécier le comportement d'*E. coli* (pris comme modèle d'*Enterobacteriaceae*) mis en présence de MOA issue de l'oxydation par le chlore ou l'ozone

d'algues *Chlorella* (nommée MOA-Cl₂ et MOA-O₃ respectivement) ajoutée en petite quantité (+0,2 mg CODB L⁻¹) dans une eau de réseau déchlorée stérile. Deux essais indépendants sont présentés ci-dessous sous la forme d'une publication parue dans la revue *Applied and Environmental Microbiology* (Vol. 71, n°2, pp. 734-740) sous le titre « *Escherichia coli* behavior in the presence of organic matter released by algae exposed to water treatment chemicals ». Les caractéristiques de la MOA-Cl₂ et de la MOA-O₃ sont détaillées au chapitre précédent (§ IV.4.). Tous les résultats bruts sont détaillés en annexe X.2.1.

Escherichia coli Behavior in the Presence of Organic Matter Released by Algae Exposed to Water Treatment Chemicals

C. Bouteleux,¹ S. Saby,² D. Tozza,³ J. Cavard,⁴ V. Lahoussine,⁵ P. Hartemann,¹ and L. Mathieu^{6*}

Faculté de Médecine, Département Environnement et Santé Publique, S.E.R.E.S.,¹ and Faculté de Médecine, Département Environnement et Santé Publique, E.P.H.E.,⁶ Vandoeuvre-lès-Nancy, VEOLIA Water, Anjou Recherche, Maisons-Laffitte,² Compagnie Générale des Eaux³ and Agence de l'Eau Seine Normandie,⁵ Nanterre, and Syndicat des Eaux D'Ile de France, Paris,⁴ France

Received 23 April 2004/Accepted 2 September 2004

When exposed to oxidation, algae release dissolved organic matter with significant carbohydrate (52%) and biodegradable (55 to 74%) fractions. This study examined whether algal organic matter (AOM) added in drinking water can compromise water biological stability by supporting bacterial survival. *Escherichia coli* (1.3×10^5 cells ml⁻¹) was inoculated in sterile dechlorinated tap water supplemented with various qualities of organic substrate, such as the organic matter coming from chlorinated algae, ozonated algae, and acetate (model molecule) to add 0.2 ± 0.1 mg of biodegradable dissolved organic carbon (BDOC) liter⁻¹. Despite equivalent levels of BDOC, *E. coli* behavior depended on the source of the added organic matter. The addition of AOM from chlorinated algae led to an *E. coli* growth equivalent to that in nonsupplemented tap water; the addition of AOM from ozonated algae allowed a 4- to 12-fold increase in *E. coli* proliferation compared to nonsupplemented tap water. Under our experimental conditions, 0.1 mg of algal BDOC was sufficient to support *E. coli* growth, whereas the 0.7 mg of BDOC liter⁻¹ initially present in drinking water and an additional 0.2 mg of BDOC acetate liter⁻¹ were not sufficient. Better maintenance of *E. coli* cultivability was also observed when AOM was added; cultivability was even increased after addition of AOM from ozonated algae. AOM, likely to be present in treatment plants during algal blooms, and thus potentially in the treated water may compromise water biological stability.

In spite of the disinfection processes, bacterial proliferation can be observed in drinking water distribution network systems (20, 26, 37, 42) proving that certain bacterial populations are able to adapt, transiently or permanently, to the oligotrophic conditions of distribution networks (16, 17). This phenomenon has been described for fecal indicators such as coliform bacteria, particularly *Escherichia coli* (16), and poses the problem of compliance with water quality health regulations.

Although multiple factors certainly affect microbial growth phenomena, organic matter in treated waters, mainly the biodegradable fraction, has a determining effect since it provides a carbon and energy source essential to the growth of heterotrophic bacteria, including coliforms (16, 19, 25, 38, 39, 42). Atypical events (algal bloom, swelling, rainfall, etc.) capable of modifying the quality of the organic matter in raw and treated waters have been suggested to be a catalyst for coliform growth (3, 18, 23). Lake et al. (15) showed that there is a strong link between the end of the algal bloom and the presence of coliforms in the distribution system, leading to a situation incompatible with health standards. Algal products in the treated water were suspected of providing a good nutritional source for bacterial regrowth in the distribution system. In addition to the natural capacity of algae to secrete organic compounds, massive contamination at the inlet of a treatment plant using preoxidation can lead to algal cell lysis and release of large quantities of dissolved organic matter (33, 34).

Working in this context, the present paper aims to underscore the influence of specifically algal organic matter (AOM) on the survival and/or the growth of *E. coli* in tap water. This study thus compares the effects of various substrates (dissolved organic matter released by chlorinated or ozonated algae and acetate) on the behavior of *E. coli* in sterile drinking water supplied with low but equivalent amounts (0.2 ± 0.1 mg liter⁻¹) of biodegradable dissolved organic carbon (BDOC). The results should enable us to determine whether addition of AOM in drinking water, likely to be present during algal blooms in a treatment plant using preoxidation, can induce a biological imbalance capable of supporting survival of bacteria of sanitary interest (*E. coli*), which indicates a potential health hazard in the water distribution network.

MATERIALS AND METHODS

Production of AOM. (i) Algal culture. Algae were recovered from 2 liters of river water (Moselle River, France) by filtration through a 2- μ m-pore-size polycarbonate membrane (Millipore, Ltd., Watford, United Kingdom), followed by membrane desorption by sonication in 10 ml of mineral growth medium [for 1 liter of milliQ water: 40 mg of Ca(NO₃)₂ · 4H₂O, 100 mg of KNO₃, 30 mg of MgSO₄ · 7H₂O, 40 mg of K₂HPO₄, 15 μ g of CuSO₄ · 5H₂O, 30 μ g of (NH₄)₆Mo₇O₂₄ · 4H₂O, 30 μ g of ZnSO₄ · 7H₂O, 30 μ g of CoCl₂ · 6H₂O, 30 μ g of Mn(NO₃)₂ · 4H₂O, 30 μ g of C₆H₈O₇ · H₂O, 30 μ g of H₃BO₃, 812.5 μ g of C₆H₅FeO₇ · 5H₂O, 312.5 μ g of FeSO₄ · 7H₂O, and 312.5 μ g of FeCl₃ · 6H₂O]. The algal suspension was inoculated in the mineral medium to reach a final concentration of 10⁷ algae liter⁻¹. The culture was rotated at 35 rpm at 25 $\pm$ 2°C in a 16-h-light–8-h-dark cycle (5,000 lx) and aerated by CO₂-air (2%) bubbling. These conditions led to the selection of a green algae (*Chlorella*), which composed >99% of the culture when oxidation experiments were done.

(ii) Oxidation of algae. The algal culture, in stationary growth phase, was washed twice by centrifugation (10 min, 2,000 $\times$ g) in sterile distilled water. The pellet was resuspended in order to obtain around 5×10^9 algae liter⁻¹. This algal suspension (pH = 6.03 $\pm$ 0.47) was either chlorinated (7.8 $\pm$ 0.1 mg of Cl₂ liter⁻¹ applied) or ozonated (5.3 mg of O₃ liter⁻¹ applied). These concentrations of

* Corresponding author. Mailing address: Département Environnement et Santé Publique, E.P.H.E., Faculté de Médecine, 9 av. de la Forêt de Haye, BP184, 54505 Vandoeuvre-lès-Nancy, France. Phone: 33-(0)3-83-68-34-86. Fax: 33-(0)3-83-68-34-89. E-mail: laurence.mathieu@medecine.uhp-nancy.fr.

oxidant were determined in preliminary assays and corresponded to the maximum DOC concentrations released by algae. Batch chlorination was carried out, without shaking, in darkness at $22 \pm 2^\circ\text{C}$ with a diluted commercial solution of sodium hypochlorite. Ozonation was carried out in a semicontinuous system at $22 \pm 2^\circ\text{C}$. Ozone was produced with a Trailgaz ozone generator (Laboratory LO) by using pure oxygen. The gas flow ($\text{O}_3 + \text{O}_2$) was fixed at 10 liters h^{-1} . After 45 min of contact for chlorine and 15 min for ozone, the oxidant residuals were neutralized with sodium thiosulfate. The organic matter released by algae (i.e., the AOM) was recovered by filtration on $0.2\text{-}\mu\text{m}$ -pore-size membrane (Whatman, Clifton, N.J.), characterized (DOC, BDOC, sugars, and proteins), and named AOM- Cl_2 and AOM- O_3 for organic matter after algal chlorination and ozonation, respectively. Chlorine and ozone concentrations were determined by DPD colorimetric and iodometric methods, respectively (1).

Bacterial inoculum. An *E. coli* strain isolated from a drinking water was used. For each assay, the strain was grown on CASO nutritive medium (Merck) for 24 h at $37 \pm 1^\circ\text{C}$. A suspension ($\sim 10^9$ cells ml^{-1}) was prepared in sterile tap water without chlorine ($0.2\text{-}\mu\text{m}$ -pore-size filtration and autoclave at 121°C during 15 min), and bacteria were washed by centrifugation (10 min, $10,000 \times g$) in sterile tap water and incubated for 24 h at $22 \pm 2^\circ\text{C}$ in order to acclimatize them to the dechlorinated tap water. The suspension was then washed two additional times by centrifugation.

Bacterial counts. Culturable *E. coli* were determined by the plate count technique. Samples and appropriate 10-fold dilutions were filtered, in duplicate, through 47-mm -diameter, $0.45\text{-}\mu\text{m}$ -pore-size acetate membranes (Millipore Corp., Bedford, Mass.). Membranes were incubated on TTC-Tergitol 7 lactose medium (Merck) at $37 \pm 1^\circ\text{C}$, and colonies were counted after 24 h. The results are expressed in CFU per milliliter.

Total numbers of bacteria and cells with membrane integrity were determined with Live/Dead BacLight kit (Molecular Probes catalog no. L7012). This kit is based on the use of two nucleic acid stains: syto9 penetrates inside cells with both intact or damaged membranes, staining the cells green, whereas propidium iodide penetrates cells with damaged membranes, staining the cells red. The staining protocol was carried out as previously described (4). Briefly, the stains (0.17 mM syto9 and 1 mM propidium iodide) were added to 1 ml of sample, followed by incubation in the dark for 15 min. The sample was then filtered through a 25-mm -diameter, $0.2\text{-}\mu\text{m}$ -pore-size black polycarbonate membrane (Millipore), and the filter was mounted in BacLight mounting oil. The observation was made with an epifluorescence microscope (BX40; Olympus) equipped with a $\times 100$ immersion objective lens, a 470- to 490-nm excitation filter, and a 520-nm barrier filter. The total number of marked cells (green or red fluorescence) corresponded to the total number of bacteria in the sample. Only the cells with green fluorescence were counted as bacteria with membrane integrity (i.e., viable). Ten to twenty microscopic fields were counted, depending on cell concentration, to arrive at a count of at least 600 cells for each sample. Two replicates were made for each sample. The detection limit was 1.4×10^3 cells ml^{-1} .

For fluorescence in situ hybridization (FISH), ENT1 probe ($5'\text{-CCGCTTGC TCTCGCAG-3'}$), labeled with Cy3 at the $5'$ end and specific for *Enterobacteriaceae* 16S rRNA, was used to detect *E. coli* (22). The FISH protocol was adapted from that of Manz et al. (24). Each sample (1 to 10 ml) was filtered through a 25-mm -diameter, $0.2\text{-}\mu\text{m}$ -pore-size white polycarbonate membrane (Millipore) and was fixed with 3.7% (vol/vol) formaldehyde for 30 min. The sample was washed twice with phosphate-buffered saline ($\text{pH } 7.4$), air dried, and dehydrated with 2 ml of increasing concentrations of ethanol (50 , 80 , and 95% , 3 min each). Then, $50 \mu\text{l}$ of hybridization solution (20% formamide, 0.9 M NaCl, 0.1% sodium dodecyl sulfate, 20 mM Tris-HCl [$\text{pH } 7.2$]) containing 50 ng of the labeled probe was applied to the filter, and a coverslip was put on the filter to limit evaporation during hybridization. Hybridization was performed for 2 h at $46 \pm 1^\circ\text{C}$ in a moisture chamber. The filter was then washed twice for 15 min in 30 ml of 46°C preheated wash solution (215 mM NaCl, 0.1% sodium dodecyl sulfate, 20 mM Tris-HCl [$\text{pH } 7.2$]), air dried, and mounted on a slide with AF87 antifading reagent (Citifluor, Ltd., London, United Kingdom). Hybridized cells were visualized by epifluorescence microscopy with a 510- to 550-nm excitation filter and a 590-nm barrier filter. The concentration of bacteria was calculated by using the method described above. Two replicates were made for each sample. The detection limit was 1.4×10^2 cells ml^{-1} for 10 ml of sample analyzed. The quality of the hybridization procedure was checked systematically by using species known to hybridize (or not) with the ENT1 probe.

Characterization of dissolved organic matter. All glassware used for organic matter analyses was treated at 550°C for 4 h in order to remove residual organic matter.

DOC levels were measured with a TOC-Meter (O.I. Corp. Model 700 TOC analyzer calibrated with a potassium phthalate solution at $5 \text{ mg of C liter}^{-1}$) after filtration of the sample (40 ml) through a $0.45\text{-}\mu\text{m}$ -pore-size polyvinylidene difluoride membrane (Millipore). Inorganic carbon was eliminated by phospho-

ric acid and by nitrogen bubbling. CO_2 formed was measured by infrared detection. The results are expressed in $\text{mg of C liter}^{-1}$. The detection and sensitivity limits were 0.1 and $0.05 \text{ mg liter}^{-1}$, respectively. Values were expressed as the mean of three measurements.

BDOC levels were determined as described by Servais et al. (38). A 300-ml sample was sterilized by filtration through a $0.2\text{-}\mu\text{m}$ -pore-size polyvinylidene difluoride membrane (Millipore). Portions (6 ml) of a biodiversified inoculum (i.e., river water filtered through a $2\text{-}\mu\text{m}$ -pore-size membrane in order to eliminate large particles and protozoa) were added to the sample. Incubation occurred in the dark at $22 \pm 2^\circ\text{C}$ for 28 days, during which DOC was measured weekly. BDOC was calculated as the difference between initial DOC and minimum DOC measured during incubation. Controls were carried out in order to verify bacterial inoculum activity (acetate plus inoculum). The detection limit was $0.1 \text{ mg liter}^{-1}$.

Sugar concentrations were determined by the phenol-sulfuric acid method as described by Dubois et al. (12) with glucose as the standard. Absorbance was measured at a wavelength of 490 nm by using a UVIKON spectrophotometer. The detection limit was 1 mg liter^{-1} . The measurements were done in triplicate. Since the precise chemical formula of the carbohydrates detected was unknown, the percentage of DOC represented by sugars was estimating by assuming that carbon accounts for 40% of the molecule (value derived of the formula of glucose, $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$).

Protein concentrations were measured with a NanoOrange Kit (Molecular Probes), with a Hitachi F4500 spectrofluorimeter, and with bovine serum albumin as the standard. The detection limit was $0.3 \text{ mg liter}^{-1}$. The measurements were done in triplicate.

Experimental procedure. To determine whether the addition of AOM in drinking water can support *E. coli* survival, the organic matter released by *Chlorella* algae after chlorination (AOM- Cl_2) or after ozonation (AOM- O_3) was diluted in sterile dechlorinated drinking water in order to supplement the drinking water with $0.2 \pm 0.1 \text{ mg of BDOC liter}^{-1}$ coming from AOM (the volume of AOM added was not sufficient to produce a dilution effect; i.e., the dilution rate was $<4\%$). A model of easily biodegradable organic matter, sodium acetate solution, was also prepared in drinking water in the same conditions. A blank containing only the sterile dechlorinated drinking water was prepared in parallel. Each sample was then inoculated with the *E. coli* suspension to reach a final concentration of $(1.3 \times 10^5) \pm (2.1 \times 10^4)$ cells ml^{-1} and incubated at $22 \pm 2^\circ\text{C}$ without shaking in darkness. Changes in the numbers of total *E. coli*, cultivable *E. coli*, hybridized *E. coli* (FISH), *E. coli* with membrane integrity, and DOC concentrations were recorded over a period of 11 days. Two assays were carried out in the presence of AOM coming from chlorinated algae (AOM- Cl_2) and three assays were carried out in the presence of AOM coming from ozonated algae (AOM- O_3).

RESULTS

Characterization of dissolved organic matter released by algae after oxidation. *Chlorella* algae were suspended in sterile distilled water in order to obtain a concentration representative of an algal bloom (5×10^9 algae liter^{-1}). The DOC concentration of the algal suspension was initially $1.1 \pm 0.5 \text{ mg liter}^{-1}$. This algal suspension was then oxidized, either by chlorine ($7.8 \text{ mg of Cl}_2 \text{ liter}^{-1}$ applied) or by ozone ($5.3 \text{ mg of O}_3 \text{ liter}^{-1}$ applied). Oxidation of algal cells led to a massive release of organic matter (Table 1): on the average, 7.7 and $16.3 \text{ mg of DOC liter}^{-1}$ after ozonation and chlorination, respectively. This mixture of organic molecules did not contain measurable protein ($<0.3 \text{ mg liter}^{-1}$), but there was a strong proportion of carbohydrate molecules (52% of DOC) and biodegradable compounds. The BDOC fraction differed depending on the oxidant used: 74% BDOC after ozonation and 55% after chlorination. These results suggest that either the algae released different compounds when exposed to different oxidants or the organic matter released by the algae underwent structural modifications when reacting with the oxidant.

***E. coli* behavior in the presence of AOM.** (i) **Initial characteristics of the samples.** The initial characteristics of each tested solution are presented in Table 2. The DOC concentrations of the drinking water (dilution water) varied from 1.2 to

TABLE 1. Concentrations of DOC, BDOC, proteins, and sugars in the dissolved organic matter released by the ozonated algae or chlorinated algae^a

Dissolved organic matter	DOC (mg liter ⁻¹)	BDOC		Proteins (mg eq of BSA liter ⁻¹)	Sugars	
		mg liter ⁻¹	% DOC		mg eq of Glc liter ⁻¹	% DOC
Released by ozonated algae	7.7 (0.1)	5.6 (0.1)	74	<DL	9.9 (0.8)	52
Released by chlorinated algae	16.3 (3.0)	8.6 (3.9)	55	<DL	21.1 (6.6)	52

^a Three experiments were averaged, and the numbers in parentheses are standard deviations. BSA, bovine serum albumin; Glc, glucose. DL (detection limit) = 0.3 mg eq of bovine serum albumin per liter.

1.8 mg liter⁻¹, of which 31 to 49% were biodegradable. The C/N/P ratios show that the nutritive element limiting bacterial growth in the drinking water was carbon (assuming C/N/P = 100/10/1). The weak additions of dissolved organic matter (acetate or AOM) in the sterile dechlorinated drinking water led to organic matter concentrations equivalent to the values classically measured in distribution networks (1.21 to 2.04 mg of DOC liter⁻¹). The BDOC of the drinking water was increased, as expected, from 0.1 to 0.3 mg liter⁻¹ for the AOM and up to 0.5 mg liter⁻¹ for acetate (Table 2). The total BDOC concentration of the tested solutions has thus fluctuated from 0.4 to 1.2 mg liter⁻¹. However, in spite of these additions, carbon remained the limiting element for growth compared to nitrogen and phosphorus. *E. coli* inoculated in these different qualities of organic matter was able to biodegrade from 0.1 to 0.4 mg liter⁻¹ of the DOC (14 to 43% of the total BDOC).

(ii) **Effect of AOM on *E. coli* growth.** Microscopic counts of total numbers of cells revealed more or less pronounced growth of *E. coli* in all samples (Fig. 1). For nonsupplemented drinking water samples, growth of *E. coli* during the 11 days was negligible [from $(1.4 \times 10^5) \pm (1.8 \times 10^4)$ to $(1.8 \times 10^5) \pm (2.9 \times 10^4)$ cells ml⁻¹] in spite of the presence of 0.4 to 0.7 mg of BDOC liter⁻¹ and a DOC consumption by *E. coli* that reached 0.2 mg liter⁻¹ in some samples (Table 2). This growth corresponded to an average cellular production of 0.1 log (Fig. 2).

The addition of the tested organic matter (0.1 to 0.5 mg of BDOC liter⁻¹) led to different effects according to the origin and/or nature of the organic molecules (Fig. 2). Drinking water supplemented with acetate or with AOM-Cl₂ did not support the growth of *E. coli* under our experimental conditions. On

average, the production of *E. coli* was similar to that measured in nonsupplemented drinking water (0.1 log).

In contrast, addition of AOM-O₃ to drinking water allowed significant growth of *E. coli*, corresponding well with the amount of DOC consumed (Table 2). Higher *E. coli* counts were detectable after 48 h of incubation with AOM-O₃; the growth curve stabilized from 4 to 7 days (Fig. 1). *E. coli* cell production was 4 to 12 times higher than observed in non-supplemented drinking water, with higher levels of added AOM-O₃ yielding greater *E. coli* proliferation (Fig. 1). *E. coli* counts increased 3-, 14-, and 26-fold for additions of 0.1, 0.2, and 0.3 mg of BDOC liter⁻¹, respectively.

In our experimental conditions, AOM-O₃ appeared to be a favored substrate for *E. coli* growth: 0.1 mg of algal BDOC liter⁻¹ was sufficient to support *E. coli* growth, whereas the 0.7 mg of BDOC liter⁻¹ initially present in drinking water and an additional 0.2 mg of BDOC acetate liter⁻¹ (selected as a compound easily assimilated by bacteria) were not sufficient.

(iii) **Effect of AOM on *E. coli* cultivability.** Bacterial cultivability was estimated by the number of *E. coli* able to grow on selective TTC-Tergitol lactose medium. Among the total *E. coli* population, on average $(5.6 \times 10^4) \pm (1.2 \times 10^4)$ cells ml⁻¹ were initially cultivable (31 to 61% of the total cells). As described in many studies, drinking water was an unfavorable environment for *E. coli* survival: the number of cultivable *E. coli* organisms decreased steadily with incubation time in the two experiments, even when DOC was consumed (Fig. 3). This decrease of cultivability was three to four times faster in experiment A, perhaps because of the higher pH (8.3 and 7.7 for experiments A and B, respectively). The slope of the decreasing curve for experiment A was -7×10^2 CFU h⁻¹, leading to

TABLE 2. Initial characteristics of sterile dechlorinated drinking water samples (supplemented or not with acetate or AOM)^a

Expt	pH	Initial DOC (mg liter ⁻¹)	Total BDOC (mg liter ⁻¹)	Added BDOC (mg liter ⁻¹)	C/N/P ratio	Consumed DOC by <i>E. coli</i> (mg liter ⁻¹)
A						
Drinking water	8.3	1.21	0.4	0	100/377/2	<DL
Acetate	8.3	1.71	0.9	0.5	100/123/1	<DL
AOM-Cl ₂ -1	8.3	1.29	0.5	0.1	100/250/2	<DL
AOM-Cl ₂ -2	8.3	1.55	0.7	0.3	100/151/1	0.1
B						
Drinking water (n = 2)	7.7 (0.1)	1.61 (0.28)	0.7 (0.3)	0	100/122/5	0.2 (0.02)
Acetate	7.7	1.61	0.7	0.2	100/131/5	0.3
AOM-O ₃ -1	7.6	1.85	0.9	0.1	100/154/4	0.3
AOM-O ₃ -2	7.7	1.90	1.1	0.2	100/81/5	0.4
AOM-O ₃ -3	7.6	2.04	1.2	0.3	100/65/6	0.4

^a Added BDOC corresponds solely to the BDOC brought by the addition of the tested organic matter (acetate and AOM). AOM-Cl₂, organic matter released by chlorinated algae; AOM-O₃, organic matter released by ozonated algae. Numbers in parentheses represent the standard deviations of two experiments. Consumed DOC = DOC_{day 11} - DOC_{day 0}. Total BDOC = BDOC_{tested organic matter} + BDOC_{drinking water}. DL (detection limit) = 0.1 mg liter⁻¹.

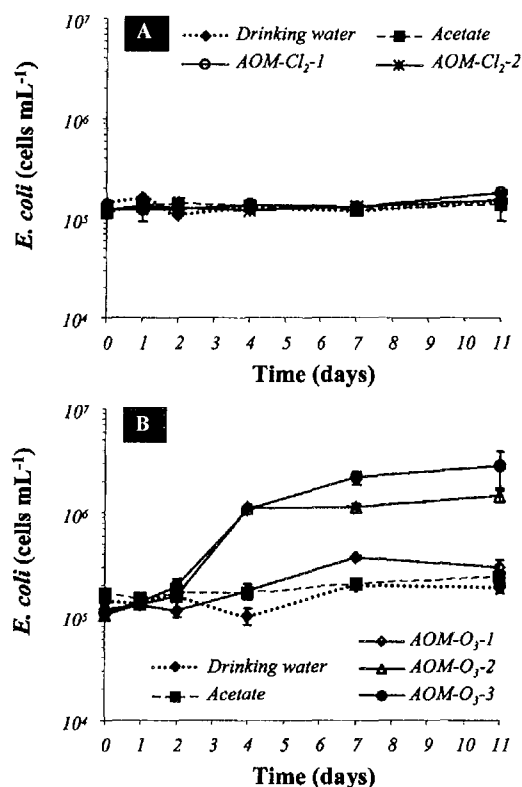


FIG. 1. Total number of *E. coli* measured by microscopic counting in the sterile dechlorinated drinking water samples (supplemented or not with acetate or AOM) during the 11 days of incubation in experiment A (test with AOM-Cl₂) (A) and in experiment B (test with AOM-O₃) (B). AOM-Cl₂, organic matter released by chlorinated algae; AOM-O₃, organic matter released by ozonated algae. DOC and BDOC concentrations of each sample are presented in Table 2.

a total disappearance (<1 CFU ml⁻¹) of the 7×10^4 CFU ml⁻¹ initially present in less than 7 days. In experiment B, 7×10^2 CFU ml⁻¹ were still detected after 11 days (the slope of the decreasing curve was -2×10^2 CFU h⁻¹).

Adding acetate to the drinking water (0.2 to 0.5 mg of BDOC liter⁻¹) did not support the survival of *E. coli* because the kinetic pattern of lost *E. coli* cultivability was the same as with nonsupplemented drinking water: the slopes of the decreasing curves were -6.5×10^2 CFU h⁻¹ in experiment A and -2×10^2 CFU h⁻¹ in experiment B.

The addition of organic matter coming from chlorinated algae (AOM-Cl₂) yielded a particular two-phase *E. coli* cultivability curve (Fig. 3A). During the first 48 to 96 h, compounds coming from chlorinated algae were unfavorable for *E. coli* survival. The number of CFU strongly declined (-4.4 log, on average), and the curve exhibited a 2.4-fold faster decline than in nonsupplemented dechlorinated drinking water, suggesting a toxic or an inhibiting effect of AOM-Cl₂. However, after 96 h of incubation, a fraction of the *E. coli* population was able to adapt to the experimental conditions since the number of cultivable *E. coli* increased gradually until the end of the experiment ($+1.8$ log), a phenomenon only observed when the added organic matter came from chlorinated algae. This disclosed ei-

ther nonmeasurable growth (below cell count sensitivity threshold) or renewed cultivability not observed with organic matter coming from other sources.

The organic matter released by ozonated algae (AOM-O₃) supported *E. coli* cultivability since the *E. coli* count (CFU) increased over the 11-day experiment (Fig. 3B). This increase, which ran parallel with the growth, was measurable from 24 to 48 h. The rise in *E. coli* cultivability was more significant for higher levels of added AOM-O₃: for additions of 0.1, 0.2, and 0.3 mg of BDOC liter⁻¹, the numbers of cultivable *E. coli* increased 4-, 12- and 21-fold, respectively. After 7 days of incubation, the cultivable *E. coli* cell count remained stable at ca. 1.5×10^5 CFU ml⁻¹, irrespective of the AOM-O₃ concentration.

(iv) Effect of AOM on other physiological activities of *E. coli*. The quantity of hybridized *E. coli* cells (as determined by FISH) and their membrane integrity (as determined by the BacLight method) were also screened during the assays. In the presence of AOM-O₃, the number of hybridized *E. coli* cells increased in parallel with increases in total number of cells (growth), cultivable cells (5- to 18-fold increase depending on the initial DOC concentration), and cells with membrane integrity (3- to 43-fold increase) (Table 3). At the end of incubation, on the average, FISH thus detected 52% of *E. coli* versus 51% at the beginning of the experiment. An increase of the fraction of cells with intact membrane was observed (80% versus 54% at the beginning of the experiment), suggesting the organic matter released by ozonated algae had a favorable effect on the physiological state of *E. coli*. In contrast, although *E. coli* cultivability decreased in nonsupplemented drinking water and in acetate- and AOM-Cl₂-supplemented drinking water, *E. coli* membrane integrity (BacLight kit) appeared to be unaffected since the number of viable *E. coli* organisms remained constant during the 11-day experiment and never represented less than 81% of the total *E. coli* population (Table 3). Similarly, the number of *E. coli* hybridized with the fluorescent probe (FISH) remained stable during the entire incubation period (Table 3), indicating that the number of rRNAs was sufficient to allow observation.

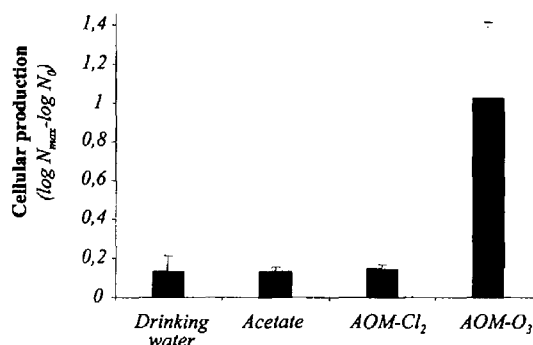


FIG. 2. Quantity of *E. coli* cells produced in 11 days of incubation in the different organic matters (acetate or AOM) added or not to drinking water. Cellular production values were calculated with the total number of *E. coli* cells determined by epifluorescence counting and are expressed in log values (i.e., $\log N_{\max} - \log N_0$). The bars correspond to the minimal and maximal values obtained for the various tests. AOM-Cl₂, organic matter released by chlorinated algae; AOM-O₃, organic matter released by ozonated algae.

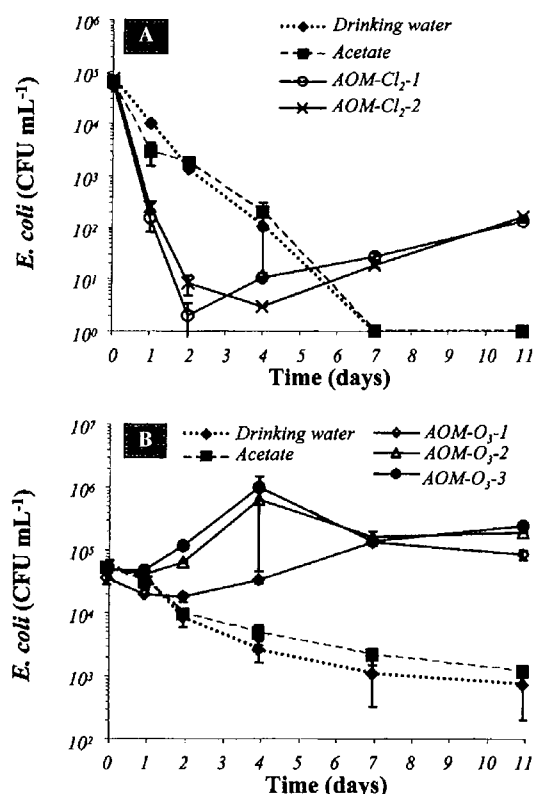


FIG. 3. Concentrations of cultivable *E. coli* in the sterile dechlorinated drinking water samples (supplemented or not with acetate or AOM) during the 11 days of incubation in experiment A (test with AOM-Cl₂) (A) and in experiment B (test with AOM-O₃) (B). AOM-Cl₂, organic matter released by chlorinated algae; AOM-O₃, organic matter released by ozonated algae. DOC and BDOC concentrations of each sample are presented in Table 2.

DISCUSSION

The AOM tested in this study was recovered after oxidation of an algal monoculture of the *Chlorophyceae* *Chlorella*. This AOM resulting from an alteration of the algal cell (plasmolysis observed by electronic microscopy [data not shown]) (33, 34) can thus come from the wall, from the intracellular contents, or from both. This AOM can be considered representative of the various compounds that could be released by any algae because the composition and the metabolism of the algal cells are relatively similar among the various groups of algae, especially in the *Chlorophyceae* group (5, 13). Indeed, because of their metabolism (photosynthesis), algae produce large quantities of organic compounds, such as monosaccharides and polysaccharides, uronic acids, peptides, and amino acids (32, 40, 41), that are likely to be released during oxidation. The reserve substances are always composed of polysaccharides-glucanes (glucose polymers) belonging to the family of starches or laminarines. Moreover, the algal wall is largely composed of carbohydrates (cellulose, pectin, mannane, xylane, galactane, etc.) whatever the species (5, 13). This also explains why this AOM released by *Chlorella* algae exposed to oxidation is

mainly composed of carbohydrates (52%) and not of proteins (<0.3 mg of equivalent bovine serum albumin liter⁻¹).

Our results showed that the addition of AOM into dechlorinated drinking water (0.2 ± 0.1 mg of added BDOC liter⁻¹) enhanced *E. coli* growth, cultivability, or both. This suggests that *E. coli* can use this AOM as a substrate. However, different *E. coli* behaviors were observed when AOM, at an equivalent level of added BDOC, came from two different origins: AOM-Cl₂ or AOM-O₃.

The AOM-Cl₂ did not support growth of *E. coli* but caused a decline followed by a renewal of its cultivability after 2 to 4 days of incubation. As reported by Boualam et al. (3) and Ribas et al. (35), the decline of *E. coli* cultivability can be explained either by the excretion of bacterial inhibitors (antibiotics) by algae in parallel with AOM (29) or by the presence of chlorination by-products in the AOM that could be stressful for the *E. coli* population. A weak concentration of THM (trihalomethane) was measured in the AOM-Cl₂ (4.8 ± 1.4 µg of THM liter⁻¹ for 5 mg of Cl₂ liter⁻¹) (data not shown). However, from the fourth day of incubation, the number of cultivable *E. coli* increased again. This renewal of cultivability showed that a fraction of the *E. coli* population was able to adapt to the AOM-Cl₂ conditions. This phenomenon could correspond either to nonvisible growth in terms of total bacteria (sensitivity threshold too low) or to cultivability renewal, with some noncultivable bacteria (injured bacteria in phase of repair or dormant bacteria) becoming cultivable again when favorable conditions reappeared (14, 27, 31).

In contrast, the AOM-O₃ enhanced the growth and cultivability of *E. coli*. The much more favorable effect of the AOM-O₃ is in agreement with the action of ozone, which renders organic matter more biodegradable by breaking chemical bonds, aromatic cycles, etc. (10, 11, 21, 28, 30, 35). It is indeed highly probable that the compounds released by *Chlorella* algae are high-molecular-weight biopolymers (polysaccharides such as cellulose, pectin, etc.) issuing from the algal wall (2, 9), and they can thus probably be degraded into smaller units by reaction with ozone. This is reflected in the results by a better biodegradation of compounds released after ozonation, which are more easily and especially more quickly assimilated by bacteria. It takes only 14 days to biodegrade the biodegradable fraction of the AOM-O₃ (74% of DOC), whereas it takes 28 days to biodegrade the biodegradable fraction of the AOM-Cl₂ (55% of DOC) (data not shown).

The AOM has a more favorable effect on *E. coli* than sodium

TABLE 3. Percentage of hybridized *E. coli* (with ENT1probe) and viable *E. coli* (membrane integrity) in the total population just after inoculation (day 0) and after 11 days of incubation (day 11)^a

Medium (n)	% Hybridized cells (SD)		% Viable cells (SD)	
	Day 0	Day 11	Day 0	Day 11
Drinking water (3)	41 (6)	46 (9)	83 (16)	81 (15)
Acetate (2)	45 (17)	42 (7)	92 (10)	98 (26)
AOM-Cl ₂ (2)	57 (7)	44 (10)	100 (0)	89 (4)
AOM-O ₃ (3)	51 (13)	52 (35)	54 (4)	80 (25)

^a Two or three experiments were averaged; the numbers in parentheses are the standard deviations. AOM-Cl₂, organic matter released by chlorinated algae; AOM-O₃, organic matter released by ozonated algae. n, number of experiments.

acetate, which is, however, known to be very easily biodegradable (6, 28). In contrast to acetate, the AOM tested in the present study corresponds to a mixture of undoubtedly very diversified organic compounds, of which ca. 50% are identified as sugars. In addition to carbon, nitrogen, and phosphorous (present in all batch reactors), other nutritive elements, such as growth factors (vitamins, amino acids, siderophores, trace elements, and organic cofactors) could be brought by the AOM and facilitate the survival of heterotrophic bacteria, including *E. coli* (7, 8, 16, 29, 33). This could possibly explain why AOM had such a positive effect compared to acetate and would suggest that an element necessary for *E. coli* growth was probably missing in batch reactor containing the dechlorinated drinking water supplemented with acetate.

Lastly, although BDOC is classically used to estimate biological stability of water (16, 25, 26, 37, 42), our results showed that measuring BDOC concentration is not sufficient to predict the behavior of *E. coli* in drinking water. It is not the quantity of biodegradable compounds but rather their quality that controls bacterial behavior. Qualitative assay of BDOC (and not simply detection of an amount exceeding a critical threshold) appears to be necessary to evaluate the nutritive status of water, especially during seasonal events such as algal blooms that can strongly modify the nature of the organic matter. This approach, in which microbial growth is the determining factor rather than a quantity of organic compounds, has been previously used to determine the potential of growth of coliforms in drinking water by Rice et al. in 1991 (36).

These findings emphasize the important effect of the nature of the AOM on the behavior of *E. coli* in drinking water conveying specific organic compounds, of which an undefined part is likely to pass through the treatment process, particularly the oxidation steps. The compounds released by the *Chlorella* algae after exposure to water treatment chemicals (chlorine or ozone) thus constitute a favorable substrate for *E. coli*. Our results clearly showed that drinking water conveying a small quantity of AOM (0.1 to 0.3 mg of BDOC liter⁻¹) could support *E. coli* growth or allow better maintenance of *E. coli* cultivability. Because water treatment processes do not fully remove the organic matrix, the presence of AOM generated during treatment, and thus potentially present in treated water, is likely to represent a risk for the microbiological stability of water.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was carried out as part of a research program coordinated by the Centre International de l'Eau de Nancy (NanCIE, Nancy, France). It was funded by Compagnie Générale des Eaux (CGE, Nanterre, France), Agence de l'Eau Seine-Normandie (AESN, Nanterre, France), Anjou-Recherche (Veolia Water, Maisons-Laffitte, France), Syndicat des Eaux d'Ile de France (SEDIF, Paris, France), and the Communauté Urbaine du Grand Nancy (CUGN, Nancy, France).

REFERENCES

- American Public Health Association. 1998. Standard methods for the examination of water and wastewater, 20th ed. American Public Health Association, Washington D.C.
- Becquevort, S., T. Bouvier, C. Lancelot, G. Cauwet, G. Deliat, V. N. Egorov, and V. N. Popovichev. 2002. The seasonal modulation of organic matter utilization by bacteria in the Danube-Black sea mixing zone. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 54:337-354.
- Boualam, M., L. Mathieu, S. Fass, J. Cavard, and D. Gatel. 2002. Relationship between coliform culturability and organic matter in low nutritive waters. *Water Res.* 36:2618-2626.
- Boulos, L., M. Prévost, B. Barbeau, J. Coallier, and R. Desjardins. 1999. LIVE/DEAD® BacLight™: application of a new rapid staining method for direct enumeration of viable and total bacteria in drinking water. *J. Microbiol. Methods* 37:77-86.
- Bourrelly, P. 1966. Les algues d'eau douce: initiation à la systématique, vol. 1-1. N. Boubée, Paris, France.
- Brenner, J. D. 1984. Family I: *Enterobacteriaceae*, p. 408-516. In N. R. Krieg and J. G. Holt (ed.), *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol. 1. The Williams & Wilkins Co., Baltimore, Md.
- Cabridenc, R. 1995. Les algues: un réactif biologique particulièrement intéressant. *Techniques Sciences et Méthodes* 1:17-19.
- Camper, A. 1994. Coliform regrowth and biofilm accumulation in drinking water systems: a review, p. 91-105. In G. G. Geesey, Z. Lewandowski, and H.-C. Flemming (ed.), *Biofouling and biocorrosion in industrial water systems*. Lewis Publishers, Boca Raton, Fla.
- Couté, A. 1995. Diversité chez les microalgues. *Techniques Sciences et Méthodes* 1:20-21.
- DeLaat, J., M. Doré, and J. Mallevialle. 1991. Influence d'une préozonation sur l'adsorbabilité et la biodégradabilité des substances humiques d'origine aquatique et sur les performances des filtres de charbon actif en grain. *Water Res.* 25:151-164.
- Doré, M. 1989. *Chimie des oxydants et traitement des eaux*. Lavoisier, Paris, France.
- Dubois, M., K. A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers, and F. Smith. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28:350-356.
- Gayral, P. 1975. Les algues: morphologie, cytologie, reproduction, écologie. Doin, Paris, France.
- Kell, D. B., and M. Young. 2000. Bacterial dormancy and culturability: the role of autocrine growth factors. *Curr. Opin. Microbiol.* 3:238-243.
- Lake, R., S. Driver, and S. Ewington. 2001. The role of algae in causing coliform problems within the distribution system, p. 153. *Proceedings of the Second World Water Congress*. International Water Association, Berlin, Germany.
- LeChevallier, M. W. 1990. Coliform regrowth in drinking water: a review. *J. Am. Water Works Assoc.* 82:74-86.
- LeChevallier, M. W., T. M. Babcock, and R. G. Lee. 1987. Examination and characterization of distribution system biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* 53:2714-2724.
- LeChevallier, M. W., B. H. Olson, and G. A. Gordon. 1990. Assessing and controlling bacterial regrowth in distribution systems. *American Water Works Association*, Denver, Colo.
- LeChevallier, M. W., W. Schulz, and L. G. Ramon. 1991. Bacterial nutrients in drinking water. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:857-862.
- LeChevallier, M. W., N. J. Welch, and D. B. Smith. 1996. Full-scale studies of factors related to coliform regrowth in drinking water. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:2201-2211.
- Lefebvre, E., and J. P. Croué. 1995. Modification de la matière organique lors des traitements conventionnels de potabilisation. *Rev. Sci. Eau* 8:463-479.
- Loge, F. J., R. W. Emerick, D. E. Thompson, C. N. Douglas, and J. L. Darby. 1999. Development of a fluorescent 16S rRNA oligonucleotide probe specific to the family *Enterobacteriaceae*. *Water Environ. Res.* 71:75-83.
- Lowther, E. D., and R. H. Moser. 1984. Detecting and eliminating coliform regrowth. In *Proceedings of the Water Quality Technology Conference*. American Water Works Association, Denver, Colo.
- Manz, W., R. Amann, R. Szewzyk, U. Szewzyk, T. A. Stenström, P. Hutzler, and K. H. Schleifer. 1995. In situ identification of *Legionellaceae* using 16S rRNA-targeted probes and confocal laser scanning microscopy. *Microbiology* 141:29-39.
- Mathieu, L., J. L. Paquin, J. C. Block, G. Randon, J. Maillard, and D. Reasoner. 1992. Paramètres gouvernant la prolifération bactérienne dans les réseaux de distribution. *Rev. Sci. Eau* 5:91-112.
- Mathieu, L., J. C. Block, M. Prévost, A. Maul, and R. De Bishop. 1995. Biological stability of drinking water in the city of Metz distribution system. *J. Water SRT-Aqua* 44:230-239.
- McDougald, D., S. A. Rice, D. Weichert, and S. Kjelleberg. 1998. Nonculturable: adaptation or debilitation? *FEMS Microbiol. Ecol.* 25:1-9.
- Merlet, N., N. Karpel Vel Leitner, and M. Doré. 1992. Incidence de quelques étapes de traitement sur l'évolution du CODB d'eaux à potabiliser et de molécules modèles. *Sci. Tech. Eau* 25:17-22.
- Metting, B., and J. W. Pyne. 1986. Biologically active compounds from microalgae. *Enzyme Microb. Tech.* 8:386-394.
- Miettinen, I. T., T. Vartiainen, and P. J. Martikainen. 1998. Microbial growth in drinking waters treated with ozone, ozone/hydrogen peroxide or chlorine. *Ozone-Sci. Eng.* 20:303-315.
- Montfort, P., and B. Baleux. 1999. Bactéries viables noncultivables: réalités et conséquences. *Bull. Soc. Fr. Microbiol.* 14:201-207.
- Moore, B. G., and R. G. Tisher. 1964. Extracellular polysaccharides of algae: effect on life-support system. *Science* 145:586-587.
- Peterson, H. G., S. E. Hrudey, I. A. Cantin, T. R. Perley, and S. L. Kenefick. 1995. Physiological toxicity, cell membrane damage, and the release of dis-

- solved organic carbon and geosmin by *Aphanizomenon flos-aquae* after exposure to water treatment chemicals. *Water Res.* 9:1515–1523.
34. Plummer, J. D., and J. K. Edzwald. 2000. Impacts of ozone on coagulation of algal-laden waters. In *Proceedings of the Water Quality Technology Conference*. American Water Works Association, Salt Lake City, Utah.
35. Ribas, F., J. Frias, J. M. Huguet, and F. Lucena. 1997. Efficiency of various water treatment in the removal of biodegradable and refractory organic matter. *Water Res.* 31:639–649.
36. Rice, E. W., P. V. Scarpino, D. J. Reasoner, G. S. Logsdon, and D. K. Wild. 1991. Correlation of coliform growth response with other water quality parameters. *J. Am. Water Works Assoc.* 83:98–102.
37. Servais, P. 1996. Rôle du chlore et de la matière organique biodégradable dans le contrôle de la croissance bactérienne en réseau de distribution de l'eau potable. *Tribune Eau* 96:3–12.
38. Servais, P., G. Billen, and M. C. Hascoet. 1987. Determination of the biodegradable fraction of dissolved organic matter in waters. *Water Res.* 21: 445–450.
39. Servais, P., G. Billen, P. Bouillot, and M. Benezet. 1992. A pilot study of biological GAC filtration in drinking water. *Aqua* 41:163–168.
40. Sundh, I. 1989. Characterization of phytoplankton extracellular products (PDOC) and their subsequent uptake by heterotrophic organisms in a mesotrophic forest lake. *J. Plankton Res.* 11:463–486.
41. Sundh, I. 1992. Biochemical composition of dissolved organic carbon derived from phytoplankton and used by heterotrophic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 58:2938–2947.
42. Volk, C., and J. C. Joret. 1994. Paramètres prédictifs de l'apparition des coliformes dans les réseaux de distribution d'eau d'alimentation. *Sci. Eau* 7: 131–152.

V.3. Essais complémentaires concernant l'effet de la MOA-Cl₂ sur *E. coli*

V.3.1. Objectifs

Dans la section précédente, nous avons montré que l'ajout de MOA-Cl₂ dans une eau de réseau déchlorée stérile ne permettait pas de croissance significative d'*E. coli* mais provoquait une évolution particulière de sa cultivabilité en deux phases (Figure 3A, publication AEM) :

- une première phase (0-4 j) où l'ajout de MOA-Cl₂ est défavorable à la survie d'*E. coli* puisqu'une diminution drastique des concentrations en *E. coli* cultivables, plus rapide que dans l'eau non supplémentée, est observée, suggérant un effet toxique ou inhibiteur de la MOA-Cl₂ ;
- une deuxième phase (4-11 j) où une fraction de la population d'*E. coli* est capable de s'adapter aux conditions expérimentales puisque le nombre d'*E. coli* cultivables augmente à nouveau progressivement jusqu'à la fin de l'expérience, phénomène non observé dans les autres milieux testés.

Pour comprendre si le regain de cultivabilité observé est dû soit à une adaptation de la souche d'*E. coli* aux conditions environnantes (hypothèse 1), soit à une disparition d'un élément « toxique » ou inhibiteur après 4 jours d'incubation de la MOA-Cl₂ à 22°C (hypothèse 2), un essai complémentaire a été réalisé. Le protocole expérimental détaillé et les résultats de cet essai sont présentés dans les paragraphes suivants.

V.3.2. Protocole expérimental

De l'eau du réseau de Nancy a été prélevée au robinet du laboratoire, déchlorée par agitation pendant 18-24 h à température ambiante (20-25°C) et neutralisation du résiduel par ajout de thioisulfate de sodium, puis stérilisée par filtration sur 0,2 µm et autoclavage (20 min., 121°C). Le pH de l'eau après autoclavage (8,3) est neutralisée par ajout de HCl 1N stérile. Cette eau de réseau déchlorée stérile (ER) a ensuite été supplémentée avec de la MOA-Cl₂ (stérile) de manière à augmenter le CODB de l'ER de +0,2 mg CODB L⁻¹. A ce stade, le pH, la conductivité, le COD et le CODB ont été mesurés puis ce milieu a ensuite étéensemencé par une suspension d'*E. coli* puis incubé à 22±2°C sans agitation, à l'obscurité pendant 11 jours. Durant cette période, l'évolution du nombre d'*E. coli* cultivables sur gélose sélective (TTC-tergitol) a été suivie. Des dénombrements bactériens ont été réalisés ponctuellement sur gélose non sélective (PCA) afin de contrôler qu'aucune contamination n'est intervenue durant l'expérience.

Pour pouvoir répondre à l'objectif fixé, quatre situations différentes ont été testées en parallèle (correspondant à 4 flacons différents) :

- ↳ Situation 1 : ER+MOA-Cl₂ préparée extemporanément + *E. coli* préparé extemporanément (démarche expérimentale identique à celle du chapitre V.2).
- ↳ Situation 2 : ER+MOA-Cl₂ « vieillie » + *E. coli* préparé extemporanément.
- ↳ Situation 3 : ER+MOA-Cl₂ « vieillie » + *E. coli* « adapté ».
- ↳ Situation 4 : ER+MOA-Cl₂ préparée extemporanément + *E. coli* « adapté ».

La préparation extemporanée de la population d'*E. coli* est décrite au chapitre III (§ III.5). La population d'*E. coli* « adaptée » correspond à la population d'*E. coli* mis au contact de la MOA-Cl₂ pendant 11 jours et récupérée par centrifugation (2 fois 10 minutes à 10000 g, lavage dans ER) dans le flacon correspondant à la situation 1. L'étude du comportement de cette population « adaptée » dans la MOA-Cl₂ a pour but de tester si le regain de cultivabilité observé est dû à l'adaptation d'une fraction de la population d'*E. coli* (hypothèse 1). L'ER+MOA-Cl₂ « vieillie » signifie qu'elle a été stockée pendant 11 jours (22°C, obscurité) avant d'êtreensemencée par la population d'*E. coli* (pendant ces 11 jours, le flacon a été agité et ouvert régulièrement pour simuler les gestes effectués lors de la situation 1). Ce milieu est testé pour savoir si l'hypothèse de la disparition d'un élément « toxique » au cours de l'incubation (hypothèse 2) peut être vérifiée.

V.3.2. Résultats

Caractéristiques initiales des 4 situations testées

Dans les quatre situations testées, les caractéristiques physico-chimiques sont relativement similaires (Tableau V.1) : le pH et la conductivité ont varié de 7,06 à 7,13 et de 277 à 285 $\mu\text{S cm}^{-1}$. Le COD a fluctué de 1,3 à 1,4 mg L^{-1} . L'objectif théorique de travailler à CODB équivalent dans tous les flacons a été respecté (en moyenne 0,2 mg CODB L^{-1} ajouté). Juste après inoculation par *E. coli* ($t=0$), les concentrations en *E. coli* cultivables mesurées lors des situations 1 et 2 étaient bien supérieures à celles des situations 3 et 4. Ces résultats s'expliquent par la démarche expérimentale utilisée : lors des situations 3 et 4, la souche d'*E. coli* utilisée pour ensemencer les flacons est celle qui a été récupérée en fin de situation 1 (*E. coli* « adapté »), or, le nombre d'*E. coli* cultivables à ce stade n'était que de $5,7 \cdot 10^3 \text{ UFC mL}^{-1}$; de plus, l'étape de centrifugation effectuée pour récupérer la population d'*E. coli* a également conduit à une perte de cellules.

Sur la période de 11 jours, aucune biodégradation mesurable du COD n'a été mesurée quelle que soit la situation testée ($<0,1 \text{ mg C L}^{-1}$).

Tableau V.1. Caractéristiques physico-chimiques (juste avant inoculation d'*E. coli*) et microbiologiques (juste après inoculation d'*E. coli*) initiales des quatre flacons correspondant aux quatre situations testées. LD = 0,1 mg COD L⁻¹.

Paramètres mesurés	Situation 1	Situation 2	Situation 3	Situation 4
pH	7,06	7,11	7,09	7,13
Conductivité (μS cm ⁻¹)	280	277	285	281
COD (mg L ⁻¹)	1,41	1,37	1,45	1,32
COD consommé par <i>E. coli</i> en 11 j (mg L ⁻¹)	<LD	<LD	<LD	<LD
CODB (mg L ⁻¹)	0,18	0,15	0,21	0,16
<i>E. coli</i> cultivables (UFC mL ⁻¹)	9,5 10 ⁴	7,6 10 ⁴	8,4 10 ²	7,7 10 ²

Evolution de la cultivabilité d'*E. coli*

Les résultats de cet essai, présentés à la figure V.1, confirment que la cultivabilité d'*E. coli* mis en présence d'eau de réseau supplémentée en MOA-Cl₂ (situation 1) chute sur les premiers jours d'incubation (2,3 log en 4 jours) puis réaugmente jusqu'à la fin de l'expérience.

Lorsque la MOA-Cl₂ a été incubée pendant 11 jours à 22°C avant d'inoculer *E. coli* (situation 2), le profil est similaire avec cependant une décroissance des UFC moins importante (0,7 log en 2 jours) suggérant que l'effet inhibiteur de la MOA-Cl₂ diminue avec son « vieillissement ».

La situation 4 démontre que la population d'*E. coli* récupérée en fin de situation 1 (à t11j) est adaptée à la MOA-Cl₂ : en effet, lorsque celle-ci est réinoculée dans la même MOA, sa cultivabilité ne chute plus durant les premiers jours mais au contraire augmente (0,6 log en 11 jours).

Enfin la situation 3 menant aux mêmes résultats que la situation 4, ceci confirme l'adaptation de la population d'*E. coli* à la MOA-Cl₂, que celle-ci ait été « vieillie » ou non.

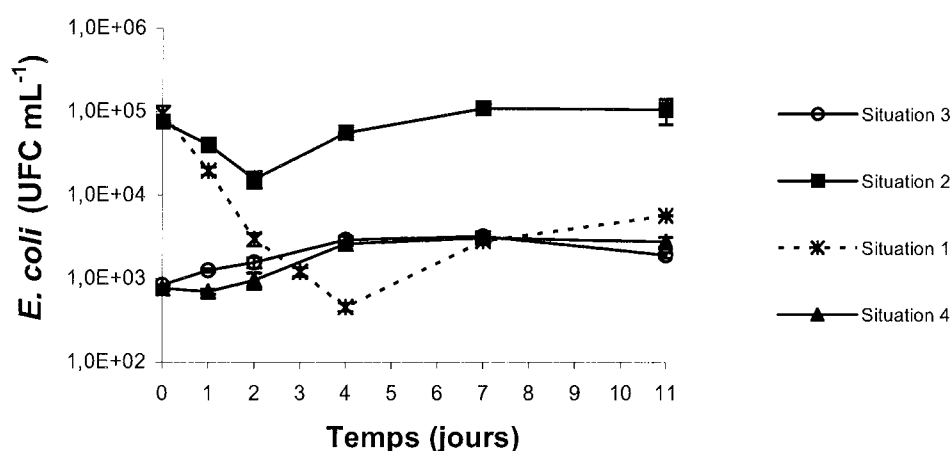


Figure V.1. Evolution de la cultivabilité d'*E. coli* dans les différents milieux testés. Situation 1=ER+MOA préparée extemporanément + *E. coli* préparé extemporanément. Situation 2=ER+MOA « vieillie » + *E. coli* préparé extemporanément. Situation 3=ER+MOA « vieillie » + *E. coli* « adapté ». Situation 4=ER+MOA préparée extemporanément + *E. coli* « adapté ». Les barres d'erreurs représentent l'écart type sur la moyenne de 2 mesures.

Les résultats de cette étude permettent ainsi de conforter l'idée de la présence, dans la MOA-Cl₂, d'un élément inhibiteur de la cultivabilité d'*E. coli* durant les premiers jours d'incubation (situation 1). Par ailleurs, ces résultats permettent également d'appuyer l'hypothèse selon laquelle une fraction de la population d'*E. coli* s'est adaptée à la MOA-Cl₂ (hypothèse 1). Cependant, en comparant les résultats des situations 1 et 2, l'hypothèse 2 (disparition de l'élément toxique au cours de l'incubation) ne peut pas être complètement écartée mais semble jouer un rôle moins important que l'adaptation de la population.

V.4. Comportement d'*E. coli* en présence de MOA-NS traitée ou non par oxydation

Dans cette partie nous étudions l'effet d'un ajout de MOA dissoute issue de la sécrétion naturelle des algues (MOA-NS) dans une eau de réseau, sur le comportement d'*E. coli*. La nature de la MOA-NS dans les eaux brutes étant susceptible d'être modifiée par les traitements d'oxydation lorsque celle-ci passe par la filière de potabilisation, cette partie s'attache donc également à étudier si la MOA-NS ayant subi une oxydation au chlore (MOA-NS-Cl₂) ou à l'ozone (MOA-NS-O₃) a le même effet sur le comportement d'*E. coli* que la MOA-NS non traitée. Les résultats de 3 essais indépendants sont présentés ci-dessous ; l'effet de la MOA-NS oxydée a été apprécié uniquement dans un des trois essais (n°1). Tous les résultats bruts sont détaillés en annexe X.2.2. Les caractéristiques détaillées des différentes MOA sont décrites au chapitre précédent (§ IV).

V.4.1. Protocole expérimental

De l'eau du réseau de Nancy a été prélevée au robinet du laboratoire puis déchlorée par agitation pendant 18-24 h à température ambiante (20-25°C) et neutralisation du chlore résiduel par ajout de thiosulfate de sodium. Elle a ensuite été stérilisée par filtration sur 0,2 µm et par autoclavage (20 min., 121°C). Le pH étant augmenté par l'autoclavage, il a été neutralisé à l'aide de HCl 1N stérile de manière à le ramener vers 7,5. L'eau de réseau stérile déchlorée est alors répartie dans des flacons en verre traités à 550°C (§ III.1) puis différentes natures de MOD stériles sont alors ajoutées dans les flacons de façon à augmenter le CODB de l'eau de réseau de 0,2 mg L⁻¹. Les différentes natures de MOD testées dans cette partie sont :

- la MOA-NS non traitée (cf § IV.2.) (n=4)
- la MOA-NS chlorée (cf § IV.3.) (n=2)
- la MOA-NS ozonée (cf § IV.3.) (n=2)

- l'acétate de sodium (n=3)

L'acétate est utilisé comme témoin de MOD facilement assimilable par les bactéries. Un flacon contenant uniquement l'eau de réseau stérile déchlorée (ER) est également effectué en parallèle pour chaque essai (n=4). A ce stade, l'azote et le phosphore total, ainsi que le CODB sont mesurés afin de pouvoir estimer le facteur limitant la croissance bactérienne (ratio C/N/P).

Les flacons sont ensuiteensemencés avec une suspension d'*E. coli* (t_0), préparée comme décrit au § III.5., à raison d'environ 10^5 cellules mL^{-1} en concentration finale puis ils sont incubés à $22\pm 2^\circ\text{C}$ sans agitation, à l'obscurité pendant 11 jours. Six prélèvements répartis sur les 11 jours sont réalisés afin de dénombrer le nombre d'*E. coli* totaux (marquage au syto 9 et PI – kit *BacLight*), le nombre d'*E. coli* cultivables (UFC) sur gélose sélective (TTC-tergitol) ou non sélective (PCA), le nombre d'*E. coli* marqués par hybridation *in situ* et le nombre d'*E. coli* ayant une membrane endommagée (marquage au PI – kit *BacLight*). Des mesures de COD, pH et conductivité sont également effectuées à t_0 et t_{11j} . L'inoculation par *E. coli* induit une contamination en COD très faible (en moyenne $+0,01 \text{ mg C L}^{-1}$) considérée comme négligeable par rapport aux ajouts de MOD testés dans nos essais ($+0,2 \text{ mg CODB L}^{-1}$). L'ensemble des outils et des méthodes utilisés est décrit dans le chapitre III.

V.4.2. Caractéristiques initiales des échantillons

Le tableau V.2 montre les caractéristiques physico-chimiques initiales des différents milieux testés (eau de réseau stérile supplémentée ou non avec de l'acétate ou de la MOA). Le pH et la conductivité ont varié respectivement de 7,38 à 7,98 et de 277 à $518 \mu\text{S cm}^{-1}$, reflétant la variabilité de l'eau du robinet (les trois essais n'ont pas été effectués aux mêmes périodes de l'année). La concentration en COD de l'eau de réseau (eau de dilution) a varié selon l'essai de 1,6 à $1,7 \text{ mg L}^{-1}$ dont 22 à 31% de CODB. Le fait d'ajouter de la matière organique dissoute (MOA ou acétate) à l'eau de réseau déchlorée stérile a en moyenne augmenté le COD de $0,2 (\pm 0,02) \text{ mg L}^{-1}$ et le CODB de $0,19 (\pm 0,05) \text{ mg L}^{-1}$, comme souhaité dans les conditions expérimentales, tout en restant ainsi à des niveaux de concentrations classiquement rencontrés en eau de distribution. Après ajout de MOD, le CODB représentait 26 à 40% du COD. Même si les concentrations en azote et phosphore ont montré des variations importantes d'un essai à l'autre, le calcul du ratio C/N/P montre que nous avons toujours travaillé dans des conditions où le carbone était l'élément limitant de la croissance bactérienne, même lorsqu'un ajout de MOD a été effectué dans l'eau de réseau. Aucune biodégradation par la population d'*E. coli* injectée n'a été mesurée sur les 11 jours d'expérience ($<0,1 \text{ mg COD L}^{-1}$).

D'un point de vue microbiologique, la souche d'*E. coli* ayant été préparée dans les mêmes conditions à chaque expérience, les valeurs initiales (injectées) n'ont que très peu varié d'un essai à l'autre (Figure V.2). Une hiérarchie classique entre les différentes méthodes de dénombrements bactériens est observée : tous échantillons confondus, le nombre total d'*E. coli* juste après inoculation des flacons est en moyenne de $2,0 \cdot 10^5 \pm 3,7 \cdot 10^4$ cellules mL^{-1} dont $91 \pm 8\%$ présentent une membrane intègre, $80 \pm 14\%$ marqués par hybridation *in situ* (sonde ENT1 spécifique des *Enterobacteriaceae*) et $62 \pm 30\%$ d'*E. coli* cultivables sur milieu sélectif.

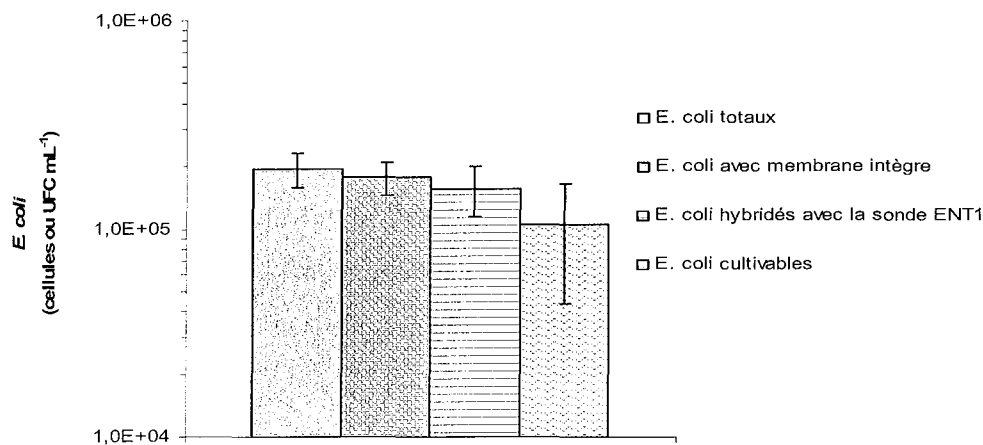


Figure V.2. Moyenne des dénombrements bactériens effectués dans les différents échantillons d'eau de réseau supplémentée ou non en MOD, juste après inoculation d'*E. coli*, tous les essais confondus. Les barres d'erreurs représentent l'écart type sur la moyenne des mesures (n=15).

Tableau V.2. Caractéristiques physico-chimiques initiales des différents milieux testés (eau de réseau (ER) supplémentée ou non en matière organique dissoute). Lors de l'essai 1, chaque flacon (sauf celui contenant l'acétate) a été réalisé en duplicat ; seule la moyenne des mesures sur les deux flacons est présentée ici ($\pm$ écarts types). LD=0,1 mg L⁻¹.

Essai	pH	Conductivité ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	COD initial (mg L ⁻¹)	CODB total (mg L ⁻¹)	CODB ajouté (mg L ⁻¹)	Ratio C/N/P	COD consommé par <i>E. coli</i> (mg L ⁻¹)
<u>Essai 1</u>							
ER (n=2)	7,98 $\pm$ 0,01	513 $\pm$ 12	1,72 $\pm$ 0,05	0,52 $\pm$ 0,03	0 $\pm$ 0	100/36/10	<LD
ER+Acétate (n=1)	7,68	506	1,94	0,74	0,22	100/13/18	<LD
ER+MOA-NS (n=2)	7,97 $\pm$ 0,01	517 $\pm$ 0	1,90 $\pm$ 0,07	0,76 $\pm$ 0,02	0,24 $\pm$ 0,02	100/16/6	<LD
ER+MOA-NS-Cl ₂ (n=2)	7,82 $\pm$ 0,21	518 $\pm$ 0,7	1,92 $\pm$ 0,02	0,72 $\pm$ 0,05	0,20 $\pm$ 0,05	100/18/15	<LD
ER+MOA-NS-O ₃ (n=2)	7,69 $\pm$ 0,04	516 $\pm$ 0,7	1,91 $\pm$ 0,01	0,73 $\pm$ 0,02	0,21 $\pm$ 0,02	100/36/10	<LD
<u>Essai 2</u>							
ER (n=1)	7,46	291	1,56	0,35	0	100/309/20	<LD
ER+Acétate (n=1)	7,43	282	1,78	0,51	0,16	100/208/21	<LD
ER+MOA-NS (n=1)	7,46	308	1,79	0,47	0,12	100/222/15	<LD
<u>Essai 3</u>							
ER (n=1)	7,42	300	1,70	0,43	0	100/548/13	<LD
ER+Acétate (n=1)	7,38	277	1,92	0,69	0,26	100/335/8	<LD
ER+MOA-NS (n=1)	7,42	286	1,87	0,56	0,13	100/432/10	<LD

V.4.3. Effet de la MOA-NS traitée ou non par oxydation sur la croissance d'*E. coli*

La croissance bactérienne a été suivie par comptage microscopique du nombre total d'*E. coli* sur les 11 jours d'expérience (Figure V.3). Dans l'eau de réseau déchlorée stérile non supplémentée en matière organique, la croissance d'*E. coli* durant les 11 jours d'incubation est négligeable (de $2,0 \cdot 10^5 \pm 3,4 \cdot 10^4$ à $2,3 \cdot 10^5 \pm 6,7 \cdot 10^4$ cellules mL^{-1}) malgré la présence de 0,4 à 0,5 mg CODB L^{-1} (Tableau V.2). Cette croissance correspond à une production cellulaire de 0,1 log en moyenne sur les trois essais (Tableau V.3).

L'ajout de MOD dans l'eau de réseau (+0,1 à 0,3 mg CODB L^{-1}), quelle que soit son origine (acétate ou MOA) permet d'augmenter significativement la croissance d'*E. coli* (Figure V.3). En effet, en présence de MOA-NS, la croissance d'*E. coli*, visible dès 24 h d'incubation ou seulement après 4 à 7 jours selon l'essai, induit une production cellulaire de 0,47 log en moyenne, valeur environ 4,3 fois supérieure à celle de l'eau de réseau non supplémentée (Tableau V.3). Cette croissance s'effectue sans biodégradation mesurable du COD par *E. coli* ($<0,1 \text{ mg L}^{-1}$). Par comparaison, l'ajout d'acétate permet également de favoriser la croissance d'*E. coli* dans deux essais sur trois (Figure V.3) : à l'exception de l'essai 2 où, comme le témoin (ER), la production cellulaire calculée sur les 11 jours d'expérience est nulle (0,02 log), la croissance d'*E. coli* est 3 à 4 fois plus élevée (0,4 à 0,5 log) lorsque de l'acétate est ajouté à l'eau de réseau (Tableau V.3). Ces résultats suggèrent que la MOA-NS est aussi favorable voire plus que l'acétate pour la croissance d'*E. coli*.

Tableau V.3. Production cellulaire d'*E. coli*, exprimée en log ($\log N_{\max} - \log N_0$), en 11 jours d'incubation dans l'eau de réseau stérile déchlorée (ER) supplémentée ou non en MOD. *nd=non déterminé.

Essai	Production cellulaire (log)				
	ER	ER+MOA-NS	ER+MOA-NS-Cl ₂	ER+MOA-NS-O ₃	ER+Acétate
1 (n=1 à 2)	0,15 ± 0,08	0,56 ± 0,16	0,58 ± 0,27	0,52 ± 0,05	0,53
2 (n=1)	0,01	0,46	nd*	nd*	0,02
3 (n=1)	0,14	0,28	nd*	nd*	0,40
Moy (n=2 à 4)	0,11 ± 0,08	0,47 ± 0,16	0,58 ± 0,27	0,52 ± 0,05	0,31 ± 0,27

Le fait d'oxyder la MOA-NS (chlore ou ozone) ne semblent pas avoir d'influence sur la croissance d'*E. coli* (Figure V.3, Essai 1) puisque les productions cellulaires calculées en présence de MOA-NS, de MOA-NS-Cl₂ et de MOA-NS-O₃ ne sont pas significativement différentes ($p>0,9999$) (Tableau V.3). Ceci ne paraît pas surprenant puisque l'oxydation du surnageant d'algues n'a pas conduit à des modifications drastiques de la MOD (§ IV.3.) notamment en terme de CODB.

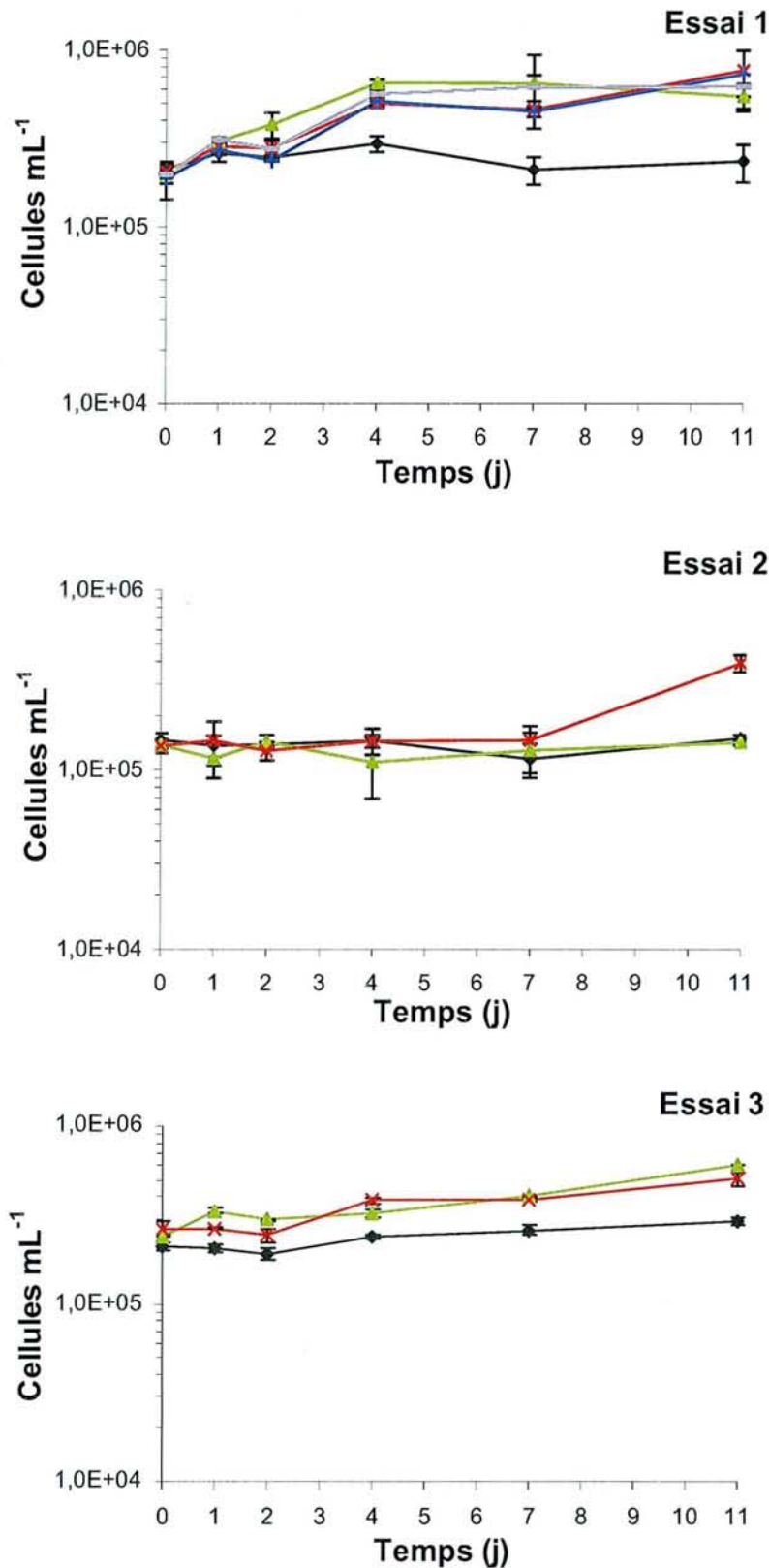


Figure V.3. Evolution du nombre total d'*E. coli* durant les 11 jours d'incubation dans l'eau de réseau stérile déchlorée supplémentée ou non en matière organique dissoute (♦ : eau de réseau non supplémentée (ER), ▲ : ER+acétate, x : ER+MOA-NS, + : ER+MOA-NS-Cl₂, - : ER+MOA-NS-O₃). Contrairement aux essais 2 et 3 réalisés en simplicat (n=1, 2 mesures par point), l'essai 1 représente les résultats moyens de deux flacons (n=2, 4 mesures par point) effectués en parallèle.

V.4.4. Effet de la MOA-NS traitée ou non par oxydation sur la cultivabilité d'*E. coli*

Le nombre d'*E. coli* cultivables a été déterminé sur milieu sélectif et non sélectif. Les dénombrements par les deux techniques n'ayant pas montré d'écart remarquable (Annexe X.2.2), ce paragraphe décrit uniquement les résultats sur gélose sélective.

Les résultats présentés à la figure V.4 montrent que, de manière générale, la cultivabilité d'*E. coli* baisse ou se maintient durant les 11 jours d'incubation et quel que soit le milieu testé. Lors de l'essai 1, une légère augmentation de la cultivabilité, parallèle à la croissance (Figure V.4) est même observée durant les 24 à 48 premières heures pour tous les milieux testés (+0,1 à 0,4 log) excepté pour la MOA-NS-Cl₂.

Cependant, la perte de cultivabilité d'*E. coli* sur les 11 jours d'essais est systématiquement moins rapide lorsque l'eau de réseau est supplémentée en MOD. Elle est en effet 3 à 9 fois plus lente en présence de MOA-NS (Tableau V.4). L'ajout d'acétate favorise également la survie d'*E. coli* puisqu'il ralentit de 1,2 à 1,8 fois la baisse de cultivabilité par comparaison à l'eau de réseau non supplémentée et permet même un maintien dans l'essai 1. D'une manière globale sur tous les essais, l'ajout de MOA-NS permet une survie d'*E. coli* soit comparable, soit meilleure que l'ajout d'acétate.

Tableau V.4. Evolution de la cultivabilité d'*E. coli*, exprimée en log (log N₁₁ – log N₀), dans l'eau de réseau déchlorée stérile (ER) supplémentée ou non en MOD (acétate ou MOA-NS) durant les 11 jours d'incubation à 20±2°C. *nd=non déterminé.

Essai	Evolution de la cultivabilité (log)				
	ER	ER+MOA-NS	ER+MOA-NS-Cl ₂	ER+MOA-NS-O ₃	ER+Acétate
1 (n=1 à 2)	-0,54 ± 0,23	-0,07 ± 0,01	0,02 ± 0,04	-0,48 ± 0,14	0,03
2 (n=1)	-0,90	-0,30	nd*	nd*	-0,74
3 (n=1)	-0,30	-0,12	nd*	nd*	-0,17
Moy (n=2 à 4)	-0,57 ± 0,28	-0,14 ± 0,11	0,02 ± 0,04	-0,48 ± 0,14	-0,30 ± 0,40

Contrairement à ce qui a été observé en terme de croissance, le fait d'oxyder la MOA-NS a une influence sur la cultivabilité d'*E. coli* (Figure V.4, Essai 1). De manière surprenante, la MOA-NS-O₃ semble diminuer la survie d'*E. coli* puisque le nombre d'*E. coli* cultivables chute 7 fois plus vite qu'en présence de la MOA-NS non traitée. La MOA-NS-Cl₂ conduit quant à elle à une cinétique différente des autres échantillons, en deux phases :

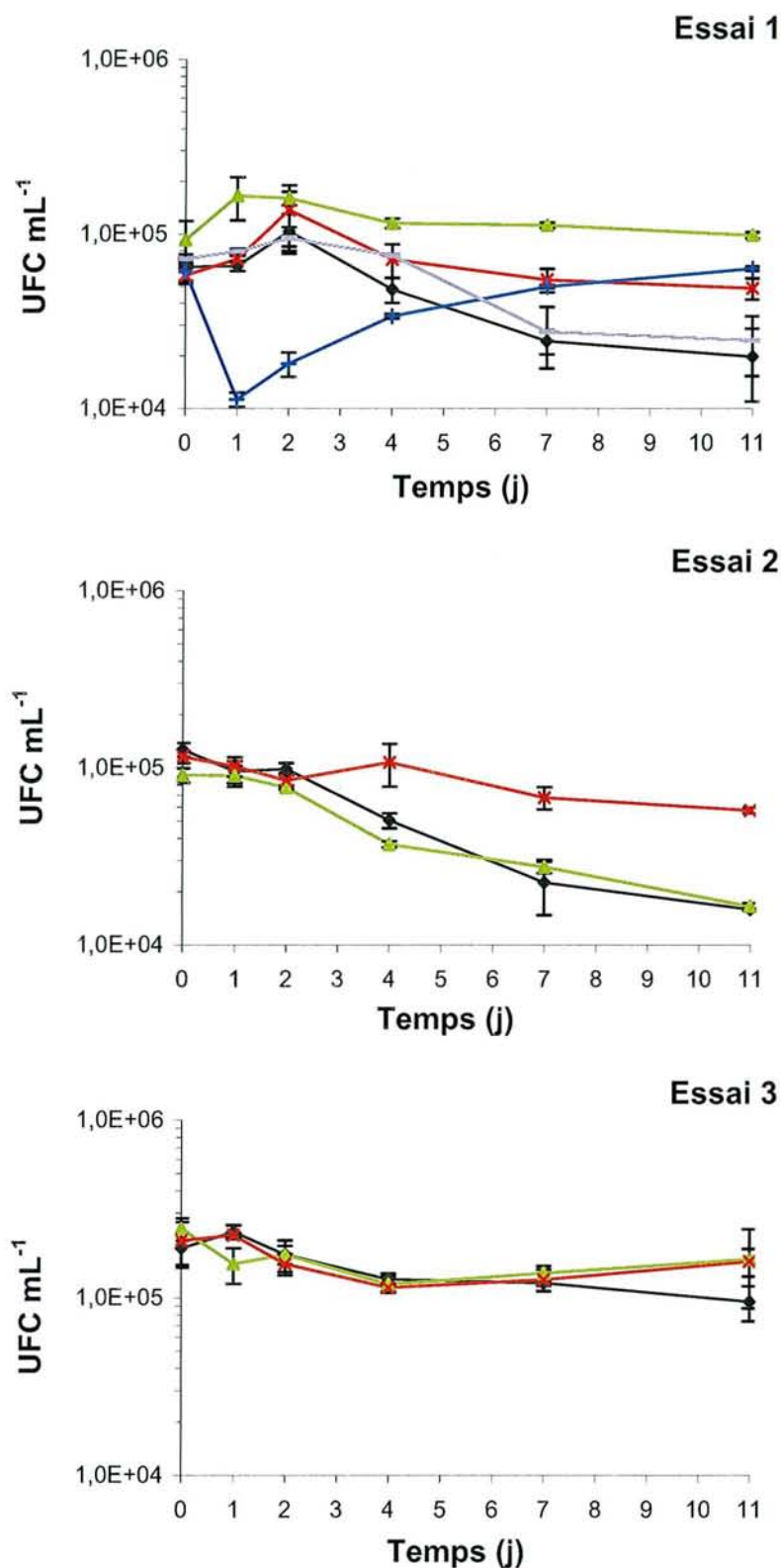


Figure V.4. Evolution du nombre d'*E. coli* cultivables sur gélose sélective (TTC-tergitol) durant les 11 jours d'incubation dans l'eau de réseau stérile déchlorée supplémentée ou non en matière organique dissoute (♦ : eau de réseau non supplémentée (ER), ▲ : ER+acétate, x : ER+MOA-NS, + : ER+MOA-NS-Cl₂, - : ER+MOA-NS-O₃). Contrairement aux essais 2 et 3 réalisés en simplicat (n=1, 2 mesures par point), l'essai 1 représente les résultats moyens de deux flacons (n=2, 4 mesures par point) effectués en parallèle.

- durant les 24 1^{ères} heures, la cultivabilité d'*E. coli* chute (-0,7 log en moyenne) alors qu'elle augmente dans les autres MOD (facteur 1,3 à 3,6), suggérant la présence d'un élément « toxique » ou inhibiteur dans la MOA-NS-Cl₂ ;

- après 24 heures d'incubation, alors que la cultivabilité commence à chuter dans les autres échantillons (0,3 à 0,6 log), une augmentation progressive de la cultivabilité est observée dans la MOA-NS-Cl₂ jusqu'à atteindre sa valeur initiale et arriver à un niveau comparable à celui de la MOA-NS non traitée à partir du 7^{ème} jour. Cette adaptation d'une fraction de la population d'*E. coli* est à rapprocher de celle observée en présence de MOA relarguée par des algues chlorées (MOA-Cl₂) (Figure 3, § V.2 et Figure V.1, § V.3).

V.4.5. Effet de la MOA-NS traitée ou non par oxydation sur d'autres activités physiologiques d'*E. coli*

Le nombre d'*E. coli* marqués par FISH et présentant une membrane intègre évoluent de manière similaire au nombre de bactéries totales dans tous les échantillons (Annexe X.2.2) : lorsqu'il y a croissance, le nombre de cellules marquées par la sonde ENT1 augmente également, même dans les flacons où la cultivabilité baisse. Cependant, une faible baisse significative ($p=0,0294$, $n=15$) du pourcentage de cellules marquées par FISH est observée entre le début et la fin de l'incubation (Tableau V.5) : tous milieux confondus et en moyenne dans les trois essais, les cellules marquées par FISH représentent 70% (± 10) à t_{11j} contre 80% (± 14) à t_0 . En parallèle, l'intégrité membranaire des cellules n'est que peu altérée puisque 84% (± 16) des cellules totales présentent une membrane intègre en fin d'expérience contre 91% (± 8) à t_0 , différence non significative ($p=0,2211$, $n=15$) (Tableau V.5).

Tableau V.5. Pourcentage d'*E. coli* hybridés avec la sonde ENT1 (FISH) et d'*E. coli* présentant une membrane intègre (Kit *BacLight*) juste après inoculation ($t=0$) et après 11 jours d'incubation dans les différents milieux testés.

	% d' <i>E. coli</i> hybridés avec la sonde ENT1		% d' <i>E. coli</i> présentant une membrane intègre	
	$t=0$	$t=11$	$t=0$	$t=11$
ER (n=4)	84 $\pm$ 5	68 $\pm$ 13	86 $\pm$ 4	78 $\pm$ 15
ER+Acétate (n=3)	85 $\pm$ 4	69 $\pm$ 1	95 $\pm$ 2	80 $\pm$ 5
ER+MOA-NS (n=4)	82 $\pm$ 20	80 $\pm$ 9	92 $\pm$ 6	82 $\pm$ 26
ER+MOA-NS-Cl ₂ (n=2)	63 $\pm$ 23	68 $\pm$ 11	92 $\pm$ 2	92 $\pm$ 4
ER+MOA-NS-O ₃ (n=2)	77 $\pm$ 6	64 $\pm$ 11	94 $\pm$ 2	97 $\pm$ 1

En conclusion,

- La MOA-NS apparaît comme un substrat utilisable par *E. coli* puisque le fait d'ajouter cette matière organique à l'eau de réseau favorise sa croissance et sa cultivabilité.
- Dans nos conditions expérimentales, et malgré des ajouts équivalents en terme de CODB (+0,2 mg L⁻¹ en moyenne), la MOA-NS a permis une survie d'*E. coli* comparable ou meilleure que l'acétate, connue comme molécule facilement assimilable par les bactéries.
- Le fait d'oxyder (chlore ou ozone) la MOA-NS avant de la mettre en contact avec *E. coli*, n'a pas d'influence mesurable sur la croissance de la bactérie mais semble influencer sa cultivabilité : la MOA-NS-O₃ induit une chute plus rapide de la cultivabilité d'*E. coli* alors que la MOA-NS-Cl₂ provoque une diminution suivie d'une remontée de la cultivabilité.
- L'eau de réseau supplémentée en MOA-NS, traitée ou non par oxydation, permet toujours un meilleur maintien de la cultivabilité que l'eau de réseau non supplémentée.

V.5 Discussion

Après avoir étudié la composition de la matière organique algale, qu'elle soit issue d'une sécrétion naturelle (pendant la croissance des algues) ou d'une oxydation (chlore ou ozone), nous nous sommes attaché à évaluer la capacité de cette MOA à favoriser ou non la survie ou la croissance d'une souche d'Entérobactéries (*Escherichia coli*). En effet, la composition majoritairement glucidique et biodégradable de la MOA peut potentiellement représenter une source de nutriments pour la croissance des bactéries hétérotrophes, dont *E. coli*, au sein d'un réseau de distribution. De plus, le chapitre précédent ayant montré que plusieurs origines de MOA (présentant des natures différentes) pouvaient être présentes dans les eaux traitées (MOA naturellement sécrétée par les algues ou relarguée après une oxydation...), nous avons étudié l'impact d'un ajout équivalent de ces MOA (+0,2 mg CODB L⁻¹) dans une eau de réseau déchlorée stérile sur le comportement d'*E. coli* afin de pouvoir les comparer entre elles.

Comportement d'*E. coli* dans l'eau de réseau déchlorée stérile non supplémentée en MOD

Les résultats de ces travaux ont en premier lieu confirmé que l'eau de réseau stérile, même sans chlore, est un environnement défavorable pour la survie d'*E. coli*. En effet, aucune croissance significative d'*E. coli* n'est observée dans ce milieu et sa cultivabilité décroît régulièrement au cours de l'incubation. Ce phénomène a déjà été largement décrit dans la littérature (Boualam, 2001, Boualam *et al.*, 2002 ; Fass *et al.*, 1996 ; Parent *et al.*, 1996) et a été relié principalement au statut nutritionnel de l'eau de réseau. En effet, même si certaines études ont montré que certaines souches

de coliformes (dont *E. coli*) pouvaient croître dans des eaux faiblement chargées en matière organique (Camper *et al.* 1991 ; Sibille *et al.*, 1998 ; Van der Kooij, 1997), cet organisme est décrit comme une espèce copiotrophe, c'est à dire qu'elle requière des quantités importantes de matière organique pour pouvoir survivre, définition contraire aux conditions oligotrophes rencontrées en eau potable.

Influence de la MOA sur le comportement d'E. coli

Les résultats de ces travaux ont montré qu'*E. coli* est influencé par la MOA quelle qu'elle soit (sécrétion naturelle ou relargage après oxydation). En effet, lorsque de la MOA est ajoutée à une eau de réseau déchlorée stérile (+0,2 mg CODB L⁻¹), le comportement d'*E. coli* est différent de celui observé dans l'eau de réseau non supplémentée. Les figures V.5 et V.6 résument l'effet de chaque MOA testée sur la croissance et la cultivabilité d'*E. coli*, tous essais confondus.

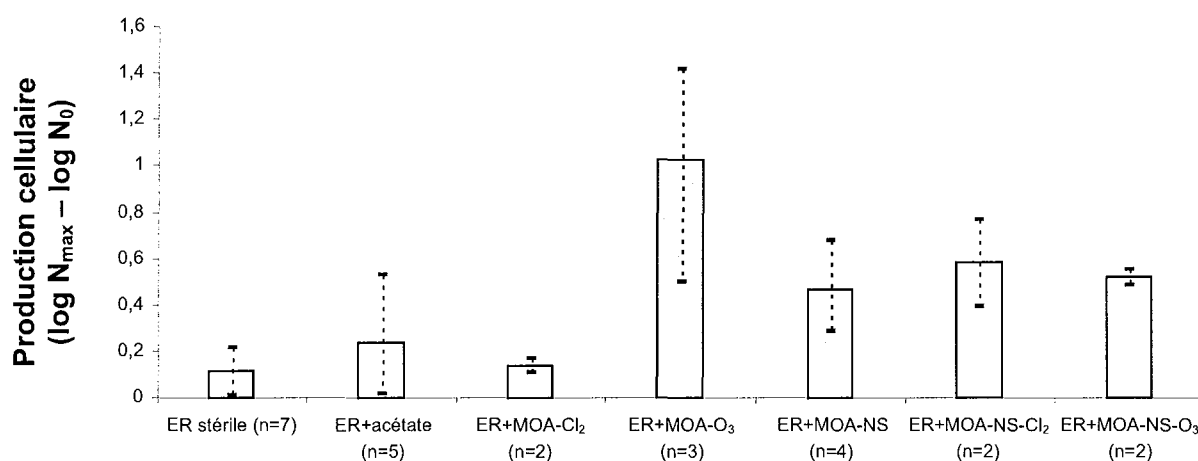


Figure V.5. Production cellulaire d'*E. coli* (log N_{max} - log N₀) obtenues en présence de différentes qualités de MOD. Les barres d'erreurs ne correspondent pas à des écarts types mais aux valeurs minimales et maximales obtenues lors des différents essais.

Il apparaît clairement que l'ajout de MOA a favorisé soit la croissance d'*E. coli*, soit sa cultivabilité, soit les deux à la fois, ce qui suggère qu'*E. coli* peut utiliser cette MOA comme substrat. Compte tenu du fait que nous nous sommes placés en carbone limitant dans nos essais, il n'est pas étonnant d'augmenter la survie d'*E. coli* en ajoutant de la MOD. Pourtant, de manière plus surprenante, les différentes origines de MOA ne mènent pas à des comportements similaires d'*E. coli*, malgré des niveaux équivalents en CODB ajouté :

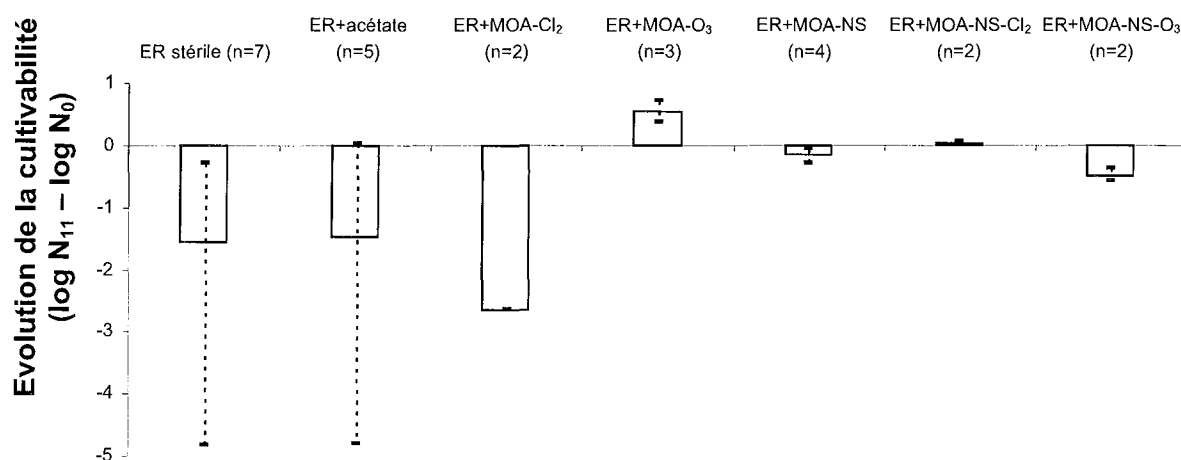


Figure V.6. Evolution du nombre d'*E. coli* cultivables ($\log N_{11} - \log N_0$) en 11 jours d'incubation dans différentes qualités de MOD. Les barres d'erreurs correspondent aux valeurs minimales et maximales obtenues lors des différents essais.

La matière organique relarguée par les algues *Chlorella* suite à une chloration ($7,8 \text{ mg Cl}_2 \text{ L}^{-1}$ appliqué, $5 \cdot 10^9$ algues L^{-1}) (MOA-Cl₂) n'a pas favorisé significativement la croissance d'*E. coli* mais a provoqué une perte (plus rapide que dans l'eau de réseau non supplémentée) suivie d'un regain de cultivabilité après 2 à 4 jours d'incubation. La chute de cultivabilité ne peut pas être attribuée à un résiduel de chlore car celui-ci a été neutralisé en excès avant l'inoculation d'*E. coli* ($<0,01 \text{ mg Cl}_2 \text{ L}^{-1}$). La présence d'inhibiteurs bactériens excrétés par les algues en parallèle du relargage de MOA-Cl₂ tels que des antibiotiques (Metting et Pyne, 1986) ou la présence de sous produits de chloration pouvant être stressants pour la population d'*E. coli* pourraient expliquer cet effet négatif de la MOA-Cl₂ au cours des premiers jours d'incubation (Boualam *et al.*, 2002 ; Ribas *et al.*, 1997). Une faible concentration de THM (trihalométhanés) a d'ailleurs été mesurée dans la MOA-Cl₂ ($4,8 \pm 1,4 \text{ } \mu\text{g THM L}^{-1}$ pour $5 \text{ mg Cl}_2 \text{ L}^{-1}$) (cf § IV.4.). Cependant, à partir du 4^{ème} jour d'incubation, le nombre d'*E. coli* cultivables s'est remis à augmenter. Ce phénomène peut correspondre soit à une croissance non visible en termes de bactéries totales (seuil de sensibilité trop bas), soit à une reviviscence : des bactéries non cultivables mais ayant conservé une certaine activité physiologique (bactéries blessées, dormantes) ont trouvé des conditions favorables et redeviennent cultivables (Kell et Young, 2000 ; McDougald *et al.*, 1998 ; Montfort et Baleux, 1999). Deux hypothèses ont été testées pour expliquer ce regain de cultivabilité : (i) la disparition, après 2 à 4 jours d'incubation, d'un élément toxique (antibiotique, THM...) amené par la MOA-Cl₂, et (ii) l'adaptation d'une fraction de la population d'*E. coli* à cette MOA-Cl₂. Les résultats présentés au § V.3 ont permis de confirmer la deuxième hypothèse en montrant que la population d'*E. coli* récupérée en fin d'incubation avec la MOA-Cl₂ n'est plus défavorisée lorsqu'elle est remise en contact une deuxième fois avec la même MOA. Ce phénomène d'adaptation a déjà été observé chez

des bactéries en réponse à un stress oxydant. Dukan et Touati (1996) montrent en effet qu'une souche d'*E. coli* ayant subi une chloration préalable (dose subléthale) résiste mieux à un 2^{ème} stress oxydant que la même souche n'ayant pas subi de chloration.

Contrairement à la MOA-Cl₂, la matière organique relarguée par les algues suite à une ozonation (5,3 mg O₃ L⁻¹ appliqué, 5 10⁹ algues L⁻¹) (MOA-O₃) favorise la croissance et la cultivabilité d'*E. coli*. L'effet nettement favorable de la MOA-O₃ est en accord avec l'action de l'ozone, qui rend la matière organique plus biodégradable en cassant les liaisons chimiques, les cycles aromatiques... (DeLaat *et al.*, 1991 ; Doré, 1989, Lefebvre *et al.*, 1995 ; Merlet *et al.*, 1992a ; Miettinen *et al.*, 1998 ; Ribas *et al.*, 1997). En effet, les oxydants ayant sans doute attaqué la paroi des algues, il est fort probable, au regard de la structure algale, que les molécules relarguées présentent des masses moléculaires élevées (cellulose, pectine) (Becquevort *et al.*, 2002 ; Couté, 1995), qui ont pu être dégradées en unités plus petites sous l'action de l'ozone (et non du chlore) les rendant ainsi plus facilement utilisables par les bactéries. L'étude de la distribution des masses moléculaires apparentes (MMA) a d'ailleurs montré que la MOA-O₃ utilisée dans ces essais contenait plus de molécules de faible MMA (42% du COD<0,5 kDa) et moins de molécules de forte MMA (14% du COD>30 kDa) que la MOA-Cl₂ (64% du COD>30 kDa et 19% du COD<0,5 kDa). Ce point est aussi concordant avec une meilleure biodégradation de la MOA-O₃ qui est plus facilement et particulièrement plus rapidement assimilée par les bactéries : il faut seulement 14 jours pour biodégrader la fraction biodégradable de la MOA-O₃ (74% du COD) alors qu'il faut 28 jours pour la MOA-Cl₂ (54% du COD) (cf § IV.4.).

La matière organique issue de la sécrétion naturelle d'algues (MOA-NS), c'est-à-dire le surnageant d'une culture d'algues, a permis une croissance d'*E. coli* en parallèle d'une légère baisse du nombre d'*E. coli* cultivables, conduisant au concept de bactéries viables mais non cultivables (VBNC) décrit depuis plusieurs années (Roszak et Colwell, 1987). Ces résultats vont dans le même sens que ceux obtenus par Boualam *et al.* (2002) qui ont déjà montré une croissance et en parallèle une baisse de cultivabilité d'un mélange de dix souches de coliformes en présence d'un surnageant de culture d'algues. Dans leurs conditions d'expérience, ils montraient une augmentation du nombre total de coliformes d'environ 0,5 log en 9 jours avec un apport en MOA trois fois supérieur à celui testé dans nos essais.

Même si les molécules sécrétées par les algues de part leur métabolisme sont décrites comme facilement biodégradables car de faible masse moléculaire (acides aminés, peptides, sucres simples...) (Hellebust, 1967 ; Sundh, 1989, 1992 ; Maurin *et al.*, 1997), cette MOA a cependant engendré une croissance inférieure à celle obtenue dans la MOA-O₃, malgré des concentrations en

CODB équivalentes. La distribution de taille des molécules composant ces deux types de matière organique (décrite au chapitre IV) peut expliquer ce résultat : la MOA-NS comporte de l'ordre de 80% de composés dont la taille est supérieure à 30 kDa contre seulement 14% pour la MOA-O₃. Notons également que la fraction de toute petite taille (<0,5 kDa) est aussi largement supérieure dans la MOA-O₃ (42% contre 17% pour la MOA-NS).

Le fait d'oxyder (chloration ou ozonation) la MOA-NS ne semble pas avoir d'impact sur l'évolution du nombre total d'*E. coli* puisque des croissances similaires sont observées dans la MOA-NS non traitée, ozonée ou chlorée (Figure V.5). Au regard de la littérature concernant l'action de l'ozone sur la matière organique (DeLaat *et al.*, 1991 ; Doré, 1989, Lefebvre *et al.*, 1995 ; Merlet *et al.*, 1992a ; Miettinen *et al.*, 1998 ; Ribas *et al.*, 1997) et vu que les caractéristiques spectrales de la MOA-NS ozonée suggéraient la présence de molécules à caractère moins aromatique et sans doute de plus petites masses moléculaires, une croissance plus rapide aurait pu être attendue dans la MOA-NS ozonée. Cependant, en se basant sur les caractéristiques globales de chaque MOA (détaillées au chapitre IV), ces résultats ne sont pas surprenants puisque les concentrations en CODB n'ont pas montré d'évolution significative après oxydation.

Des différences sont toutefois à noter au niveau de la cultivabilité. Contrairement à la MOA-NS non traitée et la MOA-NS-O₃ qui montrent des cinétiques proches, la MOA-NS-Cl₂ provoque une baisse de cultivabilité d'*E. coli* durant les premières 24 heures suivie d'une reprise de la cultivabilité menant à des valeurs d'UFC voisines de celles mesurées dans la MOA-NS non traitée après 7 jours d'incubation. Même si ce phénomène de perte puis de reprise de cultivabilité reste à expliquer, il est tout de même à rapprocher des cinétiques observées lorsqu'*E. coli* est mis en présence de MOA issue de la chloration d'algues. La similitude entre les cinétiques de cultivabilité observées en présence de MOA-Cl₂ et de MOA-NS-Cl₂ appuie l'hypothèse selon laquelle l'élément « toxique » présent dans ces deux MOA viendrait plutôt de sous-produits d'oxydation que d'une substance relarguée par les algues ; en effet, l'étape de chloration de la MOA-NS s'est effectuée après l'élimination des cellules algales et éliminent donc l'hypothèse d'un composé venant directement des algues, l'effet inhibiteur n'étant pas observé dans la MOA-NS non traitée.

Comparaison entre l'effet de la MOA et celui de l'acétate sur le comportement d'E. coli

Malgré des concentrations équivalentes ajoutées dans l'eau de réseau (+0,2 mg CODB L⁻¹), l'effet de la MOA (issue d'algues *Chlorella*) sur *E. coli* s'est avéré équivalent voire meilleur que celui de l'acétate, composé pourtant très facilement biodégradable (Brenner, 1984 ; Merlet *et al.*, 1992a). Contrairement à l'acétate, la MOA testée dans cette étude correspond à un mélange de composés organiques sans doute très diversifiés, parmi lesquels seuls 50% environ ont été identifiés

comme étant des sucres. Gayte *et al.* (1999) ont d'ailleurs montré que plus le nombre de composés organiques (de nature différente) ajoutés dans une eau de rivière était grand, plus l'activité des bactéries hétérotrophes était importante. Par ailleurs, en plus du carbone, de l'azote et du phosphore (présents dans tous les batchs), d'autres éléments nutritifs tels que des facteurs de croissance (vitamines, acides aminés, sidérophores, oligoéléments, cofacteurs organiques) ont pu être apportés par la MOA et ainsi faciliter la survie des bactéries hétérotrophes comme *E. coli* (Cabridenc, 1995 ; Camper, 1994 ; LeChevallier, 1990 ; Metting et Pyne, 1986 ; Peterson *et al.*, 1995). Ceci pourrait expliquer pourquoi la MOA a un effet si positif comparé à l'acétate. Dans nos conditions d'expérience, 0,1 mg de CODB d'origine algale suffit à augmenter la cultivabilité et la croissance d'*E. coli* tandis que les 0,7 mg de CODB initialement présents dans l'eau de réseau ou encore les 0,2 mg de CODB amenés par l'acétate en sont incapables.

En conclusion, les résultats présentés dans ce chapitre ont permis de montrer que :

(i) les composés organiques issus de l'algue *Chlorella*, qu'ils soient sécrétés naturellement par les algues au cours de leur croissance, ou qu'ils soient relargués par les algues suite à un stress oxydant constituent un substrat favorable pour la souche d'*E. coli* étudiée en augmentant sa croissance et/ou sa cultivabilité.

(ii) la nature de la matière organique algale revêt une importance particulière sur le comportement d'*E. coli* en eau de distribution stérile puisque, malgré des concentrations équivalentes en CODB ajoutées à l'eau de réseau déchlorée stérile (0,2 mg CODB ajouté L⁻¹), *E. coli* présente un comportement différent selon l'origine (et donc la nature) de la matière organique testée. Ceci sous-entend que la concentration en CODB n'est donc pas directement prédictive du comportement d'*E. coli*, sans doute par apport de nutriments traces promoteurs de la croissance, nutriments qu'il est difficile de quantifier. Ainsi, connaître le CODB d'une eau n'est pas un outil suffisant en lui-même pour prédire la stabilité biologique de cette eau.

(iii) étant donné l'effet favorable de la MOA sur *E. coli* et puisque les traitements de potabilisation n'éliminent pas totalement la matrice organique, la présence de MOA dans l'eau brute ou générée pendant le traitement est susceptible de représenter un danger pour la stabilité microbiologique des eaux potables.

Cependant, des essais en présence de bactéries autochtones des eaux potables semblent nécessaires afin de pouvoir apprécier réellement ce danger. De même, il serait intéressant d'estimer l'effet de la MOA, non plus sur une souche cultivée en laboratoire, mais directement sur une population d'Entérobactéries naturellement présente en eau potable. Ces deux situations sont explorées dans les chapitres suivants.

Chapitre VI - Influence de la MOA sur le comportement d'*E. coli* dans l'eau potable en présence de bactéries autochtones

VI.1.	Introduction.....	166
VI.2.	Effet de la MOA sur le comportement d' <i>E. coli</i> en suspension en conditions statiques....	167
VI.2.1.	Protocole expérimental.....	167
VI.2.2.	Caractéristiques initiales des milieux testés	168
VI.2.3.	Comportement des bactéries autochtones dans l'eau de réseau non supplémentée en MOD et en absence d' <i>E. coli</i>	170
VI.2.4.	Effet de la MOA sur la population bactérienne totale (autochtone + <i>E. coli</i>)	172
VI.2.5.	Effet de la MOA sur la population d' <i>E. coli</i> injectée	174
VI.3.	Effet de la MOA sur le comportement d' <i>E. coli</i> en suspension et fixé en conditions dynamiques	177
VI.3.1.	Protocole expérimental.....	178
VI.3.2.	Caractéristiques initiales des réacteurs avant et après injection d' <i>E. coli</i>	179
VI.3.3.	Caractéristiques des eaux alimentant les réacteurs après supplémentation en MOA	180
VI.3.4.	Effet de la MOA sur l'évolution des bactéries en suspension	181
VI.3.5.	Effet de la MOA sur l'évolution des bactéries fixées.....	184
VI.4.	Discussion.....	187

VI.1. Introduction

Dans le chapitre précédent, nous avons montré que l'ajout de MOA, qu'elle soit issue de la sécrétion naturelle des algues ou relarguée après un stress oxydant, dans une eau de réseau stérile (filtration sur 0,2 µm et autoclavage) favorisait la survie d'une souche d'*E. coli* inoculée massivement (10^5 cellules mL⁻¹). Cependant, plusieurs auteurs ont montré que la présence des bactéries autochtones de l'eau pouvait avoir une influence sur la survie d'*E. coli* (LeChevallier *et al.*, 1980 ; LeChevallier et McFeters, 1985b ; Ramalho *et al.*, 2001 ; Vachée *et al.*, 1997). Les travaux de LeChevallier *et al.* (1980) et LeChevallier et McFeters (1985b) ont en effet montré que certaines espèces bactériennes hétérotrophes autochtones des eaux de distribution étaient antagonistes des bactéries coliformes (dont *E. coli*). De même, Ramalho *et al.* (2001) ont montré plus récemment qu'*E. coli* inoculé dans une eau minérale stérile (filtrée) maintenait sa cultivabilité plus longtemps que dans la même eau non stérile. La synthèse de substances inhibitrices par la population autochtone et/ou des phénomènes de compétition vis-à-vis des nutriments ont été suggérés par ces auteurs pour expliquer l'effet défavorable de la présence des bactéries autochtones sur la survie d'*E. coli*.

Afin de nous rapprocher des caractéristiques d'une eau potable et partant du principe que la MOA peut également favoriser la survie et/ou la croissance des bactéries autochtones de l'eau, nous nous sommes posé la question de savoir si *E. coli* aurait le même comportement en présence de MOA si les populations autochtones de l'eau de réseau étaient conservées. Pour répondre à cette question, deux types d'essais ont été conduits :

- Des essais en condition statique (batch), réalisés dans les mêmes conditions qu'au chapitre précédent mais en laissant les bactéries initialement présentes dans l'eau de réseau. Dans ces essais, trois origines de MOA ont été testées : la MOA naturellement sécrétée par les algues (MOA-NS), la MOA relarguée par les algues après une chloration (MOA-Cl₂) et la MOA relarguée par les algues après une ozonation (MOA-O₃).
- Des essais en condition dynamique à l'aide de réacteurs Propella™. Ceux-ci permettent de reproduire le régime hydraulique existant dans les réseaux de distribution d'eau potable tout en appliquant des conditions maîtrisées (temps de résidence hydraulique, vitesse, température...), et en disposant d'un écosystème spécifique du réseau, en particulier en ce qui concerne le biofilm à l'état de pseudo-équilibre. Les objectifs de ces essais en condition dynamique étaient (i) de comparer le comportement d'*E. coli* en présence de MOA en conditions statique et dynamique, et (ii) d'évaluer l'effet d'un ajout de MOA sur la population d'*E. coli* fixée dans le

biofilm. Seule une origine de MOA a été étudiée : la MOA naturellement sécrétée par les algues (MOA-NS).

Que ce soit en conditions statiques ou dynamiques, pour pouvoir différencier la population d'*E. coli* parmi la population totale, la méthode d'hybridation *in situ* avec des sondes fluorescentes (FISH) a été utilisée en employant la sonde spécifique des *Enterobacteriaceae* (sonde ENT1) décrite par Loge *et al.* (1999).

Ce chapitre s'organise en trois parties : le comportement d'*E. coli* inoculé dans une eau de réseau non stérile supplémentée ou non en MOA est étudié dans un premier temps en condition statique puis dans un deuxième temps en condition dynamique. Enfin, dans un troisième temps, une disussion des résultats est présentée. L'ensemble des outils et des techniques utilisés pour réaliser les travaux décrits dans cette partie est détaillé dans le chapitre III.

VI.2. Effet de la MOA sur le comportement d'*E. coli* en suspension en conditions statiques

Les travaux présentés dans cette partie avaient pour but d'évaluer l'influence de la MOA sur le comportement d'*E. coli* en suspension inoculé dans une eau de réseau non stérile en travaillant en condition statique (batch). Les résultats, comparés à ceux du chapitre précédent, doivent permettre d'évaluer si la présence ou l'absence de bactéries autochtones des eaux potables influence le comportement d'*E. coli* vis-à-vis de la MOA. Les résultats bruts sont présentés en annexe X.3.1.

VI.2.1. Protocole expérimental

De l'eau de réseau de Nancy a été prélevée au robinet du laboratoire puis déchlorée par agitation pendant 18-24 h et neutralisation du chlore résiduel ($0,03 \text{ mg Cl}_2 \text{ total L}^{-1}$) par ajout de thiosulfate de sodium ($0,2 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ en concentration finale). Elle est alors répartie dans 6 flacons en verre traités à 550°C pour limiter les traces de carbone (§ III.1) puis différentes natures de MOD stériles sont alors ajoutées dans les flacons de façon à augmenter le CODB de l'eau de réseau de $0,2 \text{ mg L}^{-1}$. Les différentes natures de MOD testées sont : la MOA-NS non traitée (cf § IV.2.), la MOA- Cl_2 (algues chlorées à $7,8 \text{ mg L}^{-1}$, cf § IV.4.), la MOA- O_3 (algues ozonées à $5,3 \text{ mg L}^{-1}$, cf § IV.4.) et l'acétate de sodium (utilisé comme témoin de MOD facilement assimilable par les bactéries). Deux flacons contenant uniquement l'eau de réseau déchlorée (ER) sont également effectués en

parallèle. A ce stade, l'azote et le phosphore total, ainsi que le CODB sont dosés afin de pouvoir estimer quel facteur est limitant pour la croissance bactérienne.

Chaque flacon (sauf un servant de témoin pour suivre uniquement la population autochtone dans l'ER non supplémentée) est ensuiteensemencé avec une suspension d'*E. coli* (t_0), préparée comme décrit au § III.5., à raison d'environ 10^5 cellules mL^{-1} en concentration finale, puis ils sont incubés à $22 \pm 2^\circ\text{C}$ sans agitation, à l'obscurité pendant 15 jours. Des prélèvements réguliers sont ensuite réalisés afin de dénombrer :

1. le nombre de bactéries totales (marquage au syto 9 et PI, kit *BacLight*),
2. le nombre de bactéries hétérotrophes cultivables (UFC) sur gélose non sélective (PCA),
3. le nombre d'*E. coli* cultivables (UFC) sur gélose sélective (TTC-tergitol),
4. le nombre d'*Eubacteria* marquées par hybridation *in situ* (sonde EUB338),
5. le nombre d'*E. coli* marqués par hybridation *in situ* (sonde ENT1),
6. le nombre de bactéries ayant une membrane intègre (bactéries PI, kit *BacLight*).

Seules les mesures 3 et 5 permettent de suivre spécifiquement la population d'*E. coli*, les autres détectant à la fois les autochtones de l'eau et *E. coli* sans pouvoir les distinguer. Des mesures de COD, pH et conductivité sont également effectuées à t_0 et t_{15j} . L'ensemble des outils et des méthodes utilisés est décrit dans le chapitre III. Chaque point correspond à la moyenne de deux mesures ($n=1$ essai).

VI.2.2. Caractéristiques initiales des milieux testés

Le tableau VI.1 détaille les caractéristiques physico-chimiques initiales des différents milieux testés avant et juste après inoculation par *E. coli*.

Avant inoculation, l'eau de réseau utilisée dans ces essais présentait un COD moyen de $1,22 \text{ mg L}^{-1}$ et un CODB inférieur à la limite de détection ($<0,1 \text{ mg L}^{-1}$). Comme attendu, le fait de supplémenter cette eau de réseau avec différentes MOD a augmenté le COD de $0,2$ à $0,4 \text{ mg L}^{-1}$ et le CODB de $0,2$ à $0,3 \text{ mg L}^{-1}$. Ainsi, le CODB représentait de <8 à 20% du COD dans les différents milieux testés. Le pH était compris entre $7,4$ et $7,5$ et la conductivité a varié de 251 à $261 \mu\text{S cm}^{-1}$. Les concentrations en azote total étaient relativement fortes avec une valeur moyenne de $2,44 \text{ mg N L}^{-1}$ tandis que les dosages de phosphore total ont tous révélé des valeurs inférieures à la limite de détection ($<0,14 \text{ mg P L}^{-1}$).

L'inoculation par *E. coli* n'a pas modifié significativement le pH, la conductivité et les concentrations en COD (contamination n'excédant pas 5%).

Tableau VI.1. Caractéristiques physico-chimiques initiales de l'eau de réseau (ER) supplémentée ou non en MOD avant inoculation et après inoculation d'*E. coli*. ER₁=eau de réseau dans laquelle *E. coli* n'a pas été inoculé ; ER₂=eau de réseau dans laquelle *E. coli* a été inoculé (n=1).

	ER ₁	ER ₂	ER+MOA-NS	ER+MOA-Cl ₂	ER+MOA-O ₃	ER+Acétate
<u>Avant inoculation d'<i>E. coli</i></u>						
COD (mg L ⁻¹)	1,24	1,19	1,60	1,57	1,45	1,43
CODB (mg L ⁻¹)	<0,1	<0,1	0,28	0,31	0,19	0,18
pH	7,45	7,45	7,40	7,41	7,37	7,45
Conductivité (μS cm ⁻¹)	255	261	259	252	251	255
Phosphore (mg P L ⁻¹)	<0,14	<0,14	<0,14	<0,14	<0,14	<0,14
Azote (mg N L ⁻¹)	2,46	2,51	2,51	2,35	2,48	2,37
<u>Après inoculation d'<i>E. coli</i></u>						
COD (mg L ⁻¹)	/	1,25	1,56	1,54	1,47	1,45
pH	/	7,46	7,43	7,44	7,39	7,43
Conductivité (μS cm ⁻¹)	/	262	261	255	255	259

D'un point de vue microbiologique, l'eau de réseau utilisée dans ces essais (avant inoculation d'*E. coli*) contenait de l'ordre de $3 \cdot 10^5$ bactéries mL⁻¹ (Tableau VI.2) dont 60% présentaient une membrane intègre, 0,06% étaient cultivables sur milieu non sélectif et 68% étaient détectées par la sonde universelle EUB338. Aucun coliforme cultivable (<1/100 mL) n'a été mis en évidence sur gélose sélective (TTC-tergitol). Les *Enterobacteriaceae* initialement présentes dans l'eau de réseau n'ont pas pu être dénombrées.

Juste après inoculation des différents milieux par *E. coli*, le nombre total de bactéries a été multiplié par 1,9 représentant $5,7 \cdot 10^5$ cellules mL⁻¹ en moyenne. Parmi cette population totale, 64% présentaient une membrane intègre, 53% et 55% étaient cultivables sur gélose non sélective et sélective respectivement, 81% étaient des *Eubacteria* (FISH-EUB338) et 41% des *Enterobacteriaceae* (dont *E. coli*). Ainsi, 90% des *E. coli* injectés à t_0 ont été détectés par la méthode FISH utilisant la sonde spécifique des *Enterobacteriaceae*. L'augmentation de la part de bactéries avec une membrane intègre, cultivables et marquées par FISH après l'inoculation indique que la population d'*E. coli* injectée présentait une activité physiologique plus importante que les bactéries autochtones de l'eau.

Tableau VI.2. Caractéristiques microbiologiques initiales de l'eau de réseau supplémentée ou non en MOD avant et après inoculation d'*E. coli* tous milieux confondus.

Méthodes de dénombrement	t ₀ avant injection d' <i>E. coli</i> (n=6)	t ₀ après injection d' <i>E. coli</i> (n=5)
Bactéries totales (Kit <i>BacLight</i>) (cellules mL ⁻¹)	3,15 10 ⁵ ± 5,66 10 ⁴	5,74 10 ⁵ ± 7,87 10 ⁴
Bactéries avec membrane intègre (Kit <i>BacLight</i>) (cellules mL ⁻¹)	1,88 10 ⁵ ± 6,70 10 ⁴	3,70 10 ⁵ ± 9,74 10 ⁴
Bactéries cultivables totales (gélose PCA, 15j, 22°C) (UFC mL ⁻¹)	2,03 10 ² ± 1,18 10 ²	3,02 10 ⁵ ± 5,18 10 ⁴
<i>Eubacteria</i> (FISH) (cellules mL ⁻¹)	2,13 10 ⁵ ± 4,29 10 ⁴	4,64 10 ⁵ ± 8,25 10 ⁴
<i>E. coli</i> cultivables (gélose TTC-tergitol, 24h, 37°C) (UFC mL ⁻¹)	<0,01	3,17 10 ⁵ ± 8,30 10 ⁴
<i>Enterobacteriaceae</i> (FISH) (cellules mL ⁻¹)	nd*	2,32 10 ⁵ ± 2,87 10 ⁴

*nd=non déterminé (lames illisibles du fait de débris trop nombreux).

VI.2.3. Comportement des bactéries autochtones dans l'eau de réseau non supplémentée en MOD et en absence d'*E. coli*

Avant d'étudier la survie d'*E. coli* dans une eau de réseau déchlorée supplémentée ou non en MOD, il paraît important de connaître le comportement des bactéries autochtones de l'eau de réseau durant une incubation à 22°C. En effet, le fait d'ajouter une concentration importante d'*E. coli* (de l'ordre de 10⁵ cellules mL⁻¹) risque de masquer l'évolution des bactéries initialement présentes dans l'eau de réseau et notamment en terme de cultivabilité. La figure VI.1.a montre d'ailleurs que lorsque l'eau de réseau déchlorée est incubée pendant 11 jours à 22°C, le nombre de bactéries cultivables augmente très fortement (+3 log). Le pourcentage de bactéries hétérotrophes cultivables passe ainsi de 0,06% à t=0 à 5% à t=11j avec un maximum atteignant 19% à t=7j. Ce phénomène, qui correspond soit à une croissance, soit à un regain de cultivabilité, est sans doute à relier à la conjonction de plusieurs facteurs : l'absence de chlore (neutralisé par ajout de thiosulfate avant l'incubation) éliminant ainsi la pression de sélection, la présence de MOD et la température d'incubation.

En parallèle de la cultivabilité, une augmentation du nombre total de cellules est observée correspondant à une croissance de 0,4 log en 7 jours. Le nombre de bactéries marquées par la sonde EUB338 montre une évolution similaire au nombre total. Enfin, l'intégrité membranaire des cellules bactériennes autochtones est améliorée durant l'incubation : le pourcentage de cellules présentant une membrane intègre déjà relativement fort à t=0 (67%) passe à 78% à t=11j avec un maximum à t=7j (81%).

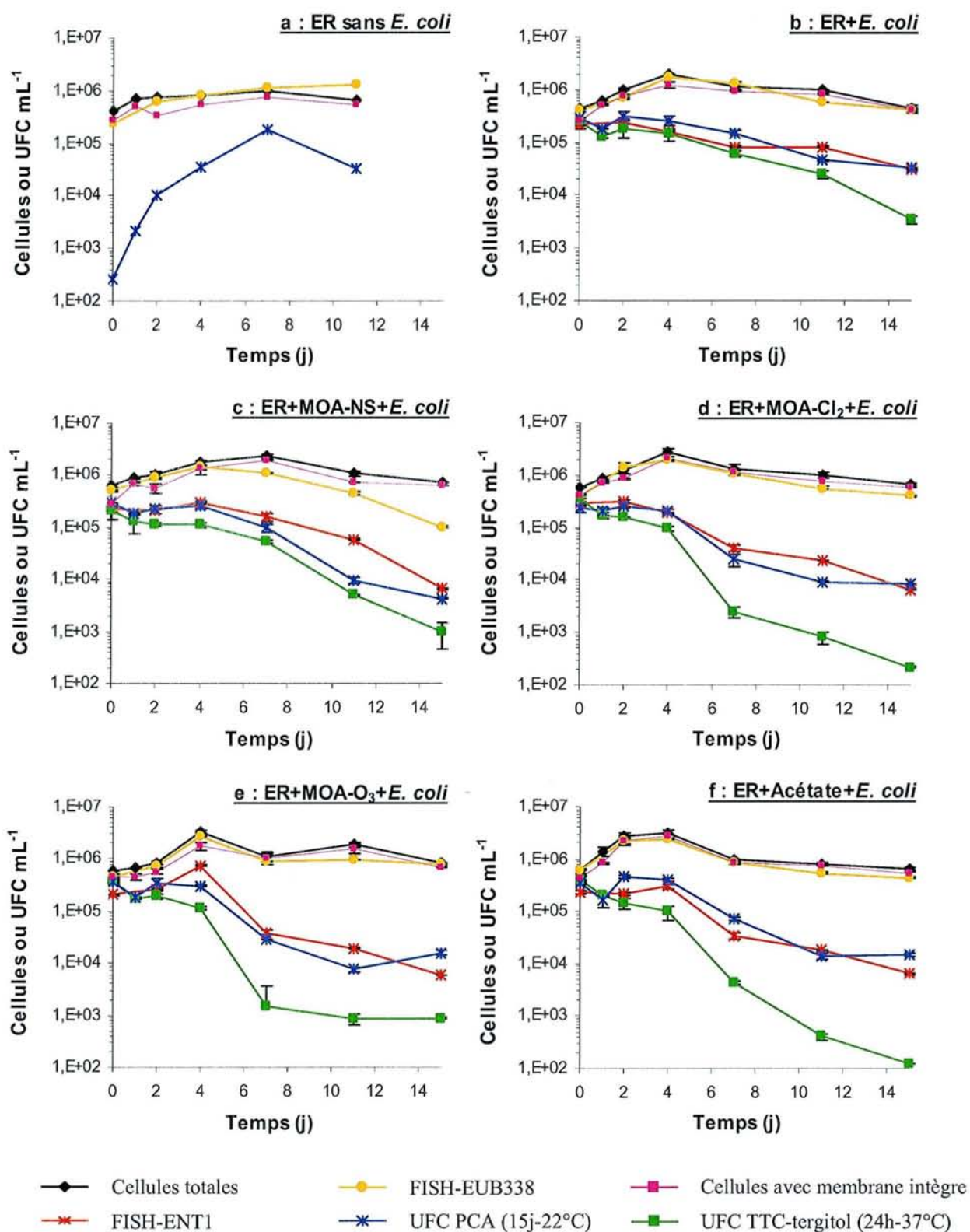


Figure VI.1. Suivi de la population bactérienne pendant 15 jours d'incubation dans chaque milieu testé et avec différentes méthodes de dénombrement. Chaque point correspond à la moyenne de deux mesures ($\pm$ écarts types).

VI.2.4. Effet de la MOA sur la population bactérienne totale (autochtone + *E. coli*)

Le comportement de la population bactérienne totale (autochtones + *E. coli*) a été caractérisé en mesurant l'évolution du nombre de bactéries grâce à quatre techniques de dénombrement ne permettant pas de distinguer la population autochtone de la population d'*E. coli* injectée : comptage microscopique du nombre total, du nombre de bactéries présentant une membrane intègre, du nombre de bactéries marquées par la sonde EUB338 et détermination du nombre de bactéries hétérotrophes cultivables (milieu non sélectif).

Quel que soit le milieu testé, l'évolution du nombre total de bactéries (autochtones + *E. coli*), mesuré par comptage microscopique, présente deux phases durant les 15 jours d'incubation (Figure VI.1.b à f) :

- une première phase entre 0 et 4 jours (jusqu'à 7 jours pour la MOA-NS) où le nombre total de bactéries augmente quelle que soit la nature de MOD testée et de manière parallèle au nombre de bactéries marquées par la sonde EUB338. Les productions cellulaires mesurées sont comprises entre 0,56 et 0,74 log (Tableau VI.3) et correspondent à une multiplication du nombre initial par 3,6 à 5,5. Le nombre de cellules produites est toujours supérieur lorsque de la MOD a été ajoutée à l'eau de réseau (Tableau VI.3). L'ajout de MOA-O₃ permet la croissance la plus importante devant l'acétate (respectivement, 1,7 et 1,6 fois celle de l'eau de réseau non supplémentée). Au contraire, la MOA-NS est celle qui permet la croissance la moins élevée. Cependant, le faible écart entre les productions cellulaires mesurées dans l'eau de réseau non supplémentée et l'eau de réseau supplémentée en MOD semble montrer que le fait d'ajouter 0,2 mg L⁻¹ de CODB provenant de la MOA ou de l'acétate n'a que peu d'influence sur la croissance bactérienne totale (*E. coli* + autochtone).

D'un point de vue cinétique, le nombre maximal de cellules est atteint plus ou moins rapidement selon les origines de MOD : le calcul des vitesses d'augmentation du nombre de cellules totales (pentes déterminées sur la partie linéaire) montre que l'acétate permet la croissance la plus rapide (0,32 log j⁻¹) devant la MOA-O₃ (0,24 log j⁻¹) alors que la MOA-NS induit la vitesse la plus lente (0,08 log j⁻¹). Des vitesses similaires sont mesurées dans la MOA-Cl₂ et l'eau de réseau non supplémentée (0,17 log j⁻¹). Ces écarts de vitesse reflètent sans doute des différences d'affinité de chaque MOD testée avec les bactéries.

- une deuxième phase à partir du 4^{ème} jour où le nombre total de bactéries diminue jusqu'à la fin de l'expérience. Cette diminution, relativement comparable d'un milieu à l'autre, varie de -0,5 à

-0,7 log (Tableau VI.3). Elle peut être associée soit à une adsorption des bactéries à la surface des flacons, soit à une lyse bactérienne (suite à la mort cellulaire), soit à une prédation par les protistes initialement présents dans l'eau de réseau. Le nombre de bactéries marquées par la sonde EUB338 diminue parallèlement au nombre total de cellules. En effet, la perte de cellules est comparable qu'elle soit estimée par mesure du nombre total ou du nombre d'*Eubacteria* hybridées (Tableau VI.3). Seule la MOA-NS induit une diminution plus rapide des *Eubacteria* que du nombre total (-1,1 log entre le 4^{ème} et le 15^{ème} jour contre -0,4 log) suggérant que l'activité physiologique d'une fraction des *Eubacteria* diminue en rendant le signal fluorescent trop faible pour être détecté ; en effet, le marquage FISH est dépendant du nombre de ribosomes présents dans la cellule, lui-même dépendant du taux de croissance.

Tableau VI.3. Nombre de cellules totales produites durant l'incubation ($N_{\max}-N_0$) et évolution du nombre de bactéries (totales ou marquées par la sonde EUB338) (exprimée en log) lors de la première (0-4 j) et de la deuxième phase (4-15 j).

Milieu testé	Nombre de cellules totales produites en 15j (mL^{-1})	Evolution du nombre de bactéries (log)			
		1 ^{ère} phase (0 - 4 j)*		2 ^{ème} phase (4 - 15 j)**	
		Cellules totales	EUB338	Cellules totales	EUB338
ER	$1,55 \cdot 10^6$	+0,66	+0,62	-0,65	-0,63
ER+MOA-NS	$1,69 \cdot 10^6$	+0,56	+0,44	-0,50	-1,14
ER+MOA-Cl ₂	$2,24 \cdot 10^6$	+0,68	+0,73	-0,63	-0,70
ER+MOA-O ₃	$2,70 \cdot 10^6$	+0,74	+0,78	-0,61	-0,54
ER+Acétate	$2,50 \cdot 10^6$	+0,70	+0,62	-0,69	-0,74

* et ** : Pour l'échantillon ER+MOA-NS, 1^{ère} phase = 0-7j, 2^{ème} phase = 7-15j

Le nombre de cellules présentant une membrane intègre évolue également de manière parallèle au nombre total de cellules (Figure VI.1) et semble montrer que la période d'incubation est favorable à la population bactérienne totale : en effet, le pourcentage de bactéries possédant une membrane intègre est significativement plus élevé en fin de l'expérience (Man Whitney, $p=0,009$) quel que soit le milieu testé : en moyenne, il est de $64 \pm 14\%$ à $t=0$ contre $86 \pm 4\%$ à $t=15$ j.

Les résultats obtenus sur gélose non sélective (PCA) montrent que durant les 4 premiers jours, le nombre de bactéries hétérotrophes cultivables (autochtones + *E. coli*) reste relativement stable alors qu'une croissance est observée en parallèle (Figure VI.1.b à f). L'ajout de MOD dans l'eau de réseau ne permet pas de favoriser la cultivabilité bactérienne par comparaison à l'eau de réseau non supplémentée. Par contre, à partir du 4^{ème} jour d'incubation, la cultivabilité chute jusqu'au 11^{ème} jour puis semble se stabiliser entre $4,2 \cdot 10^3$ et $3,2 \cdot 10^4$ UFC mL^{-1} selon le milieu. Cette baisse de cultivabilité est légèrement plus forte en présence de MOD (perte en 15 j = -1,84 à -1,35 log contre

-0,95 log dans l'eau non supplémentée). Cette baisse est attribuable préférentiellement à la population d'*E. coli* injectée car (i) le témoin dans lequel aucun *E. coli* n'a été inoculé (Figure VI.1.a) montre que les autochtones augmentent fortement leur cultivabilité, ce signal étant masqué par la population d'*E. coli*, et (ii) l'écart qui se crée entre le nombre de bactéries cultivables mesuré sur milieu PCA et celui mesuré sur milieu TTC-tergitol (spécifique des *E. coli*) à partir du 7^{ème} jour dans la plupart des flacons permet de dire qu'à partir de ce moment, les bactéries mises en évidence sur gélose PCA correspondent majoritairement aux hétérotrophes autres que *E. coli*. Le pourcentage de bactéries cultivables représente de 1 à 7% des cellules totales à t=15 jours contre 0,06% à t=0 (avant inoculation d'*E. coli*), ce qui suggère que l'eau de réseau déchlorée, qu'elle soit supplémentée ou non en MOD, est favorable aux bactéries autochtones.

VI.2.5. Effet de la MOA sur la population d'*E. coli* injectée

Pour étudier spécifiquement le comportement de la population d'*E. coli* injectée parmi la population totale, deux méthodes de dénombrement ont été utilisées : la technique FISH utilisant une sonde spécifique des *Enterobacteriaceae* (ENT1) et la culture sur milieu sélectif (gélose au TTC-Tergitol).

Comme pour le nombre total de bactéries, l'évolution du nombre d'*E. coli* marqués par la sonde ENT1 présente deux phases (Figure VI.1.b à f). Durant les quatre premiers jours, le nombre d'*E. coli* reste stable (maximum 0,1 log d'augmentation) dans tous les milieux testés (excepté dans la MOA-O₃), alors que le nombre d'Eubactéries augmente parallèlement et qu'une croissance est observable (0,6 à 0,7 log). La croissance observée est donc majoritairement imputable aux bactéries autochtones de l'eau de réseau autres que les Entérobactéries. En effet, seuls 1 à 4% des cellules produites sont des *E. coli* (Tableau VI.4) sauf dans la MOA-O₃ où le pourcentage atteint 20% (+0,6 log). L'ajout de MOA-O₃ est donc la seule MOD qui permette à la population d'*E. coli* de se multiplier significativement et/ou d'améliorer son activité physiologique en augmentant son niveau de ribosomes (permettant ainsi de visualiser des bactéries non détectables auparavant de part une trop faible intensité de fluorescence). Cependant, quel que soit le milieu testé, le nombre de cellules produites (calculées sur le nombre de bactéries marquées par la sonde ENT1) est toujours supérieur lorsque de la MOD a été ajoutée dans l'eau de réseau (facteur 1,1 à 19) (Tableau VI.4).

Tableau VI.4. Nombre de cellules totales et d'*E. coli* produites ($N_{\max}$ - N_0) durant les 4 premiers jours d'incubation dans les différents milieux testés.

	Nombre de cellules produites (/mL)		Fraction de cellules produites étant des <i>E. coli</i>
	Cellules totales	<i>E. coli</i>	
ER	1,55 10^6	2,8 10^4	2%
ER+MOA-NS	1,69 10^6	6,8 10^4	4%
ER+MOA-Cl ₂	2,24 10^6	3,2 10^4	1%
ER+MOA-O ₃	2,70 10^6	5,3 10^5	20%
ER+Acétate	2,50 10^6	7,6 10^4	3%

Après 4 jours d'incubation, le nombre d'*E. coli* détectés par FISH diminue jusqu'à la fin de l'expérience (-0,7 à -2,1 log), où néanmoins de $6 \cdot 10^3$ à $3 \cdot 10^4$ *E. coli* mL⁻¹ sont encore détectés montrant qu'il persiste une population physiologiquement active dont 2 à 15% restent cultivables.

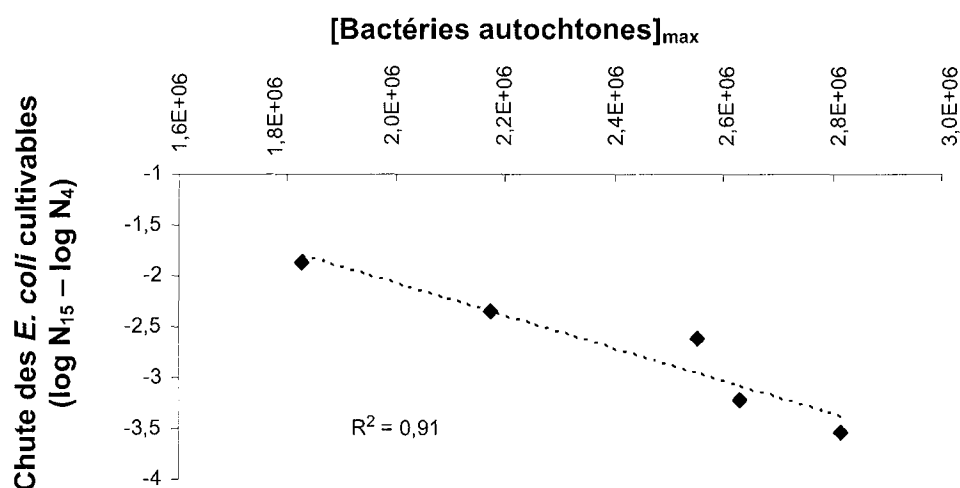
D'autre part, le nombre d'*E. coli* hybridés (sonde ENT1) chute plus vite que le nombre d'Eubactéries (sonde EUB338) (Figure VI.1) ce qui signifie (i) que la chute des Eubactéries n'est pas uniquement due à la chute des *E. coli* et (ii) que l'activité physiologique des *E. coli* baisse. En effet, en considérant que les cellules bactériennes s'accrochent aux parois ou sont ingérées par les protistes indépendamment de leur origine (autochtones ou *E. coli*), la chute plus rapide du nombre de bactéries détectées par la sonde ENT1 par rapport à celles détectées par la sonde EUB338 suggère que les milieux testés (ER±MOD) profitent plus aux bactéries autochtones qu'aux *E. coli*, même dans la MOA-O₃ qui permettait une croissance significative d'*E. coli*.

De manière surprenante, les vitesses de décroissance des cellules marquées par la sonde ENT1 sont 2 à 3 fois plus rapides dans l'eau de réseau supplémentée en MOD que dans l'eau de réseau non supplémentée suggérant que l'ajout de MOD a un effet défavorable sur cette population bactérienne (Tableau VI.5). La compétition entre la population autochtone et les *E. coli* peut être un élément de réponse pour expliquer ce phénomène. En effet, l'ajout de MOD profitant principalement aux bactéries autochtones (production cellulaire comprise entre 0,6 et 0,7 log), celles-ci se multiplient et deviennent plus nombreuses ; ainsi, alors que les *E. coli* représentaient 41% de la population totale à t=0, ils ne représentent plus que 13% à t=4 jours (tous milieux confondus).

Tableau VI.5. Vitesse de décroissance (pente) des cellules marquées par la sonde ENT1 (FISH) entre le 4^{ème} et le 15^{ème} jour d'incubation dans les différents milieux testés.

Milieu testé	Pente de décroissance entre le 4 ^{ème} et le 15 ^{ème} jour ($\log j^{-1}$)
ER	-0,059
ER+MOA-NS	-0,148
ER+MOA-Cl ₂	-0,124
ER+MOA-O ₃	-0,174
ER+Acétate	-0,140

Ces résultats sont corroborés par ceux obtenus sur gélose sélective qui permettent de suivre l'évolution du nombre d'*E. coli* cultivables (Figure VI.1). En effet, d'un point de vue global sur les 15 jours d'incubation, le nombre d'*E. coli* cultivables chute de -1,9 à -3,5 log selon le milieu testé (Tableau VI.6). L'addition de MOD dans l'eau de réseau s'avère défavorable à la cultivabilité d'*E. coli* (chute 1,3 à 1,9 fois plus forte). Ces résultats sont donc en accord avec les signaux obtenus par la technique FISH et l'hypothèse d'une compétition accrue entre autochtones et *E. coli* lorsque de la MOD est ajoutée à l'eau de réseau. D'ailleurs, la diminution du nombre d'*E. coli* cultivables, bien qu'observée tout au long de l'incubation, est plus rapide (2 à 4 fois) à partir du 4^{ème} jour, quand le nombre de cellules totales (représentées principalement par les autochtones) atteint son maximum (Tableau VI.6), en accord avec les signaux observés en FISH. D'ailleurs, la figure VI.2 semble montrer que plus le nombre de bactéries autochtones totales est important dans le milieu, plus le nombre d'*E. coli* cultivables chute rapidement. Il s'agirait donc d'un effet indirect de l'ajout de MOD, celle-ci n'étant pas réellement défavorable à la survie d'*E. coli* (cf chapitre précédent).


Figure VI.2. Relation entre le nombre maximal de bactéries autochtones totales (bactéries totales - *E. coli*) dans le milieu et la décroissance du nombre d'*E. coli* cultivables ($\log N_{15} - \log N_4$).

D'autre part, la chute de cultivabilité d'*E. coli* s'effectue plus rapidement que le nombre d'*E. coli* marqués par la sonde ENT1, ce qui traduit une perte de la capacité à cultiver et/ou une mort des bactéries.

La nature de la MOD ajoutée à l'eau de réseau ne semble pas avoir d'impact fort sur la survie d'*E. coli* ; cependant, la MOA-O₃ se distingue des autres MOD car (i) c'est la seule qui permette d'augmenter significativement le nombre d'*E. coli* (FISH) et, (ii) contrairement aux autres MOD testées où les UFC chutent régulièrement jusqu'à la fin de l'expérience, une stabilisation de la cultivabilité d'*E. coli* est observée dans la MOA-O₃ à partir de 7 jours d'incubation.

Tableau VI.6. Evolution de la cultivabilité d'*E. coli* sur milieu sélectif (gélose au TTC-tergitol) et vitesse de décroissance durant les deux phases (0 à 4 jours et 4 à 15 jours).

	Evolution globale de la cultivabilité (log)	Vitesse de décroissance (log j ⁻¹)	
	0-15 j	0-4j	4-15j
ER	-1,89	-0,040	-0,144
ER+MOA-NS	-2,36	-0,063	-0,197
ER+MOA-Cl ₂	-3,22	-0,130	-0,222
ER+MOA-O ₃	-2,61	-0,108	-0,170
ER+Acétate	-3,53	-0,145	-0,260

En conclusion, les résultats de ces travaux ont permis de montrer 3 points remarquables :

- l'ajout de MOA dans l'eau de réseau déchlorée profite majoritairement aux bactéries autochtones de l'eau et non à la population d'*E. coli* injectée (augmentation des Eubactéries (autres qu'*E. coli*) 3 à 50 fois plus forte que celle des *E. coli*).
- l'ajout de MOA provoque une chute plus rapide des concentrations en *E. coli* totaux (FISH-sonde ENT1) et cultivables sur les 15 jours d'expérience, sans doute à cause de phénomènes de compétition avec la population autochtone dont les proportions sont supérieures lorsque de la MOD est ajoutée (effet indirect de la MOA).
- seule la MOA-O₃ favorise visiblement la population d'*E. coli* injectée sur les premiers jours d'incubation puisqu'une augmentation significative du nombre d'*E. coli* a été observée (0,6 log).

VI.3. Effet de la MOA sur le comportement d'*E. coli* en suspension et fixé en conditions dynamiques

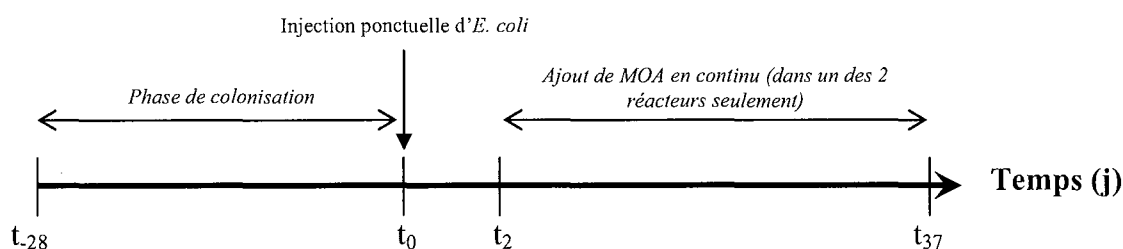
L'objectif des travaux présentés dans cette partie était de caractériser le comportement d'*E. coli* en phase planctonique et fixée dans un système dynamique (réacteur Propella™) alimenté en

continu par de l'eau de réseau supplémentée ou non en MOA. Une seule nature de MOA a été testée dans ces essais : il s'agit de la matière organique naturellement sécrétée par les algues (MOA-NS). Les résultats bruts sont présentés en annexe X.3.2.

VI.3.1. Protocole expérimental

Deux Propella™, dont les caractéristiques sont détaillées au § III.11, sont alimentés en continu par de l'eau de réseau de Nancy pendant 4 semaines de manière à les coloniser avec les bactéries autochtones de l'eau et atteindre un état de pseudo-équilibre. L'alimentation des réacteurs se fait par l'intermédiaire de réservoirs renouvelés tous les jours (dispositif décrit au § III.11). Deux mL d'une suspension d'*E. coli* (préparée comme décrit au § III.5) sont injectés dans les deux réacteurs. La concentration de l'inoculum est ajustée de manière à obtenir une concentration de l'ordre de 10^8 *E. coli* mL⁻¹ en concentration finale.

Les pilotes sont arbitrairement laissés pendant une heure sans alimentation et sous agitation afin de permettre une répartition homogène des *E. coli* dans les réacteurs. Puis, l'alimentation est remise en fonction et un échantillon (t=0) est prélevé dans l'eau en entrée (réservoirs) et en sortie de réacteur ainsi qu'au niveau du biofilm par prélèvement d'un coupon (procédure décrite au § III.11.3). Les concentrations en *E. coli* dans l'eau en sortie des pilotes et dans le biofilm sont suivies pendant 2 jours puis l'eau alimentant un des deux réacteurs est supplémentée continuellement en MOA-NS de manière à ajouter théoriquement +0,2 mg CODB L⁻¹. Cet ajout de MOA est effectué tous les jours dans le réservoir d'entrée jusqu'à la fin de l'expérience. Les concentrations en *E. coli* sont suivies pendant 35 jours supplémentaires après l'ajout de MOA dans un des deux réacteurs. Les analyses microbiologiques effectuées sur l'eau en entrée et en sortie de réacteur ainsi que sur le biofilm sont : la quantification du nombre de bactéries totales (Kit BacLight), de bactéries marquées par la sonde ENT1 (FISH), de bactéries hétérotrophes cultivables (UFC) sur milieu non sélectif (gélose PCA), d'*E. coli* cultivables (UFC) sur milieu sélectif (gélose TTC-tergitol). Les analyses physico-chimiques effectuées sur l'eau (entrée et sortie) sont : le COD, le CODB, le chlore résiduel, le pH et la conductivité. Le matériel et les méthodes utilisées sont détaillés au chapitre III. La séquence temporelle des gestes effectués sur les réacteurs est représentée schématiquement ci-dessous :



VI.3.2. Caractéristiques initiales des réacteurs avant et après injection d'*E. coli*

Le tableau VI.7 détaille les caractéristiques moyennes des deux réacteurs juste avant et juste après l'injection d'*E. coli* (aucun des réacteurs n'a encore reçu de MOA). L'eau d'entrée présente un pH de 7,3 et une conductivité de $432 \mu\text{S cm}^{-1}$. Le COD de l'eau de réseau alimentant les deux réacteurs est de $1,9 \text{ mg L}^{-1}$ dont 7% de CODB.

Avant injection d'*E. coli*, les concentrations en COD et CODB de l'eau de sortie montrent que tout le CODB et une partie du COD ($-0,41 \text{ mg COD L}^{-1}$) ont été consommés à l'intérieur des réacteurs. En parallèle de cette consommation de matière organique, une légère production bactérienne ($+0,2 \text{ log}$) est observée entre l'entrée et la sortie des réacteurs suggérant que les bactéries se multiplient. Parmi la population totale de bactéries, 7% sont cultivables sur gélose non sélective dans l'eau d'entrée contre 17% dans l'eau de sortie. Les concentrations en *Enterobacteriaceae* n'évoluent pas entre l'entrée et la sortie des réacteurs. Elles représentent 0,5% dans l'eau d'entrée et 0,2% dans l'eau de sortie. Aucun coliforme cultivable n'est détecté en entrée et en sortie de réacteur ($<0,01 \text{ UFC mL}^{-1}$). Dans le biofilm, $1,75 \cdot 10^6 (\pm 2,55 \cdot 10^5)$ cellules totales cm^{-2} sont mesurées. Les bactéries cultivables sur gélose non sélective et celles marquées par la sonde ENT1 (FISH) représentent respectivement 7% et 0,4% de la population bactérienne totale.

La concentration théorique d'*E. coli* injectés dans chaque Propella™ est de $6,8 \cdot 10^8$ cellules mL^{-1} . Une heure après l'injection, la concentration moyenne d'*E. coli* totaux mesurée expérimentalement dans l'eau de sortie des réacteurs, estimée par le nombre de bactéries hybridées avec la sonde ENT1, est de $2,9 \cdot 10^8 (\pm 1,8 \cdot 10^7)$ cellules mL^{-1} ($+6,2 \text{ log}$ par rapport au niveau initial). L'injection massive d'*E. coli* à $t=0$ se traduit par une augmentation moyenne de 3,8 log en terme de bactéries totales, de 4,7 log en terme de bactéries cultivables et de plus de 10,2 log en terme d'*E. coli* cultivables dans l'eau de sortie des réacteurs (Tableau VI.7). Dans le biofilm, l'injection d'*E. coli* provoque une augmentation de 1,1 log en terme de bactéries totales, de 3,2 log en terme d'Entérobactéries, de 3,1 log en terme de bactéries cultivables et de plus de 7,2 log en terme d'*E. coli* cultivables. L'écart observé entre les concentrations en bactéries ou *E. coli* cultivables et celles en bactéries ou Entérobactéries totales résulte sans doute d'une sous-estimation de nos mesures effectuées en épifluorescence (bruit de fond important sur ce prélèvement). Le calcul de la quantité totale de bactéries présentes dans la phase libre et dans la phase fixée¹ montre que seulement 6% des *E. coli* injectés (FISH) sont fixés sur les parois 1 h après l'injection.

¹ L'estimation de la surface du Propella™ (surface= 3293 cm^2) prend en compte le corps externe, le corps interne, les parties inférieures et supérieures, mais ne tient pas compte des différents paramètres propres à chaque matériaux qui entrent en jeu dans l'estimation de leur affinité vis-à-vis des biofilms.

Tableau VI.7. Caractéristiques physico-chimiques et microbiologiques des 2 réacteurs avant injection d'*E. coli* (état de pseudo-équilibre) et juste après injection d'*E. coli* (t=1h). Aucun des deux réacteurs n'a encore reçu de MOA-NS. Les chiffres entre parenthèses correspondent au nombre de mesures effectuées.

	Moyenne ($\pm$ écarts types) des 2 Propella™	
	Avant injection d' <i>E. coli</i>	Après injection d' <i>E. coli</i>
Eaux d'entrée (réservoirs)		
pH	7,3 $\pm$ 0,2 (3)	
Conductivité ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	432 $\pm$ 56 (3)	
COD (mg L ⁻¹)	1,90 (1)	
CODB (mg L ⁻¹)	0,13 (1)	
Chlore libre résiduel (mg L ⁻¹)	0,01 $\pm$ 0,005 (5)	
Bactéries totales (cellules mL ⁻¹)	5,53 10 ⁴ $\pm$ 7,07 10 ³ (2)	
Bactéries hybridées avec la sonde ENT1 (cellules mL ⁻¹)	2,84 10 ² (1)	
Bactéries hétérotrophes cultivables (UFC mL ⁻¹)	3,80 10 ³ $\pm$ 6,33 10 ³ (3)	
<i>E. coli</i> cultivables (UFC mL ⁻¹)	<0,01 (4)	
Eaux de sortie		
pH	7,1 $\pm$ 0,3 (8)	7,4 $\pm$ 0 (2)
Conductivité ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	411 $\pm$ 32 (8)	445 $\pm$ 0 (2)
COD (mg L ⁻¹)	1,49 $\pm$ 0,01 (2)	nd*
CODB (mg L ⁻¹)	0,01 (1)	nd*
Chlore libre résiduel (mg L ⁻¹)	<0,01 $\pm$ 0 (5)	<0,01 $\pm$ 0 (2)
Bactéries totales (cellules mL ⁻¹)	8,74 10 ⁴ $\pm$ 2,21 10 ⁴ (2)	5,07 10 ⁸ $\pm$ 0 (2)
Bactéries hybridées avec la sonde ENT1 (cellules mL ⁻¹)	2,03 10 ² $\pm$ 0 (2)	2,92 10 ⁸ $\pm$ 1,77 10 ⁷ (2)
Bactéries hétérotrophes cultivables (UFC mL ⁻¹)	1,47 10 ⁴ $\pm$ 1,22 10 ⁴ (8)	2,94 10 ⁸ $\pm$ 2,87 10 ⁸ (2)
<i>E. coli</i> cultivables (UFC mL ⁻¹)	<0,01 $\pm$ 0 (2)	1,75 10 ⁸ $\pm$ 3,54 10 ⁸ (2)
Biofilms		
Bactéries totales (cellules cm ⁻²)	1,75 10 ⁶ $\pm$ 2,55 10 ⁵ (2)	2,42 10 ⁷ $\pm$ 2,90 10 ⁶ (2)
Bactéries hybridées avec la sonde ENT1 (cellules cm ⁻²)	7,18 10 ³ $\pm$ 0 (2)	1,12 10 ⁷ $\pm$ 7,07 10 ⁵ (2)
Bactéries hétérotrophes cultivables (UFC cm ⁻²)	1,22 10 ⁵ $\pm$ 1,15 10 ⁵ (8)	5,76 10 ⁷ $\pm$ 1,14 10 ⁷ (2)
<i>E. coli</i> cultivables (UFC cm ⁻²)	<1,42 (2)	2,47 10 ⁷ $\pm$ 1,24 10 ⁷ (2)

*nd=non déterminé

VI.3.3. Caractéristiques des eaux alimentant les réacteurs après supplémentation en MOA

Le tableau VI.8 présente les résultats d'analyses effectuées sur l'eau alimentant les deux réacteurs pendant toute la durée de l'expérience à partir du moment où de la MOA-NS a été ajoutée continuellement dans un des 2 réacteurs (t=2j). L'ajout de MOA augmente significativement ($p=0,05$) les concentrations en COD (+0,41 mg L^{-1}) et CODB (+0,33 mg L^{-1}) de l'eau d'entrée, mais ne modifie pas le pH et la conductivité de l'eau. Les caractéristiques microbiologiques ne sont pas non plus significativement modifiées par l'ajout de MOA (Tableau VI.8).

Tableau VI.8. Caractéristiques physico-chimiques et microbiologiques moyennes ($\pm$ écarts types) des eaux alimentant les réacteurs durant toute la durée de l'expérience à partir du moment où de la MOA a été ajoutée en entrée dans un des deux réacteurs ($t=2j$).

	Propella™ sans MOA	Propella™ avec MOA	n*
pH	7,2 $\pm$ 0,2	7,3 $\pm$ 0,3	5
Conductivité ($\mu S\ cm^{-1}$)	426,8 $\pm$ 42,8	423,6 $\pm$ 42,2	5
Chlore libre résiduel ($mg\ L^{-1}$)	0,01 $\pm$ 0,05	0,01 $\pm$ 0,05	5
COD ($mg\ L^{-1}$)	1,97 $\pm$ 0,48	2,38 $\pm$ 0,60	5
CODB ($mg\ L^{-1}$)	0,20 $\pm$ 0,19	0,53 $\pm$ 0,43	4
Bactéries totales (cellules mL^{-1})	8,59 $10^4 \pm 3,68\ 10^4$	8,53 $10^4 \pm 3,56\ 10^4$	6
Bactéries hybridées avec la sonde ENT1 (cellules mL^{-1})	1,62 $10^2 \pm 9,25\ 10^1$	1,69 $10^2 \pm 7,87\ 10^1$	6
Bactéries hétérotrophes cultivables (UFC mL^{-1})	1,81 $10^3 \pm 4,11\ 10^3$	1,84 $10^3 \pm 4,11\ 10^3$	7
<i>E. coli</i> cultivables (UFC mL^{-1})	<0,01	<0,01	19

*n=nombre de mesures effectuées

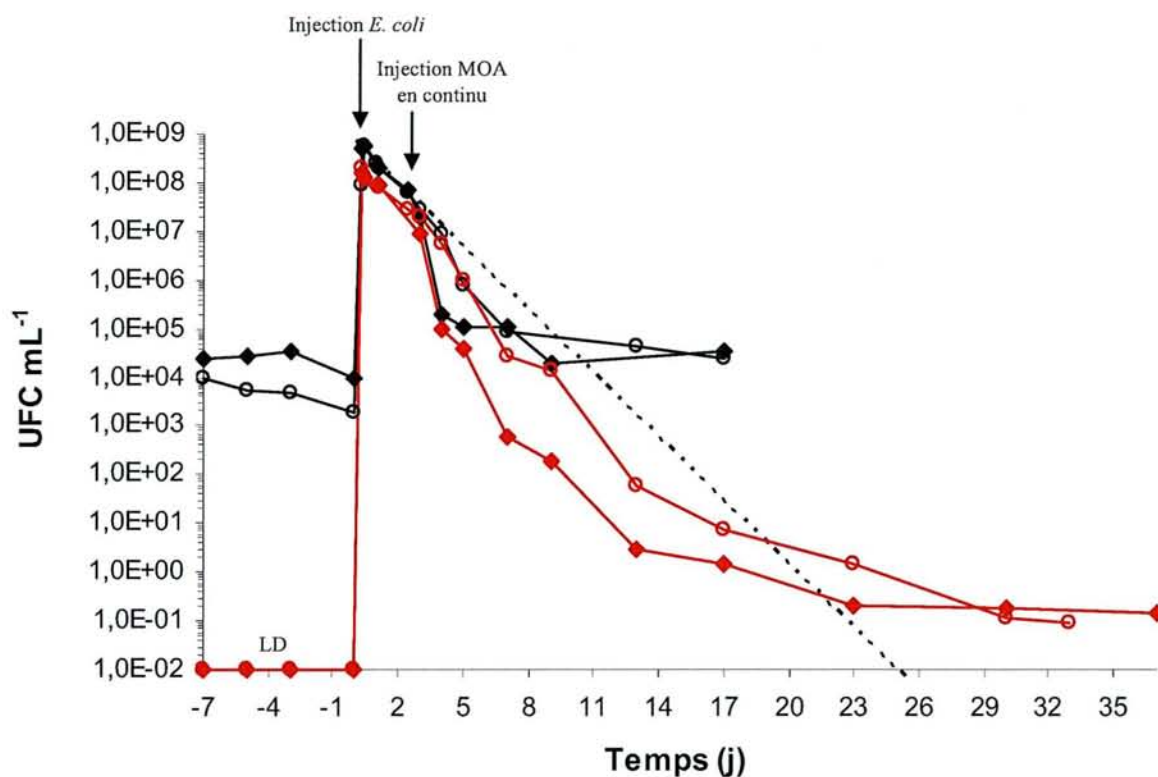
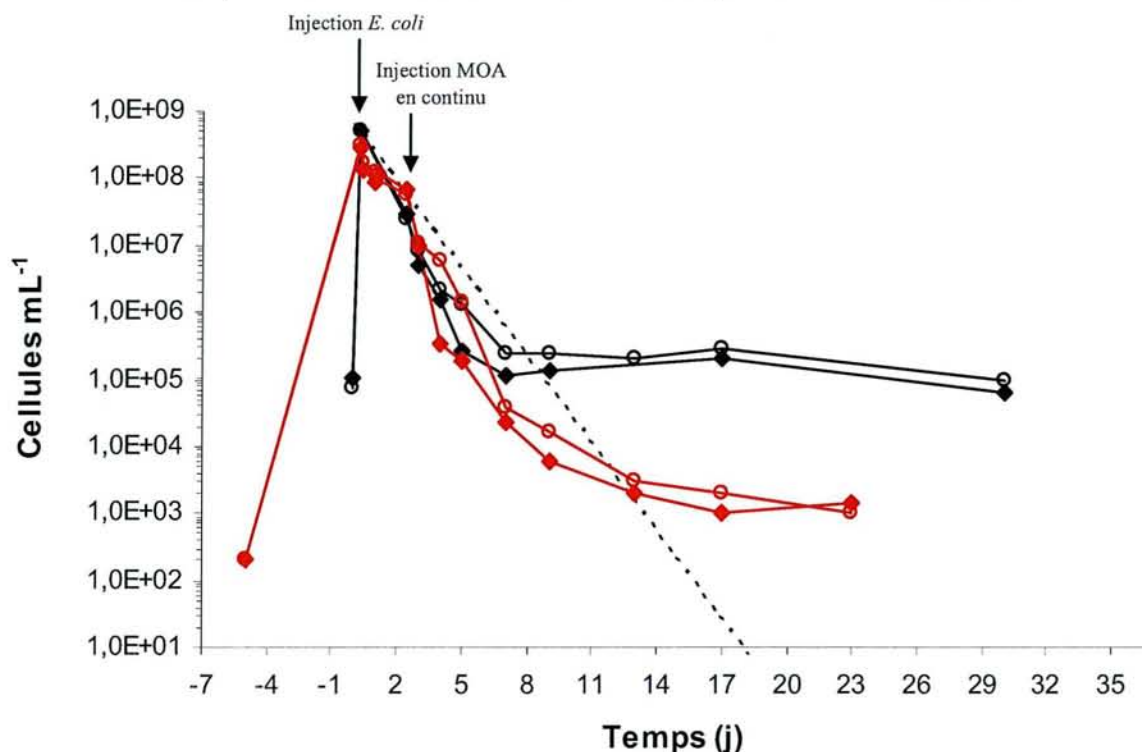
VI.3.4. Effet de la MOA sur l'évolution des bactéries en suspension

L'évolution au cours du temps des concentrations en bactéries totales et *E. coli* totaux (sonde ENT1) ainsi que celle des concentrations en bactéries hétérotrophes cultivables et *E. coli* cultivables dans l'eau de sortie des deux réacteurs sont présentées respectivement aux figures VI.3 et VI.4.

De manière logique, sur les 5 premiers jours, la population bactérienne totale étant majoritairement représentée par la population d'*E. coli* injectée, les courbes représentant les cellules totales et les *E. coli* totaux sont donc superposées. Il en est de même pour les courbes représentant les hétérotrophes cultivables et les *E. coli* cultivables.

La population d'*E. coli* injectée n'est pas capable de coloniser durablement les réacteurs. Au cours des 2 premiers jours suivants l'injection d'*E. coli* (avant MOA), les quatre paramètres microbiologiques mesurés montrent une décroissance régulière parallèle à la droite théorique de lessivage, indiquant une élimination de la population injectée par le flux d'eau. Puis, indépendamment de l'ajout de MOA dans l'un des deux réacteurs (à $t=2\ j$), le nombre de bactéries totales et cultivables ainsi que le nombre d'*E. coli* totaux et cultivables présentent une décroissance plus rapide que si les bactéries subissaient uniquement un lessivage, suggérant soit une adsorption d'une fraction de la population des *E. coli* injectés à la surface des réacteurs, soit une lyse des cellules, soit un phénomène de prédation accru des bactéries.

A partir du 7^{ème} jour, les concentrations en cellules totales et cultivables diminuent moins rapidement et « croisent » la courbe de lessivage théorique pour se stabiliser à un niveau légèrement supérieur à celui avant injection (facteur 1,1 à 3), surtout dans le Propella™ supplémenté en MOA. La décroissance des concentrations en *E. coli* totaux et *E. coli* cultivables s'infléchit à partir du 17^{ème} et du 30^{ème} jour.



Le croisement de la courbe théorique avant le retour à l'état initial traduit probablement une croissance des *E. coli*, insuffisante toutefois pour observer un maintien des concentrations. A la fin de l'expérience, les concentrations d'*E. coli* totaux et cultivables mesurées sont encore supérieures de près de 1 log par rapport au niveau initial, indépendamment de l'ajout de MOA. A titre d'exemple, après 37 jours, 14 *E. coli* cultivables /100 mL sont encore détectés (contre <1 UFC/100 mL avant injection).

Les concentrations des quatre paramètres microbiologiques mesurés ne montrent pas de différence statistiquement significative ($p>0,05$) entre le Propella™ sans MOA et celui avec MOA. Cependant, l'ajout de MOA se traduit par des concentrations en bactéries totales, hétérotrophes cultivables, *E. coli* totaux et *E. coli* cultivables en sortie de Propella™ avec MOA toujours supérieures à celles observées dans le Propella™ sans MOA, et ceci dès le 3^{ème} jour (24 h après ajout de MOA). A titre d'exemple, 4 jours après injection d'*E. coli* (soit 2 jours après ajout en continu de MOA), l'écart observé entre la concentration de *E. coli* totaux dans le Propella™ avec MOA et sans MOA est de 1,2 log. L'effet est plus marqué pour les *E. coli* cultivables avec 1,7 log d'écart.

Les vitesses de décroissance calculées sur les 7 premiers jours sont en effet 1,2 fois plus lentes dans le Propella™ supplémenté en MOA que dans le Propella™ sans MOA (Tableau VI.9) en ce qui concerne les concentrations en bactéries totales, *E. coli* totaux et bactéries hétérotrophes cultivables. L'effet est plus marqué au niveau des *E. coli* cultivables avec une décroissance durant les 7 premiers jours 1,5 fois moins rapide dans le réacteur supplémenté en MOA (Tableau VI.9).

La fraction cultivable des *E. coli* injectés chute d'ailleurs plus rapidement dans le réacteur non supplémenté en MOA (Figure VI.5), suggérant que les *E. coli* conservent plus longtemps leur capacité à cultiver lorsque de la MOA est ajoutée. Ainsi, après 7 jours, 72% des *E. coli* sont encore cultivables dans le réacteur supplémenté en MOA contre 3% dans le réacteur sans MOA.

Tableau VI.9. Vitesses de décroissance des concentrations en bactéries totales, *E. coli* totaux (FISH-sonde ENT1), bactéries hétérotrophes totales cultivables (gélose non sélective PCA) et *E. coli* cultivables (gélose sélective au TTC-tergitol) dans l'eau de sortie calculées sur les 7 premiers jours.

Paramètre mesuré	Vitesse de décroissance ($\log j^{-1}$)	
	Propella™ sans MOA	Propella™ avec MOA
Bactéries totales	-0,57	-0,49
<i>E. coli</i> totaux	-0,64	-0,53
Hétérotrophes cultivables (15j, 22°C)	-0,66	-0,54
<i>E. coli</i> cutivables (24h, 37°C)	-0,82	-0,54

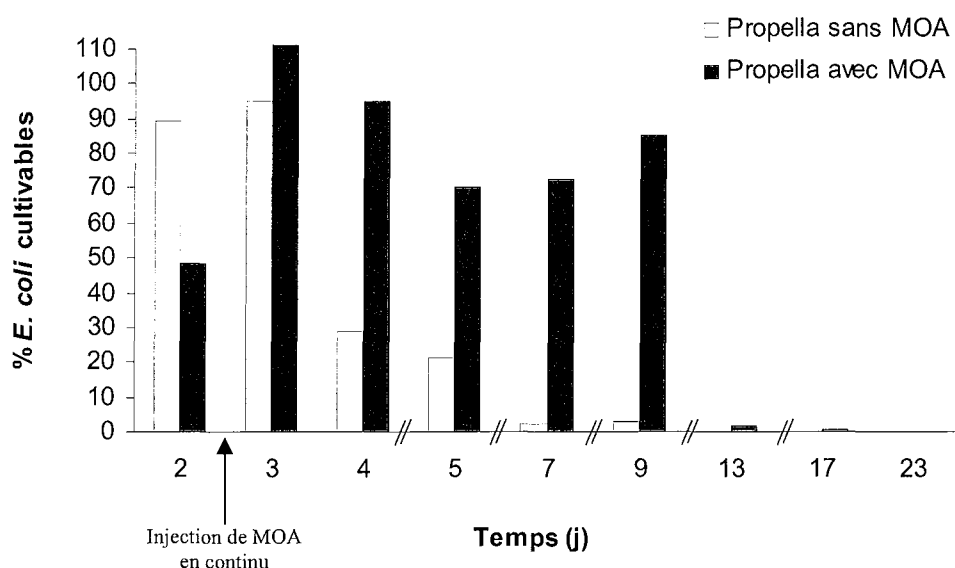


Figure VI.5. Pourcentage d'*E. coli* cultivables (sur gélose sélective au TTC-tergitol, 24h, 37°C) par rapport aux *E. coli* totaux (mesurés par FISH-ENT1) en fonction du temps dans les deux réacteurs.

VI.3.5. Effet de la MOA sur l'évolution des bactéries fixées

La fraction d'*E. coli* fixés sur les parois des Propella™ 1 h après injection ne représente en moyenne que 6% de la quantité totale d'*E. coli* dans les réacteurs, ce qui correspond à une concentration initiale moyenne dans le biofilm de $1,12 \cdot 10^7$ *E. coli* cm⁻². Comme dans la phase eau, l'évolution des concentrations en bactéries totales et cultivables durant les premiers jours est contrôlée par celle des concentrations en *E. coli* totaux et cultivables puisqu'*E. coli* représente une proportion importante de la population totale (43 à 74%) (Figures VI.6 et VI.7).

Les concentrations en bactéries totales et *E. coli* totaux restent relativement stables durant les deux premiers jours après l'injection (avant ajout de MOA) (Figure VI.6) alors que le nombre de bactéries hétérotrophes cultivables et d'*E. coli* cultivables commencent déjà à diminuer (Figure VI.7), suggérant une perte de la capacité à cultiver de la population d'*E. coli* fixée dès les premiers jours. Puis, indépendamment de l'ajout de MOA dans l'un des deux réacteurs, une chute rapide et régulière des concentrations des quatre paramètres microbiologiques mesurés est observée dans les deux Propella™ jusqu'à stabilisation. Le niveau de concentration avant injection est retrouvé à partir de 8 j pour les cellules totales et de 17 j pour les bactéries hétérotrophes cultivables tandis que le niveau de base des *E. coli* totaux n'est toujours pas récupéré après 23 j (près de 1 log de plus comme dans la phase eau). En terme d'*E. coli* cultivables, il faut plus de 30 j pour retrouver le niveau de concentration mesuré avant injection.

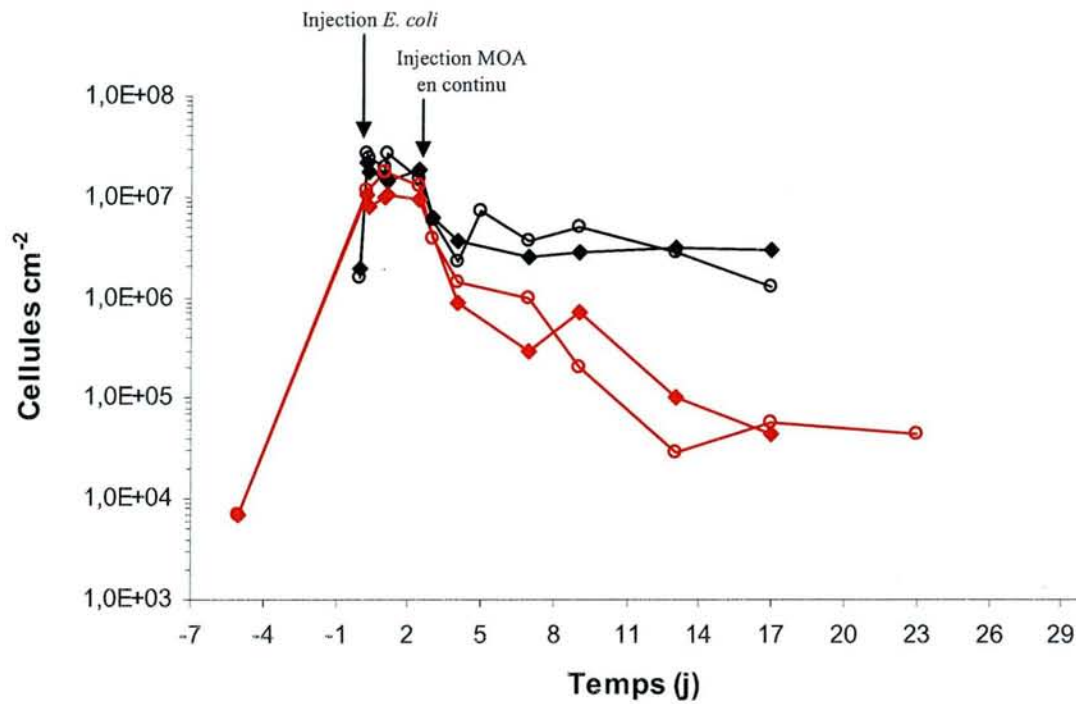


Figure VI.6. Evolution dans le temps des concentrations en bactéries totales (—) et *E. coli* totaux (—) dans le biofilm des réacteurs après injection d'*E. coli* (○ : Propella avec MOA, ♦ : Propella sans MOA, ----- courbe de lessivage).

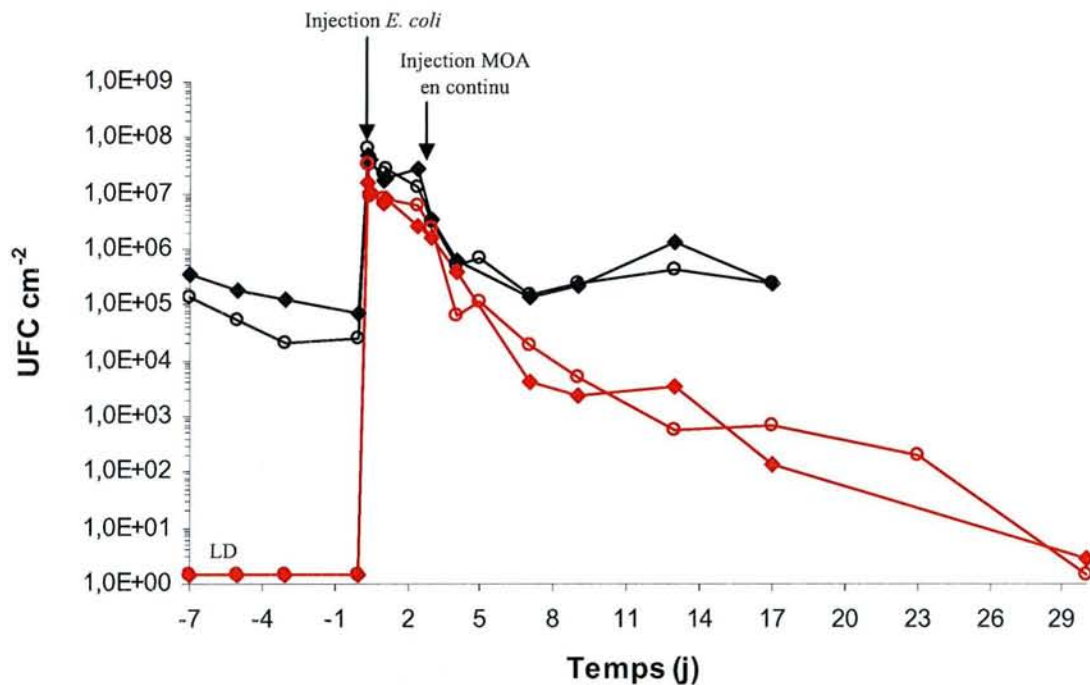


Figure VI.7. Evolution dans le temps des concentrations en hétérotrophes totales cultivables sur gélose non sélective (—) et *E. coli* cultivables sur gélose sélective (—) dans le biofilm des réacteurs après injection d'*E. coli* (○ : Propella avec MOA, ♦ : Propella sans MOA, ----- courbe de lessivage). LD=limite de détection (1,42 UFC cm⁻²).

Aucun effet significatif de l'ajout de MOA n'a pu être mis en évidence dans le biofilm ($p=0,21$). Les vitesses de décroissance calculées durant les 7 premiers jours (période linéaire) sont en effet très similaires dans les deux réacteurs quelle que soit la méthode de dénombrement utilisée (Tableau VI.10). L'ajout de 0,2 mg CODB L⁻¹ d'origine algale sur une période de 35 jours ne semble donc pas suffisant pour favoriser la survie/croissance du faible nombre d'*E. coli* présents dans le biofilm.

Tableau VI.10. Vitesses de décroissance des concentrations en bactéries totales, *E. coli* totaux (FISH-sonde ENT1), bactéries hétérotrophes totales cultivables (gélase non sélective PCA) et *E. coli* cultivables (gélase sélective au TTC-tergitol) dans le biofilm calculées sur les 7 premiers jours.

Paramètre mesuré	Vitesse de décroissance (log j ⁻¹)	
	Propella™ sans MOA	Propella™ avec MOA
Bactéries totales	-0,15	-0,15
<i>E. coli</i> totaux	-0,40	-0,39
Hétérotrophes cultivables (15j, 22°C)	-0,25	-0,20
<i>E. coli</i> cultivables (24h, 37°C)	-0,51	-0,48

Le nombre de bactéries cultivables, qu'elles soient dénombrées sur gélose sélective ou non sélective, diminue 2 à 3 fois plus vite que le nombre de bactéries totales et d'*E. coli* totaux, confirmant qu'une fraction de la population perd sa capacité à cultiver (Tableau VI.10). Cependant, les vitesses de décroissance sont moins rapides dans le biofilm que dans la phase eau (Tableau VI.9). Ceci se répercute sur la répartition de la population d'*E. coli* au sein du réacteur, la majorité des *E. coli* se trouvant dans le biofilm en fin d'expérience (Figure VI.8). Ceci met en évidence l'effet protecteur et favorable du biofilm pour la population injectée, effet toutefois insuffisant pour permettre une colonisation durable des réacteurs.

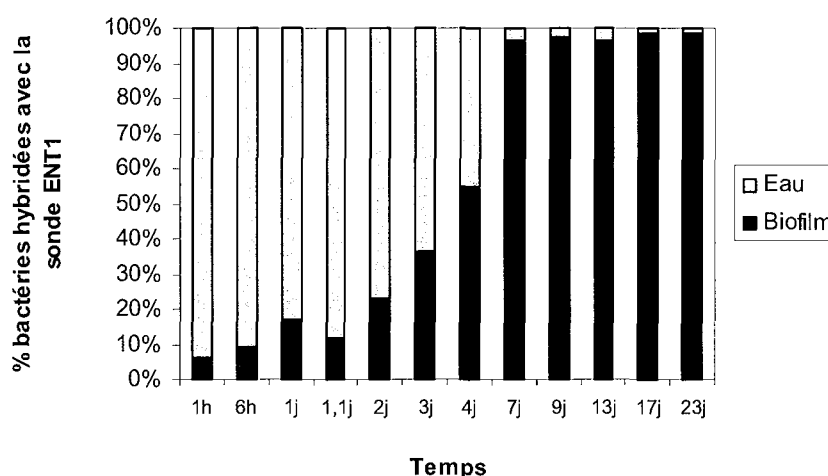


Figure VI.8. Répartition des *E. coli* totaux (bactéries hybridées avec la sonde ENT1) dans la phase eau et dans le biofilm en fonction du temps.

VI.4. Discussion

Les résultats présentés dans cette partie ont permis d'apprécier le comportement d'*E. coli* injecté dans une eau de réseau supplémentée ou non en MOA et en présence des bactéries autochtones de l'eau. Des essais en conditions statiques (batch) et en conditions dynamiques (réacteur Propella™) ont été réalisés afin d'étudier le comportement d'*E. coli* en suspension et fixé aux parois selon le cas. En conditions statiques, différentes origines de MOA ont été testées : la MOA naturellement sécrétée par les algues (MOA-NS), la MOA relarguée par les algues après une chloration (MOA-Cl₂) et la MOA relarguée après une ozonation (MOA-O₃). Pour des raisons techniques (nécessité d'un grand volume), seule la MOA-NS a été testée en conditions dynamiques. Ce paragraphe s'articule selon deux axes : (1) la différence de comportement d'*E. coli* vis-à-vis d'un ajout de MOA dans une eau de réseau en présence et absence des bactéries autochtones en conditions statiques, et (2) la différence de survie d'*E. coli* dans la MOA-NS en conditions statiques et dynamiques

- Les essais menés en batch en présence de bactéries autochtones ont montré que l'ajout de MOA (+0,2 mg CODB L⁻¹) dans l'eau de réseau favorise légèrement la production de cellules totales (facteur 1,1 à 1,7). L'utilisation de la méthode FISH (sonde ENT1) pour différencier la population d'*E. coli* des bactéries totales a permis de montrer que cette croissance était principalement reliée aux bactéries autochtones et non aux *E. coli* (selon l'origine de la MOA, seuls 1 à 20% des cellules produites sont des *E. coli*). Ainsi, l'ajout de MOA est plus favorable à la croissance des bactéries autochtones que des *E. coli* injectés. Ce phénomène n'est pas surprenant dans la mesure où la souche d'*E. coli* utilisée dans nos essais est une souche de laboratoire (bien qu'elle ait été isolée d'un réseau d'eau) sans doute moins adaptée aux conditions oligotrophes de l'eau potable que les bactéries autochtones. Plusieurs études ont d'ailleurs montré que les bactéries coliformes (dont *E. coli*) requièrent pour croître des concentrations en nutriments plus importantes que celles nécessaires aux bactéries hétérotrophes autochtones des réseaux de distribution d'eau potable (LeChevallier et McFeters, 1985b). De plus, contrairement à *E. coli*, la flore autochtone, de part sa diversité d'espèces, présente sans doute des activités enzymatiques variées qui risquent de faciliter l'assimilation de la MOA.

Dans nos essais, seule la MOA-O₃ a permis une augmentation significative du nombre d'*E. coli* (+0,6 log), les autres MOD testées ayant seulement provoqué une augmentation ≤0,1 log, et ceci malgré des ajouts équivalents en terme de CODB. Ces résultats confirment que l'origine/nature de la MOA a une influence sur la réponse d'*E. coli*. Ce point avait déjà été mis en évidence dans les

essais réalisés en absence de bactéries autochtones et a été discuté au chapitre précédent (Chapitre V).

En terme de cultivabilité, l'ajout de MOA est défavorable à la survie d'*E. coli* puisqu'il provoque une chute plus rapide du nombre d'*E. coli* cultivables (-2,4 à -3,5 log en 15 jours) en comparaison à l'eau de réseau non supplémentée (-1,9 log). Ces résultats sont donc contraires à ceux obtenus en absence de bactéries autochtones (chapitre V). L'hypothèse de phénomènes de compétition entre bactéries peut être avancée : en effet, plusieurs auteurs ont montré que certaines espèces bactériennes hétérotrophes autochtones des eaux potables sont antagonistes d'autres bactéries, dont les coliformes (effet léthal ou sublétal) (Ducluzeau *et al.*, 1984 ; Kersters *et al.*, 1996 ; LeChevallier et McFeters, 1985b ; LeChevallier *et al.*, 1980 ; Mary *et al.*, 2001 ; Ramalho *et al.*, 2001 ; Vachée *et al.*, 1997). Même si les phénomènes mis en jeu sont mal connus à l'heure actuelle, il semblerait que la synthèse de substances inhibitrices par certaines bactéries autochtones (par l'intermédiaire de vésicules membranaires contenant des hydrolases du peptidoglycane, des protéases...) et/ou une compétition vis-à-vis des nutriments soient à l'origine de cet effet antagoniste (Banning *et al.*, 2003 ; Kadurugamuwa et Beveridge, 1996 ; LeChevallier et McFeters, 1985b ; Li *et al.*, 1998 ; Ramalho *et al.*, 2001).

Dans nos essais, l'ajout de MOA dans l'eau de réseau a favorisé la croissance des bactéries autochtones, et, en les rendant plus nombreuses a pu induire une compétition plus forte vis-à-vis de la population d'*E. coli*. Ceci semble tout à fait probable au regard des cinétiques obtenues dans nos essais : en effet, au début de l'expérience, lorsque les bactéries autochtones représentent moins de 60% de la population totale, la chute de cultivabilité d'*E. coli* s'effectue plus lentement (facteur 2 à 4) qu'après le 4^{ème} jour, où les bactéries autochtones atteignent leur nombre maximal et représentent plus de 87% de la population totale. Ces résultats sont en accord avec ceux de Ramalho *et al.* (2001) qui ont également montré que lorsque la population autochtone des eaux (minérales) devenait plus nombreuse, la survie d'une souche d'*E. coli* injectée était défavorisée. De même, LeChevallier et McFeters (1985b) ont montré une corrélation significative ($p < 0,05$) entre le niveau initial de bactéries hétérotrophes cultivables et la vitesse de diminution du nombre d'*E. coli* cultivables injectés dans une eau potable.

- L'impact d'un ajout de MOA-NS sur le comportement d'*E. coli* en conditions dynamiques (réacteur Propella™) est différent de celui observé en conditions statiques. En conditions dynamiques, l'ajout de MOA-NS dans l'eau d'alimentation du réacteur se traduit par un meilleur maintien des concentrations en *E. coli* totaux et cultivables en sortie de Propella™. Malgré l'absence de significativité statistique, l'ajout de MOA-NS semble donc transitoirement favorable à

la survie d'*E. coli* en conditions dynamiques. Sachant que les deux paramètres utilisés pour le suivi de la population d'*E. coli* sont majoritairement dépendant de l'état physiologique de celle-ci (cultivabilité, synthèse d'ARN), il est ainsi fort probable que la MOA puisse améliorer l'état physiologique des *E. coli* injectés. L'effet transitoire de la MOA, observé à travers un retour à des niveaux similaires entre les 2 Propella™ en plus de 30 jours pour les *E. coli* cultivables et en 17 jours pour les *E. coli* totaux, semble s'accorder avec un maintien transitoire de l'état physiologique d'*E. coli* dans les réacteurs supplémentés en MOA sans toutefois observer de croissance. Cet aspect transitoire du maintien d'*E. coli*, suggérant que cette bactérie n'arrive pas à contaminer durablement les réseaux de distribution, a déjà été observé par plusieurs auteurs (Fass *et al.*, 1996 ; McMath *et al.*, 1999 ; Parent *et al.*, 1996 ; Sibille *et al.*, 1998).

L'hypothèse la plus probable pour expliquer que l'ajout de MOA-NS soit favorable à la survie d'*E. coli* dans nos essais en conditions dynamiques alors qu'il ne l'est pas dans nos essais en batchs est qu'un épuisement de la MOA-NS est susceptible de se produire dans les batchs mais pas dans les réacteurs puisque ceux-ci ont été alimentés en continu par la MOA. De plus, la différence de proportion d'*E. coli* parmi la population totale entre les deux essais peut être à l'origine de cette différence de comportement. En effet, la concentration initiale d'*E. coli* injectés dans les Propella™ ($2,9 \cdot 10^8$ cellules mL^{-1}) est largement supérieure à celle des autochtones initialement présentes ($8,7 \cdot 10^4$ cellules mL^{-1}), contrairement aux essais en batch, limitant probablement les phénomènes de compétition.

L'absence d'effet significativement différent dans le biofilm des deux Propella™ (avec et sans MOA-NS) reste cependant en désaccord avec plusieurs études relatant l'importance du biofilm dans l'établissement et le maintien d'une population dans des conditions similaires à celles rencontrées dans un réseau d'eau potable (Camper *et al.*, 1996 ; Gagnon *et al.*, 2000). Ceci suggère que les $0,3 \text{ mg CODB L}^{-1}$ ajoutés en continu dans le réacteur ne sont pas suffisants pour perturber l'équilibre du biofilm et observer un signal significatif. D'autres essais (non présentés ici) ont d'ailleurs montré que l'ajout de MOA-NS ($+0,2 \text{ mg CODB L}^{-1}$) pendant 3 semaines au cours de la colonisation de réacteurs Propella™ n'a pas d'effet significatif sur les niveaux de bactéries autochtones fixées (totales et cultivables). Cependant, plusieurs auteurs ont montré que l'ajout de matière organique biodégradable à des concentrations similaires (10 à $350 \text{ } \mu\text{g C L}^{-1}$) augmentait fortement la densité bactérienne du biofilm ($0,8$ à $1,8 \text{ log UFC cm}^{-2}$) (Gagnon *et al.*, 2000 ; Ndiongue *et al.*, 2005 ; Van der Kooij *et al.*, 1995). La différence de nature des substrats organiques utilisés dans ces études (acétate, aldéhydes, acides aminés libres...) pourrait expliquer la différence avec nos résultats (la MOA-NS montrant des cinétiques de biodégradation lentes contrairement à

l'acétate). De plus, Carlson et Silverstein (1998) ont montré que plus le poids moléculaire des composés organiques (présentant la même charge) était fort plus la sorption des molécules dans le biofilm diminuait. A titre d'exemple pour des molécules neutres, 88% de la quantité de cellobiose (343 Da) disparaît de la phase eau en 4 heures (témoin d'une sorption) contre 55% pour un dextran de 6kDa et 20% pour un dextran de 40 kDa. Or, la MOA-NS utilisée dans nos essais contient près de 80% de molécules de masse moléculaire apparente supérieure à 30 kDa, ce qui a pu limiter la diffusion de la MOA-NS dans le biofilm.

En conclusion,

- En présence des bactéries autochtones et en conditions statiques, l'ajout de MOA s'est avéré défavorable à la survie d'*E. coli*, sans doute à cause de phénomènes de compétition avec la population autochtone. Seule la MOA-O₃ a permis une augmentation transitoire du nombre d'*E. coli* détectés par FISH (+0,6 log).
- Par contre, en conditions dynamiques, même si aucun effet significatif de la MOA-NS n'a été mis en évidence sur la population d'*E. coli* fixés dans le biofilm, la MOA a permis de réduire la vitesse de disparition des *E. coli* planctoniques (totaux et cultivables), sans permettre pour autant une colonisation durable des pilotes.

Cette étude a également permis de mettre en évidence, avant d'injecter *E. coli*, la présence d'*Enterobacteriaceae* dans l'eau de réseau alimentant les réacteurs et dans le biofilm (de l'ordre de $2 \cdot 10^2$ cellules mL⁻¹ et de $7 \cdot 10^3$ cellules cm⁻² respectivement) grâce à l'utilisation de la méthode d'hybridation *in situ* (sonde ENT1). Leur présence dans des eaux de distribution est discutée dans le chapitre suivant qui s'intéresse à l'effet de la MOA sur cette population d'*Enterobacteriaceae* naturellement présente en eau potable. Il nous est en effet apparu intéressant, suite aux résultats obtenus dans ce chapitre, d'étudier si l'ajout de MOA avait le même effet sur une population d'Entérobactéries indigènes des eaux potables que sur une souche d'*E. coli* cultivée en laboratoire.

Chapitre VII - Influence de la MOA sur le comportement des *Enterobacteriaceae* naturellement présentes dans les eaux potables

VII.1. Introduction.....	192
VII.2. Quantification des <i>Enterobacteriaceae</i> dans les eaux brutes et les eaux traitées – cas de l’usine E. Imbeaux de Nancy	193
VII.2.1. Démarche expérimentale.....	193
VII.2.2. Résultats	193
VII.2.2.1. Evolution dans la filière de traitement	194
VII.2.2.2. Evolution saisonnière des concentrations en <i>Enterobacteriaceae</i>	196
VII.2.2.3. Facteurs influençant la concentration d’ <i>Enterobacteriaceae</i> dans l’eau traitée.....	199
VII.3. Effect of algal organic matter on the behavior of <i>Enterobacteriaceae</i> naturally occurring in drinking water and detected by fluorescent <i>in situ</i> hybridization	202
VII.4. Discussion.....	222

VII.1. Introduction

Dans les chapitres précédents (chapitres V et VI), l'effet d'un ajout de MOA dans une eau potable sur la survie d'*E. coli* (utilisé comme modèle d'*Enterobacteriaceae*) a été étudié en conditions statiques (batch) et dynamiques (Propella™), et en présence ou absence de la flore autochtone. Les résultats ont montré qu'en absence de bactérie autochtones (eau potable stérile), l'ajout de MOA, quelle que soit son origine, favorisait la survie d'*E. coli* en augmentant sa croissance et/ou sa cultivabilité. Par contre, en présence de bactéries autochtones (>40% de la population totale), l'effet observé est inverse et a été expliqué par des phénomènes de compétition entre bactéries (sécrétion de substances inhibitrices et/ou compétition vis-à-vis des nutriments) (Ramalho *et al.*, 2001). Cependant, ces essais ont nécessité l'injection massive (de l'ordre de 10^5 cellules mL⁻¹) d'une souche d'*E. coli* de laboratoire, sans doute non adaptée aux conditions environnementales des eaux potables. Ce chapitre a donc pour but d'étudier l'effet de la MOA, non plus sur une souche d'Entérobactéries cultivée en laboratoire, mais directement sur la population d'*Enterobacteriaceae* indigène des eaux potables. Pour ce faire, l'étude s'est divisée en deux temps :

- dans un premier temps, il a fallu évaluer les niveaux d'*Enterobacteriaceae* (vivantes ou mortes) détectables dans les eaux potables en sortie d'usine de traitement en utilisant la méthode FISH. Puis, nous avons apprécié leurs variabilités sur une période d'un an dans les eaux brutes et les eaux traitées (avant et après post-chloration) en essayant de relier les variations de la concentration en *Enterobacteriaceae* dans les eaux traitées avec les fluctuations dans les eaux brutes ainsi qu'avec d'autres paramètres tels que la concentration en algues, le COD, le CODB...

- dans un deuxième temps, nous avons étudié si l'ajout de MOA avait une influence sur cette population d'*Enterobacteriaceae* naturellement présente dans l'eau en sortie d'usine de potabilisation, dans le but de démontrer si une fraction des *Enterobacteriaceae* détectées en sortie d'usine par la méthode FISH était vivante. Cette partie est présentée sous la forme d'une publication soumise à la revue *Applied and Environmental Microbiology* sous le titre « Effect of algal organic matter on the behavior of *Enterobacteriaceae* naturally occurring in drinking water and detected by fluorescent *in situ* hybridization ».

VII.2. Quantification des *Enterobacteriaceae* dans les eaux brutes et les eaux traitées - cas de l'usine Edouard Imbeaux de Nancy

L'objet de cette phase d'étude est d'estimer le flux d'*Enterobacteriaceae* transitant dans une filière de traitement en utilisant la méthode d'hybridation *in situ* permettant de s'affranchir de l'étape de culture sur gélose. Les eaux en entrée (eau brute = Moselle) et en sortie de l'usine E. Imbeaux de Nancy ainsi que l'eau en sortie de filtre CAG (avant post-chloration) ont été analysées sur une période de douze mois (mai 2003 à juin 2004).

VII.2.1. Démarche expérimentale

Deux litres d'eau (1 litre dans 1 flacon passé à 550° et 1 litre dans un flacon plastique stérile contenant 20 mg de thiosulfate de sodium) ont été prélevés régulièrement (deux à quatre fois par mois) pendant 1 an à 3 points de prélèvement :

- en entrée d'usine (Moselle) = eau brute
- en sortie de filtre CAG (usine Edouard Imbeaux – Nancy) = eau CAG
- en sortie d'usine (après chloration et ajout d'eau de chaux) = eau traitée

La filière de traitement E. Imbeaux de Nancy est une filière biologique classique incluant successivement : une préchloration (javel), une coagulation-floculation-décantation (sulfate d'alumine), une filtration rapide sur sable, une ozonation (0,3-0,4 mg O₃ résiduel L⁻¹), une filtration sur charbon actif en grain (CAG), une remise à l'équilibre du pH par ajout d'eau de chaux (≈6 mg L⁻¹) et une postchloration (javel).

Lors de chaque prélèvement d'eau, les paramètres mesurés sont : la température, le pH et la conductivité, les bactéries marquées par hybridation *in situ* (*Enterobacteriaceae* et *Eubacteria*), les bactéries cultivables (UFC par incorporation en gélose non sélective PCA), les coliformes cultivables (UFC sur gélose sélective au TTC-tergitol), les bactéries totales (DAPI), le COD, le CODB (seulement 1 semaine sur 2 en entrée et sortie d'usine), la concentration algale (seulement sur l'eau brute). Toutes les méthodes sont détaillées au chapitre III.

VII.2.2. Résultats

Pendant une année, l'ensemble des paramètres analytiques présentés ci-dessus a été suivi dans les eaux d'entrée (eau brute) et de sortie (eau CAG et eau traitée) de la filière de traitement de

Nancy. L'analyse des données a permis de dégager trois axes d'intérêt qui sont présentés dans les paragraphes suivants (tous les résultats bruts sont détaillés en annexe X.4.1) :

- l'évolution moyenne des paramètres bactériologiques et de la MOD lors du passage sur la filière,
- l'évolution saisonnière des *Enterobacteriaceae* et des bactéries totales dans l'eau brute et l'eau traitée,
- les corrélations linéaires entre la concentration d'*Enterobacteriaceae* dans l'eau traitée et les paramètres pouvant l'influencer (MOD des eaux brutes, température de l'eau, concentration en *Enterobacteriaceae* et en algues dans l'eau brute).

VII.2.2.1. Evolution dans la filière de traitement

a) Caractéristiques moyennes des eaux brutes, des eaux CAG et des eaux traitées.

Afin de pouvoir évaluer l'impact des traitements sur les paramètres mesurés dans cette étude, les caractéristiques moyennes des différentes eaux sur toute la campagne de prélèvement ont été calculées (Tableau VII.1). Ces valeurs moyennes expriment avant tout des ordres de grandeur car elles subissent des variations dans le temps et sont ainsi encadrées d'un écart type souvent important.

Grâce à l'utilisation de la méthode FISH, des *Enterobacteriaceae* (vivantes et/ou mortes) ont été systématiquement détectées dans les trois eaux étudiées durant les douze mois d'analyse (mai 2003 à juin 2004).

L'eau brute (Moselle) présente un COD moyen de $3,6 \text{ mg L}^{-1}$ dont 28% de CODB. Elle contient en moyenne $1,7 \cdot 10^7$ bactéries mL^{-1} dont 18% d'Eubactéries (FISH-EUB338) et moins de 0,03% de bactéries hétérotrophes cultivables (Tableau VII.1). La faible proportion d'Eubactéries peut s'expliquer par l'état physiologique des bactéries (nombre de ribosomes insuffisants pour être détectables) et par la difficulté de lecture des lames au microscope (débris, amas, bruit de fond, autofluorescence algale...). En moyenne dans l'eau brute, $4,6 \cdot 10^4$ *Enterobacteriaceae* mL^{-1} (0,3% de la population totale) sont mesurées dont 0,05% de coliformes cultivables.

Dans l'eau CAG dont le COD moyen est de l'ordre de $1,7 \text{ mg L}^{-1}$, seules $2,7 \cdot 10^5$ bactéries mL^{-1} sont retrouvées dont 51% d'Eubactéries, 0,3% d'*Enterobacteriaceae*, 0,17% de cultivables et moins de 1 coliforme cultivable pour 100 mL. Ces valeurs diminuent après le traitement de chloration puisque, dans l'eau traitée, il n'est mis en évidence que $2,1 \cdot 10^5$ bactéries mL^{-1} dont 29%

d'Eubactéries, 0,2% d'*Enterobacteriaceae* et moins de 0,003% de bactéries cultivables. L'eau traitée présente un COD moyen de 1,6 mg L⁻¹ dont 16% de CODB.

Tableau VII.1. Caractéristiques moyennes de l'eau brute, de l'eau CAG et de l'eau traitée sur les 12 mois d'analyses. Les chiffres entre parenthèses représentent l'écart type sur les moyennes des mesures (n=36).

	Eau brute	Eau CAG	Eau traitée
Chlore libre appliqué (mg L ⁻¹)	3,16 (1,22)**	/	0,84 (0,27)***
pH	7,56 (0,50)	6,92 (0,45)	7,44 (0,19)
Conductivité (μS cm ⁻¹)	320,02 (113,72)	341,43 (118,78)	353,97 (114,19)
COD (mg L ⁻¹)	3,59 (0,73)	1,67 (0,30)	1,61 (0,24)
CODB (mg L ⁻¹)	1,02 (0,60)	nd*	0,26 (0,20)
Algues (cellules L ⁻¹)	7,08 10 ⁷ (7,71 10 ⁷)	nd*	nd*
Bactéries totales (cellules mL ⁻¹)	1,72 10 ⁷ (2,83 10 ⁷)	2,66 10 ⁵ (1,88 10 ⁵)	2,06 10 ⁵ (1,90 10 ⁵)
Eubactéries (cellules mL ⁻¹)	3,08 10 ⁶ (1,62 10 ⁶)	1,37 10 ⁵ (7,45 10 ⁴)	6,00 10 ⁴ (3,51 10 ⁴)
Entérobactéries (cellules mL ⁻¹)	4,61 10 ⁴ (2,94 10 ⁴)	7,89 10 ² (1,65 10 ³)	3,50 10 ² (4,08 10 ²)
Bactéries cultivables en 3j (UFC mL ⁻¹)	2,34 10 ³ (4,26 10 ³)	2,68 10 ² (1,19 10 ³)	6,39 10 ⁻¹ (8,33 10 ⁻¹)
Bactéries cultivables en 15j (UFC mL ⁻¹)	5,21 10 ³ (1,48 10 ⁴)	4,61 10 ² (1,43 10 ³)	5,56 10 ⁰ (1,81 10 ¹)
Coliformes cultivables (UFC mL ⁻¹)	2,32 10 ¹ (5,03 10 ¹)	<0,01 (0)	<0,01 (0)
*nd : non déterminé	** préchloration de l'eau brute	*** postchloration en sortie d'usine	

b) Abattements moyens

En moyenne sur les 12 mois d'analyses, la filière de traitement permet ainsi d'abattre 99% du nombre de bactéries totales (1,9 log) dont 98% avant l'étape de chloration (Tableau VII.1). Après chloration, 1 cellule bactérienne sur 5 n'est plus détectée alors qu'elle l'était en sortie de filtre CAG, suggérant une altération des acides nucléiques par le chlore (puisque aucune action physique éliminant des bactéries n'est effectuée entre ces deux étapes) conduisant à un marquage au DAPI moins efficace.

Le rendement d'élimination des bactéries cultivables entre l'eau brute et l'eau en sortie de filtre CAG est de 91%. L'étape de chloration élimine encore 99% des bactéries cultivables restantes à l'issue de la filtration sur CAG ce qui correspond à un abattement de 3 log par rapport à l'eau brute. Par comparaison à l'abattement calculé sur les cellules totales (1,9 log), ceci signifie que les

cellules sont présentes mais ont perdu leur capacité à pousser sur gélose nutritive, sans doute principalement à cause de l'oxydation par le chlore.

Le nombre de bactéries marquées par la sonde EUB338 subit un abattement de 98% entre l'eau brute et l'eau traitée (1,7 log), en adéquation avec les 99% d'élimination des bactéries totales. Cependant, plus d'1 Eubactérie sur 2 présentes en sortie de filtre CAG n'est plus détectée après la chloration (contre 1 sur 5 en DAPI). Ceci suggère que l'oxydation altère l'intégrité des cellules (en particulier les ARNr) en ne permettant plus à la sonde oligonucléotidique de se fixer correctement ou en assez grand nombre pour pouvoir être visualisée au microscope (intensité de fluorescence trop faible). Le marquage FISH est donc plus sensible à la chloration que le marquage au DAPI.

De la même manière, la filière de traitement permet d'abattre les concentrations en Entérobactéries de 99% (2,1 log) en adéquation avec les 99% d'élimination des bactéries totales (1,9 log), suggérant ainsi que les traitements n'éliminent pas spécifiquement certaines populations bactériennes. Le pourcentage d'Entérobactéries parmi la population bactérienne totale reste en effet comparable avant et après traitements (0,3% dans l'eau brute et l'eau CAG et 0,2% dans l'eau traitée). En moyenne, 1 *Enterobacteriaceae* est détectée pour 174 *Eubacteria* dans l'eau CAG et pour 171 *Eubacteria* dans l'eau traitée, ce qui confirme que l'étape d'oxydation au chlore « élimine » de la même manière les *Enterobacteriaceae* et les autres *Eubacteria*.

La cultivabilité des bactéries coliformes est totalement inhibée au cours des différentes étapes de traitement.

En ce qui concerne la matière organique, 55% du COD initial et une forte proportion du CODB (74%) sont éliminés par la filière de traitement. L'abattement du COD est de 54% entre l'eau brute et l'eau en sortie de filtre CAG et de 3% entre l'eau CAG et l'eau en sortie d'usine (après chloration et ajout d'eau de chaux).

VII.2.2.2. Evolution saisonnière des concentrations en *Enterobacteriaceae*

Le suivi dans le temps (sur 12 mois) des concentrations en *Enterobacteriaceae* avait pour but de valider la présence continue de ces bactéries dans les eaux traitées et d'essayer de relier leurs niveaux de concentration avec les différents paramètres microbiologiques et environnementaux mesurés. L'évolution saisonnière des concentrations en *Enterobacteriaceae* (hybridées avec la sonde ENT1 et coliformes cultivables) ainsi qu'en bactéries totales sur toute la campagne de prélèvement (mai 2003-juin 2004) est présentée à la figure VII.1 pour les eaux d'entrée et de sortie de l'usine E. Imbeaux. Les résultats obtenus pour l'eau CAG sont rapportés en annexe X.4.1 (Figure X.2).

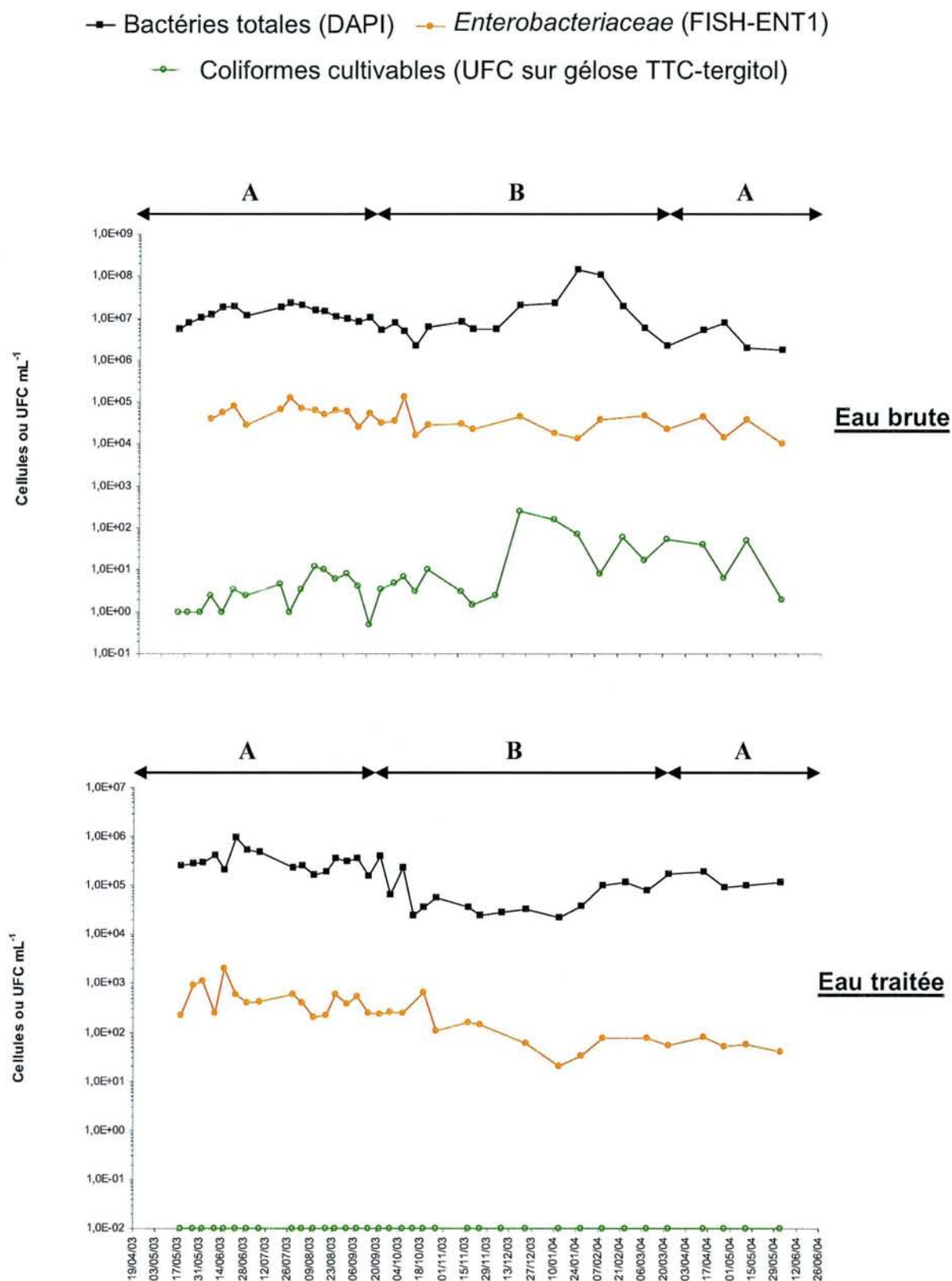
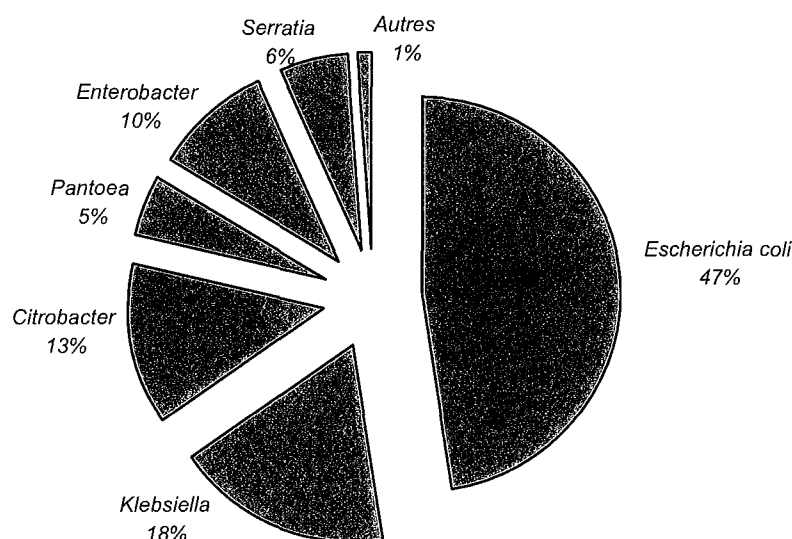


Figure VII.1. Evolution des paramètres microbiologiques entre mai 2003 et juin 2004 dans l'eau brute (Moselle) et l'eau traitée. Chaque point correspond à 2 mesures. A=printemps-été, B=automne-hiver.

Dans l'eau brute, le nombre total de bactéries subit des variations importantes durant les 12 mois d'étude avec des concentrations allant de $1,7 \cdot 10^6$ à $1,4 \cdot 10^8$ cellules mL^{-1} , les concentrations maximales étant atteintes aux mois de janvier-février, en relation avec des concentrations en COD plus fortes à cette période.

Contrairement aux bactéries totales, les concentrations en *Enterobacteriaceae* restent relativement stables. Elles varient de $1 \cdot 10^4$ à $1,3 \cdot 10^5$ cellules mL^{-1} représentant ainsi 0,01 à 2,7% de la population bactérienne totale. Aucune différence significative (Mann Withney, $p=0,13$) n'a été mise en évidence entre les saisons printemps-été ($20 \pm 5^\circ\text{C}$) et automne-hiver ($11 \pm 5^\circ\text{C}$). Parmi cette population d'*Enterobacteriaceae*, des coliformes cultivables sont régulièrement détectés, en concentration plus importante durant l'hiver (facteur 4 en moyenne). Leur concentration en eau brute varie ainsi de <1 à $2,5 \cdot 10^2$ UFC mL^{-1} . Ils représentent donc $<0,08\%$ à 0,9% des *Enterobacteriaceae* détectées par FISH. L'identification des espèces de coliformes cultivables a montré qu'*E. coli* était l'espèce la plus souvent isolée dans l'eau de Moselle (Figure VII.2).



FigureVII.2. Répartition des différentes espèces de coliformes cultivables (n=350 colonies identifiées) détectées dans l'eau brute (Moselle) (36 échantillons d'eau analysés).

Malgré les traitements, l'eau traitée contient encore des concentrations élevées d'*Enterobacteriaceae* qui montrent des fluctuations importantes variant de $2 \cdot 10^1$ à $2 \cdot 10^3$ cellules mL^{-1} au cours des 12 mois. Cette sous-population bactérienne correspond ainsi à 0,03 à 1,8% des bactéries totales. L'évolution saisonnière des concentrations en *Enterobacteriaceae* dans l'eau traitée est relativement proche de celle des concentrations en bactéries totales avec une décroissance forte durant l'automne et l'hiver (-1 log en moyenne). Durant toute la campagne de prélèvements,

aucun coliforme cultivable sur milieu sélectif n'a été détecté dans l'eau traitée ($<0,01$ UFC mL^{-1}).

Cette différence FISH/cultivabilité était attendue et peut correspondre à :

- des bactéries stressées ou abîmées (viables mais non cultivables sur le milieu gélosé),
- des bactéries mortes,
- des *Enterobacteriaceae* non coliformes.

Comme pour les bactéries totales, les *Enterobacteriaceae* mesurées au printemps 2004 n'atteignent pas les niveaux de concentrations mesurés au printemps 2003 (1 log d'écart) ce qui peut être expliqué par la température de l'eau qui était plus élevée en 2003 aux mêmes dates (+3°C).

VII.2.2.3. Facteurs influençant la concentration d'*Enterobacteriaceae* dans l'eau traitée

Le suivi dans le temps des paramètres microbiologiques et physico-chimiques des eaux en entrée et en sortie d'usine avait pour but de relier la qualité de l'eau brute avec celle de l'eau traitée, particulièrement en terme d'Entérobactéries. La grande quantité de résultats obtenus au cours de cette période d'étude permet d'envisager des analyses mettant en relation les divers paramètres étudiés. Cependant, peu de corrélations linéaires ont pu clairement être vérifiées pour expliquer les variations de la concentration en *Enterobacteriaceae* dans l'eau traitée (matrice de corrélation présentée en annexe X.4.1, tableau X.20). Seules les 5 corrélations qui nous paraissent les plus pertinentes sont présentées dans cette partie. Il s'agit des relations entre la concentration en *Enterobacteriaceae* dans l'eau traitée et :

- (i) la concentration d'*Enterobacteriaceae* dans l'eau brute,
- (ii) la concentration d'algues dans l'eau brute,
- (iii) la concentration de MOD (COD et CODB) dans l'eau brute,
- (iv) la température de l'eau traitée (reflétant celle de l'eau brute et celle de l'air).

L'analyse de la figure VII.3 montre qu'il existe une corrélation significative ($R=0,53$; $p=0,0032$) entre le log des concentrations d'*Enterobacteriaceae* dans l'eau brute et celles dans l'eau traitée. Cette relation suggère que quelle que soit la quantité d'*Enterobacteriaceae* dans l'eau brute, celles-ci sont éliminées de la même manière par la filière de traitement. Cependant, d'après cette relation, les variations d'*Enterobacteriaceae* dans l'eau brute n'expliquent que 28% des niveaux d'*Enterobacteriaceae* dans l'eau traitée.

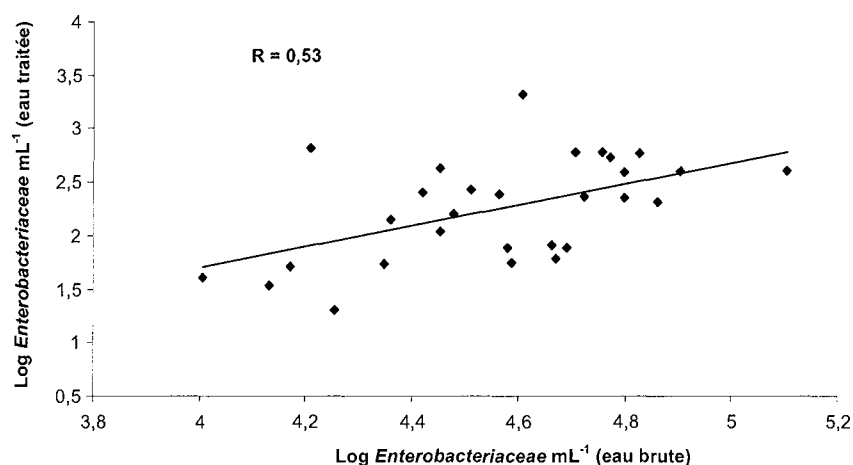


Figure VII.3. Concentration d'*Enterobacteriaceae* dans l'eau traitée en fonction de la concentration d'*Enterobacteriaceae* dans l'eau brute (n=29).

En ce qui concerne la relation entre le log de la concentration d'*Enterobacteriaceae* dans l'eau traitée et le log de la concentration d'algues dans l'eau brute, la figure VII.4 montre qu'il existe également une corrélation significative ($R=0,77$; $p<0,0001$) entre les deux paramètres. Cette relation, montrant que près de 60% des variations de niveau des *Enterobacteriaceae* de l'eau traitée sont expliquées par celle des concentrations en algues dans l'eau brute, conforte notre hypothèse de travail, à savoir que la prolifération d'algues dans l'eau de ressource pourrait favoriser la présence d'Entérobactéries en eau traitée. Par contre, aucune relation linéaire n'a été mise en évidence entre les quantités de nutriments (COD, CODB) et la concentration en algues dans l'eau brute. D'ailleurs, la figure VII.5 montre clairement qu'il n'existe pas de relation directe entre ces deux paramètres et la concentration d'*Enterobacteriaceae* dans l'eau traitée.

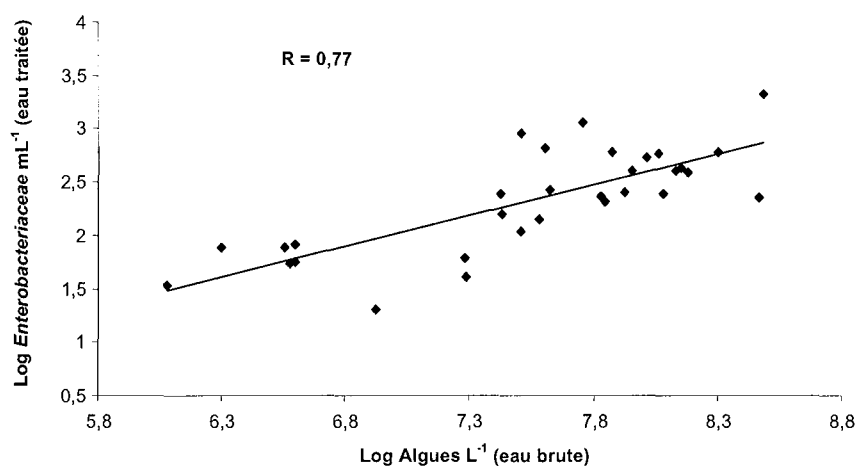


Figure VII.4. Concentration d'*Enterobacteriaceae* dans l'eau traitée en fonction de la concentration d'algues dans l'eau brute (n=31).

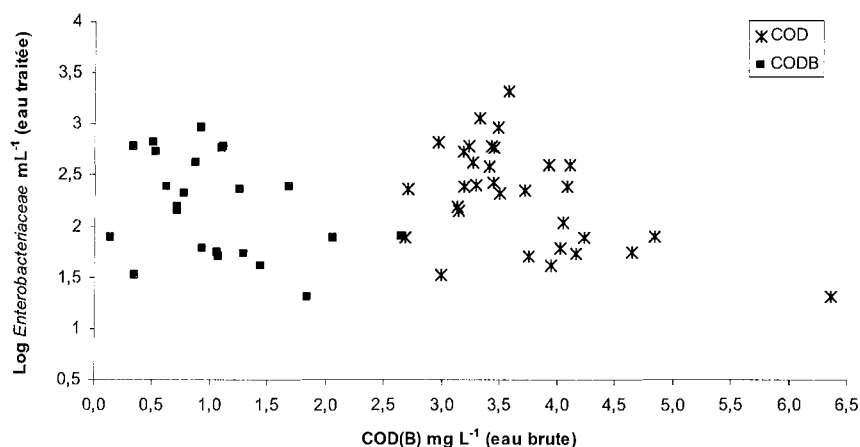


Figure VII.5. Concentration d'*Enterobacteriaceae* dans l'eau traitée en fonction de la concentration en COD (n=32) et en CODB (n=23) dans l'eau brute.

Cependant, il n'est pas possible d'affirmer que la concentration d'algues influe directement sur la concentration d'*Enterobacteriaceae* en eau traitée car ces deux paramètres sont chacun très bien corrélés avec la température de l'eau traitée ($R=0,85$ et $0,73$ respectivement, $p<0,0001$) (Figure VII.6). Soit la température agit directement sur les *Enterobacteriaceae*, soit elle agit indirectement en favorisant par exemple la prolifération d'algues.

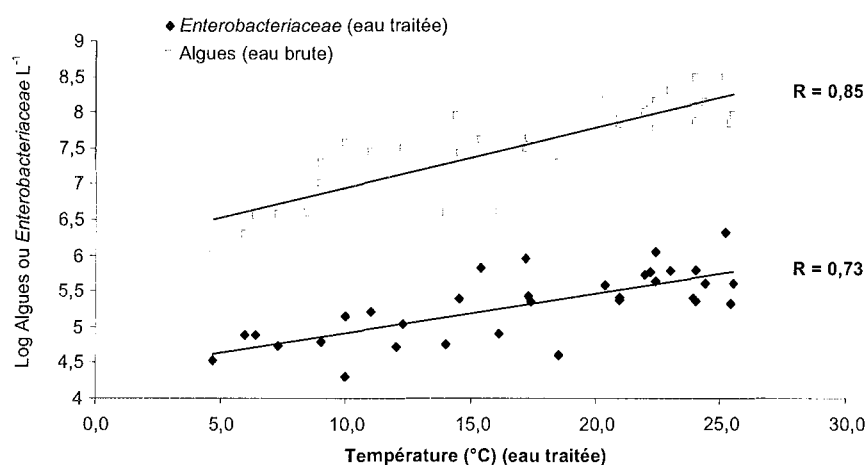


Figure VII.6. Concentration d'*Enterobacteriaceae* dans l'eau traitée (n=33) ou d'algues dans l'eau brute en fonction de la température de l'eau traitée (n=34).

D'un point de vue global, il semble que la température soit un des paramètres les plus influents (effet saison) puisque des corrélations significatives ont été observées avec la plupart des variables microbiologiques mesurées (matrice de corrélation en annexe X.4.1, tableau X.20). Ces résultats rappellent que la dynamique bactérienne dans les eaux (brutes ou traitées) est multifactorielle et donc difficilement reliable de manière simple à un seul paramètre.

VII.3. Effect of algal organic matter on the behavior of *Enterobacteriaceae* naturally occurring in drinking water and detected by fluorescent *in situ* hybridization

Après avoir vérifié et quantifié la présence d'Entérobactéries dans les eaux potables, nous avons voulu savoir si une fraction de cette population était viable (la méthode FISH ne nous permettant pas de l'affirmer) et si sa survie pouvait être favorisée par l'ajout de MOA.

Ce chapitre est présenté sous la forme d'une publication soumise à la revue *Applied and Environmental Microbiology* sous le titre «Effect of algal organic matter on the behavior of *Enterobacteriaceae* naturally occurring in drinking water and detected by fluorescent *in situ* hybridization». Tous les résultats bruts sont présentés en annexe X.4.2.

Effect of algal organic matter on the behavior of *Enterobacteriaceae* naturally occurring in drinking water and detected by fluorescent *in situ* hybridization

Bouteleux C.¹, Josse T.¹, Pauly D.¹ and Mathieu L.^{2*}

¹ Service d'Etudes et de Recherches en Environnement et Santé, Département Environnement et Santé Publique, 9 avenue de la forêt de Haye, BP 184, 54505 Vandoeuvre-lès-Nancy.

² Laboratoire d'hydroclimatologie Médicale de l'EPHE, 9 avenue de la forêt de Haye, BP 184, 54505 Vandoeuvre-lès-Nancy.

* corresponding author.

Tel : +33 (0) 3 83 68 34 86

Fax : +33 (0) 3 83 68 34 89

Email : laurence.mathieu@medecine.uhp-nancy.fr

ABSTRACT

This study aimed to quantify the *Enterobacteriaceae* naturally occurring in drinking water (DW) by using fluorescent *in situ* hybridization (FISH) and to appreciate their behavior in response to an addition of algal organic matter (AOM). Three origins of AOM were tested : AOM naturally secreted by algae during growth (AOM-NS) and AOM released by algae after oxidation by chlorine (AOM-Cl₂) or ozone (AOM-O₃). Dechlorinated DW samples were supplemented with 0.2 mg BDOC L⁻¹ of the three types of AOM or acetate. The results demonstrated that *Enterobacteriaceae* were systematically present in DW at the outlet of the treatment plant (on average 3.5×10^2 cells mL⁻¹). The use of the DVC-FISH method showed that a fraction of this subpopulation was viable whereas conventional culture-based methods were unable to detect them. When dechlorinated DW was incubated with AOM, a growth of total bacteria was measured. Among the total bacteria, a fraction of *Enterobacteriaceae* benefited from the addition of AOM. Supplementation with AOM enabled DW to support a more significant increase in the number of *Enterobacteriaceae* detected by FISH (+0.3 to 0.7 log) than nonsupplemented DW (+0.2 log). In spite of equivalent additions of BDOC, the behavior of *Enterobacteriaceae* proved to be different according to the origin/nature of the tested organic matters, AOM-O₃ exhibiting the strongest increase of *Enterobacteriaceae*. The AOM were as much or more favorable than acetate suggesting that algal products were a favorite substrate for this subpopulation and could participate in the degradation of biological stability of DW.

INTRODUCTION

Knowledge concerning the taxonomic composition of drinking waters has made real progress during the last decade with the development of new analytical techniques. Until recently, the identification of bacterial species was indeed done from the colonies which agreed to cultivate on nutritive media. It is now acknowledged however that, under certain conditions, injured bacterial cells in water environments can evolve into a viable but non-culturable (VBNC) state, and are undetectable with the culture-based methods currently used for water quality assessment (15, 42). Because of this VBNC state, only about 1 to 2% of the total population of bacteria can be characterized by culture-based method (1, 22). Emergence of molecular techniques such as fluorescent *in situ* hybridization (FISH) allowing direct detection of cells at the single-cell level without a cultivation step, has resulted in better knowledge of the bacterial phylogenetic groups present in drinking waters (planktonic and fixed cells). Recently, several studies attempted to characterize *Proteobacteria* in drinking water (3, 23, 24, 43, 51) but at the present time, very little work has been devoted to subpopulations such as *Enterobacteriaceae* belonging to γ -*Proteobacteria* (4, 17). These bacteria are of particular importance because some species are pathogens or opportunistic pathogens and others are used as indicators of fecal contamination (coliforms). As such, their presence in drinking water is often a cause of non-compliance with regulatory standards.

Non-compliance is often associated with several factors such as water temperature, disinfectant concentration, nutritive status, etc. (6). Recently, Lake *et al.* (26) showed that the presence of coliform bacteria in drinking waters could be linked with the proliferation of algae in resource water. These authors suggested that the organic matter secreted by algae (AOM) could provide an additional substrate for heterotrophic bacteria. During algal bloom, the AOM likely to be present in a treatment plant and thus in treated water can come (i) from the raw water which contains the organic molecules naturally secreted by algae during growth (mainly by photosynthesis mechanisms) (9, 28, 48, 49), and (ii) from oxidation treatments, mainly preoxidation which, by lysing cells, release organic compounds (7, 11, 20, 38, 39, 47). In previous studies, Bouteleux *et al.* (11) showed that the survival of *E. coli* was favored when AOM (released by algae after oxidation) was added to a sterile drinking water. Similarly, Boualam *et al.* (8) observed that the cultivability of coliform bacteria was maintained longer when a supernatant of algal culture was added to drinking water. It thus appears relevant to characterize this *Enterobacteriaceae* subpopulation and its viability in relation with the nutrient status of drinking waters since bacterial viability is strongly controlled by the presence of dissolved organic matter (31, 32, 45, 46, 50).

The purpose of this study was thus (i) to quantify *Enterobacteriaceae* and their viability (Direct Viable Count procedure) in drinking waters at the outlet of a treatment plant using the FISH method, (ii) to determine whether addition of AOM in drinking water can support survival and/or growth of these noncultivable *Enterobacteriaceae* naturally present in drinking water, and (iii) to determine whether the behavior of *Enterobacteriaceae* is dependent on the origin/nature of the AOM. Three types of AOM were tested at the same low levels of biodegradable carbon, i.e., 0.2 mg BDOC L⁻¹: AOM naturally secreted by algae during growth (AOM-NS), AOM released by algae after chlorination (AOM-Cl₂) and after ozonation (AOM-O₃).

MATERIALS AND METHODS

Water samples. Drinking water was collected at the outlet of the treatment plant of Nancy (France) which treats surface water coming from the Moselle river. The treatment steps comprise prechlorination, coagulation-flocculation-decantation, sand filtration, ozonation, biological activated carbon filtration, pH adjustment (lime) and disinfection with chlorine. Water samples were collected in 1-L sterile bottles containing sodium thiosulphate (20 mg L⁻¹ final concentration) in order to remove chlorine residual.

Production of AOM in laboratory culture. Algae were recovered from 2 liters of river water (Moselle river, France, Sept. 2001) by filtration through a 2- μ m-pore-size polycarbonate membrane (Millipore Ltd., Watford, UK), followed by membrane desorption by sonication in 10 mL of mineral growth medium (11). The algal suspension was inoculated in the mineral medium to reach a final concentration of 10⁷ algae L⁻¹. The culture was rotated at 35 rpm at 25 $\pm$ 2°C in a 16 h light/8 h dark cycle (5,000 lux) and aerated by CO₂/air (2%) bubbling. These conditions led to the selection of a green alga (*Chlorella*) which composed >99% of the culture when AOM was recovered.

(i) *Recovery of AOM-NS (naturally secreted)* : AOM-NS was recovered by filtering (0.2- μ m pore-size membrane) the algal culture in stationary growth phase;

(ii) *Recovery of AOM-Cl₂ and AOM-O₃* : the algal culture, in stationary growth phase, was washed twice by centrifugation (10 min, 2,000 $\times$ g) in sterile distilled water. The pellet was resuspended in order to obtain around 5 $\times$ 10⁹ algae L⁻¹. This algal suspension (pH=6.03 $\pm$ 0.47) was either chlorinated (7.8 $\pm$ 0.1 mg Cl₂ L⁻¹ applied), or ozonated (5.3 mg O₃ L⁻¹ applied). Batch chlorination was carried out, without shaking, in darkness at 22 $\pm$ 2°C with a diluted commercial solution of sodium hypochlorite. Ozonation was carried out in a semicontinuous system at 22 $\pm$ 2°C. Ozone was produced with a Trailgaz ozone generator (Laboratory LO) using pure oxygen. The gas flow (O₃+O₂) was fixed at 10 L h⁻¹. After 45 min of contact for chlorine and 15 min for ozone, the

oxidant residuals were neutralized with sodium thiosulfate. The organic matter released by chlorinated algae (AOM-Cl₂) or ozonated algae (AOM-O₃) was recovered by filtration on 0.2- μ m-pore-size membrane (Whatman, Clifton, USA). Chlorine and ozone concentrations were determined by DPD colorimetric and iodometric methods, respectively (2). The characteristics of each AOM are summarized in table 1.

TABLE 1. Characterization of the three types of AOM tested (nd=inferior to the detection limit=0.3 mg equivalent Bovin Serum Albumin L⁻¹).

Type of AOM	DOC (mg L ⁻¹)	BDOC (%)	Sugars (%)	Proteins (%)
AOM-NS	136	81	71	0.1
AOM-Cl ₂	19.8	29	50	nd
AOM-O ₃	7.7	75	47	nd

Bacterial counts. (a) *Culturable heterotrophic bacteria counts* were performed on plate count agar (PCA) (Merck). Plates were incubated for 15 days at 22 $\pm$ 2°C. The results are expressed in CFU per milliliter.

(b) *Culturable coliforms* were determined by the plate count technique: 10 to 100 mL of sample were filtered, in duplicate, through 47-mm-diameter, 0.45- μ m-pore-size acetate membranes (Millipore Corp., Bedford, Mass.). Membranes were incubated on TTC-tergitol 7 lactose medium (Merck) at 37 $\pm$ 1°C, and typical colonies were counted after 24h. The results are expressed in CFU per milliliter.

(c) *Total number of bacteria* was determined with Live/Dead BacLight kit (Molecular probes). The staining protocol was carried out as previously described (10, 11). The observation was made with an epifluorescent microscope (BX40, Olympus) equipped with a $\times$ 100 immersion objective lens, a 470- to 490-nm excitation filter, and a 520-nm barrier filter. The total number of stained cells (green plus red fluorescence) corresponded to the total number of bacteria in the sample. Ten to twenty microscopic fields were counted, depending on cell concentration, to arrive at a count of at least 600 cells for each sample. The detection limit was 1.4×10^3 cells mL⁻¹.

(d) *Direct Viable Count procedure (DVC)*: the protocol was adapted from Baudart *et al.* (5). The assay included a bacterial cell metabolism revivification step in the presence of a nutritive source and a DNA gyrase inhibitor (nalidixic acid), which stops cell division and increases the intracellular rRNA content and the cellular length of sensitive cells. The sample was filtered through a 25-mm-diameter, 0.2- μ m-pore-size white polycarbonate membrane (Millipore) and placed on a 25-mm cellulose pad (Millipore) soaked in 650 μ l of nutritive broth (70% phosphate-buffered saline pH 7.4 (Sigma), 0.036% yeast extract, 0.36% casamino acid) containing nalidixic acid (final concentration

10 $\mu\text{g mL}^{-1}$, Sigma). The sample was then incubated at $37\pm 1^\circ\text{C}$ for 4 h in a moisture chamber. Membrane was recovered and replaced on filtration device to undergo the various steps of the FISH procedure described below (from the fixation step).

(e) *Fluorescent in situ hybridization* (FISH): the universal probe EUB338 (5'-GCTGCCTCC CGTAGGAGT-3') was used to estimate the density of total bacteria detected by FISH (1). The ENT1-probe (5'-CCGCTTGCTCTCGCGAG-3') was used to detect specifically *Enterobacteriaceae* (29). The probes were labeled with Cy3 (5'-end). The FISH protocol was adapted from Manz *et al.* (30). The sample was filtered through a 25-mm-diameter, 0.2- μm -pore-size white polycarbonate membrane (Millipore) and was fixed with 3.7% (v/v) formaldehyde for 30 min. The sample was washed twice with phosphate buffer saline (pH 7.4), air-dried and dehydrated with 2 mL of increasing concentrations of ethanol (50%, 80% and 95%, 3 min each). A volume of 50 μL of hybridization solution (20% formamide, 0.9 M NaCl, 0.1% SDS and 20 mM Tris-HCl pH 7.2) containing 50 ng of the labeled probe was applied to the filter and a coverslip was put on the filter to limit evaporation during hybridization (2 h at $46\pm 1^\circ\text{C}$ in a moisture chamber). The filter was then washed twice for 15 min in 30 ml of 46°C preheated wash solution (215 mM NaCl, 0.1% SDS and 20 mM Tris-HCl pH 7.2) and mounted on a slide with AF87 antifading reagent (Citifluor Ltd., London, UK). Hybridized cells were visualized by epifluorescence microscopy with a 510- to 550-nm excitation filter and a 590-nm barrier filter. Ten to one hundred microscopic fields were counted depending on cell concentration (for *Enterobacteriaceae*, 100 microscopic fields were systematically counted). The detection limit was 1.4×10^2 cells mL^{-1} for 10 mL filtered (EUB338) and 4.1 cells mL^{-1} for 100 mL filtered (ENT1). The standard error was estimated around 20% for each sample. The quality of the hybridization procedure was checked systematically by using species known to hybridize (or not) with the probes.

Size of *Enterobacteriaceae* for estimation of viability: the size (length) of each *Enterobacteriaceae* visualized during microscopic observation of the samples after hybridization with ENT1-probe with or without a preliminary DVC procedure was measured (elongated and not-elongated cells) using the software DP50-software version 3.2 (Olympus). Since the concentration of *Enterobacteriaceae* was weak (around 10 to 200 bacteria per 100 microscopic field), the totality of detected bacteria were sized. The size distribution of cells detected by FISH without DVC was statistically compared (Mann Whitney, $p < 0.05$) to the one of cells detected by DVC-FISH to define the presence of viable (elongated) *Enterobacteriaceae*.

Characterization of dissolved organic matter (DOM). All glassware used for organic matter analyses was treated at 550°C for 4 h in order to remove residual organic matter.

(i) *Dissolved Organic Carbon (DOC)* was measured with a TOC-meter (O.I. corporation- Model 700 TOC analyzer calibrated with a potassium phthalate solution at 5 mg C L⁻¹) after filtration of the sample through a 0.45-μm-pore-size Polyvinylidene difluoride membrane (Millipore). Inorganic carbon was eliminated by phosphoric acid and by nitrogen bubbling. CO₂ formed was measured by infrared detection. Results are expressed in mg C L⁻¹. The detection and sensitivity limits were 0.1 and 0.05 mg L⁻¹, respectively. Values were expressed as the mean of 3 measurements.

(ii) *Biodegradable DOC (BDOC)* was determined as previously described (44). A 300 mL sample was sterilized by filtration through a 0.2-μm-pore-size Polyvinylidene difluoride membrane (Millipore). Six mL of a biodiversified inoculum (river water filtered through a 2-μm membrane) were added to the sample. Incubation occurred in the dark at 22±2°C for 28 days during which DOC was measured weekly. BDOC was calculated as the difference between initial DOC and minimum DOC measured during incubation. Controls were carried out in order to verify bacterial inoculum activity (acetate + inoculum). The detection limit was 0.1 mg L⁻¹.

Statistical analysis. Statistical comparisons between different concentrations or sizes were made by using the Mann Whitney test and were carried out with the Statview 5.0 software package (SAS institute Inc., Cary, NC).

Experimental procedure. (i) The occurrence of *Enterobacteriaceae* in drinking water at the outlet of the treatment plant was followed regularly (2 to 4 sampling per month) during a one year period using plate count agar counting and FISH detection. During this period, two series of assays were used to estimate the viability of *Enterobacteriaceae* detected in drinking water via the DVC-FISH method. (ii) These two series of assays also served to determine whether addition of AOM in drinking water can support *Enterobacteriaceae* survival. Thus, AOM-NS, AOM-Cl₂ or AOM-O₃ and a solution of sodium acetate (model of easily biodegradable compounds) were added in the dechlorinated drinking water in order to supplement it with 0.2 mg BDOC L⁻¹. A blank containing only the dechlorinated drinking water was prepared in parallel. Each sample was then incubated at 22±2°C without shaking in darkness. The bacterial population was recorded over a period of 11 days.

RESULTS

Occurrence of Enterobacteriaceae in drinking water

The drinking water produced by the treatment plant of Nancy (France) was analyzed for a one year period in order to estimate the average level of *Enterobacteriaceae* in treated water. The average characteristics of water over all the duration of analysis are presented in table 2.

TABLE 2. Average characteristics of drinking water samples over the 12 month period (05/2003-06/2004). Numbers in parentheses represent the standard deviations (n=36).

Analyzed parameters	Treated water
Free chlorine applied (mg L ⁻¹)	0.8 (0.3)
pH	7.4 (0.2)
Conductivity (μS cm ⁻¹)	354.0 (114.2)
DOC (mg L ⁻¹)	1.6 (0.2)
BDOC (mg L ⁻¹)	0.3 (0.2)

The FISH method systematically detected *Enterobacteriaceae* in treated water (Fig. 1). The concentrations varied from 2.0×10^1 to 2.1×10^3 cells mL⁻¹ during the sampling period. On average, 3.5×10^2 *Enterobacteriaceae* mL⁻¹ were detected in drinking water. They thus represented 0.17% of the total population and 0.58% of the EUB338-labeled bacterial population. No cultivable coliform was measured on selective agar during the 12 months of analysis (<0.01 CFU mL⁻¹), suggesting that the detected *Enterobacteriaceae* were either noncoliform *Enterobacteria*, or dead bacteria, or bacteria in a viable but non cultivable physiological state.

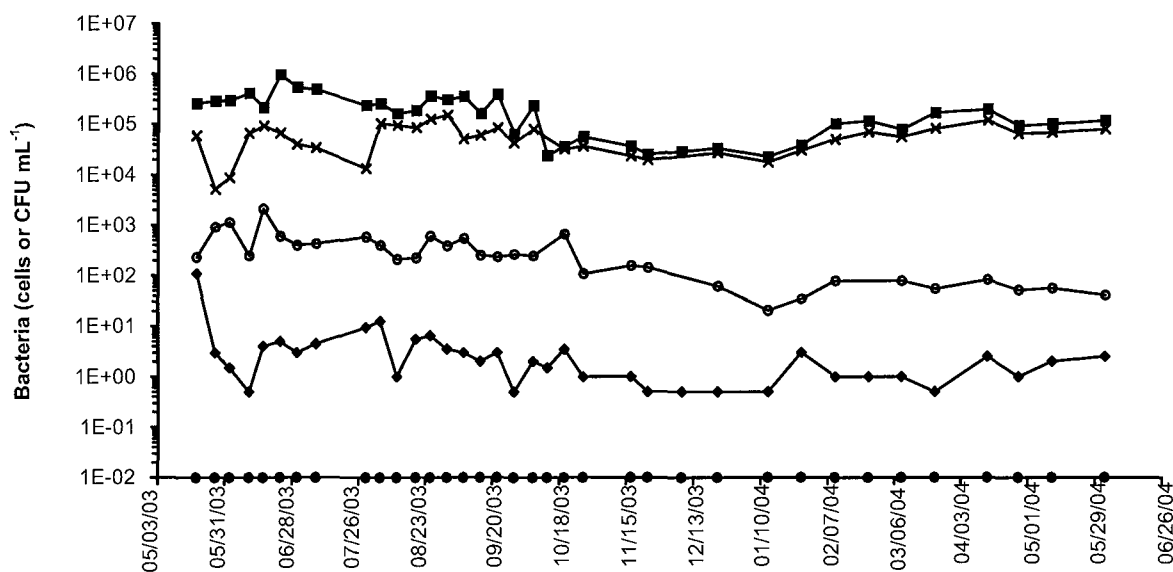


FIG. 1. Concentrations of total bacteria (■), cultivable bacteria on non selective agar (PCA) (◆), *Eubacteria* (EUB338-detected cells) (×), *Enterobacteriaceae* (ENT1-detected cells) (○) and cultivable coliforms on selective agar (TTC-tergitol 7) (●) in treated water during the 12 months of analysis.

During the sampling period, two series of analyses were used to estimate the viability of *Enterobacteriaceae* detected in drinking water via the DVC-FISH method. The size of all ENT1-probe-labeled *Enterobacteriaceae* with or without preliminary DVC revivification was measured microscopically. Figure 2 shows the size distribution of *Enterobacteriaceae* measured in drinking water samples by FISH with and without DVC. Because of the diversity of sizes in the population and the weak signal of elongation, it was difficult to fix rigorously a threshold value above which bacteria could be considered elongated (criterion of viability). So, it was decided to compare the size distribution of *Enterobacteriaceae* detected by FISH and by DVC-FISH. The statistical comparison of sizes showed that the DVC step increased significantly the size of bacteria (Mann Whitney, $p < 0.0001$). It appears clearly that the size distribution shifted to the right (larger sizes) when the DVC step was carried out: *Enterobacteriaceae* detected by FISH measured on average 905 (± 388) nm whereas those detected by DVC-FISH measured 1326 (± 521) nm. Twenty percents of *Enterobacteriaceae* detected by DVC-FISH had a size higher than the maximum value obtained in the control population (FISH without DVC). This shows that at least 20% of the *Enterobacteriaceae* present in drinking waters were able to elongate, i.e. to synthesize cellular material, which means that a fraction of this population was viable.

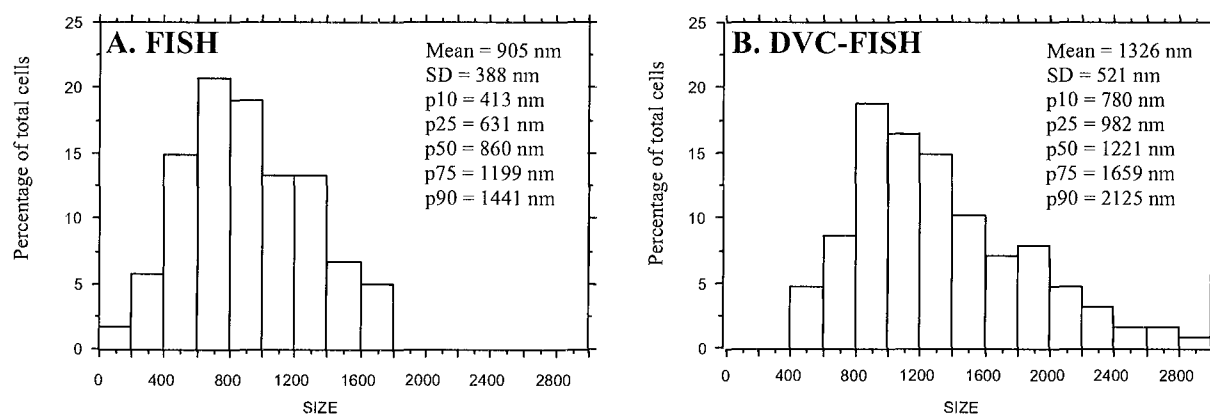


FIG. 2. Size distribution of all *Enterobacteriaceae* cells present in the drinking water samples ($n=2$, 128 bacteria measured) detected by FISH without (A) and with (B) a DVC step (SD=standard deviation ; p=percentile).

Effect of AOM on the bacterial population naturally occurring in drinking water

To determine the influence of AOM on the population of *Enterobacteriaceae* naturally occurring in drinking waters, two independent tests were carried out in batches (Sept. and Oct. 2004). The dechlorinated drinking water was supplemented with 4 types of organic matter (AOM-NS, AOM- Cl_2 , AOM- O_3 and acetate) in order to increase the BDOC of the water by $+0.2 \text{ mg L}^{-1}$. Initial

characteristics of each tested water are presented in table 2. The behavior of *Enterobacteriaceae* and autochthonous bacteria were then recorded over a period of 11 days.

(i) *Effect of AOM on the total bacterial population survival*

Microscopic counts of total number of cells revealed more or less pronounced growth of bacteria in all samples (Fig. 3). The total number of bacteria increased from 48 h of incubation and was stabilized around the 7th day. For nonsupplemented drinking water samples, growth of total bacteria during the 11 days was relatively low (from $4.1 \times 10^5 \pm 1.2 \times 10^5$ to $1.7 \times 10^6 \pm 5.6 \times 10^5$ cells mL⁻¹) in spite of the presence of 0.15 mg BDOC L⁻¹ (Table 3). This growth corresponded to an average cellular production of 0.6 log (Table 4).

TABLE 3. Initial characteristics (T₀) of tested waters (dechlorinated drinking water (DW) supplemented or not with dissolved organic matter). Two experiments are averaged ($\pm$ standard deviation). DL = 0.1 CFU mL⁻¹.

	Tested waters				
	DW	DW+AOM-NS ^a	DW+AOM-Cl ₂ ^b	DW+AOM-O ₃ ^c	DW+Acetate
<i>Physico-chemical parameters</i>					
DOC (mg C L ⁻¹)	1.54 $\pm$ 0.02	1.90 $\pm$ 0.06	1.77 $\pm$ 0.04	1.86 $\pm$ 0.01	1.98 $\pm$ 0.21
BDOC (mg C L ⁻¹)	0.15 $\pm$ 0.03	0.47 $\pm$ 0.08	0.38 $\pm$ 0.03	0.45 $\pm$ 0.10	0.60 $\pm$ 0.21
BDOC added (mg C L ⁻¹)	0 $\pm$ 0	0.32 $\pm$ 0.11	0.23 $\pm$ 0.06	0.30 $\pm$ 0.13	0.45 $\pm$ 0.23
Nitrogen (mg N L ⁻¹)	0.79 $\pm$ 0.16	0.82 $\pm$ 0.19	0.82 $\pm$ 0.19	0.77 $\pm$ 0.16	0.68 $\pm$ 0.03
Phosphorous (mg P L ⁻¹)	0.24 $\pm$ 0.17	0.13 $\pm$ 0.01	0.15 $\pm$ 0.04	0.12 $\pm$ 0	0.13 $\pm$ 0.01
pH	7.32 $\pm$ 0.02	7.39 $\pm$ 0.01	7.32 $\pm$ 0.01	7.34 $\pm$ 0.01	7.31 $\pm$ 0.01
Conductivity (μ S cm ⁻¹)	222 $\pm$ 21	232 $\pm$ 20	220 $\pm$ 14	213 $\pm$ 22	218 $\pm$ 16
<i>Microbiological parameters</i>					
Total bacteria (cells mL ⁻¹)	4.1 $\pm$ 1.2 $\times 10^5$	3.9 $\pm$ 1.3 $\times 10^5$	4.2 $\pm$ 0.6 $\times 10^5$	3.9 $\pm$ 2.0 $\times 10^5$	2.9 $\pm$ 1.0 $\times 10^5$
Eubacteria (cells mL ⁻¹)	1.5 $\pm$ 0.9 $\times 10^5$	1.8 $\pm$ 0.8 $\times 10^5$	1.6 $\pm$ 0.5 $\times 10^5$	1.6 $\pm$ 0.6 $\times 10^5$	1.2 $\pm$ 0.2 $\times 10^5$
<i>Enterobacteriaceae</i> (cells mL ⁻¹)	4.1 $\pm$ 1.7 $\times 10^1$	3.9 $\pm$ 0.3 $\times 10^1$	4.7 $\pm$ 2.0 $\times 10^1$	4.1 $\pm$ 1.7 $\times 10^1$	3.7 $\pm$ 1.7 $\times 10^1$
Cultivable bacteria (CFU mL ⁻¹)	1.4 $\pm$ 1.0 $\times 10^1$	2.7 $\pm$ 3.1 $\times 10^1$	1.2 $\pm$ 0.4 $\times 10^1$	3.1 $\pm$ 3.6 $\times 10^1$	1.3 $\pm$ 1.2 $\times 10^1$
Cultivable coliforms (CFU mL ⁻¹)	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL

^aAOM-NS = dissolved organic matter naturally secreted by algae

^bAOM-Cl₂ = dissolved organic matter released by chlorinated algae

^cAOM-O₃ = dissolved organic matter released by ozonated algae

The addition of the tested organic matters (+0.2 to +0.5 mg BDOC L⁻¹) led to different effects according to the origin and/or nature of the organic molecules (Fig. 3). The addition of acetate to drinking water did not lead to a more pronounced growth than nonsupplemented drinking water (0.7 log). Contrary to acetate, the addition of AOM supported the growth of bacteria (Fig. 3) since the cellular production was multiplied by 2 to 4 compared to nonsupplemented drinking water (Table 4). In spite of equivalent concentrations of added BDOC in all samples, the AOM-O₃ was the most favorable substrate by causing the strongest growth (2.2 log).

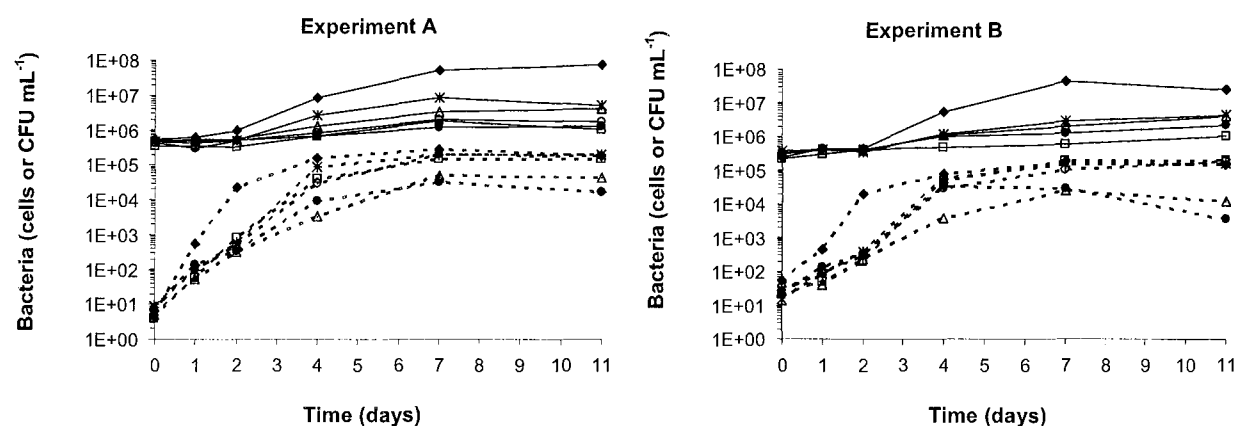


FIG. 3. Concentrations of total bacteria (—) and cultivable heterotrophic bacteria on non selective agar (---) in the different tested waters during the 11 days of incubation: drinking water (●), drinking water+AOM-O₃ (◆), drinking water+acetate (□), drinking water+AOM-NS (Δ) and drinking water+AOM-Cl₂ (*).

The number of bacteria detected by the universal probe EUB338 (FISH) increased in parallel with the total number of bacteria. However, the productions of *Eubacteria* were higher than those of total cells (Table 4), which suggests that, during the 11 days of incubation, the physiological state of cells was improved allowing a better microscopic detection; the percentage of *Eubacteria* rose from 41% (at t=0) to 90% (at t=11 days) on average in all the tested mediums. It could also corresponds to a specific multiplication of *Eubacteria* which could not be detected by total counting because of a lower sensitivity threshold.

TABLE 4. Cellular production during the 11 days of incubation ($\log N_{\max} - \log N_0$) in terms of total bacteria, *Eubacteria*, *Enterobacteriaceae* and cultivable heterotrophic bacteria in the different tested waters. Results of the two experiments are averaged $\pm$ standard deviation.

Tested waters	Production ($\log N_{\max} - \log N_0$)			
	Total bacteria	<i>Eubacteria</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	Cultivable bacteria*
DW	0.60 ± 0.28	1.02 ± 0.36	0.18 ± 0.08	3.41 ± 0.33
DW+AOM-NS	1.02 ± 0.11	1.33 ± 0.21	0.33 ± 0.01	3.35 ± 0.89
DW+AOM-Cl ₂	1.15 ± 0.16	1.44 ± 0.10	0.44 ± 0.09	4.18 ± 0.24
DW+AOM-O ₃	2.20 ± 0.07	2.39 ± 0.14	0.73 ± 0.08	4.12 ± 0.28
DW+Acetate	0.69 ± 0.04	0.88 ± 0.11	0.32 ± 0.15	4.27 ± 0.43

* on non selective medium

In parallel to the growth of total bacteria, the cultivability of heterotrophic bacteria increased strongly during the 11 days of incubation in the drinking water supplemented or not with organic matter (Fig. 3). The number of cultivable bacteria strongly increased from the beginning of the experiment and stabilized around 10^4 to 10^5 CFU mL⁻¹ after 7 days. Therefore, after 7 days, the cultivable bacteria accounted for 4% of the total population versus 0.005% at t=0. The increase of cultivability (3 to 4 log in 11 days) was different according to the nature of organic matter tested (Table 4). The number of cultivable bacteria after 11 days in AOM-Cl₂, AOM-O₃ and acetate

(contrary to AOM-NS) was 1 log higher compared to the nonsupplemented drinking water. Cultivability increased faster when AOM-O₃ rather than other media was added. Contrary to AOM-NS This increase was an expression of cell multiplication or renewed cultivability, or both.

(ii) Effect of AOM on the survival of *Enterobacteriaceae* population

The *Enterobacteriaceae* population (0.01% of total cells at t=0) was differentiated from the total population by using the FISH method (probe ENT1) coupled or not with the DVC procedure. Since all fluorescent cells were counted (elongated and not elongated), the concentrations of *Enterobacteriaceae* counted after FISH or DVC-FISH did not show a statistically significant difference (Mann Whitney, $p > 0.11$). So, only the results obtained by FISH are presented here. The time course of the *Enterobacteriaceae* concentrations (Fig. 4) showed an increase in all tested media from the beginning of the experiment to the 7th day of incubation. After this time, concentrations stabilized or decreased. In nonsupplemented drinking water, AOM-NS and acetate, the increase remained weak (+0.2 to +0.3 log) (Table 3), showing a 1.5- to 2.2-fold increase over the initial concentration. The addition of AOM-O₃ and AOM-Cl₂ in drinking water had a more pronounced effect on *Enterobacteriaceae* with a respective average increase of 0.7 and 0.4 log (Table 3). Thus, compared to nonsupplemented drinking water, the addition of AOM released by algae after oxidation multiplied by 5 (AOM-Cl₂) to 10 (AOM-O₃) the number of *Enterobacteriaceae* produced. These results show that, although addition of AOM was favorable to the *Enterobacteriaceae* population naturally occurring in drinking water, it was even more beneficial for the total bacterial population (other than *Enterobacteriaceae*). Indeed, only 0.001 to 3% of total produced cells were *Enterobacteriaceae* cells. Moreover, figure 5 shows that the increase of *Enterobacteriaceae* was proportional to that of total cells with an average increase of 0.3 log for *Enterobacteriaceae* and 1 log for total cells.

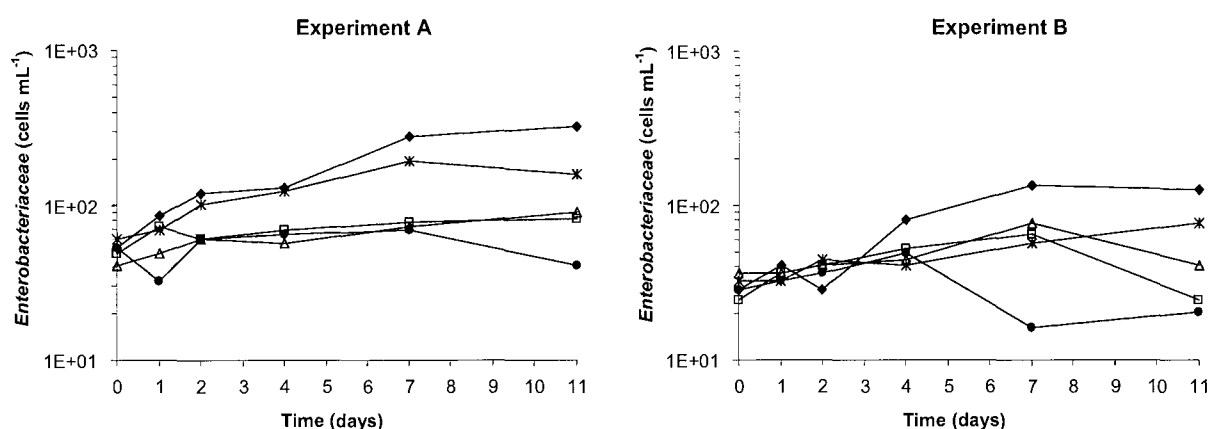


FIG. 4. Concentrations of *Enterobacteriaceae* (ENT1-detected cells, detection limit=4.1 cells mL⁻¹) in the different tested waters during the 11 days of incubation : drinking water (●), drinking water+AOM-O₃ (◆), drinking water+acetate (□), drinking water+AOM-NS (Δ) and drinking water+AOM-Cl₂ (*).

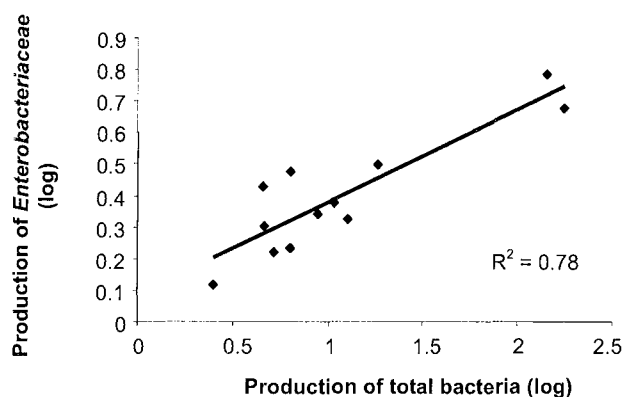


FIG. 5. Relation between the number of produced *Enterobacteriaceae* (ENT1-detected cells) and produced total bacteria ($\log N_{\max} - \log N_0$) in all tested waters (n=12).

The use of the DVC-FISH method revealed the presence of viable *Enterobacteriaceae* in drinking water. The DVC step indeed caused an elongation of cells, which is commonly associated with viability. The comparison of size distributions of *Enterobacteriaceae* cells in the blank (nonsupplemented drinking water) and in the samples supplemented with organic matter revealed a significant difference at the end of the experiment (Mann Whitney, $p=0.0005$ to 0.015 according to the tested medium). The addition of DOM increased the 50th percentile by a factor of 1.4 to 1.6 (Fig. 6). These results confirm that the addition of DOM (AOM or acetate) was favorable for the survival of *Enterobacteriaceae* but not sufficient to enable development of cultivable coliform bacteria on selective agar medium throughout the experiment. The increase of the size and of the concentration of *Enterobacteriaceae* confirmed the presence of viable *Enterobacteriaceae* in drinking water.

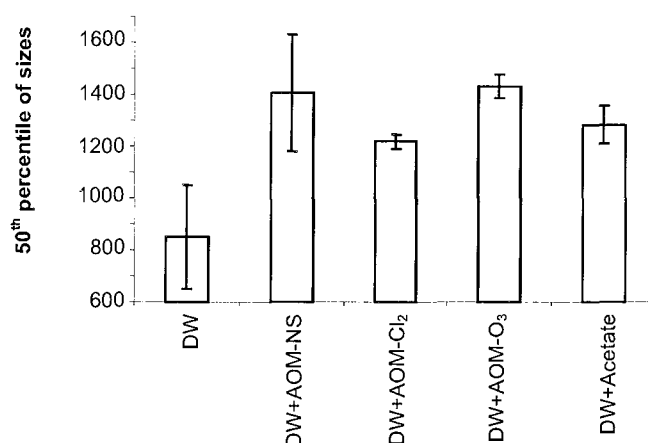


FIG. 6. 50th percentile of sizes of *Enterobacteriaceae* detected by DVC-FISH at the end of the experiment (t=11days) in all tested waters. Values of the two experiments are averaged. Bars represent standard deviations.

DISCUSSION

(i) Occurrence of *Enterobacteriaceae* in drinking waters

Until now, bacteria in water at the outlet of treatment plants have been identified and counted solely with the culture-based method. This technique implies that the cells are able to multiply to be detected. However potabilisation treatments (ozone, chlorine...) injure a fraction of the bacterial population which thus becomes undetectable by this method (19, 36, 37, 40). Taking into account the results obtained with culture methods, it was long considered that drinking waters were free of *Enterobacteriaceae*. By using a nonconventional method (FISH), this study showed for the first time that non-cultivable *Enterobacteriaceae* were systematically detected in drinking water at the outlet of the treatment plant (on average 3.5×10^2 cells mL⁻¹). Since they are present in raw waters, it is not surprising to detect them in treated waters because treatments do not specifically remove selected bacterial populations. Moreover, our results indicated that variations in *Enterobacteriaceae* were closely related with the total bacterial count.

The DVC-FISH method showed that a fraction of this continuous flow of *Enterobacteriaceae* was viable (at least 20%). This is in agreement with previous studies (5, 6, 17) which demonstrated the sporadic presence of viable *Enterobacteriaceae* (elongated cells) in drinking waters at levels not exceeding 135 cells /100 mL. In these studies, only viable *Enterobacteriaceae* were measured. In the present study, all ENT1-probe-labeled bacteria, whether viable or dead, were counted, possibly explaining the difference in concentration between our results and those of other studies. Moreover, Delabre *et al.* (17) used a method targeting only viable *E. coli* and not all bacteria belonging to the *Enterobacteriaceae* family. Moreover, several studies showed that the bacterial composition of drinking waters could strongly vary according to the studied network (pipe material, oxidant type, origin of raw water...). For example, the percentage of γ -proteobacteria (subclass including *Enterobacteriaceae*) in water and biofilm samples has been reported to range from 0.3 to 7%, with extreme values even reaching 41% (3, 23, 24, 43, 51).

Using DVC procedure, the criterion of viability was an elongation of cells following a revivification step (25) with the definition of a threshold value of bacterial size above which bacteria could be considered to be elongated. Because of the diversity of the measured sizes and the weak elongation of cells, it appeared difficult to define rigorously a threshold value, and thus it was not possible to quantify the viable fraction among all *Enterobacteriaceae* detected by FISH. Moreover, the few publications which used the DVC-FISH method to count viable bacteria in environmental samples gave no indication on the selected threshold (4, 5, 17, 21, 25, 40), undoubtedly reflecting the difficulty of this choice and the fact that it is sample-dependent. Choosing a threshold value is

particularly difficult for drinking water samples exhibiting a low number of targeted cells (such as the *Enterobacteriaceae* subpopulation) and a high proportion of starved, injured or stressed bacteria. For these reasons, we chose in this study not to fix a threshold value but to use a new qualitative approach to estimate the presence of viable *Enterobacteriaceae* in the sample. All the bacteria labeled with the ENT1 probe (whether elongated or not) were counted, followed by a statistical comparison (Mann Whitney test) between the size distributions of bacteria detected by FISH and by DVC-FISH. The statistically significant difference ($p < 0.0001$) made it possible to affirm that a fraction (not quantified) of *Enterobacteriaceae* was capable of elongating and thus viable.

(ii) Effect of AOM on the *Enterobacteriaceae* naturally occurring in drinking waters

The results of this study showed that a fraction of *Enterobacteriaceae* naturally present in drinking water benefited from addition of AOM. Supplementation with AOM enabled drinking water to harbor a more significantly larger number of *Enterobacteriaceae* (+0.3 to +0.7 log) than non supplemented water (+0.2 log). This favorable effect of the AOM was previously demonstrated using laboratory strains (*E. coli* and coliform bacteria) massively inoculated in drinking waters (8, 11) but this is the first time that it is highlighted in an *in situ* population of *Enterobacteriaceae*.

In spite of equivalent additions of BDOC, the behavior of *Enterobacteriaceae* proved to be different according to the origin/nature of the tested DOM, AOM-O₃ allowing the strongest increase of the *Enterobacteriaceae* concentrations. The much more favorable effect of AOM-O₃ is in agreement with the action of ozone, which renders organic matter more biodegradable by breaking chemical bonds, aromatic cycles, etc. (16, 18, 27, 33, 35, 41). The study of the molecular weight distribution (MW) of each AOM moreover showed that AOM-O₃ contained more low MW molecules (42% of DOC < 500 Da) and fewer high MW molecules (14% of DOC > 30000 Da) than the two other origins of AOM tested (80% and 64% of DOC > 30000 Da and 17% and 19% of DOC < 500 Da, for AOM-NS and AOM-Cl₂, respectively) (data not shown).

It is interesting to note that AOM, whatever its origin (AOM-NS, AOM-Cl₂ or AOM-O₃) was as favorable or more favorable than acetate, despite the fact that this model molecule is known to be very easily assimilable by bacteria (12, 33). As suggested by Bouteleux *et al.* (11), in contrast to acetate, the AOM tested in the present study corresponds to a mixture of undoubtedly very diversified organic compounds, of which only 50-70% are identified as sugars. The unidentified fraction could contain other nutritive elements (vitamins, cofactors...) which could facilitate the survival of heterotrophic bacteria (13, 14, 34) and could possibly explain why AOM had such a positive effect compared to acetate.

The findings of this work have demonstrated the presence of *Enterobacteriaceae* in drinking water of which a fraction is viable whereas conventional culture-based methods unable to detect them. As previously demonstrated, the addition of AOM had a favorable effect on the survival of drinking water bacteria and, on the same basis, on the *Enterobacteriaceae* naturally present, in spite of their low representativity among the total population. The incapacity of the culture method to detect this subpopulation of viable *Enterobacteriaceae* (VBNC bacteria or sensitivity threshold too low) demonstrates the need for using techniques other than traditional methods to evaluate the microbiological diversity of distributed waters and assess the bacterial behavior in relation to modifications of the nutritive status of water. This would be particularly important during seasonal events which affect the organic matrix of drinking water.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank the Communauté Urbaine du Grand Nancy (CUGN, Nancy, France) and the Société Nancéenne des eaux (SNE, Vandoeuvre-lès-Nancy, France) to have authorized the access to the treatment plant of Nancy during the twelve months of analysis.

REFERENCES

1. **Amann, R.I., W. Ludwig, and K.-H. Schleifer.** 1995. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* **59**:143-169.
2. **American Public Health Association.** 1998. Standard methods for the examination of water and wastewater, 20th ed. American Public Health Association, Washington D.C.
3. **Batté, M., L. Mathieu, P. Laurent, and M. Prévost.** 2003. Influence of phosphate and disinfection on the composition of biofilms produced from drinking water, as measured by fluorescence *in situ* hybridization. *Can. J. Microbiol.* **49**:741-753.
4. **Baudart, J., A. Olaizola, J. Coallier, V. Gauthier, and P. Laurent.** 2005. Assessment of a new technique combining a viability test, whole-cell hybridization and laser-scanning cytometry for the direct counting of viable *Enterobacteriaceae* cells in drinking water. *FEMS Microbiol. Lett.* **243**:405-409.
5. **Baudart, J., J. Coallier, P. Laurent, and M. Prévost.** 2002. Rapid and sensitive enumeration of viable diluted cells of members of the family *Enterobacteriaceae* in Freshwater and drinking water. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:5057-5063.
6. **Besner, M.-C., V. Gauthier, P. Servais, and A. Camper.** 2002. Explaining the occurrence of coliforms in distribution systems. *J. Am. Water Works Assoc.* **94**:95-109.
7. **Betzer, N., and Y. Kott.** 1969. Effect of halogens on algae. *Water Res.* **3**:237-264.
8. **Boualam, M., L. Mathieu, S. Fass, J. Cavard, and D. Gatel.** 2002. Relationship between coliform culturability and organic matter in low nutritive waters. *Water Res.* **36**:2618-2626.

9. **Bougis, P.** 1974. Ecologie du plancton marin. Vol. I. Le phytoplancton. Masson, Paris, 196p.
10. **Boulos, L., M. Prévost, B. Barbeau, J. Coallier, and R. Desjardins.** 1999. LIVE/DEAD® BacLight™ : application of a new rapid staining method for direct enumeration of viable and total bacteria in drinking water. *J. Microbiol. Methods* **37**:77-86.
11. **Bouteleux, C., S. Saby, D. Tozza, J. Cavard, V. Lahoussine, P. Hartemann, and L. Mathieu.** 2005. *Escherichia coli* behavior in the presence of organic matter released by algae exposed to water treatment chemicals. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**:734-740.
12. **Brenner, J.D.** 1984. Family I :*Enterobacteriaceae*, p. 408-516. *In* N.R. Krieg and J.G. Holt (ed.), *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol. 1. Williams & Wilkins, Baltimore, Md.
13. **Cabridenc, R.** 1995. Les algues: un réactif biologique particulièrement intéressant. *Techniques Sciences et Méthodes* **1**:17-19.
14. **Camper, A.** 1994. Coliform regrowth and biofilm accumulation in drinking water systems: a review, p. 91-105. *In* G. G. Geesey, Z. Lewandowski, and H.-C. Flemming (ed.), *Biofouling and biocorrosion in industrial water systems*. Lewis Publishers, Boca Raton, Fla.
15. **Colwell, R.R., and D.J. Grimes.** 2000. Nonculturable microorganisms in the environment. ASM Press, Washington, DC.
16. **DeLaat, J., M. Doré, and J. Mallevialle.** 1991. Influence d'une préozonation sur l'adsorbabilité et la biodégradabilité des substances humiques d'origine aquatique et sur les performances des filtres de charbon actif en grain. *Water Res.* **25**:151-164.
17. **Delabre, K., V. Dile, M.-R. de Roubin, D. Gatel, F. Poty, and J. Cavard.** 2001. New analytical tools for distribution system surveillance. *Proceedings of the Water Quality Technology Conference*. American Water Works Association, Washington, D.C.
18. **Doré, M.** 1989. Chimie des oxydants et traitement des eaux. Lavoisier, Paris, France.
19. **Dukan, S., Y. Lévi, and D. Touati.** 1997. Recovery of culturability of an HOCl-stressed population of *Escherichia coli* after incubation in phosphate buffer: resuscitation or regrowth? *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:4204-4209.
20. **Echelberger, W.F., J.L. Pavoni, P.C. Singer, and M.W. Tenny.** 1971. Disinfections of algae-laden waters. *J. Sanit. Engng Div. Am. Soc. Civ. Engrs.* **172**:721-730.
21. **Joux, F., and P. Lebaron.** 1997. Ecological implications of an improved direct viable count method for aquatic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:3643-3647.
22. **Kalmbach, S.** 1998. Polyphasic characterization of the microbial population of drinking water biofilms. PhD Thesis. University of Berlin, Berlin, Germany.
23. **Kalmbach, S., W. Manz, and U. Szewzyk.** 1997. Dynamics of biofilm formation in drinking water: phylogenetic affiliation and metabolic potential of single cells assessed by formazan reduction and *in situ* hybridization. *FEMS Microbiol. Ecol.* **22**:265-279.
24. **Kalmbach, S., W. Manz, B. Bendinger, and U. Szewzyk.** 2000. *In situ* probing reveals *Aquabacterium commune* as a widespread and highly abundant bacterial species in drinking water biofilms. *Water Res.* **34**:575-581.

25. **Kogure, K., U. Simidu, and N. Taga.** 1979. A tentative direct microscopic method for counting living marine bacteria. *Can. J. Microbiol.* **25**:415-420.
26. **Lake, R., S. Driver, and S. Ewington.** 2001. The role of algae in causing coliform problems within the distribution system, p. 153. Proceedings of the Second World Water Congress. International Water Association, Berlin, Germany.
27. **Lefebvre, E., and J.P. Croué.** 1995. Modification de la matière organique lors des traitements conventionnels de potabilisation. *Rev. Sci. Eau* **8**:463–479.
28. **Lignell, R.** 1990. Excretion of organic carbon by phytoplankton : its relation to algal biomass, primary productivity and bacterial secondary productivity in the Baltic Sea. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **68**:85-89.
29. **Loge, F.J., R.W. Emerick, D.E. Thompson, D.C. Nelson, J.L. Darby.** 1999. Development of a fluorescent 16S rRNA oligonucleotide probe specific to the family *Enterobacteriaceae*. *Water Environ. Res.* **71**:75-83.
30. **Manz, W., R. Amann, R. Szewzyk, U. Szewzyk, T.A. Stenström, P. Hutzler, and K.H. Schleifer.** 1995. *In situ* identification of *Legionellaceae* using 16S rRNA-targeted probes and confocal laser scanning microscopy. *Microbiology* **141**:29-39.
31. **Mathieu, L., J.-C. Block, M. Prévost, A. Maul, and R. De Bishop.** 1995. Biological stability of drinking water in the city of Metz distribution system. *J. Water SRT-Aqua* **44**:230-239.
32. **Mathieu, L., J.-L. Paquin, J.-C. Block, G. Randon, J. Maillard, and D. Reasoner.** 1992. Parameters governing bacterial growth in water distribution systems. *Sci. Eau* **5**:91-112.
33. **Merlet, N., N. Karpel Vel Leitner, and M. Doré.** 1992. Incidence de quelques étapes de traitement sur l'évolution du CODB d'eaux à potabiliser et de molécules modèles. *Sci. Tech. Eau* **25**:17–22.
34. **Metting, B., and J. W. Pyne.** 1986. Biologically active compounds from microalgae. *Enzyme Microb. Tech.* **8**:386–394.
35. **Miettinen, I. T., T. Vartiainen, and P. J. Martikainen.** 1998. Microbial growth in drinking waters treated with ozone, ozone/hydrogen peroxide or chlorine. *Ozone-Sci. Eng.* **20**:303-315.
36. **Monfort, P., and B. Baleux.** 1999. Bactéries viables non cultivables : réalités et conséquences. *Bull. Soc. Fr. Microbiol.* **14** :201-207.
37. **Oliver, J.D.** 2000. Formation of viable but nonculturable cells, p. 239-272. *In* S. Kjelleberg (Ed.), *Starvation in Bacteria*. Plenum Press, New York.
38. **Peterson, H.G., S.E. Hrudey, I.A. Cantin, T.R. Perley, and S.L. Kenefick.** 1995. Physiological toxicity, cell membrane damage, and the release of dissolved organic carbon and geosmin by *Aphanizomenon flos-aquae* after exposure to water treatment chemicals. *Water Res.* **9**:1515–1523.
39. **Plummer, J.D., and K. Edzwald.** 1998. Effect of ozone on disinfection by-product formation of algae. *Wat. Sci. Tech.* **37**:49-55.
40. **Pommepuy, M., M. Butin, A. Derrien, M. Gourmelon, R.R. Colwell, and M. Cormier.** 1996. Retention and enteropathogenicity by viable but nonculturable *Escherichia coli* exposed to seawater and sunlight. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:4621-4626.

41. Ribas, F., J. Frias, J. M. Huguet, and F. Lucena. 1997. Efficiency of various water treatment in the removal of biodegradable and refractory organic matter. *Water Res.* **31**:639-649.
42. Rompré, A., P. Servais, J. Baudart, P.R. De-Roubin, and P. Laurent. 2002. Detection and enumeration of coliforms in drinking water : current methods and emerging approaches. *J. Microbiol. Methods* **49**:31-54.
43. Schwartz, T., S. Hoffmann, and U. Obst. 1998. Formation and bacterial composition of young, natural biofilms obtained from public bank-filtered drinking water systems. *Water Res.* **32**:2787-2797.
44. Servais, P., G. Billen, and M.C. Hascoet. 1987. Determination of the biodegradable fraction of dissolved organic matter in waters. *Water Res.* **21**:445-450.
45. Servais, P., G. Billen, P. Laurent, Y. Lévi, and G. Randon. 1992. Studies of BDOC and bacterial dynamics in the drinking water distribution system of the northern parisian suburbs. *Sci. Eau* **5**:69-89.
46. Servais, P., P. Laurent, and G. Randon. 1995. Comparison of the bacterial dynamics in various french distribution systems. *J. Water SRT-Aqua* **44**:10-17.
47. Sukenik, A., B. Telch, A.W. Wachs, G. Shelef, I. Nir, and D. Levanon. 1987. Effect of oxidants on microalgal flocculation. *Wat. Res.* **21**:533-539.
48. Sundh, I. 1989. Characterization of phytoplankton extracellular products (PDOC) and their subsequent uptake by heterotrophic organisms in a mesotrophic forest lake. *J. Plankton. Res.* **11**:463-486.
49. Sundh, I. 1992. Biochemical composition of dissolved organic carbon derived from phytoplankton and used by heterotrophic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**:2938-2947.
50. Volk, C., and M.W. LeChevallier. 1999. Impacts of the reduction of nutrient levels on bacterial water quality in distribution systems. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:4957-4966.
51. Williams, M.M., J.W.S Domingo, M.C. Meckes, C.A. Kelty, and H.S. Rochon. 2004. Phylogenetic diversity of drinking water bacteria in a distribution system simulator. *J. Appl. Microbiol.* **96**:954-964.

VII.4. Discussion

VII.4.1. Quantification des *Enterobacteriaceae* en eau de distribution

L'objet de cette étude était d'estimer le flux d'Entérobactéries transitant dans une filière de traitement en utilisant la méthode d'hybridation *in situ* permettant de s'affranchir de l'étape de culture sur gélose. Des prélèvements réguliers ont donc été réalisés en entrée et en sortie de l'usine de potabilisation Edouard-Imbeaux de Nancy sur la période de mai 2003 à juin 2004.

L'utilisation de la méthode FISH a permis de mettre en évidence que l'eau traitée (en sortie d'usine) contient systématiquement des *Enterobacteriaceae* (vivantes ou mortes) à la hauteur de $3,5 \cdot 10^2$ cellules mL^{-1} en moyenne, représentant ainsi 0,2% des cellules totales. En couplant cette méthode à la procédure DVC, il a été possible de montrer que la taille moyenne des *Enterobacteriaceae* hybridées était significativement augmentée ($p < 0,0001$) après l'étape de revivification. Il est donc possible d'affirmer qu'une fraction (non quantifiée) des *Enterobacteriaceae* détectées a la capacité de synthétiser du matériel cellulaire, signe d'une viabilité (Coallier *et al.*, 1994 ; Kogure *et al.*, 1979). Compte tenu de la présence d'Entérobactéries dans l'eau brute, il ne paraît pas surprenant d'en retrouver dans l'eau traitée puisque les traitements de potabilisation ne sont pas à priori spécifiques des Entérobactéries. Pourtant, très peu d'études ont montré leur existence en eau traitée : seules les études de Baudart *et al.* (2001, 2002, 2005) et Delabre *et al.* (2001) ont montré des détections ponctuelles d'*Enterobacteriaceae* viables dans les eaux potables en utilisant la méthode DVC-FISH. Cependant, même si les concentrations mesurées en eau traitée dans cette étude peuvent paraître élevées, elles sont d'un point de vue théorique tout à fait logiques et attendues puisque l'abattement des *Enterobacteriaceae* au cours des traitements est tout à fait proportionnel à celui des cellules totales. Autrement dit, en considérant que l'abattement de la population d'*Enterobacteriaceae* des eaux brutes (en moyenne $4,6 \cdot 10^4$ cellules mL^{-1}) n'a pas plus de chance d'être éliminée par les traitements que les autres bactéries, on devrait retrouver de l'ordre de $4,6 \cdot 10^2$ *Enterobacteriaceae* mL^{-1} dans l'eau traitée (-99%), valeur très proche de nos données expérimentales ($3,5 \cdot 10^2$ cellules mL^{-1}).

Le suivi dans le temps des paramètres microbiologiques et physico-chimiques des eaux en entrée et en sortie d'usine durant toute la campagne de prélèvement a permis d'apprécier si la qualité des eaux traitées (en terme d'Entérobactéries) pouvait être reliée à la qualité des eaux brutes. Il apparaît que la concentration d'*Enterobacteriaceae* de l'eau traitée est significativement corrélée

aux concentrations d'*Enterobacteriaceae* ($p=0,0032$) et d'algues ($p<0,0001$) de l'eau brute ainsi qu'à la température de l'eau ($p<0,0001$). La température étant elle-même corrélée avec la plupart des paramètres étudiés, il semble qu'elle contrôle de manière prépondérante la qualité microbiologique des eaux. Cette observation, qui a déjà été décrite dans la littérature pour les bactéries coliformes (Fransolet *et al.*, 1985 ; LeChevallier *et al.*, 1996a), n'est pas surprenante dans le sens où la température influe directement sur la physiologie bactérienne. Les Entérobactéries étant mésophiles (taux de croissance optimum vers 30-40°C), leur taux de croissance augmente avec la température (Fransolet *et al.*, 1985). Cependant, Camper (1996) a suggéré que l'élévation du nombre de bactéries coliformes en période chaude pourrait être directement reliée à l'augmentation des substrats carbonés disponibles (provenant des pluies et des blooms algaux) plutôt qu'à un effet direct de la température. Même si dans nos essais les concentrations en COD et CODB n'apparaissent pas linéairement corrélées à la température ou à la concentration d'*Enterobacteriaceae* des eaux brutes ou des eaux traitées ($p>0,05$), il est possible que la qualité organique des eaux soit différente (au-delà de la quantité) et qu'elle influe sur les populations bactériennes. Les essais de laboratoire présentés dans les chapitres précédents ont d'ailleurs montré que les Enterobactéries étaient sensibles à la qualité (nature) de la matière organique et non pas seulement à la quantité.

VII.4.2. Effet de la MOA sur des *Enterobacteriaceae* autochtones et allochtones

Par comparaison aux résultats obtenus au chapitre VI, il nous a paru intéressant d'évaluer si le comportement des *Enterobacteriaceae* naturellement présentes dans les eaux potables (autochtones) vis-à-vis de la MOA était le même que celui d'*E. coli* cultivé en laboratoire et injecté massivement dans l'eau potable (chapitre VI).

L'effet d'un ajout de MOA dans l'eau potable montre des différences et des similitudes entre le comportement des *Enterobacteriaceae* autochtones et celui des *E. coli* injectés (allochtones). Alors que seule la MOA-O₃ permettait une élévation du nombre d'*E. coli* hybridés avec la sonde ENT1 par rapport au témoin non supplémenté, toutes les MOD testées augmentent les concentrations d'*Enterobacteriaceae* autochtones des eaux potables. Le tableau VII.2 résume l'augmentation (en log) des concentrations d'*Enterobacteriaceae* naturellement présentes dans les eaux et d'*E. coli*. L'augmentation mesurée est jusqu'à 9 fois supérieure dans le cas des *Enterobacteriaceae* autochtones.

Tableau VII.2. Augmentation ($\log N_{\max} - \log N_0$) du nombre d'*E. coli* allochtones injectés dans l'eau potable supplémentée ou non en MOD et du nombre d'Entérobactéries naturellement présentes dans l'eau (autochtones).

Milieu testé	Augmentation (log)	
	<i>E. coli</i> (allochtone)	<i>Enterobacteriaceae</i> (autochtone)
Eau potable	0,1	0,2
Eau potable + MOA-NS	0,1	0,3
Eau potable + MOA-Cl ₂	0,1	0,4
Eau potable + MOA-O ₃	0,6	0,7
Eau potable + Acetate	0,1	0,3

De plus, alors qu'une baisse plus importante des niveaux d'*E. coli* allochtones hybridés était observée dès le 4^{ème} jour dans les batchs contenant de la MOD (par comparaison à celui n'en contenant pas), suggérant une atteinte physiologique des cellules, les Entérobactéries naturellement présentes dans l'eau augmentent jusqu'à la fin de l'expérience ou restent relativement stables dès le 7^{ème} jour. L'effet négatif de l'ajout de MOA sur la population d'*E. coli* allochtones, observé au chapitre précédent, a été expliqué par un phénomène de compétition avec les bactéries autochtones des eaux potables (Kadurugamuwa et Beveridge, 1996 ; LeChevallier et McFeters, 1985b ; Li *et al.*, 1998 ; Ramalho *et al.*, 2001). Les résultats présentés ici suggèrent que la population d'*Enterobacteriaceae* ne subit pas, ou tout du moins en plus faible mesure, cette compétition. Ceci peut être expliqué par le fait que les *Enterobacteriaceae* autochtones des eaux potables sont plus adaptées aux conditions environnementales que la souche d'*E. coli* de laboratoire. Les signaux observés ne signifient pas pour autant que les *Enterobacteriaceae* naturellement présentes dans les eaux potables sont plus favorisées qu'*E. coli* par l'ajout de MOA car nous avons travaillé à des niveaux de concentration différents (10^5 mL^{-1} pour *E. coli* et 10^2 mL^{-1} pour les *Enterobacteriaceae*). Or, certaines études ont montré que la survie/croissance bactérienne en batch était dépendante de la concentration initiale en bactéries (Dukan *et al.*, 1997). De plus, étant donné que nous n'avons pas identifié quelles étaient les espèces d'*Enterobacteriaceae* responsables de l'augmentation du nombre de cellules hybridées avec la sonde ENT1, il est possible que ce ne soit pas une souche d'*E. coli* qui profite de l'ajout de MOA mais une autre espèce qui n'aurait pas forcément le même comportement qu'*E. coli*.

A l'inverse, des similitudes ont été observées entre les essais avec *E. coli* et ceux avec les *Enterobacteriaceae* autochtones de l'eau : ces résultats ont permis de confirmer (i) que le comportement des bactéries est différent selon l'origine de la MOA malgré des ajouts équivalents en terme de CODB, la MOA-O₃ étant celle qui permet l'augmentation la plus forte des concentrations en *Enterobacteriaceae*, et (ii) que la MOA est un substrat facilement utilisable par les Entérobactéries puisqu'elle permet une survie soit comparable soit supérieure à l'acétate.

Chapitre VIII - Conclusions générales

Les réseaux de distribution d'eau potable sont continuellement alimentés par des flux de matières organiques et inorganiques, ainsi que par des microorganismes provenant directement de l'usine de potabilisation et/ou introduits suite à des événements ponctuels comme des ruptures d'intégrité du réseau, des dépassements de la capacité de traitement ou des interventions humaines. Parmi les microorganismes de l'eau de distribution, les Entérobactéries revêtent une importance particulière puisque la plupart présente un pouvoir pathogène ou pathogène opportuniste et que certaines (les bactéries coliformes) sont utilisées comme indicateur de contamination fécale des eaux. La survie de ces microorganismes, comme toute bactérie hétérotrophe, est fortement dépendante de la matière organique dissoute biodégradable présente dans les eaux potables. Des épisodes ponctuels saisonniers tels que les blooms algaux, susceptibles de modifier la matrice organique des eaux brutes, et donc des eaux traitées, ont ainsi été suspectés comme pouvant favoriser les recroissances bactériennes en réseau de distribution.

Dans ce contexte, l'objectif de ce travail était donc d'étudier l'influence d'une matière organique particulière - la matière organique d'origine algale (MOA) - sur la survie des Entérobactéries dans les eaux potables afin d'estimer si la présence de MOA dans l'eau de distribution pouvait dégrader la qualité microbiologique de l'eau.

La composition de la MOA (mélange complexe de molécules organiques) utilisée lors de ce travail suggère en effet que cette matière organique spécifique représente une source importante de composés biodégradables pour les bactéries hétérotrophes. En effet, quelle que soit son origine, la MOA contient une forte proportion de sucres (47-71%), quelques acides aminés (2-8%), peu de composés aromatiques ($SUVA_{254}$ faible) et des quantités négligeables de protéines (0-0,1%), ce qui lui confère un fort potentiel biodégradable ($54\% < CODB < 81\%$).

Des différences qualitatives sont cependant observées selon l'origine de la MOA. La MOA issue d'algues *Chlorella* ozonées (MOA-O₃) présente un fort CODB (74%) et apparaît comme la matière organique la plus facilement assimilable par les bactéries puisque composée par une majorité de molécules de faible MMA (jusqu'à 85% du COD < 0,5 kDa) et caractérisée par des cinétiques de biodégradation très rapides. Bien que présentant un très fort pourcentage de CODB (81%), la MOA issue de la sécrétion naturelle des algues *Chlorella* (MOA-NS) requière plus de temps pour être biodégradée, en accord avec les fortes proportions de molécules de grandes MMA

(77% du COD>30 kDa). La MOA issue d'algues chlorées (MOA-Cl₂) est celle qui présente le plus faible potentiel biodégradable (54%).

L'oxydation (chlore ou ozone) de la MOA-NS ne modifie pas significativement les quantités de COD, CODB, sucres et protéines mais semble diminuer les concentrations en acides aminés (-14 à -36%) et abaisser l'aromaticité des composés organiques.

Ces différentes MOA ont été confrontées à des Entérobactéries (souche de laboratoire ou population indigène des eaux) afin d'en apprécier la dynamique en eau de distribution. L'idée étant de travailler sur la nature des composés algaux, tous les essais ont été conçus pour travailler à CODB équivalent pour l'ensemble des MOA testées.

En absence de bactérie autochtone, l'ajout de 0,2 mg CODB L⁻¹ de MOA (quelle que soit son origine) dans une eau de distribution déchlorée stérile favorise la survie d'une souche d'*E. coli* massivement injectée dans l'eau (pris comme modèle d'Entérobactérie) en augmentant sa croissance et/ou sa cultivabilité. Pourtant, selon l'origine de la MOA, *E. coli* présente un comportement différent, malgré des concentrations équivalentes en CODB ajoutées à l'eau de réseau. La MOA-O₃, comme on pouvait s'y attendre au regard de sa composition, est la plus favorable à *E. coli* en multipliant par 8 la production de cellules par rapport à l'eau non supplémentée en matière organique (facteur 4 pour la MOA-NS et 1,4 pour la MOA-Cl₂). Le fait d'oxyder la MOA-NS n'a eu que peu d'impact sur le comportement d'*E. coli*, en accord avec les faibles modifications de la matière organique suite à l'oxydation.

Ces résultats suggèrent que la concentration en CODB n'est pas directement prédictive du comportement d'*E. coli* et que la nature des composés joue un rôle essentiel.

En présence des bactéries autochtones, l'effet de la MOA sur *E. coli* semble dépendre des conditions expérimentales appliquées et particulièrement de la concentration d'*E. coli* inoculés et du mode d'injection de la MOA (ponctuel ou continu).

En conditions statiques (batch), un ajout ponctuel de MOA s'est au contraire avéré défavorable à la survie d'*E. coli* (perte de la cultivabilité 2 à 3 fois plus rapide), sans doute à cause de phénomènes de compétition avec la population autochtone. Seule la MOA-O₃ a permis une augmentation transitoire du nombre d'*E. coli* détectés par FISH (+0,6 log).

Par contre, en conditions dynamiques (réacteurs Propella™, MOA ajoutée en continu), même si aucun effet significatif de la MOA-NS (seule MOA testée dans ces essais) n'a été mis en évidence sur la population d'*E. coli* fixés dans le biofilm, elle a permis de réduire la vitesse de

disparition des *E. coli* planctoniques (totaux et cultivables), sans permettre pour autant une colonisation durable des pilotes.

Pour s'affranchir de la nécessité d'une injection massive d'une souche d'*E. coli* de laboratoire pour étudier l'effet de la MOA sur les Entérobactéries, la dernière phase expérimentale s'est attachée à évaluer l'effet de la MOA sur la population d'*Enterobacteriaceae* non cultivables naturellement présentes dans les eaux de distribution. L'utilisation de la méthode FISH a en effet permis de mettre en évidence pour la première fois la présence systématique de cette sous-population bactérienne dans les eaux traitées (sortie de l'usine E. Imbeaux de Nancy).

L'ajout de MOA dans l'eau traitée a confirmé l'effet favorable de la MOA sur les Entérobactéries : selon son origine, la MOA a permis de multiplier par 2 à 5 le nombre d'*Enterobacteriaceae* autochtones de l'eau, démontrant qu'une fraction de cette population est viable et capable d'utiliser cette MOA comme substrat. Comme précédemment, la MOA-O₃ a représenté la matière organique permettant la plus forte augmentation du nombre d'Entérobactéries.

Le message principal extrait des résultats acquis dans le cadre de ce travail de recherche est que la qualité de la matière organique des eaux traitées, pouvant être modifiée par des événements ponctuels atteignant la matrice organique des eaux brutes, est susceptible d'influencer le devenir des Entérobactéries accidentellement introduites et/ou déjà présentes dans les systèmes de distribution. Parmi ces événements ponctuels, la prolifération d'algues dans l'eau de ressource peut dégrader la qualité microbiologique des eaux de distribution. En effet, en plus d'amener des composés organiques issus de leur sécrétion naturelle, les algues peuvent générer de la matière organique très fortement biodégradable si des traitements de préoxydation sont appliqués sur l'eau brute. C'est donc un mélange de toutes les MOA qui ont été testées individuellement en laboratoire qui risque d'être présent dans les eaux traitées. Ce phénomène est susceptible de doper le statut nutritif de l'eau en entrée de filière et risque de modifier la matrice organique des eaux traitées en apportant une nouvelle nature de matière organique sans doute uniquement présente en bruit de fond en dehors de ces événements saisonniers. Au-delà des Entérobactéries, c'est toute la dynamique bactérienne hétérotrophe qui est susceptible d'être influencée par ces modifications du statut nutritif de l'eau.

Bien que le CODB soit classiquement utilisé pour estimer la stabilité microbiologique de l'eau potable, les résultats obtenus dans cette étude montrent que, lors d'événements saisonniers, mesurer la concentration de CODB n'est pas suffisant pour prédire le comportement de certaines

espèces bactériennes d'intérêt sanitaire telles que les Entérobactéries. En effet, une des hypothèses énoncée pour expliquer l'effet très favorable de la MOA (dans certains cas plus favorable que de l'acétate) a été la présence potentielle parmi la MOA de composés promoteurs de la croissance bactérienne tels que des vitamines, des cofacteurs, des oligoéléments... présents à l'état de trace (donc difficilement quantifiables) mais en quantité suffisante pour pouvoir favoriser la survie bactérienne. Il faut garder à l'esprit que parmi les molécules sécrétées ou relarguées par les algues, des éléments minéraux peuvent être apportés et influencer sur les résultats observés.

Une caractérisation qualitative des molécules composant le CODB des eaux, et non pas seulement la simple détection d'une concentration dépassant un seuil critique, apparaît être nécessaire pour évaluer le statut nutritif de l'eau, particulièrement lors d'évènements saisonniers tels que les blooms algaux qui peuvent fortement modifier la nature de la matrice organique des eaux traitées.

D'un point de vue scientifique, une analyse poussée qui consisterait à caractériser très finement la fraction organique biodégradable de l'eau considérée permettrait d'identifier les composés organiques (% de CODB mais aussi vitesse de biodégradation, concentrations en sucres, en acides aminés..., répartition des MMA...) et d'estimer leur impact sur la croissance bactérienne. Dans nos essais, la première phase de travail qui a consisté à caractériser la MOA a en effet permis d'avoir une première estimation de l'effet de chaque MOA sur des populations bactériennes. Des tests microbiologiques consistant à mesurer la survie/croissance d'espèces ou de genres bactériens spécifiques (en utilisant peut-être la méthode FISH qui permettrait de travailler en présence de la flore autochtone et d'étudier les populations *in situ*) dans l'eau dont on veut estimer le statut nutritif pourraient également amener des éléments de réponse.

Cependant, ces analyses sont peu envisageables dans le contexte du traitement de l'eau potable compte tenu de la complexité de certaines techniques et surtout du délai de réponse des tests biologiques qui seraient difficilement compatibles avec la gestion d'une filière de traitement. Sans forcément passer par la création d'un nouvel outil méthodologique, une meilleure connaissance des eaux de ressource, principalement celles présentant des problèmes récurrents de blooms algaux, pourrait permettre d'agir de manière préventive et/ou curative lors des blooms et d'optimiser l'élimination par la filière de la matière organique biodégradable potentiellement amenée par les algues.

La mise en évidence de la présence d'Entérobactéries viables mais non cultivables dans les eaux traitées grâce à la méthode FISH est également un point clé de ce travail. En effet, les travaux présentés ici ont montré qu'il existait un flux continu d'Entérobactéries, tant spatial (entre l'entrée et la sortie de l'usine de traitement) que temporel (détection systématique durant un an). Ce point,

qui n'apparaît pas surprenant dans la mesure où des Entérobactéries sont détectées dans les eaux brutes et que les traitements conventionnels de potabilisation n'ont aucune raison d'éliminer plus spécifiquement cette population bactérienne, est cependant nouveau et va à l'encontre de l'idée reçue comme quoi les eaux potables, en absence de contamination particulière, seraient exemptes d'Entérobactéries. L'absence de détection de cette sous-population par les méthodes classiques de culture sur gélose montre qu'il est nécessaire de développer d'autres techniques que les méthodes traditionnelles pour pouvoir évaluer la diversité microbiologique des eaux distribuées et le comportement bactérien vis-à-vis du statut nutritif de l'eau. Ceci semble particulièrement important lors d'évènements saisonniers qui peuvent affecter la matrice organique de l'eau potable.

Ainsi, les évènements saisonniers ponctuels telle que la prolifération d'algues dans l'eau de ressource représentent un danger potentiel quant au maintien de la stabilité biologique des eaux. Dans la continuité de ces travaux, il serait intéressant d'identifier les espèces d'Entérobactéries constituant la fraction mesurée en eau traitée et celles qui profitent préférentiellement d'un apport de MOA. Leur présence au sein même du réseau de distribution et non plus seulement en sortie d'usine de traitement mériterait d'être caractérisée (en terme de nombre et d'espèces).

De même, au-delà des Entérobactéries, d'autres sous-populations bactériennes d'intérêt sanitaires (mycobactéries, légionnelles...) pourraient également être étudiées.

Enfin, il serait intéressant d'apprécier l'influence sur les bactéries de MOA provenant d'autres algues que *Chlorella* comme des cyanobactéries, dans la mesure où les composés excrétés par ce type d'organismes sont susceptibles d'être différents de ceux relargués par les algues vertes étudiées dans ce travail. De même, des essais dans des eaux chlorées, ajoutant une pression de sélection, permettraient sans doute d'estimer plus finement l'impact réel d'un apport de MOA dans des eaux de distribution sur les communautés microbiennes.





Chapitre IX - Références bibliographiques

- Aaronson, S. 1978. Excretion of organic matter by phytoplankton in vitro. *Limnol. Oceanogr.* **23**:838.
- Abernathy, C.G., and A. Camper. 1997. Interactions between pipe materials disinfectants, corrosion inhibitors, organics and distribution biofilms. In *Water Quality Technology Conference*, American Water Works Association, Denver, Co., 9-12 novembre.
- Abernathy, C.G., and A. Camper. 1998. The effect of phosphorous based corrosion inhibitors and low disinfectant residuals on distribution biofilms. In *Water Quality Technology Conference*, American Water Works Association, San Diego, Ca., 1-4 novembre.
- Adams, J.C., M.S. Lytle, D.G. Dickman, J.P. Connell, and W.R. Bressler. 1989. Comparison of methods for enumeration of selected coliforms exposed to ozone. *Appl. Environ. Microbiol.* **55** :33-35.
- AFNOR (Association Française de Normalisation). 1985. Essais des eaux – Recherche et dénombrement des coliformes et des coliformes thermotolérants – Méthode générale par ensemencement en milieu liquide (NPP). Norme NF T90-413, octobre 1985.
- AFNOR (Association Française de Normalisation). 1990. Eaux-méthodes d'essais. Recueil de Normes Françaises, 4^{ème} édition, La Defense, Paris, 735 pp.
- AFNOR (Association française de normalisation). 1995a. Essais Des eaux – Evaluation en milieu aqueux du carbone organique dissous biodégradable – Méthode par bactéries en suspension. Norme XP T 90-318, avril 1995.
- AFNOR (Association Française de Normalisation). 1995b. Dosage des ions fluorure, chlorure, nitrite, orthophosphate, bromure, nitrate et sulfate dissous, par chromatographie des ions en phase liquide. Partie 1 : méthode applicable pour les eaux faiblement contaminées. Norme NF EN ISO 10304-1, juin 1995.
- AFNOR (Association Française de Normalisation). 1997a. Dosage du phosphore. Dosage spectrométrique à l'aide du molybdate d'ammonium. Norme NF EN 1189, janvier 1997.
- AFNOR (Association Française de Normalisation). 1997b. Qualité de l'eau – dosage des hydrocarbures halogénés hautement volatils – méthodes par chromatographie en phase gazeuse. Norme NF EN ISO 10301, juillet 1997.
- AFNOR (Association Française de Normalisation). 2000a. Qualité de l'eau – Recherche et dénombrement des *Escherichia coli* et des bactéries coliformes – Partie 1 : méthode par filtration sur membrane. Norme NF EN ISO 9308-1, septembre 2000.
- AFNOR (Association Française de Normalisation). 2000b. Dosage de l'ammonium. Partie 2 : méthode spectrophotométrique au bleu d'indophénol. Norme NF T90-015-2, janvier 2000.
- AFSSA (Agence française de sécurité sanitaire des aliments). 2003. In *Journées scientifiques d'échanges sur les biotoxines – toxines de microalgues et cyanobactéries*, 6 mars.
- Agbekodo, K.M., et B. Legube. 1995. Distribution du CODB d'une eau de surface ayant subi deux types de traitement différents. *Environ. Technol.* **16**:657-666.
- Agbekodo, K.M., B. Legube, P. Cote, et M.M. Bourbigot. 1994. Performance de la nanofiltration pour l'élimination de la matière organique naturelle : essai sur l'usine de Méry/Oise. *Sci. Eau.* **7**:183-200.
- Agbekodo, K.M., J.P. Croué, S. Dard, et B. Legube. 1996. Analyse par HPLC et GC/SM des constituants du carbone organique dissous (COD), du COD biodégradable (CODB) et des composés organohalogénés (TOX) d'un perméat de nanofiltration. *Sci. Eau* **4**:535-555.
- Aiken, G.R. 1984. Evaluation of ultrafiltration for determining molecular weight of fulvic acids. *Environ. Sci. Tech.* **18**:978-981.
- Alken, G.R. 1984. Evaluation of ultrafiltration for determining molecular weight of fulvic acid. *Environ. Sci. Technol.* **18**:978-981.
- Amann, R.I., L. Krumholz, and D.A. Stahl. 1990. Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology. *J. Bacteriol.* **172**:762-770.
- Amann, R.I., W. Ludwig, and K.-H. Schleifer. 1995. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* **59**(1):143-169.
- Amblard, C., G. Bourdier, J.F. Carrias, N. Maurin, et C. Quiblier. 1996. Evolution saisonnière de la structure des communautés microbiennes dans un réservoir d'eau potable. *Wat. Res.* **30**:613-624.

- Antoun, E.N., J.E. Dyksen, and D.J. Hildebrand.** 1999. Unidirectional flushing : a powerful tool. *J. AWWA*. **91(7)**:62-71.
- APHA (American Public Health Association).** 1998. Standard methods for the examination of water and wastewater, 20th ed. American Public Health Association, Washington D.C.
- Appenzeller, B. M. R., M. Batté, L. Mathieu, J.-C. Block, V. Lahoussine, J. Cavard, and D. Gatel.** 2001. Effect of adding phosphate to drinking water on bacterial growth in slightly and highly corroded pipes. *Wat. Res.* **35**:1100-1105.
- Aquino, S.F., and D.C. Stuckey.** 2004. Soluble microbial products formation in anaerobic chemostats in the presence of toxic compounds. *Wat. Res.* **38**:255-266.
- Ashbold, N.J., M.R. Dorsch, P.T. Cox, and B. Banens.** 1997. Blooming *E. coli*, what to they mean ? In *Coliforms and E. coli – problem or solution ?* D. Kay et C. Fricker (Eds.), The Royal Society of Chemistry, Cambridge, p. 78-85.
- Astier, F., J.-L. Paquin, L. Mathieu, M. Morlot, et P. Hartemann.** 1995. Etude en pilote du développement du goût de moisi en fonction du vieillissement de l'eau. *Environ. Technol.* **16**:955-965.
- Bablon, G., C. Ventresque, and F. Roy.** 1987. Evolution of organics in a potable water treatment system. *Aqua.* **2**:110-113.
- Banning, N., S. Toze, and B.J. Mee.** 2003. Persistence of biofilm-associated *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* in groundwater and treated effluent in a laboratory model system. *Microbiology.* **149**:47-55.
- Batté, M., L. Mathieu, P. Laurent, and M. Prévost.** 2003. Influence of phosphate and disinfection on the composition of biofilms produced from drinking water, as measured by fluorescence *in situ* hybridization. *Can. J. Microbiol.* **49**:741-753.
- Baudart, J., A. Olaizola, P. Laurent, J. Coallier, and M. Prévost.** 2001. New rapid methods to track diluted *Enterobacteriaceae* cells in drinking waters. In *Water Quality Technology Conference*, American Water Works Association, Washington, DC, 18-21 juin.
- Baudart, J., J. Coallier, P. Laurent, and M. Prévost.** 2002. Rapid and sensitive enumeration of viable diluted cells of members of the family *Enterobacteriaceae* in Freshwater and drinking water. *Appl. Environ. Microbiol.* **68(10)**:5057-5063.
- Baudart, J., A. Olaizola, J. Coallier, V. Gauthier, and P. Laurent.** 2005. Assessment of a new technique combining a viability test, whole-cell hybridization and laser-scanning cytometry for the direct counting of viable *Enterobacteriaceae* cells in drinking water. *FEMS Microbiol. Lett.* **243**:405-409.
- Baudry, J.-P. (Ed).** 1984. Traitement des eaux. Le Griffon d'Argile : Sainte-Foy (Qc), Canada. 231 p.
- Bayardelle, P., and M. Zafarullah.** 2002. Development of oligonucleotide primers for the specific PCR-based detection of the most frequent *Enterobacteriaceae* species DNA using *wec* gene templates. *Can. J. Microbiol.* **48**:113-122.
- Baynes, S.B., and M.L. Pace.** 1991. The production of dissolved organic matter by phytoplankton and its importance to bacteria : patterns across marine and Freshwater systems. *Limnol. Oceanogr.* **36(6)**:1078-1090.
- Becquevort, S., T. Bouvier, C. Lancelot, G. Cauwet, G. Deliat, V.N. Egorov, and V.N. Popovichev.** 2002. The seasonal modulation of organic matter utilization by bacteria in the Danube-Black sea mixing zone. *Estuar., Coast. Shelf Sci.* **54**:337-354.
- Bej, A.K., R.J. Steffan, J. DiCesare, L. Haff, and R.M. Atlas.** 1990. Detection of coliform bacteria in water by polymerase chain reaction and gene probes. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**:307-314.
- Bej, A.K., M.H. Mahbubani, J.L. DiCesare, and R.M. Atlas.** 1991a. Polymerase chain reaction-gene probe detection of microorganisms by using filter-concentrated samples. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**:3529-3534.
- Bej, A.K., S.C. McCarty, and R.M. Atlas.** 1991b. Detection of coliform bacteria and *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction : comparison with defined substrate and plating methods for water quality monitoring. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**:2429-2432.
- Bellin, T., M. Pulz, A. Matussek, H.G. Hempen, and F. Gunzer.** 2001. Rapid detection of enterohemorrhagic *Escherichia coli* by real-time PCR with fluorescent hybridization probes. *J. Clin. Microbiol.* **39**:370-374.
- Berg, J.D., and L. Fiksdal.** 1988. Rapid detection of total and fecal coliforms in water by enzymatic hydrolysis of 4-methylumbelliferone- β -D-galactosidase. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**:2118-2122.
- Berman, D., E.W. Rice, and J.C. Hoff.** 1988. Inactivation of particle-associated coliforms by chlorine and monochloramine. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**:507-512.

- Besner, M-C., V. Gauthier, B. Barbeau, R. Millette, R. Chapleau, and M. Prévost. 2001. Understanding distribution system water quality. *Jour. AWWA*. **93(7)**:101-114.
- Besner, M-C., V. Gauthier, P. Servais, and A. Camper. 2002. Explaining the occurrence of coliforms in distribution systems. *Jour. AWWA*. **94(8)**:95-109.
- Betzer, N., and Y. Kott. 1969. Effect of halogens on algae. *Wat. Res.* **3**:237-264.
- Billen, G., et P. Servais. 1989. Modélisation des processus de dégradation bactérienne de la matière organique en milieu aquatique. Dans *Microorganismes dans les écosystèmes océaniques*, M. Bianchi (Ed.), chapitre 8, p.219-245, Masson, Paris.
- Billmire, E., and S. Aaronson. 1976. The secretion of lipids by the freshwater phytoflagellate *Ochromonas danica*. *Limnol. Oceanogr.* **21**:138-140.
- Bjornsen, P.F. 1988. Phytoplankton exudation of organic matter: why do healthy cells do it. *Limnol. Oceanogr.* **33**:151-154.
- Block, J.C. 1989. Biofilms in drinking water distribution systems. In *Biofilms*. W.G. Characklis, and K.C. Marshall (Eds), Wiley Series in Ecological and Applied Microbiology, p. 469-485.
- Block, J.C., and B.M.R. Appenzeller. 2001. Biofilms et distribution d'eau potable. *Bull. Soc. Fr. Microbiol.* **16**:7-12.
- Block, J.C., I. Sibille, D. Gatel, D.J. Reasoner, B. Lykins, and R. Clark. 1997. Biodiversity in drinking water distribution systems: a brief review. In *The microbiological quality of water*. J.G. Jones, and D.W. Sutcliffe (Eds), Freshwater Biological Association, London, UK, p. 63-71.
- Bohnert, J., B. Hübner, and K. Botzenhart. 2000. Rapid identification of *Enterobacteriaceae* using a novel 23S rRNA-targeted oligonucleotide probe. *Int. J. Hyg. Environ. Health.* **203**:77-82.
- Bonnet, M.C., B. Welte, A. Montiel, et M. Doré. 1991. Elimination du carbone organique biodégradable par les procédés de traitement biologique sur les filières de production d'eau potable. *Environ. Technol.* **12**:217-229.
- Bonnet, M.C., B. Welte, and A. Montiel. 1992. Removal of biodegradable dissolved organic carbon in a water treatment plant. *Wat. Res.* **26**:1673-1680.
- Boualam, M. 2001. Origine de la matière organique et devenir de bactéries coliformes dans des eaux faiblement nutritives. Thèse de doctorat : Université Henri-Poincaré Nancy I, Nancy, France, 155 p.
- Boualam, M., L. Mathieu, S. Fass, J. Cavard, and D. Gatel. 2002. Relationship between coliform culturability and organic matter in low nutritive waters. *Wat. Res.* **36**:2618-2626.
- Bougis, P. 1974. Ecologie du plancton marin. I. Le phytoplancton. Masson et Cie (Eds), 196p.
- Bouillot, P., P. Servais, G. Billen, and Y. Lévi. 1992. Biodegradable dissolved organic carbon removal during biological filtration on granular activated carbon. *Sci. Eau.* **5**:33-49.
- Boulos, L., M. Prévost, B. Barbeau, J. Coallier, and R. Desjardins. 1999. LIVE/DEAD® BacLight™ : application of a new rapid staining method for direct enumeration of viable and total bacteria in drinking water. *J. Microbiol. Meth.* **37**:77-86.
- Bourelly, P. 1966. Les algues vertes. In *Les algues d'eau douce: initiation à la systématique*. N. Boubée & C^{ie} (ed.). Paris, 511p.
- Bratbak, G. 1987. Carbon flow in an experimental microbial ecosystem. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **36**:267-276.
- Brenner, J.D. 1984. Family I :*Enterobacteriaceae*. In *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol. 1, N.R. Krieg and J.G. Holt (ed.), The Williams & Wilkins Co., Baltimore, Md, p. 408-516.
- Bruchet, A., C. Rousseau, and J. Mallevialle. 1990. Pyrolysis-GC-MS for investigating high-molecular-weight THM precursors and other refractory organics. *Jour. AWWA*. **82**:66-74.
- Brun, G.L., and D.L.D. Milburn. 1977. Automated fluorometric determination of humic substances in natural waters. *Analyt. Lett.* **10**:1209-1219.
- Bucklin, K.E., G.A. McFeters, and A. Amirtharajah. 1991. Penetration of coliforms through municipal drinking water filters. *Wat. Res.* **25(8)**:1013-1017.
- Burlingame, G.A., J. McElhaney, M. Bennet, and W.O. Pipes. 1984. Bacterial interference with coliform colony sheen production on membrane filters. *Appl. Environ. Microbiol.* **47**:56-60.
- Burtscher, C., P.A. Fall, P.A. Wilderer, and S. Wuerzt. 1999. Detection of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* in suspended organic waste by nucleic acid extraction and PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:2235-2237.
- Cabridenc, R. 1995. Les algues: un réactif biologique particulièrement intéressant. *TSM.* **1**:17-19.

- Campbell, L.** 1993. Immunofluorescence method for the detection and characterization of marine microbes. In *Handbook of methods in aquatic microbial ecology*, P.F. Kemp, B.F. Sherr, E.B. Sherr, and J.J. Cole (Eds.), Lewis Publishers, Boca Raton, FL, USA, p.295-299.
- Camper, A.** 1994. Coliform regrowth and biofilm accumulation in drinking water systems: a review. In *Biofouling and biocorrosion in industrial water systems*, G.G. Geesey, Z. Lewandowski, and H.-C. Flemming (ed.), Lewis Publishers, Boca Raton, FL, USA, p. 91-105
- Camper, A.** 1996. Factors limiting microbial growth in distribution systems : laboratory and pilot-scale experiments. American Water Works Association Research Foundation, Denver, Co., 121 p.
- Camper, A., M.W. LeChevallier, S.C. Broadaway, and G.A. McFeters.** 1986. Bacteria associated with granular activated carbon particles in drinking water. *Appl. Environ. Microbiol.* **52**(3):434-438.
- Camper, A., G.A. McFeters, W.G. Characklis, and W.L. Jones.** 1991. Growth kinetics of coliform bacteria under conditions relevant to drinking water distribution systems. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**:2233-2239.
- Capellier, M., C. Picoche, et A. Deguin.** 1992. Devenir du CODB dans les réseaux de distribution : étude de deux cas. *Sci. Eau.* **5**:51-67.
- Carlson, G., and J. Silverstein.** 1998. Effect of molecular size and charge on biofilm sorption of organic matter. *Wat. Res.* **32**(5):1580-1592.
- Carter, J.T., Y. Lee, S.G. Buchberger, L.A. Rossman, and E.W. Rice.** 1997. Correlations between travel time and water quality in a deadend loop. In *Water Quality Technology Conference*, American Water Works Association, Denver, Co., 7-11 novembre.
- Cauchi, B., G. Billen, and P. Servais.** 1993. The elimination of biodegradable organic carbon in biological contactors-biological carbon filters. *Wat. Supply.* **11**:289-298.
- Chang, E.E., P.C. Chiang, Y.W. Ko, and W.H. Lan.** 2001. Characteristics of organic precursors and their relationship with disinfection by-products. *Chemosphere.* **44**:1231-1236.
- Charnock, C., and O. Kjonno.** 2000. Assimilable organic carbon and biodegradable dissolved organic carbon in Norwegian raw and drinking waters. *Wat. Res.* **34**:2629-2642.
- Chrost, R.J., and M.A. Faust.** 1983. Organic carbon release by phytoplankton : its composition and utilization by bacterioplankton. *J. Plankton Res.* **5**:477-493.
- Chróst, R.J., R. Wcislo, and G.Z. Hajemejko.** 1986. Enzymatic decomposition of organic matter by bacteria in an eutrophic lake. *Arch. Hydrobiol.* **107**:145-165.
- Chu, C., C. Lu, and C. Lee.** 2005. Effects of inorganic nutrients on the regrowth of heterotrophic bacteria in drinking water distribution systems. *Journal of Environmental Management.* **74**:255-263.
- Clark, J.A.** 1980. The influence of increasing numbers of non-indicator organisms by the membrane filter and presence-absence test. *Can. J. Microbiol.* **26**:827.
- Clark, R.M., E.E. Geldreich, K.R. Fox, E.W. Rice, C.H. Johnson, J.A. Goodrich, J.A. Barnick, and F. Abdesaken.** 1996. Tracking a Salmonella serovar typhimurium outbreak in Gideon, Missouri : role of contaminant propagation modelling. *J. Water SRT-Aqua.* **45**:171-183.
- Clement, J.A., A. Sandvig, V. Snoeyink, W. Kriven, and P. Sarin.** 1998. Analyses and interpretation of the physical, chemical and biological characteristics of distribution system pipe scales. In *Water Quality Technology Conference*, American Water Works Association, San Diego, Ca., 1-4 novembre.
- Coallier, J., M. Prévost, and A. Rompré.** 1994. The optimization and application of two direct viable count methods for bacteria in distributed drinking water. *Can. J. Microbiol.* **40**:830-836.
- Codd, G.A.** 2000. Cyanobacterial toxins, the perception of water quality, and the prioritisation of eutrophication control. *Ecological Engineering.* **16**:51-60.
- Codony, F., J. Morato, F. Ribas, and J. Mas.** 2002. Effect of chlorine, biodegradable dissolved organic carbon and suspended bacteria on biofilm development in drinking water systems. *J. Basic Microbiol.* **42**:311-319.
- Colbourne, J.S., P.J. Dennis, A.J. Rachwal, W. Kcevil, and C. Mackerness.** 1991. The operational impact of growth of coliforms in London's distribution systems. In *Water Quality Technology Conference*, American Water Works Association, Orlando, FL.
- Collins, M.R., G.L. Amy, and C. Steelink.** 1986. Molecular weight distribution carboxylic acidity and humic substances content of aquatic organic matter : implications for removal during water treatment. *Environ. Sci. Technol.* **20**:1028-1032.

- Connolly, J.P., R.B. Coffin, and R.L. Landeck. 1994. Modeling carbon utilization by bacteria in natural water systems. In *Modelling the metabolic and physiologic and activities of microorganisms*. C.J. Hurst (Eds), John Wiley and Sons Inc., USA.
- Couté, A. 1995. Diversité chez les microalgues. *TSM*. **1**:20-21.
- Craddock, J.L., and R.G. Castle. 1997. Viable but injured coliforms in drinking water supplies. In *Coliforms and E. coli: problem or solution?* D. Kay et C. Fricker (Eds.), The Royal Society of Chemistry, Cambridge, p. 182-188.
- Craun, G.F. 1980. Disease outbreaks caused by drinking water. *J. WPCF*. **52**:1833-1839.
- Croué, J.P., E. Lefebvre, B. Martin, and B. Legube. 1993. Removal of dissolved hydrophobic and hydrophilic organic substances during coagulation/flocculation of surface waters. *Wat. Sci. Tech.* **27**:143-152.
- Croué, J.P., J.F. Debroux, G.R. Aiken, J.A. Leenheer, and G.L. Amy. 1999. Natural organic matter : structural characteristics and reactive properties, In *Formation and control of disinfectant by-product in drinking water*, Singer P.C. (Eds.), American Water Works Association.
- Croué, J.P., G.V. Korshin, and M. Benjamin (Eds.). 2000. Characterization of natural organic matter in drinking water. AWWA Research Foundation and American Water Works Association, 324 p.
- Davies, C.M., S.C. Apte, and S.M. Peterson. 1995. B-D-galactosidase activity of viable, non-culturable coliform bacteria in marine waters. *Lett. Appl. Microbiol.* **21**:99-102.
- DeBeer, D., R. Srinivasan, and P.S. Stewart. 1994. Direct measurement of chlorine penetration into biofilms during disinfection. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**:4339-4344.
- DeLaat, J., M. Doré, et J. Mallevialle. 1991. Influence d'une préozonation sur l'adsorbabilité et la biodégradabilité des substances humiques d'origine aquatique et sur les performances des filtres de charbon actif en grain. *Wat. Res.* **25**:151-164.
- Delabre, K., V. Dile, M.-R. de Roubin, D. Gatel, F. Poty, and J. Cavard. 2001. New analytical tools for distribution system surveillance. In *Water Quality Technology Conference*, American Water Works Association, Washington, DC, 18-21 juin.
- Delarras, C. 2003. Surveillance sanitaire et microbiologique des eaux. TEC & DOC, Lavoisier, Paris, 269 p.
- Delong, E.F., G.S. Wickham, and N.R. Pace. 1989. Phylogenetic stains: ribosomal RNA-based probes for the identification of single cells. *Science*. **243**:1360-1363.
- Dennett, K.E., A. Amirtharajah, T.F. Moran, and J.P. Gould. 1996. Coagulation : its effect on organic matter. *Jour. AWWA*. **88**:129-142.
- Desselberger, U. 2000. Emerging and re-emerging infectious diseases. *Journal of Infection*. **40**:3-15.
- Ding, G., N. Sugiura, Y. Inamori, and R. Sudo. 1995. Effect of disinfection on the survival of *Escherichia coli*, associated with nematoda in drinking water. *Water Supply*. **13(3-4)**:101-106.
- Donlan, R.M., and W.O. Pipes. 1988. Selected drinking water characteristics and attached microbial population density. *J. AWWA*. **80(11)**:70-76.
- Doré, M. 1989. Chimie des oxydants et traitement des eaux. Lavoisier, Paris, France, 497 p.
- Dossier-Berne, F., B. Panais, N. Merlet, B. Cauchi, et B. Legube. 1994. Analyse des acides aminés dissous totaux dans les eaux à potabiliser en cours de traitement. *Environ. Technol.* **15**:901-916.
- Dossier-Berne, F., N. Merlet, B. Cauchi, et B. Legube. 1996. Evolution des acides aminés et de la matière organique dissoute dans une filière de production d'eau potable : corrélations avec le carbone organique dissous biodégradable et le potentiel de demande en chlore à long terme. *Sci. Eau* **1**:115-133.
- Du Preez, M., R. Kfir, and P. Coubrough. 1995. Investigation of injury of coliforms after chlorination. *Wat. Sci. Technol.* **31(5-6)**:115-118.
- Dubois, M., K.A. Gilles, J.K. Hamilton, P.A. Rebers, and F. Smith. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances, *Anal. Chem.* **28**:350-356.
- Ducluzeau, R., J.L. Nicolas, J.V. Galpin, and P. Raibaud. 1984. Influence of autochthonous bacteria on the longevity of *Escherichia coli* in bottled mineral water. *Sciences des Aliments*. **4**:585-594.
- Dukan, S., and D. Touati. 1996. Hypochlorous acid stress in *Escherichia coli*: resistance, DNA damage, and comparison with hydrogen peroxide stress. *J. Bacteriol.* **178(21)**:6145-6150.
- Dukan, S., Y. Lévi, and D. Touati. 1997. Recovery of culturability of an HOCl-stressed population of *Escherichia coli* after incubation in phosphate buffer: resuscitation or regrowth? *Appl. Environ. Microbiol.* **63(11)**:4204-4209.

- Echelberger, W.F., J.L. Pavoni, P.C. Singer, and M.W. Tenny. 1971. Disinfections of algae-laden waters. *J. Sanit. Engng Div. Am. Soc. Civ. Engrs.* **172**:721-730.
- Edberg, S.C., M.J. Allen, and D.B. Smith. 1988. National field evaluation of a defined substrate method for the simultaneous enumeration of total coliforms and *Escherichia coli* from drinking water: comparison with the standard multiple tube fermentation method. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**:1595-1601.
- Egeberg, P.K., A.A. Christy, and M. Eikenes. 2002. The molecular size of natural organic matter (NOM) determined by diffusivity and seven other methods. *Wat. Res.* **36**:925-932.
- Emde, K.M., D.W. Smith, and R. Facey. 1992. Initial investigation of microbially influenced corrosion (MIC) in a low temperature water distribution system. *Wat. Res.* **26**(2):169-175.
- EPA (Environmental Protection Agency). 2002. <http://www.epa.gov/safewater/tcr/pdf/biofilms.pdf>.
- Evans, T.M., M.W. LeChevallier, C.E. Waarvick, and R.J. Seidler. 1981. Coliform species recovered from untreated surface water and drinking water by the membrane filter, standard, and modified most-probable-number techniques. *Appl. Environ. Microbiol.* **41**(3):657-663.
- Falconer, I.R. 1999. An Overview of Problems Caused by Toxic Blue-Green Algae (Cyanobacteria) in Drinking and Recreational Water. *Inc. Environ. Toxicol.* **14**:5-12.
- Fass, S., M.L. Dincher, D.J. Reasoner, D. Gatel, and J.-C. Block. 1996. Fate of *Escherichia coli* experimentally injected in a drinking water distribution pilot system. *Wat. Res.* **30**(9):2215-2221.
- Fass, S., J.-C. Block, M. Boualam, V. Gauthier, D. Gatel, J. Cavard, S. Benabdallah, and V. Lahoussine. 2003. Release of organic matter in a discontinuously chlorinated drinking water network. *Wat. Res.* **37**:493-500.
- Federighi, M. 2004. Les formes viables non cultivables des bactéries: point de vue et retour d'expérience d'un hygiéniste. *Bull. Soc. Fr. Microbiol.* **19**(4):237-244.
- Fogg, G.E. 1977. Excretion of organic matter by phytoplankton. *Limnol. Oceanogr.* **22**:576-577.
- Fogg, G.E. 1983. The ecological significance of extracellular products of phytoplankton photosynthesis. *Bot. Marina.* **26**:3-14.
- Fransolet, G., G. Villers, and W.J. Masschelein. 1985. Influence of temperature on bacterial development in waters. *Ozone Sci. Engng.* **7**:205-227.
- Fricker, E.J., and C.R. Fricker. 1994. Application of the polymerase chain reaction to the identification of *Escherichia coli* and coliforms in water. *Lett. Appl. Microbiol.* **19**:44-46.
- Gagnon, G.A., R.M. Slawson, and P.M. Huck. 2000. Effect of easily biodegradable organic compounds on bacterial growth in a bench-scale drinking water distribution system. *Can. J. Civ. Eng.* **27**:412-420.
- Galapate, R.P., A.U. Base, and M. Okada. 2001. Transformation of dissolved organic matter during ozonation: effects on trihalomethane formation potential. *Wat. Res.* **35**:2201-2206.
- Gale, P., R. Lacey, G. Stanfield, and D. Holt. 1997. The development and application of coliform predictive models for the UK water industry. *J. Water SRT-Aqua.* **46**(4):185-195.
- Gallard, H., and U. von Gunten. 2002. Chlorination of natural organic matter: kinetics of chlorination and of THM formation. *Wat. Res.* **36**:65-74.
- Gatel, D., T. Fahmy, E. Parent, J.C. Goldman, J.-C. Joret, and J. Cavard. 1995. Forecasting the number of coliform positive samples. In *Water Quality Technology Conference*, American Water Works Association, New-Orleans, La., 12-18 novembre.
- Gauthier, V., B. Gérard, J. Portal, J.-C. Block, and D. Gatel. 1999a. Organic matter as loose deposits in a drinking water distribution system. *Wat. Res.* **33**:1014-1026.
- Gauthier, V., M.-C. Besner, M. Trépanier, B. Barbeau, R. Millette, R. Chapleau, and M. Prévost. 1999b. Understanding the microbial quality of drinking water using distribution system structure information and hydraulic modeling. In *Water Quality Technology Conference*, American Water Works Association, Tampa, Fl.
- Gayral, P. 1975. Les algues: morphologie, cytologie, reproduction, écologie. Doin (Ed.), Paris. 166 p.
- Gayte, X., D. Fontvieille, and K.J. Wilkinson. 1999. Bacterial stimulation in mixed cultures of bacteria and organic carbon from river and lake waters. *Microb. Ecol.* **38**:285-295.
- Geildreich, E.E. 1996. Microbial quality of water supply in distribution systems. CRC Press, Lewis publishers, Boca Raton, Florida, 504 p.
- Geildrech, E.E., K.R. Fox, J.A. Goodrich, E.W. Rice, R.M. Clark, and D.L. Swerdlow. 1992. Searching for a water supply connection in the Cabool, Missouri disease outbreak of *Escherichia coli* O157:H7. *Wat. Res.* **26**(8):1127-1137.

- George, I., M. Petit, and P. Servais. 2000. Use of enzymatic methods for rapid enumeration of coliforms in freshwaters. *J. Appl. Microbiol.* **88**:404-413.
- Glockner, F.O., R. Amann, A. Alfreider, J. Pernthaler, R. Psenner, K. Trebesius, and K.H. Schleifer. 1996. An *in situ* hybridization protocol for detection and identification of planktonic bacteria. *Syst. Appl. Microbiol.* **19**:403-406.
- Goldman, J.C., D.A. Hansell, and M.R. Dennett. 1992. Chemical characterization of three large oceanic diatoms : potential impact on water column chemistry. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **88**:257-270.
- Goshko, M.A., W.O. Pipes, and R.R. Christian. 1983. Coliform occurrence and chlorine residual in small water distribution systems. *J. AWWA.* **75**(7):371-374.
- Grandjean, D. 2004. Survie d'*Escherichia coli* dans les eaux potables : rôle de l'équilibre calco-carbonique et du fer ferrique. Thèse de Doctorat : Université Henri-Poincaré Nancy I, Nancy, France, 171 p.
- Grimmes, D.J., and R.R. Colwell. 1986. Viability and virulence of *Escherichia coli* suspended by membrane chamber in semitropical ocean water. *FEMS Microbiol. Lett.* **34**:161-165.
- Hanai, K., M. Satake, H. Nakanishi, and K. Venkateswaran. 1997. Comparison of commercially available kits with standard methods for detection of Salmonella strains in foods. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:775-778.
- Haslay, C., et H. Leclerc. 1993. Microbiologie des eaux d'alimentation, Lavoisier, Paris, 495 p.
- Haudidier, K., J.-L. Paquin, T. Français, P. Hartemann, G. Grapin, F. Colin, M.J. Jourdain, J.-C. Block, J. Cheron, O. Pascal, Y. Lévi, and J. Miazga. 1988. Biofilm growth in a drinking water network : a preliminary industrial pilot-plant experiment. *Wat. Sci. Tech.* **20**:109-115.
- Hellebust, J.A. 1965. Excretion of some organic compounds by marine phytoplankton. *Limnol. Oceanogr.* **10**:192-206.
- Hellebust, J.A. 1967. Excretion of some organic compounds by marine phytoplankton. *Limnol. Oceanogr.* **10**:192-206.
- Hellebust, J.A. 1974. Extracellular products. In *Algal physiology and biochemistry*, N.D. Stewart (Ed), University of California Press, Berkeley, CA, p. 838-863.
- Herrick, D. 1997. Cross-connections and backflow. *Water Well Journal.* **51**(5):67-70.
- Herson, D.S., D.R. Marshall, and H.T. Victoreen. 1984. Bacterial persistence in the distribution system. In *Water Quality Technology Conference*, American Water Works Association, Denver, Co., décembre.
- Herson, D.S., B. Mc Gonigle, M.A. Payer, and K.H. Baker. 1987. Attachment as a factor in the protection of *Enterobacter cloacae* from chlorination. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**:178-180.
- Hindman, S.H., M.S. Favero, L.A. Carson, N.J. Petersen, L.B. Schonberger, J.T. Solano. 1975. Pyrogenic reactions during haemodialysis caused by extramural endotoxin. *The Lancet.* **2**(7938):732-734.
- Hinzlin, F., and J.-C. Block. 1985. Yeasts and filamentous fungi in drinking water. *Environ. Technol. Lett.* **6**:101-106.
- Hoff, K.A. 1993. Total and specific bacterial counts by simultaneous staining with DAPI and fluorochrome-labeled antibodies. In *Handbook of methods in aquatic microbial ecology*, P.F. Kemp, B.F. Sherr, E.B. Sherr, J.J. Cole (Eds.), Lewis Publishers, Boca Raton, FL, USA, p. 149-154.
- Hoigné, J. 1997. Intercalibration of HO radical sources and water quality parameters. *Wat. Sci. Tech.* **35**(4):1-8.
- Hoigné, J., and H. Bader. 1983a. Rate constants of reactions of ozone with organic and inorganic compounds in water – Non dissociating organic compounds. *Wat. Res.* **17**:173-183.
- Hoigné, J., and H. Bader. 1983b. Rate constants of reactions of ozone with organic and inorganic compounds in water – Inorganic compounds and radicals. *Wat. Res.* **17**:185-194.
- Hoyt, J.W. 1970. High molecular weight algal substances in the sea. *Marine Biology.* **7**:93-99.
- Hübner, I., I. Steinmetz, U. Obst, D. Giebel, and D. Bitter-Suermann. 1992. Rapid determination of members of the family *Enterobacteriaceae* in drinking water by an immunological assay using a monoclonal antibody against enterobacterial common antigen. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**:3187-3191.
- Huck, P.M. 1990. Measurement of biodegradable organic matter and bacterial growth potential in drinking water. *Jour. AWWA.* **82**:78-86.
- Hudson, L.D., J.W. Hankins, and M. Battaglia. 1983. Coliforms in a water distribution system : a remedial approach. *Jour. AWWA.* **75**:564-568.
- Hureiki, L. 1993. Etude de la chloration et de l'ozonation d'acides aminés libres et combinés en milieu aqueux dilué. Thèse de Doctorat : Université de Poitiers, Poitiers, France, 141 p.

- Hureiki, L., C. Gauthier, et M. Prévost. 1994. Etude de l'évolution des acides aminés totaux dans deux filières de traitements d'eau potable. GRUTTEE, Conférence n° 23, 29-30 septembre 1994, Poitiers, France.
- Hureiki, L., C. Gauthier, et M. Prévost. 1996. Etude de l'évolution des acides aminés totaux dans deux filières de traitements d'eau potable. *Sci. Eau*. **3**:297-318.
- Ignatiades, L., and G.E. Fogg. 1973. Studies on the factors affecting the release of organic matter by *Skeletonema costatum* (Greville.) Cleve in culture. *J. Mar. Biol. Assoc. UK*. **53**:937-956.
- Iqbal, S., J. Robinson, D. Deere, J.R. Saunders, C. Edwards, and J. Porter. 1997. Efficiency of the polymerase chain reaction amplification of the *uid* gene for detection of *Escherichia coli* in contaminated water. *Lett. Appl. Microbiol.* **24**:498-502.
- Jadas-Hécart, A. 1989. Contribution à l'étude de la demande en chlore à long terme d'eau potable. Modélisation et identification des précurseurs organiques. Thèse de Doctorat : Université de Poitiers, Poitiers, France, 152 p.
- Jensen, L.M. 1983. Phytoplankton release of extracellular organic carbon, molecular weight composition, and bacterial assimilation. *Mar. Ecol. Prog. Series*. **11**:39-48.
- Joly, B., et A. Reynaud. 2003. Entérobactéries : systématique et méthodes de diagnostic. TEC & DOC (Ed.), Lavoisier, Paris, 356 p.
- Joret, J.C., et Y. Lévi. 1986. Méthode rapide d'évaluation du carbone éliminable des eaux par voie biologique. *Trib. Cebedeau*. **39**:3-9.
- Joret, J.C., Y. Lévi, and M. Gilbert. 1989. The measurement of bioeliminable dissolved organic carbon (BDOC) : a tool in water treatment. *Wat. Supply*. **7**:1-5.
- Jorgensen, E.G., and E.S. Nielsen. 1961. Effect of filtrates from cultures of unicellular algae on the growth of *Staphylococcus aureus*. *Physiologia Plantarum*. **14**:896-908.
- Juck, D., J. Ingram, M. Prévost, J. Coallier, and C. Greer. 1996. Nested PCR protocol for the rapid detection of *Escherichia coli* in potable water. *Can. J. Microbiol.* **42**:862-866.
- Kadurugamuwa, J.L., and T.J. Beveridge. 1996. Bacteriolytic effect of membrane vesicles from *Pseudomonas aeruginosa* on other bacteria including pathogens: conceptually new antibiotics. *J. Bacteriol.* **178**(10):2767-2774.
- Kalmbach, S., W. Manz, and U. Szewzyk. 1997a. Isolation of new bacterial species from drinking water biofilms and proof of their *in situ* dominance with highly specific 16S rRNA probes. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:4164-4170.
- Kalmbach, S., W. Manz, and U. Szewzyk. 1997b. Dynamics of biofilm formation in drinking water: phylogenetic affiliation and metabolic potential of single cells assessed by formazan reduction and *in situ* hybridization. *FEMS Microbiol. Ecol.* **22**:265-279.
- Kalmbach, S. 1998. Polyphasic characterization of the microbial population of drinking water biofilms. PhD Thesis : University of Berlin, Berlin, Germany, 125 p.
- Keil, R.G., and D.L. Kirchman. 1991. Contribution of dissolved free aminoacids and ammonium to the nitrogen requirements of heterotrophic bacterioplankton. *Mar. Ecol. Prog. ser.* **73**:1-10.
- Kell, D.B., A.S. Kaprelyants, D.H. Weichart, C.R. Harwood, and M.R. Barer. 1998. Viability and activity in readily culturable bacteria : a review and discussion of the practical issues. *Antonie van Leeuwenhoek*. **73**:169-187.
- Kell, D.B., and M. Young. 2000. Bacterial dormancy and culturability: the role of autocrine growth factors. *Current Opinion in Microbiology*. **3**:238-243.
- Kerstens, I., G. Huys, H. Van Duffel, M. Vancanneyt, K. Kersters, and W. Verstraete. 1996. Survival potential of *Aeromonas hydrophila* in freshwaters and nutrient-poor waters in comparison with other bacteria. *J. Appl. Bacteriol.* **80**:266-276.
- Kilb, B., B. Lange, G. Schaule, H.C. Flemming, and J. Wingender. 2003. Contamination of drinking water by coliforms from biofilms grown on rubber-coated valves. *Int. J. Hyg. Environ. Health*. **206**(6):563-573.
- Killops, S.D. 1986. Volatile ozonation products of aqueous humic material. *Wat. Res.* **20**:153-155.
- King, C.H., E.B. Shotts, R.E. Wooley, and K.G. Porter. 1988. Survival of coliforms and bacterial pathogens within protozoa during chlorination. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**(12):3023-3033.
- Kirmeyer, G.J., M. Friedman, K.D. Martel, D. Howe, M. LeChevallier, M. Abbaszadegan, M. Karim, J. Funk, and J. Harbour. 2001. Pathogen intrusion into the distribution system. American Water Works Association Research Foundation, Denver, Co.
- Kogure, K., U. Simidu, and N. Taga. 1979. A tentative direct microscopic method for counting living marine bacteria. *Can. J. Microbiol.* **25**:415-420.

- Korshin, G.V., C. Li, and M.M. Benjamin. 1998. Monitoring DBP formation with differential UV spectroscopy. *Jour. AWWA*. **90**:88-100.
- Kreig, N.R. 1984. Bergey's manual of systematic bacteriology. Vol. 1. Baltimore, MD, Williams & Wilkins Ed., 964 p.
- Kroen, W.K., and W.R. Rayburn. 1984. Influence of growth status and nutrients on extracellular polysaccharide synthesis by the soil alga *Chlamidomonas mexicana* (Chlorophyceae). *J. phycol.* **20**(2):253-257.
- Lahti, K., and L. Hiisvirta. 1995. Causes of waterborne outbreaks in community water systems in Finland: 1980-1982. *Water Sci. Technol.* **31**(5):33-36.
- Lake, R., S. Driver, and S. Ewington. 2001. The role of algae in causing coliform problems within the distribution system. In *Proc. of the Second World Water Congress, International Water Association*, Berlin, Germany, p. 153.
- Lancelot, C. 1984. Extracellular release of small and large molecules by phytoplankton in the Southern bight of the North Sea. *Estuar. Coastal Shelf Sci.* **18**:65-77.
- Lancelot, C., and G. Billen. 1985. Carbon-nitrogen relationships in nutrient metabolism of coastal marine ecosystems. In *Advances in aquatic microbiology*, Vol. 3, H.W. Jannasch, and P.J.B. Williams (Eds), Academic Press, London, p. 263-321.
- Langlais, B., et G. Bablon. 1990. Les différentes applications de l'ozone et techniques associées en traitement d'eau : un moyen pour répondre aux normes de potabilité. *Sci. Tech. Eau*. **23**:33-41.
- Laplanche, A., M. Orta de Velasquez, V. Boisdon, N. Martin, and G. Martin. 1995. Modelisation of micropollutant removal in drinking water treatment by ozonation or advanced oxidation processes. *Ozone Sci. Eng.* **17**:97-117.
- Laurent, P., P. Servais, and G. Randon. 1993. Bacterial development in distribution networks-study and modelling. *Wat. Supply*. **11**:387-398.
- Lawrence, J., H. Tosine, F.I. Onuska, and M.E. Comba. 1980. The ozonation of natural waters: product identification. *Ozone Sci. Engng.* **2**:55-64.
- Lebaron, P., P. Catala, C. Fajon, F. Joux, J. Baudart, and L. Bernard. 1997. A new sensitive, whole-cell hybridization technique for detection of bacteria involving a biotinylated oligonucleotide probe targeting rRNA and tyramide signal amplification. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:3274-3278.
- LeChevallier, M.W. 1990. Coliform regrowth in drinking water: a review. *Jour. AWWA*. **82**:74-86.
- LeChevallier, M.W. 1999. The case for maintaining a disinfectant residual. *Jour. AWWA*. **91**:86-94.
- LeChevallier, M.W., R.J. Seidler, and T.W. Evans. 1980. Enumeration and characterization of standard plate count bacteria in chlorinated and raw water supplies. *Appl. Environ. Microbiol.* **40**:922-930.
- LeChevallier, M.W., S.C. Cameron, and G.A. McFeters. 1983. New medium for improved recovery of coliform bacteria from drinking water. *Appl. Environ. Microbiol.* **45**:484-492.
- LeChevallier, M.W., and G.A. McFeters. 1985a. Enumerating injured coliforms in drinking water. *Jour. AWWA*. **77**:81-87.
- LeChevallier, M.W., and G.A. McFeters. 1985b. Interactions between heterotrophic plate count bacteria and coliform organisms. *Appl. Environ. Microbiol.* **49**:1338-1341.
- LeChevallier, M.W., T.M. Babcock, and R.G. Lee. 1987. Examination and characterization of distribution system biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**(12):2714-2724.
- LeChevallier, M.W., C.D. Cawthon, and R.G. Lee. 1988a. Factors promoting survival of bacteria in chlorinated water supplies. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**:649-654.
- LeChevallier, M.W., C.D. Cawthon, and R.G. Lee. 1988b. Mechanisms of bacterial survival in chlorinated water supplies. *Water Sci. Technol.* **20**:145-151.
- LeChevallier, M.W., C.D. Lowry, and R.G. Lee. 1990a. Disinfecting biofilms in a model distribution system. *J. AWWA*. **82**(7):87-99.
- LeChevallier, M.W., B.H. Olson, and G.A. McFeters. 1990b. Assessing and controlling bacterial regrowth in distribution systems. AWWA Research Foundation, Denver, Co., 203 p.
- LeChevallier, M.W., W. Schulz, and L.G. Ramon. 1991a. Bacterial nutrients in drinking water. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**:857-862.
- LeChevallier, M.W., W.C. Becker, P. Schorr, and R.G. Lee. 1991b. Application of biological processes to current water treatment practices. *Séminaire international : biodegradable organic matter in drinking water distribution systems*. Nancy, 2-3 oct. 1991.

- LeChevallier, M.W., C.D. Lowry, R.G. Lee, and D.L. Gibbon.** 1993. Examining the relationship between iron corrosion and the disinfection of biofilm bacteria. *Jour. AWWA.* **85(7)**:111-123.
- LeChevallier, M.W., N.J. Welch, and D.B. Smith.** 1996a. Full-scale studies of factors related to coliform regrowth in drinking water. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:2201-2211.
- LeChevallier, M.W., N.J. Shaw, and D.B. Smith.** 1996b. Factors limiting microbial growth in distribution systems: full-scale experiments. American Water Works Association Research Foundation, Denver, Co., 152 p.
- LeChevallier, M.W., M.R. Karim, M. Abbaszadegan, J.E. Funk, and M. Friedman.** 1999. Pathogen intrusion into potable water. In *Water Quality Technology Conference*, American Water Works Association, Tampa, FL., 31 octobre-3 novembre.
- LeChevallier, M.W., R.W. Gullik, M.R. Karim, M. Friedman, and J.E. Funk.** 2003. The potential for risks from intrusion of contaminants into the distribution system from pressure transients. *Journal of water and health.* **1**:3-14.
- Leclerc, H., D.A.A. Mossel, S.C. Edberg, and C.B. Struijk.** 2001. Advances in the bacteriology of the Coliform Group: their suitability as markers of microbial water safety. *Annu. Rev. Microbiol.* **55**:201-234.
- Lee, S.H., J.J. O'Connor, and S.K. Banerji.** 1980. Biologically mediated corrosion and its effect on water quality in distribution systems. *Jour. AWWA.* **72**:636-645.
- Leenheer, J.A.** 1981. Comprehensive approach to preparative isolation and fractionation of dissolved organic carbon from natural waters and wastewaters. *Environ. Sci. Technol.* **15**:578-587.
- Leenher, J.A., and J.-P. Croué.** 2003. Aquatic organic matter. *Environ. Sci. Technol.* **37(1)**:19-26.
- Lefebvre, E.** 1995. Etude par des paramètres globaux de la matière organique d'eaux brutes et clarifiées. *Rev. Sci. Eau.* **8**:125-150.
- Lefebvre, E., et J.-P. Croué.** 1995. Modification de la matière organique lors des traitements conventionnels de potabilisation. *Rev. Sci. Eau.* **8**:463-479.
- Legrand, L., et P. Leroy.** 1995. Prévention de la corrosion et de l'entartrage dans les réseaux de distribution d'eau. CIFEC, Paris, 335 p.
- Legube, B.** 1991. La matière organique des eaux naturelles. *Analisis*, 115-117.
- Legube, B., F. Xiong, J.-P. Croué, et M. Doré.** 1990. Etude sur les acides fulviques extraits d'eaux superficielles françaises. Extraction, caractérisation et réactivité avec le chlore. *Rev. Sci. Eau.* **3**:399-424.
- Lehtola, M.J., I.T. Miettinen, T. Vartiainen, and P.J. Martikainen.** 2002. Changes in content of microbially available phosphorous, assimilable organic carbon and microbial growth potential during drinking water treatment processes. *Wat. Res.* **36**:3681-3690.
- Lehtola, M.J., T. Juhna, I.T. Miettinen, T. Vartiainen, and P.J. Martikainen.** 2004a. Formation of biofilms in drinking water distribution networks, a case study in two cities in Finland and Latvia. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **31(11)**:489-494.
- Lehtola, M.J., T.K. Nissinenb, I.T. Miettinen, P.J. Martikainen, and T. Vartiainen.** 2004b. Removal of soft deposits from the distribution system improves the drinking water quality. *Wat. Res.* **38**:601-610.
- Lendenmann, U., and T. Egli.** 1998. Kinetic models for the growth of *Escherichia coli* with mixtures of sugars under carbon-limited conditions. *Biotechnology and bioengineering.* **59(1)**:99-107.
- Levasseur, S., M.O. Husson, R. Leitz, F. Merlin, F. Laurent, F. Peladan, J.L. Drocourt, H. Leclerc, and M. Van Hoegaerden.** 1992. Rapid detection of members of the family *Enterobacteriaceae* by a monoclonal antibody. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**:1524-1529.
- Lévi, Y.** 1995. Les paramètres influençant le développement des germes dans les réseaux d'eau potable. *TSM.* **3**:240-245.
- Levy, R.V., F.L. Hart, and R.D. Cheetham.** 1986. Occurrence and public health significance of invertebrates in drinking water systems. *J. AWWA.* **78(9)**:105-110.
- Lewin, R.A.** 1956. Extracellular polysaccharides of green algae. *Can. J. Microbiol.* **2**:665-672.
- Li, Z., A.J. Clarke, and T.J. Beveridge.** 1998. Gram-negative bacteria produce membrane vesicles which are capable of killing other bacteria. *J. Bacteriol.* **180(20)**:5478-5483.
- Lignell, R.** 1990. Excretion of organic carbon by phytoplankton : its relation to algal biomass, primary productivity and bacterial secondary productivity in the Baltic Sea. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **68**:85-89.
- Lippy, E.C., and S.C. Waltrip.** 1984. Waterborne disease outbreaks – 1946-1980. A thirty-five-year perspective. *Jour. AWWA.* **77**:60-67.

- Lloyd, S.W., J.M. Lea, P.V. Zimba, and C.C. Grimm. 1998. Rapid analysis of geosmin and 2-methylisoborneol in water using solid phase micro-extraction procedures. *Wat. Res.* **32**:2140-2146.
- Loge, F.J., R.W. Emerick, D.E. Thompson, D.C. Nelson, and J.L. Darby. 1999. Development of a fluorescent 16S rRNA oligonucleotide probe specific to the family *Enterobacteriaceae*. *Water Environ. Res.* **71**:75-83.
- Lowther, E.D., and R.H. Moser. 1984. Detecting and eliminating coliform regrowth. In *Water Quality Technology Conference*, American Water Works Association, Denver, Co., décembre.
- Loyer, O., B. Lüsse, and H. Bernhardt. 1985. Isolation and characterization of extracellular organic matter (EOM) from algae. *Z. Wasser-abwasser-Forsch.* **18**:76-90.
- Mague, T.H., E. Friberg, D.J. Hughes, and I. Morris. 1980. Extracellular release of carbon by marine phytoplankton : a physiological approach. *Limnol. Oceanogr.* **25**:262-279.
- Maidak, B.L., G.J. Olsen, N. Larsen, R. Overbeck, M.J. McCaughey, and C.R. Woese. 1996. The Ribosomal Database Project (RDP). *Nucleic Acids Res.* **24**:82-85.
- Malinsky-Rushansky, N.Z., and C. Legrand. 1996. Excretion of dissolved organic carbon by phytoplankton of different sizes and subsequent bacterial uptake. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **132**:249-255.
- Manz, W., R. Amann, W. Ludwig, M. Wagner, and K.H. Schleifer. 1992. Phylogenetic oligodeoxynucleotide probes for the major subclasses of *proteobacteria* : problems and solutions. *Syst. Appl. Microbiol.* **15**:593-600.
- Manz, W., U. Szewzyk, P. Ericsson, R. Amann, K.H. Schleifer, and T.A. Stenström. 1993. *In situ* identification of bacteria in drinking water and adjoining biofilms by hybridization with 16S and 23S r-RNA-directed fluorescent oligonucleotide probes. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**:2293-2298.
- Martin, R.S., W.H. Gates, R.S. Tobin, D. Grantham, R. Sumarah, P. Wolfe, and P. Forestall. 1982. Factors affecting coliform bacteria growth in distribution systems. *Jour. AWWA.* **74**(1):34-37.
- Martin-Mousset, B., J.P. Croué, E. Lefebvre, et B. Legube. 1997. Distribution et caractérisation de la matière organique dissoute d'eaux naturelles de surface. *Wat. Res.* **31**:541-553.
- Mary, P., G. Bruchet, C. Defives, and J.-P. Hornez. 2001. Growth and survival of clinical vs. environmental species of *Aeromonas* in tap water. *International Journal of Food Microbiology.* **69**:191-198.
- Mathay, A. 1993. Etude biologique et écotoxicologique de la chlorophycée *Hydrodictyon reticulum* génératrice d'une fleur d'eau, Thèse de Doctorat : INPL, Nancy, France, 212 p.
- Mathieu, L., J.-L. Paquin, J.-C. Block, G. Randon, J. Maillard, and D. Reasoner. 1992. Parameters governing bacterial growth in water distribution systems. *Sci. Eau.* **5**:91-112.
- Mathieu, L., J.-C. Block, M. Prévost, A. Maul, and R. De Bishop. 1995. Biological stability of drinking water in the city of Metz distribution system. *J. Water SRT-Aqua.* **44**:230-239.
- Matilainen, A., N. Lindqvist, S. Korhonen, and T. Tuhkanen. 2002. Removal of NOM in the different stages of the water treatment process. *Environment International.* **28**:457-465.
- Maul, A., D. Vagost, et J.-C. Block. 1989. Stratégies d'échantillonnage pour analyse microbiologique sur réseaux de distribution d'eau. Tech & Doc, Lavoisier Ed., Paris.
- Maurin, N., C. Amblard, and G. Bourdier. 1997. Phytoplanktonic excretion and bacterial reassimilation in an oligomesotrophic lake: molecular weight fractionation. *J. Plankton Res.* **19**:1045-1068.
- McFeters, G.A. 1990. Enumeration, occurrence, and significance of injured indicator bacteria in drinking water. In *Drinking water microbiology*. New-York, Springer-Verlag, Inc., p. 478-491.
- McFeters, G.A., S.C. Cameron, and M.W. LeChevallier. 1982. Influence of diluents, media, and membrane filters on detection of injured waterborne coliform bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **43**:97-103.
- McFeters, G.A., J.S. Kippin, and M.W. LeChevallier. 1986. Injured coliforms in drinking water. *Appl. Environ. Microbiol.* **51**:1-5.
- McDougald, D., S.A. Rice, D. Weichart, and S. Kjelleberg. 1998. Nonculturability : adaptation or debilitation. *FEMS Microbiol. Ecol.* **25**:1-9.
- McGuire, M.J. 1995. Off-flavors as the consumer's measure of drinking water safety. *Wat. Sci. Tech.* **31**(11):1-8.
- McKillip, J.L., L.A. Jaykus, and M. Drake. 1998. rRNA stability in heat-killed and UV-irradiated enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* O157:H7. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:4264-4268.
- McMath, S.M., C. Sumpter, D.M. Holt, A. Delanoue, and A.H.L. Chamberlain. 1999. The fate of environmental coliforms in a model water distribution system. *Lett. Appl. Microbiol.* **28**(2):93-97.

- Meili, M.** 1992. Sources, concentrations and characteristics of organic matter in softwater lakes and streams of the Swedish forest region. *Hydrobiologia*. **229**:23-41.
- Merlet, N., N. Karpel Vel Leitner, et M. Doré.** 1992a. Incidence de quelques étapes de traitement sur l'évolution du CODB d'eaux à potabiliser et de molécules modèles. *Sci. Tech. Eau*. **25**:17-22.
- Merlet, N., M. Prévost, Y. Merlet, et J. Coallier.** 1992b. Enlèvement de la matière organique dans les filtres CAG. *Sci. Eau*. **5**:143-164.
- Metting, B., and J. W. Pyne.** 1986. Biologically active compounds from microalgae. *Enzyme Microb. Tech.* **8**:386-394.
- Miettinen, I.T., T. Vartiainen, and P.J. Martikainen.** 1997. Phosphorous and bacterial growth in drinking water. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**(8):3242-3245.
- Miettinen, I. T., T. Vartiainen, and P. J. Martikainen.** 1998. Microbial growth in drinking waters treated with ozone, ozone/hydrogen peroxide or chlorine. *Ozone-Sci. Eng.* **20**:303-315.
- Miltner, R.J., H.M. Shukairy, and R.S. Summers.** 1992. Disinfection by-product formation and control by ozonation and biotreatment. *Jour. AWWA*. **84**:53-62.
- Mittelman, M.W., M. Habash, J.M. Lacroix, A.E. Khoury, and M. Krajden.** 1997. Rapid detection of *Enterobacteriaceae* in urine by fluorescent 16S rRNA *in situ* hybridization on membrane filters. *J. Microbiol. Methods*. **30**:153-160.
- Momba, M.N.B., T.E. Cloete, S.N. Venter, and R. Kfir.** 1999. Examination of the behavior of *Escherichia coli* in biofilms established in laboratory-scale units receiving chlorinated and chloraminated water. *Wat. Res.* **33**(13):2937-2940.
- Monfort, P., et B. Baleux.** 1999. Bactéries viables non cultivables : réalités et conséquences. *Bull. Soc. Fr. Microbiol.* **14**:201-207.
- Moore, B.G., and R.G. Tischer.** 1964. Extracellular polysaccharides of algae : effects on life-support systems. *Science*. **14**:586-587.
- Moran, M.A., and R.E. Hodson.** 1990. Bacterial production on humic and non humic components of dissolved organic carbon. *Limnol. Oceanogr.* **35**:1744-1756.
- Morin, P., A. Camper, W. Jones, D. Gatel, and J.-C. Goldman.** 1996. Colonization and disinfection of biofilms hosting coliform-colonized carbon fines. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:4428-4432.
- Münster, U., and R.J. Chróst.** 1990. Origin, composition and microbial utilisation of dissolved organic matter. In *Aquatic microbial ecology – Biochemical and molecular approaches*. J. Overbeck, and R.J. Chróst (Eds), Springer Verlag, p. 8-46.
- Muyima, N.Y.O., and F. Ngcakani.** 1998. Indicator bacteria and regrowth potential of the drinking water in Alice, Eastern Cape. *Water SA*. **24**(1):29-34.
- Myklestad, S.** 1977. Production of carbohydrates by marine planktonic diatoms. II. Influence of the N/P ratio in the growth medium on the assimilation ratios, growth rate and production of cellular and extracellular carbohydrates by *Chaetoceros affinis* var. *Willei* (Gran) Hustedt and *Skeletonema costatum* (Grev.) Cleve. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **29**:161-179.
- Myklestad, S.** 1995. Release of extracellular products by phytoplankton with special emphasis on polysaccharides. *The Science of the Total Environment*. **165**:155-164.
- Myklestad, S., and A. Haug.** 1972. Production of carbohydrates by the marine diatom *Chaetoceros affinis* var. *Willei* (Gran) Hustedt. I. Effect of the concentration of nutrients in the culture medium. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **9**:125-136.
- Myklestad, S., A. Haug, and B. Larsen.** 1972. Production of carbohydrates by the same marine diatom *Chaetoceros affinis* var. *Willei* (Gran) Hustedt. II. Preliminary investigation of the extracellular polysaccharide. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **9**:137-144.
- Myklestad, S., O. Holm-Hansen, K.M. Varum, and B. Volcani.** 1989. Rate of release of extracellular amino acids and carbohydrates from the marine diatom *Chaetoceros affinis*. *J. Plankton Res.* **11**:763-773.
- Nakache, F., J.-M. Mainguy, and J.W. Grenèche.** 2001. Cyanobactéries : exemple d'un cas de bloom apparu dans un barrage en Normandie ; réactions face à la crise. *TSM*. **9**:84-95.
- Ndiongue, S., P.M. Huck, and R.M. Slawson.** 2005. Effects of temperature and biodegradable organic matter on control of biofilms by free chlorine in a model drinking water distribution system. *Wat. Res.* **39**(6):953-964.

- Niquette, P., P. Servais, and R. Savoir. 2000. Impacts of pipe materials on densities of fixed bacterial biomass in a drinking water distribution system. *Wat. Res.* **34**:1952-1956.
- Niquette, P., P. Servais, and R. Savoir. 2001. Bacterial dynamics in the drinking water distribution system of Brussels. *Wat. Res.* **35**:675-682.
- Nishimura, M., K. Kita-Tsukamoto, and K. Kogure. 1993. A new method to detect viable bacteria in natural seawater using 16SrRNA oligonucleotide probe. *J. Oceanol.* **49**:51-56.
- Norton, C.D., and M.W. LeChevallier. 1997. Chloramination : its effect on distribution system water quality. *Jour. AWWA.* **89**(7):66-77.
- Obst, U., I. Hübner, M. Wecker, and D. Bitter-Suermann. 1989. Immunological method using monoclonal antibodies to detect *Enterobacteriaceae* in drinking water. *Aqua.* **38**:136-142.
- Ogura, N. 1974. Molecular weight fractionation of dissolved organic matter in coastal seawater by ultrafiltration. *Mar. Biol.* **24**:305-312.
- Ogura, N. 1975. Further studies on decomposition of dissolved organic matter in coastal seawater. *Mar. Biol.* **31**:101-111.
- Oliver, J.D. 2000. Formation of viable but nonculturable cells. In *Starvation in Bacteria*. S. Kjelleberg (Eds), Plenum Press, NewYork, p. 239-272.
- Oliver, E.D., and J.D. Harbour. 1995. Speciation of total coliforms isolated from sediments in brown water released during a flushing program undertaken by the Seattle Water Department. In *Water Quality Technology Conference*, American Water Works Association, New-Orleans, La., 12-18 novembre.
- OMS (organisation mondiale de la santé). 2004. Microbial aspects. In *Guidelines for drinking-water quality*. Third edition, Vol. 1, Chapter 7. World Health organization, Geneva, p. 121-144.
- Ootsubo, M., T. Shimizu, R. Tanaka, T. Sawabe, K. Tajima, M. Yoshimizu, Y. Ezura, and T. Ezaki. 2002. Oligonucleotide probe for detecting *Enterobacteriaceae* by *in situ* hybridizations. *J. Appl. Microbiol.* **93**:60-68.
- Orskov, I. 1984. *Klebsiella*. Bergey's Manual of systematic bacteriology, Vol. 1. N.R. Krieg et J.G. Holt (Eds.). Williams and Wilkens, Baltimore, Md.
- Ouverney, C.C., and J.A. Fuhrman. 1999. Combined microautoradiography-16S rRNA probe technique for determination of radioisotope uptake by specific microbial cell types *in situ*. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:1746-1752.
- Owen, D.M., W.J. Brennan, Z.K. Chowdhury, and G.L. Amy. 1990. A determination of the molecular weight fractionation of organic material and disinfection by-products. In *Proc. AWWA, WQTC, Advances in water analysis and treatment*, San Diego, California, 11-15 novembre, p. 957-972.
- Owen, D., G.L. Amy, Z.K. Chowdhuri, R. Paode, G. McCoy, and K. Viscoil. 1995. NOM characterization and treatability. *Jour. AWWA.* **87**:46-63.
- Paquin, J.L., J.-C. Block, K. Haudidier, P. Hartemann, F. Colin, J. Miazga, et Y. Lévi. 1992. Effet du chlore sur la colonisation bactérienne d'un réseau expérimental de distribution d'eau. *Sci. Eau.* **5**:399-414.
- Parent, A., S. Fass, M.L. Dincher, D. Reasoner, D. Gatel, and J.-C. Block. 1996. Control of coliform growth in drinking water distribution systems. *J. CIWEM.* **10**:442-445.
- Payment, P., L. Richardson, J. Siemiatycki, R. Dewar, M. Edwardes, and E. Franco. 1991. A randomized trial to evaluate the risk of gastrointestinal disease due to the consumption of drinking water meeting currently accepted microbiological standards. *Amer. J. Public. Health.* **81**:703-708.
- Payment, P., E. Coffin, and G. Paquette. 1994. Blood agar to detect virulence factors in tap water heterotrophic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**:1179-1183.
- Payment, P., J. Siemiatycki, L. Richardson, G. Renaud, E. Franco, and M. Prévost. 1997. A prospective epidemiological study of gastrointestinal health effects due to consumption of drinking water. *Health Res.* **7**:5-31.
- Pennanen, V., and J. Mannio. 1987. A note on the use of dilution to overcome quenching effects when measuring fluorescence of humic lakes. *Sci. Total Environ.* **62**:163-164.
- Peterson, H.G., S.E. Hrudey, I.A. Cantin, T.R. Perley, and S.L. Kenefick. 1995. Physiological toxicity, cell membrane damage, and the release of dissolved organic carbon and geosmin by *Aphanizomenon flos-aquae* after exposure to water treatment chemicals. *Wat. Res.* **9**(6):1515-1523.
- Peuravuori, J., and K. Pihlaja. 1998. Multimethod characterization of lake aquatic humic matter isolated with sorbing solid and tangential membrane filtration. *Anal. Chim. Acta.* **364**:203-221.
- Plummer, J.D., and K. Edzwald. 1998. Effect of ozone on disinfection by-product formation of algae. *Wat. Sci. Tech.* **37**(2):49-55.

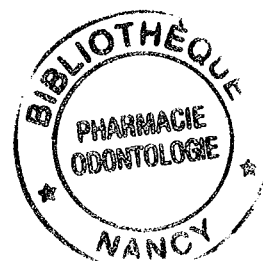
- Plummer, J.D., and J.K. Edzwald.** 2000. Impacts of ozone on coagulation of algal-laden waters. In *Water Quality Technology Conference*, American Water Works Association, Salt Lake City, Utah, 5-9 novembre.
- Pommeypuy, M., M. Butin, A. Derrien, M. Gourmelon, R.R. Colwell, and M. Cormier.** 1996. Retention and enteropathogenicity by viable but nonculturable *Escherichia coli* exposed to seawater and sunlight. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:4621-4626.
- Poulsen, L.K., F. Lan, C.S. Kristensen, P. Hobolth, S. Molin, and K.A. Krogfelt.** 1994. Spatial distribution of *Escherichia coli* in the mouse large intestine inferred from rRNA *in situ* hybridization. *Infect. Immun.* **62**:5191-5194.
- Power, K.N., and L.A. Nagy.** 1999. Relationship between bacterial regrowth and some physical and chemical parameters within Sydney's drinking water distribution system. *Wat. Res.* **33**(3):741-750.
- Prescott, A.M., and C.R. Fricker.** 1999. Use of PNA oligonucleotides for the *in situ* detection of *Escherichia coli* in water. *Mol. Cell. Probes.* **13**:261-268.
- Prévost, M., A. Rompré, J. Coallier, P. Servais, P. Laurent, B. Clément, and P. Lafrance.** 1998. Suspended bacterial biomass and activity in full-scale drinking water distribution systems: impact of water treatment. *Wat. Res.* **32**:1393-1406.
- Pyle, B.H., S.C. Broadaway, and G.A. McFeters.** 1999. Sensitive detection of *Escherichia coli* O157:H7 in food and water by immunomagnetic separation and solid-phase laser cytometry. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:1966-1972.
- Ramvalho, R., A. Afonso, J. Cunha, P. Teixeira, and P.A. Gibbs.** 2001. Survival characteristics of pathogens inoculated into bottled mineral water. *Food Control.* **12**:311-316.
- Ramus, J., and D.M. Robins.** 1975. The correlation of Golgi activity and polysaccharide secretion in *Porphyridium*. *J. Phycol.* **11**:70-74.
- Randtke, S.J.** 1988. Organic contaminant removal by coagulation and related process combinations. *Jour. AWWA* **80**:40-56.
- Regnault, B., S. Martin-Delautre, M. Lejay-Collin, M. Lefèvre, and P.A.D. Grimont.** 2000. Oligonucleotide probe for the visualization of *Escherichia coli*/*Escherichia fergusonii* cells by *in situ* hybridization : specificity and potential application. *Res. Microbiol.* **151**:521-533.
- Ribas, F., J. Frias, J. M. Huguet, and F. Lucena.** 1997. Efficiency of various water treatment in the removal of biodegradable and refractory organic matter. *Wat. Res.* **31**:639-649.
- Rice, E.W., K.R. Fox, H.D. Nash, E.J. Read, and A.P. Smith.** 1987. Comparison of media for recovery of total coliform bacteria from chemically treated water. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**:1571-1573.
- Rizet, M., J. Blanc, M. Cognet, M. Derons, N. Dorizon, et G. Filippi.** 1984. Qualité de l'eau dans les réseaux de distribution, son évolution biologique et chimique. *J. Fr. Hydrol.* **15**:207-221.
- Roberts, D.P., C.J. Sheets, and J.S. Hartung.** 1992. Evidence for proliferation of *Enterobacter cloacae* on carbohydrates in cucumber and pea spermosphere. *Can. J. Microbiol.* **38**:1128-1134.
- Rockabrand, D., T. Austin, R. Kaiser, and P. Blum.** 1999. Bacterial growth state distinguished by single-cell protein profiling : does chlorination kill coliforms in municipal effluent? *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:4181-4188.
- Rompré, A., P. Servais, J. Baudart, P.R. De-Roubin, and P. Laurent.** 2002. Detection and enumeration of coliforms in drinking water : current methods and emerging approaches. *J. Microbiol. Methods.* **49**:31-54.
- Rook, J.J.** 1977. Chlorination reactions of fluvic acids in natural waters. *Environ. Sci. Technol.* **11**:478.
- Rose, J.B., C.P. Gerba, and W. Jakubowski.** 1988. Survey of potable water supplies for *Cryptosporidium* and *Giardia*. *Environ. Sci. Technol.* **25**:1393-1400.
- Roszak, D.B., and R.R. Colwell.** 1987. Survival strategies of bacteria in the natural environment. *Microbiol. Reviews.* **51**(3):365-379.
- Ryu, J.-H., and L.R. Beuchat.** 2005. Biofilm formation by *Escherichia coli* O157:H7 on stainless steel: effect of exopolysaccharide and curli production on its resistance to chlorine. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**(1):247-254.
- Saby, S., I. Sibille, L. Mathieu, J.-L. Paquin, and J.-C. Block.** 1997. Influence of water chlorination on the counting of bacteria with DAPI (4'-6-diamidino-2 phenylindol). *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:1564-1569.
- Sathasivan, A., S. Ohgaki, K. Yamamoto, and N. Kamiko.** 1997. Role of inorganic phosphorous in controlling regrowth in water distribution system. *Wat. Sci. Tech.* **35**(8):37-44.
- Sathasivan, A., S. Ohgaki, and M. Otaki.** 1998. Can phosphorous control be a feasible option to control regrowth in Tokyo drinking water system ? In *Specialized Conference on drinking water distribution with or without disinfectant residual* – D.V.G.W., AWWA, IWW, Mülheim an der Ruhr (Allemagne). 28-30 septembre.

- Sathasivan, A., and S. Ohgaki. 1999. Application of new bacterial regrowth potential method for water distribution system – A clear evidence of phosphorous limitation. *Wat. Res.* **33(1)**:137-144.
- Schoenen, D., and O. Hoyer. 2000. Contamination of drinking water with coliform organisms by the Larvae of Gnats in the water treatment plant. *Acta Hydrochim. Hydrobiol.* **28(1)**:47-51.
- Schönhuber, W., B. Fuchs, S. Juretschko, and R. Amann. 1997. Improved sensitivity of whole-cell hybridization by the combination of horseradish peroxidase-labeled oligonucleotides and tyramide signal amplification. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:3268-3273.
- Schreiber, H., and D. Schoenen. 1994. Chemical, bacteriological and biological examination and evaluation of sediments from drinking water reservoirs – results from the first sampling phase. *Zentralbl. Hyg. Umweltmed.* **196(2)**:153-169.
- Schreppel, C.K., and A.J. Geiss. 1996. Total coliform occurrence and corrosion control. In *Proc. Of National Conf. On Integrating Corrosion Control and Other Water Quality Goals*, Cambridge, Mass.
- Schulten, H.R., and G. Gleixner. 1999. Analytical pyrolysis of humic substances and dissolved organic matter in aquatic systems structure and origin. *Wat. Res.* **33**:2489-2498.
- Seidler, R.J., T.M. Evans, J.R. Kaufman, C.E. Warwick, and M.W. LeChevallier. 1981. Limitations of standard coliform enumeration techniques. *J. AWWA.* **73**:538-542.
- Servais, P. 1996. Rôle du chlore et de la matière organique biodégradable dans le contrôle de la croissance bactérienne en réseau de distribution de l'eau potable. *Tribune Eau.* **96**:3-12.
- Servais, P., G. Billen, and M.C. Hascoet. 1987. Determination of the biodegradable fraction of dissolved organic matter in waters. *Wat. Res.* **21**:445-450.
- Servais, P., G. Billen, C. Ventresque, and G.P. Bablon. 1991. Microbial activity in granulated activated carbon filters at the Choisy-le-Roi drinking water treatment plant. *Jour. AWWA.* **83**:62-68.
- Servais, P., G. Billen, P. Bouillot, and M. Benezet. 1992a. A pilot study of biological GAC filtration in drinking water. *Aqua.* **41**:163-168.
- Servais, P., G. Billen, P. Laurent, Y. Lévi, and G. Randon. 1992b. Studies of BDOC and bacterial dynamics in the drinking water distribution system of the northern parisian suburbs. *Sci. Eau.* **5**:69-89.
- Servais, P., P. Laurent, G. Billen, and D. Gatel. 1995a. Development of a model of BDOC and bacterial biomass fluctuations in distribution systems. *Sci. Eau.* **8**:427-462.
- Servais, P., P. Laurent, and G. Randon. 1995b. Comparison of the bacterial dynamics in various french distribution systems. *J. Water SRT-Aqua.* **44**:10-17.
- Sharp, J.H. 1977. Excretion of organic matter by marine phytoplankton : do healthy cells do it? *Limnol. Oceanogr.* **22**:381-399.
- Sibille, I., L. Mathieu, J.-L. Paquin, D. Gatel, and J.-C. Block. 1997. Microbial characteristics of a distribution system fed with nanofiltered drinking water. *Wat. Res.* **31**:2318-2326.
- Sibille, I., T. Sime-Ngando, L. Mathieu, and J.-C. Block. 1998. Protozoan bacterivory and *Escherichia coli* survival in drinking water distribution systems. *Appl. Environ. Microbiol.* **64(1)**:197-202.
- Sidorowicz, S.V. 1996. The microbiology of lubricants and oils for water supply applications. *J. CIWEM.* **10(3)**:205-210.
- Sinsabaugh, R.L., R.C. Hoehn, W.R. Knoke, and A.E. Linkins. 1986. Removal of dissolved organic carbon by coagulation with iron sulfate. *Jour. AWWA.* **78**:74-82.
- Snead, M.C., V.P. Olivieri, K. Kawata, and C.W. Krusé. 1980. The effectiveness of chlorine residuals in inactivation of bacteria and viruses introduced by posttreatment contamination. *Wat. Res.* **14**:403-408.
- Sondergaard, M., and H.-H. Schierup. 1982. Dissolved organic carbon during a spring diatom bloom in lake Mossø, Denmark. *Wat. Res.* **16**:815-821.
- Spierings, G., C. Oekhuijsen, H. Hofstra, and J. Tommassen. 1993. Polymerase chain reaction for the specific detection of *Escherichia coli*/Shigella. *Res. Microbiol.* **144**:557-564.
- Steinert, M., L. Emödy, R. Amann, and J. Hacker. 1997. Resuscitation of viable but nonculturable *Legionella pneumophila* Philadelphia JR32 by *Acanthamoeba castellanii*. *Appl. Environ. Microbiol.* **63(5)**:2047-2053.
- Stender, H., K. Oliveira, S. Rigby, F. Bargoot, and J. Coull. 2001. Rapid detection, identification, and enumeration of *Escherichia coli* by fluorescence *in situ* hybridization using an array scanner. *J. Microbiol. Meth.* **45**:31-39.
- Stryer, L. (Ed.). 1988. Biochemistry. W.H. Freeman and Company, USA, New York, p.291.

- Subra, P., M.C. Hennion, et R. Rosset.** 1989. Analyse de la matière organique contenue dans des eaux de distribution par des méthodes chromatographiques. *Analisis*. **17**:163-184.
- Sukenik, A., B. Teltch, A.W. Wachs, G. Shelef, I. Nir, and D. Levanon.** 1987. Effect of oxidants on microalgal flocculation. *Wat. Res.* **21**(5):533-539.
- Sundh, I.** 1989. Characterization of phytoplankton extracellular products (PDOC) and their subsequent uptake by heterotrophic organisms in a mesotrophic forest lake. *J. Plankton. Res.* **11**:463-486.
- Sundh, I.** 1992. Biochemical composition of dissolved organic carbon derived from phytoplankton and used by heterotrophic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**:2938-2947.
- Sundh, I., and R.T. Bell.** 1992. Extracellular dissolved organic carbon released from phytoplankton as a source of carbon for heterotrophic bacteria in lakes of different humic content. *Hydrobiologia*. **229**:93-106.
- Thurman, E.M.** 1985. Organic chemistry of natural waters. Martinus Nijhoff/Dr W. Junk Publishers. 497 p.
- Thurman, E.M., and R.L. Malcolm.** 1983. Structural study of humic substances: new approaches and methods. In *Aquatic and terrestrial humic materials*. R.F. Christman, and E.T. Gjessing (Eds), Ann Arbor Science Publishers, p. 1-25.
- Tolkier-Nielsen, T., M. Halberg Larsen, H. Kied, and S. Molin.** 1997. Effects of stress treatments on the detection of *Salmonella typhimurium* by *in situ* hybridization. *International Journal of Food Microbiology*. **35**:251-258.
- Tortorello, M.L., and K.F. Reineke.** 2000. Direct enumeration of *Escherichia coli* and enteric bacteria in water, beverages and sprouts by 16S rRNA *in situ* hybridization. *Food Microbiology*. **17**:305-313.
- Trehy, M.L., R.A. Yost, and C.J. Miles.** 1986. Chlorination by-products of amino acid in natural waters. *Environ. Sci. Technol.* **20**:1117-1122.
- Tsai, Y.L., C.J. Palmer, and L.R. Sangermano.** 1993. Detection of *Escherichia coli* in sewage and sludge by polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**:353-357.
- Tsen, H.Y., C.K. Lin, and W.R. Chi.** 1998. Development and use of 16S rRNA gene targeted PCR primers for the identification of *Escherichia coli* cells in water. *J. Appl. Microbiol.* **85**:554-560.
- Tuovinen, O.H., K.S. Button, A. Vuorinen, L. Carlson, D.M. Mair, and L.A. Yut.** 1980. Bacterial, chemical, and mineralogical characteristics of tubercles in distribution pipelines. *J. AWWA*. **72**(11):626-635.
- Vachée, A., D.A.A. Mossel, and H. Leclerc.** 1997. Antimicrobial activity among *Pseudomonas* and related strains of mineral water origin. *J. Appl. Microbiol.* **83**:652-658.
- Van der Kooij, D.** 1986. The effect of treatment on assimilable organic carbon in drinking water. In *Proc. conference on Treatment of drinking water for organic contaminants*, Edmonton, Canada, 7-8 avril.
- Van der Kooij, D.** 1992. Assimilable organic carbon as an indicator of bacterial regrowth. *Jour. AWWA*. **84**:57-65.
- Van der Kooij, D.** 1997. Multiplication of coliforms at very low concentrations of substrates in tap water. In *Coliforms and E. coli, Problem or Solution?* D. Kay, and C. Fricker (Eds), Athenaeum Press Ltd, Londres, p. 195-207.
- Van der Kooij, D., and W.A.M. Hijnen.** 1985. Regrowth of bacteria on assimilable organic carbon in drinking water. *J. Fr. Hydrol.* **16**:201-218.
- Van der Kooij, D., and W.A.M. Hijnen.** 1988. Multiplication of a *Klebsiella pneumoniae* strain in water at low concentrations of substrates. *Wat. Sci. Tech.* **20**:117-123.
- Van der Kooij, D., W.A.M. Hijnen, and J.C. Kruithof.** 1989. The effects of ozonation, biological filtration and distribution on the concentration of easily assimilable organic carbon (AOC) in drinking water. *Ozone Sci. Engng.* **11**:297-311.
- Van der Kooij, D., J.H.M. Van Liverloo, J. Shellart, and P. Hiemstra.** 1995. Maintaining quality without a disinfectant residual. *Jour. AWWA*. **91**:55-64.
- Van der Wende, E., and W.G. Characklis.** 1990. Biofilms in potable water distribution systems. In *Drinking Water Microbiology*. G.A. McFeters (Ed.), Springer-Verlag, New-York, p. 249-268.
- Van Poucke, S.O., and H.J. Nelis.** 2000a. A 210-min solid phase cytometry test for the enumeration of *Escherichia coli* in drinking water. *J. Appl. Microbiol.* **89**:390-396.
- Van Poucke, S.O., and H.J. Nelis.** 2000b. Rapid detection of fluorescent and chemiluminescent total coliforms and *Escherichia coli* on membrane filters. *J. Microbiol. Methods*. **42**:233-244.
- Verner, K., and G. Schatz.** 1988. Protein translocation across membranes. *Science*. **241**:1307-1313.
- Volk, C., et J.C. Joret.** 1994. Paramètres prédictifs de l'apparition des coliformes dans les réseaux de distribution d'eau d'alimentation. *Sci. Eau*. **7**:131-152.

- Volk, C., M.W. LeChevallier, and N. Welch. 1996. Organic nutrient control during conventional treatment for limiting coliform occurrences in distributed drinking water. In *Water Quality Technology Conference*, American Water Works Association, Boston, USA, 17-20 novembre.
- Volk, C.J., C.B. Volk, and L.A. Kaplan. 1997. Chemical composition of biodegradable dissolved organic matter in streamwater. *Limnol. Oceanogr.* **42**:39-44.
- Volk, C., and M.W. LeChevallier. 1999. Impacts of the reduction of nutrient levels on bacterial water quality in distribution systems. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:4957-4966.
- Volk, C., and M.W. LeChevallier. 2000. Assessing biodegradable organic matter. *Jour. AWWA.* **92**(5):64-76.
- Volk, C., K. Bell, E. Ibrahim, D. Verges, G. Amy, and M.W. LeChevallier. 2000. Impact of enhanced and optimized coagulation on removal of organic matter and its biodegradable fraction in drinking water. *Wat. Res.* **34**:3247-3257.
- Waage, A.S., T. Vardund, V. Lund, and G. Kapperud. 1999a. Detection of low numbers of *Salmonella* in environmental water, sewage and food samples by a nested polymerase chain reaction assay. *J. Appl. Microbiol.* **87**(3):418-428.
- Waage, A.S., T. Vardund, V. Lund, and G. Kapperud. 1999b. Detection of low numbers of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in environmental water and sewage samples by nested polymerase chain reaction. *J. Appl. Microbiol.* **87**:814-821.
- Wagner, M., R. Amann, H. Lemmer, W. Manz, and K.H. Scheifer. 1994. Probing activated sludge with fluorescently labeled rRNA targeted oligonucleotides. *Water Sci. Technol.* **29**:15-23.
- Wangerski, P.J. 1978. Production of dissolved organic matter. In *Marine Ecology, Vol. IV. Dynamics*, O. Kinne (Ed), John Wiley, London, p. 115-220.
- Wessendorf, M.W., and T.C. Brelje. 1992. Which fluorophore is brightest? A comparison of the staining obtained using fluorescein, tetramethylrhodamine, lissamine rhodamine, Texas red, and cyanine 3.18. *Histochemistry.* **98**(2):81-85.
- Westerhoff, P., G. Aiken, G. Amy, and J. Debroux. 1999. Relationships between the structure of natural organic matter and its reactivity towards molecular ozone and hydroxyl radicals. *Wat. Res.* **33**:2265-2276.
- Westerhoff, P., P. Chao, and H. Mash. 2004. Reactivity of natural organic matter with aqueous chlorine and bromine. *Wat. Res.* **38**:1502-1513.
- White, D.R., and M.W. LeChevallier. 1993. AOC associated with oils for lubricating well pumps. *J. AWWA.* **85**(8):112-114.
- Widrig, D.L., K.A. Gray, and K.S. McAuliffe. 1996. Removal of algal-derived organic material by preozonation and coagulation: monitoring changes in organic quality by pyrolysis-GC-MS. *Wat. Res.* **3**(11):2621-2632.
- Wierenga, J.T. 1985. Recovery of coliforms in the presence of a free chlorine residual. *Jour. AWWA.* **77**:83-88.
- Williams, M.M., J.W.S Domingo, M.C. Meckes, C.A. Kelty, and H.S. Rochon. 2004. Phylogenetic diversity of drinking water bacteria in a distribution system simulator. *Journal of Applied Microbiology.* **96**:954-964.
- Woese, C.R., W.G. Weisburg, C.M. Hahn, B.J. Paster, L.B. Zablen, B.J. Lewis, T.J. Macke, W. Ludwig, and E. Stackebrandt. 1985. The phylogeny of purplebacteria : the gamma subdivision. *System. Appl. Microbiol.* **6**:25-33.
- Woese, C.R. 1987. Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* **51**(2):221-271.
- Yavich, A.A., K.-H. Lee, K.-C. Chen, L. Pape, and S.J. Masten. 2004. Evaluation of biodegradability of NOM after ozonation. *Wat. Res.* **38**:2839-2846.
- Zaccone, R., E. Crisafi, and G. Caruso. 1995. Evaluation of fecal pollution in coastal Italian waters by immunofluorescence. *Aquat. Microb. Ecol.* **9**:79-85.
- Zacheus, O.M., E. Iivanainen, T.K. Nissinen, M.J. Lehtola, and P.J. Martikainen. 2000. Bacterial biofilm formation on polyvinyl chloride, polyethylene and stainless steel exposed to ozonated water. *Wat. Res.* **34**:63-70.
- Zacheus, O.M., M.J. Lehtola, L.K. Korhonen, and P.J. Martikainen. 2001. Soft deposits, the key site for microbial growth in drinking water distribution networks. *Wat. Res.* **35**:1757-1765.
- Zarda, B., D. Hahn, A. Chatzinotas, W. Schönhuber, A. Neef, R.I. Amann, and J. Zeyer. 1997. Analysis of bacterial community structure in bulk soil by *in situ* hybridization. *Arch. Microbiol.* **168** :185-192.
- Zavarzin, G.A., E. Stackebrandt, and R.G. Murray. 1991. A correlation of phylogenetic diversity in the *Proteobacteria* with the influences of ecological forces. *Can. J. Microbiol.* **37**:1-6.

Chapitre X – Annexes



X.1.	Chapitre IV.....	248
X.2.	Chapitre V	251
X.3.	Chapitre VI.....	260
X.4.	Chapitre VII.....	266

X.1. Chapitre IV

Ozonation des cellules algales

Tableau X.1. Caractéristiques physico-chimiques des MOA-O₃ obtenues

N° échantillon	[oxydant] appliqué (mg/L)	[oxydant] appliqué (μM)	Temps d'oxydation (min)	[oxydant] consommé (μM)	COD (mg C/L)	Sucres (mg C/L)	Protéines (mg éq BSA/L)	CODB (mg C/L)	AAT (mg C/L)
1NO	0,00	0,00	0	0,00	0,42	0,00	<LD*	nd	nd
2NO	0,00	0,00	0	0,00	0,91	0,00	<LD*	0,47	nd
3NO	0,00	0,00	0	0,00	0,59	0,00	<LD*	0,17	nd
4NO	0,00	0,00	0	0,00	0,77	0,00	<LD*	0,24	0,042
5NO	0,00	0,00	0	0,00	1,40	0,00	<LD*	0,66	0,084
1O	0,30	6,25	1	2,29	1,71	0,57	<LD*	0,75	0,104
2O	0,60	12,50	2	5,21	4,14	1,66	<LD*	2,88	0,207
3O	0,91	18,96	3	3,96	4,74	1,90	<LD*	3,39	nd
4O	1,51	31,46	5	8,96	4,94	1,92	<LD*	3,70	0,165
5O	1,88	39,17	5	34,17	6,58	6,48	<LD*	5,32	nd
6O	3,02	62,92	10	32,92	5,15	2,36	<LD*	3,65	nd
7O	5,25	109,38	15	18,75	7,69	3,59	<LD*	5,73	1,042
8O	5,25	109,38	15	24,38	7,67	4,15	<LD*	5,66	1,094
9O	5,25	109,38	15	34,79	7,60	4,09	<LD*	5,52	nd
10O	5,70	118,75	15	58,75	5,65	3,10	<LD*	4,03	nd
11O	9,00	187,50	15	80,00	9,90	3,64	<LD*	8,62	1,284
12O	9,00	187,50	15	80,42	8,64	3,14	<LD*	7,27	0,829
13O	11,33	236,04	30	80,00	9,17	3,91	<LD*	7,31	nd
14O	16,95	353,13	45	130,21	10,79	3,76	<LD*	8,44	1,078

*LD=0,3 mg éq BSA/L

nd = non déterminé

Tableau X.1 (suite).

N° échantillon	FLUO424	FLUO470	pH	conductivité (μS/cm)	UV254	UV270	SUVA254 (L/mg.cm)
1NO	1,3700	0,0000	6,75	59,10	0,0486	0,0091	0,1157
2NO	0,0000	1,1790	6,60	99,00	0,0675	0,0052	0,0742
3NO	1,2500	1,7670	6,90	105,00	0,0696	0,0049	0,1180
4NO	1,6200	1,4370	7,60	122,30	0,0823	0,0109	0,1069
5NO	0,0000	1,5920	7,71	37,40	0,0059	0,0048	0,0042
1O	3,7000	1,8970	7,03	40,30	0,0399	0,0120	0,0233
2O	3,0800	3,1810	6,07	40,20	0,0794	0,0348	0,0192
3O	2,0700	3,1180	6,37	38,50	0,0797	0,0317	0,0168
4O	2,0500	3,4910	6,14	39,60	0,0826	0,0369	0,0167
5O	6,0300	7,5840	6,90	190,40	0,2191	0,0507	0,0333
6O	8,6900	10,3050	6,08	38,80	0,0786	0,0427	0,0153
7O	3,8800	2,8360	5,59	66,40	0,1204	0,0717	0,0157
8O	4,8200	3,1300	5,54	67,50	0,1170	0,0691	0,0153
9O	4,2100	2,8610	5,45	66,90	0,1165	0,0695	0,0153
10O	4,3600	4,1530	7,30	127,70	0,1289	0,0524	0,0228
11O	3,7800	4,8370	6,30	101,00	0,1437	0,0802	0,0145
12O	3,1300	4,5490	6,04	102,00	0,1357	0,0718	0,0157
13O	3,8300	5,3460	6,70	126,40	0,1658	0,0845	0,0181
14O	5,4200	6,5250	6,40	125,80	0,1611	0,0832	0,0149

Tableau X.1 (suite).

N° échantillon	Asp (nM)	Glu (nM)	Ser (nM)	His (nM)	Arg (nM)	Gly (nM)	Thr (nM)	Ala (nM)	Tyr (nM)	Met (nM)	Val (nM)	Phe (nM)	Ile (nM)	Leu (nM)	Orn (nM)	Lys (nM)
1NO	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
2NO	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
3NO	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
4NO	56	57	66	11	38	87	35	61	17	4	31	29	16	35	185	33
5NO	97	70	91	26	90	191	63	147	67	<LD*	98	87	96	87	161	71
1O	175	212	138	50	77	208	74	143	73	35	112	79	91	132	123	88
2O	388	804	296	57	163	580	177	315	78	51	156	109	124	181	255	139
3O	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
4O	320	594	195	48	122	543	140	243	79	42	151	103	111	158	153	85
5O	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
6O	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
7O	6030	4060	785	75	1920	2280	444	822	50	98	272	94	295	318	1907	473
8O	6140	4030	891	116	2610	2660	559	884	78	136	327	170	268	268	1447	352
9O	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
10O	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
11O	10900	6610	632	69	1580	1380	338	620	84	125	272	162	213	346	621	307
12O	5118	4415	506	65	1350	1280	322	536	85	119	248	150	197	310	478	267
13O	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
14O	7690	5900	887	45	901	2245	447	1354	46	99	365	158	186	322	408	257

*LD $\approx$ 10 nM

nd = non déterminé

Chloration des cellules algales

Tableau X.2. Caractéristiques physico-chimiques des MOA-Cl₂ obtenues.

N° échantillon	[oxydant] appliqué (mg/L)	[oxydant] appliqué (μ M)	Temps d'oxydation (min)	[oxydant] consommé (μ M)	COD (mg C/L)	Sucres (mg C/L)	Protéines (mg éq BSA/L)	CODB (mg C/L)	AAT (mg C/L)
1NC	0,00	0,00	0	0,00	2,04	0,56	<LD*	1,00	0,074
2NC	0,00	0,00	0	0,00	1,14	1,23	<LD*	0,74	0,083
3NC	0,00	0,00	0	0,00	1,14	1,22	<LD*	nd	nd
1C	0,96	13,54	45	11,97	1,53	0,97	<LD*	0,67	0,064
2C	1,00	14,10	45	12,25	2,40	2,37	<LD*	1,77	nd
3C	1,00	14,10	45	9,30	2,11	0,87	<LD*	1,65	nd
4C	1,78	25,11	45	17,89	5,35	2,65	<LD*	3,55	0,159
5C	1,94	27,36	45	25,07	5,44	4,77	<LD*	2,37	0,143
6C	2,02	28,49	45	26,06	5,19	4,02	<LD*	2,94	0,194
7C	2,86	40,34	45	34,65	9,20	3,92	<LD*	4,18	nd
8C	2,93	41,33	45	40,00	8,76	7,70	<LD*	3,02	0,168
9C	3,00	42,31	45	39,72	13,08	8,48	<LD*	7,09	0,307
10C	4,96	69,96	45	65,49	13,17	10,28	<LD*	2,92	0,227
11C	5,20	73,34	45	70,00	13,63	9,52	<LD*	7,19	0,346
12C	5,36	75,60	45	62,68	9,94	4,98	<LD*	7,40	0,171
13C	7,76	109,45	45	69,58	14,96	5,40	<LD*	13,16	0,222
14C	7,80	110,01	45	82,96	19,76	9,89	<LD*	5,82	0,165
15C	7,96	112,27	45	81,55	14,18	10,05	<LD*	6,77	0,334

Tableau X.2 (suite).

N° échantillon	FLUO424	FLUO470	pH	conductivité (µS/cm)	UV254	UV270	SUVA254 (L/mg.cm)
1NC	2,6000	2,6520	5,23	37,50	0,0340	0,0074	0,0167
2NC	3,2700	2,6860	6,03	30,40	0,0310	0,0121	0,0272
3NC	0,3300	2,3580	6,03	30,40	0,0215	0,0037	0,0189
1C	0,2000	2,6750	5,74	38,20	0,0375	0,0104	0,0245
2C	0,0000	1,0010	6,07	32,70	0,0288	0,0102	0,0120
3C	1,2900	2,5610	6,21	34,20	0,0218	0,0039	0,0103
4C	1,1300	3,7470	6,15	38,55	0,0423	0,0154	0,0079
5C	0,0000	0,0000	6,03	37,70	0,0377	0,0155	0,0069
6C	2,0400	3,6200	5,79	43,00	0,0518	0,0207	0,0100
7C	1,5100	3,6560	6,19	41,65	0,0456	0,0174	0,0050
8C	3,5800	4,4590	6,09	46,20	0,0499	0,0200	0,0057
9C	2,2400	9,9290	6,22	45,60	0,1081	0,0490	0,0083
10C	13,9000	4,8180	6,22	48,00	0,0496	0,0209	0,0038
11C	0,0000	5,2290	6,30	53,50	0,1004	0,0557	0,0074
12C	1,5200	4,5670	6,48	52,60	0,0566	0,0258	0,0057
13C	2,0600	4,6730	6,67	64,30	0,0539	0,0264	0,0036
14C	22,4000	17,2810	6,37	51,00	0,0502	0,0262	0,0025
15C	5,9800	8,0590	6,42	69,40	0,0874	0,0465	0,0062

Tableau X.2 (suite).

N° échantillon	Asp (nM)	Glu (nM)	Ser (nM)	His (nM)	Arg (nM)	Gly (nM)	Thr (nM)	Ala (nM)	Tyr (nM)	Met (nM)	Val (nM)	Phe (nM)	Ile (nM)	Leu (nM)	Orn (nM)	Lys (nM)
1NC	158	180	174	36	50	113	72	177	41	13	58	50	43	47	65	86
2NC	172	182	203	<LD*	47	197	98	234	36	21	92	99	48	111	44	<LD*
3NC	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
1C	105	100	108	22	65	236	65	176	43	11	53	45	34	47	73	59
2C	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
3C	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
4C	249	373	335	59	112	510	156	360	78	32	144	98	103	140	227	101
5C	327	454	315	<LD*	89	355	151	305	45	44	151	182	88	156	23	<LD*
6C	342	730	354	35	95	805	188	658	54	32	141	81	76	153	148	133
7C	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
8C	411	117	643	34	69	892	140	725	36	20	129	101	93	108	142	139
9C	952	846	690	69	162	1004	466	791	66	25	272	228	152	287	35	152
10C	516	554	505	21	95	1025	304	805	56	11	198	134	96	191	143	163
11C	1213	943	728	65	173	1141	633	893	57	22	300	219	153	306	124	106
12C	289	373	324	56	115	589	209	366	72	20	186	126	119	174	163	117
13C	408	510	442	44	148	762	297	560	82	26	239	161	150	240	130	152
14C	301	356	315	30	63	1000	172	551	28	16	136	115	74	146	144	140
15C	1266	875	776	75	137	1010	446	892	68	41	306	293	143	313	107	<LD*

*LD ≈ 10 mM

nd = non déterminé

X.2. Chapitre V

X.2.1. Résultats présentés au § V.2

Tableau X.3. Evolution des paramètres physico-chimiques et microbiologiques dans les différents milieux testés (Eau de réseau stérile (ER) supplémentée ou non en MOD) inoculés avec *E. coli* (0*=T₀ avant injection d'*E. coli*, 0=T₀ après injection d'*E. coli*, - : non mesuré).**

	Paramètre mesuré	Temps d'incubation (j)						
		0*	0**	1	2	4	7	11
ER + <i>E. coli</i> (expérience A)	NH ₄ (mg/L)	0,03	-	-	-	-	-	-
	NO ₂ (mg/L)	<0,10	-	-	-	-	-	-
	NO ₃ (mg/L)	7,5	-	-	-	-	-	-
	P total (mg/L)	0,02	-	-	-	-	-	-
	COD (mg/L)	1,34 ± 0,04	1,21 ± 0,02	-	-	-	-	1,28 ± 0,05
	pH	8,23	8,29	-	-	7,50	-	7,48
	conductivité (µS/cm)	189	182	-	-	190	-	191
	FISH-ENT1 (cellules/mL)	-	6,64 10 ⁴ ± 2,27 10 ⁴	-	-	8,74 10 ⁴ -	-	8,19 10 ⁴ ± 2,19 10 ⁴
	Bactéries totales (cellules/mL)	-	1,39 10 ⁵ ± 1,27 10 ⁴	1,58 10 ⁵ ± 0	1,08 10 ⁵ ± 0	1,26 10 ⁵ ± 5,66 10 ³	1,19 10 ⁵ ± 7,78 10 ³	1,44 10 ⁵ ± 5,66 10 ³
	Bactéries avec membrane intègre (cellules/mL)	-	1,38 10 ⁵ ± 1,13 10 ⁴	1,55 10 ⁵ ± 0	9,76 10 ⁴ ± 1,84 10 ³	1,11 10 ⁵ ± 9,90 10 ³	1,06 10 ⁵ ± 8,70 10 ³	1,02 10 ⁵ ± 2,50 10 ⁴
	UFC TTC-Tergitol 7 (37°C, 24h) (UFC/mL)	-	6,75 10 ⁴ ± 7,07 10 ²	1,00 10 ⁴ ± 1,41 10 ³	1,32 10 ³ ± 1,20 10 ²	1,05 10 ² ± 9,19 10 ¹	1,00 10 ⁰ ± 0	1,00 10 ⁰ ± 0
	UFC PCA (22°C, 15j) (UFC/mL)	-	4,35 10 ⁴ ± 4,95 10 ³	-	-	-	-	0 ± 0
ER + <i>E. coli</i> (expérience B – flacon 1)	NH ₄ (mg/L)	<0,02	-	-	-	-	-	-
	NO ₂ (mg/L)	<0,01	-	-	-	-	-	-
	NO ₃ (mg/L)	4,5	-	-	-	-	-	-
	P total (mg/L)	0,09	-	-	-	-	-	-
	COD (mg/L)	1,41 ± 0,01	1,41 ± 0,04	-	-	-	-	1,25 ± 0,03
	pH	7,66	7,74	-	-	7,66	-	7,56
	conductivité (µS/cm)	352	346	-	-	356	-	361
	FISH-ENT1 (cellules/mL)	-	5,68 10 ⁴ ± 1,08 10 ⁴	-	-	9,40 10 ⁴ ± 5,37 10 ³	-	8,14 10 ⁴ ± 6,65 10 ³
	Bactéries totales (cellules/mL)	-	1,56 10 ⁵ ± 1,70 10 ⁴	1,46 10 ⁵	1,48 10 ⁵ ± 1,56 10 ⁴	8,72 10 ⁴ ± 4,45 10 ³	1,97 10 ⁵ ± 0	1,99 10 ⁵ ± 5,23 10 ⁴
	Bactéries avec membrane intègre (cellules/mL)	-	1,29 10 ⁵ ± 3,89 10 ⁴	4,86 10 ⁴	1,37 10 ⁵ ± 9,90 10 ³	4,92 10 ⁴ ± 1,36 10 ⁴	1,72 10 ⁵ ± 3,32 10 ⁴	1,95 10 ⁵ ± 2,12 10 ³
	UFC TTC-Tergitol 7 (37°C, 24h) (UFC/mL)	-	6,50 10 ⁴ ± 0	3,25 10 ⁴ ± 6,36 10 ³	6,65 10 ³ ± 9,19 10 ²	3,30 10 ³ ± 2,83 10 ²	1,65 10 ³ ± 4,95 10 ²	1,10 10 ³ ± 7,78 10 ¹
	UFC PCA (22°C, 15j) (UFC/mL)	-	4,80 10 ⁴ ± 9,90 10 ³	-	-	3,95 10 ³ ± 2,12 10 ²	-	9,00 10 ² -
ER + <i>E. coli</i> (expérience B – flacon 2)	NH ₄ (mg/L)	<0,05	-	-	-	-	-	-
	NO ₂ (mg/L)	0,01	-	-	-	-	-	-
	NO ₃ (mg/L)	4,2	-	-	-	-	-	-
	P total (mg/L)	0,09	-	-	-	-	-	-
	COD (mg/L)	1,76 ± 0,01	1,80 ± 0,01	-	-	-	-	1,67 ± 0,02
	pH	7,71	7,62	-	-	7,52	-	7,43
	conductivité (µS/cm)	289	274	-	-	283	-	298
	FISH-ENT1 (cellules/mL)	-	4,88 10 ⁴ ± 2,76 10 ³	-	-	6,78 10 ⁴ -	-	7,47 10 ⁴ ± 1,38 10 ⁴
	Bactéries totales (cellules/mL)	-	1,21 10 ⁵ ± 8,49 10 ³	1,26 10 ⁵	1,62 10 ⁵ ± 8,87 10 ⁴	1,13 10 ⁵ ± 1,13 10 ⁴	1,97 10 ⁵ ± 2,26 10 ⁴	1,86 10 ⁵ ± 7,78 10 ³
	Bactéries avec membrane intègre (cellules/mL)	-	8,08 10 ⁴ ± 1,05 10 ⁴	1,15 10 ⁵	1,43 10 ⁵ ± 7,28 10 ⁴	9,72 10 ⁴ ± 1,98 10 ³	1,47 10 ⁵ ± 6,36 10 ⁴	1,38 10 ⁵ ± 2,55 10 ⁴
	UFC TTC-Tergitol 7 (37°C, 24h) (UFC/mL)	-	3,95 10 ⁴ ± 4,95 10 ³	3,65 10 ⁴ ± 6,36 10 ³	1,05 10 ⁴ ± 6,36 10 ³	1,90 10 ³ ± 9,90 10 ²	5,50 10 ² ± 2,83 10 ¹	3,50 10 ² ± 5,66 10 ¹
	UFC PCA (22°C, 15j) (UFC/mL)	-	3,65 10 ⁴ ± 1,20 10 ⁴	-	-	4,40 10 ³ ± 2,83 10 ²	-	3,30 10 ² ± 2,83 10 ¹

Tableau X.3 (suite).

Paramètre mesuré		Temps d'incubation (j)						
		0*	0**	1	2	4	7	11
ER + Acétate + <i>E. coli</i> (expérience A)	NH ₄ (mg/L)	0,03	-	-	-	-	-	-
	NO ₂ (mg/L)	<0,10	-	-	-	-	-	-
	NO ₃ (mg/L)	5,3	-	-	-	-	-	-
	P total (mg/L)	0,02	-	-	-	-	-	-
	COD (mg/L)	1,45 ± 0,04	1,71 ± 0,08	-	-	-	-	1,84 ± 0,01
	pH	8,31	8,33	-	-	7,64	-	7,68
	conductivité (µS/cm)	179	178	-	-	178	-	178
	FISH-ENT1 (cellules/mL)	- -	6,52 10 ⁴ ± 1,06 10 ³	- -	- -	7,20 10 ⁴ -	- -	6,48 10 ⁴ ± 1,48 10 ³
	Bactéries totales (cellules/mL)	- -	1,15 10 ⁵ ± 1,41 10 ⁴	1,32 10 ⁵ ± 2,19 10 ⁴	1,42 10 ⁵ ± 2,12 10 ³	1,32 10 ⁵ ± 1,98 10 ⁴	1,19 10 ⁵ ± 4,95 10 ³	1,37 10 ⁵ ± 4,24 10 ⁴
	Bactéries avec membrane intégrée (cellules/mL)	- -	1,15 10 ⁵ ± 1,48 10 ⁴	1,27 10 ⁵ ± 2,19 10 ⁴	1,33 10 ⁵ ± 4,95 10 ³	1,27 10 ⁵ ± 2,19 10 ⁴	1,06 10 ⁵ ± 9,40 10 ³	1,60 10 ⁵ ± 1,27 10 ⁴
	UFC TTC-Tergitol 7 (37°C, 24h) (UFC/mL)	- -	6,25 10 ⁴ ± 9,19 10 ³	3,00 10 ³ ± 1,41 10 ³	1,84 10 ³ ± 3,68 10 ²	1,95 10 ² ± 1,06 10 ²	1,00 10 ⁰ -	1,00 10 ⁰ ± 0
	UFC PCA (22°C, 15j) (UFC/mL)	- -	5,60 10 ⁴ ± 5,66 10 ³	- -	- -	- -	- -	2,50 10 ⁰ ± 7,07 10 ⁻¹
ER + Acétate + <i>E. coli</i> (expérience B)	NH ₄ (mg/L)	<0,02	-	-	-	-	-	-
	NO ₂ (mg/L)	<0,01	-	-	-	-	-	-
	NO ₃ (mg/L)	4,4	-	-	-	-	-	-
	P total (mg/L)	0,09	-	-	-	-	-	-
	COD (mg/L)	1,58 ± 0,01	1,61 ± 0,03	-	-	-	-	1,33 ± 0,03
	pH	7,74	7,71	-	-	7,70	-	7,57
	conductivité (µS/cm)	344	337	-	-	347	-	352
	FISH-ENT1 (cellules/mL)	- -	5,49 10 ⁴ ± 5,59 10 ³	- -	- -	8,56 10 ⁴ ± 2,75 10 ⁴	- -	8,87 10 ⁴ ± 2,73 10 ⁴
	Bactéries totales (cellules/mL)	- -	1,66 10 ⁵ ± 2,83 10 ³	1,50 10 ⁵ -	1,65 10 ⁵ ± 2,83 10 ³	1,67 10 ⁵ ± 1,70 10 ⁴	2,04 10 ⁵ ± 7,07 10 ³	2,38 10 ⁵ ± 1,20 10 ⁴
	Bactéries avec membrane intégrée (cellules/mL)	- -	1,41 10 ⁵ ± 1,98 10 ⁴	4,21 10 ⁴ -	1,56 10 ⁵ ± 5,66 10 ³	1,18 10 ⁵ ± 2,47 10 ⁴	1,59 10 ⁵ ± 6,86 10 ⁴	1,89 10 ⁵ ± 1,09 10 ⁵
	UFC TTC-Tergitol 7 (37°C, 24h) (UFC/mL)	- -	5,30 10 ⁴ ± 2,83 10 ³	3,15 10 ⁴ ± 7,78 10 ³	9,45 10 ³ ± 1,48 10 ³	4,75 10 ³ ± 1,63 10 ³	2,15 10 ³ ± 6,36 10 ²	1,18 10 ³ ± 7,78 10 ¹
	UFC PCA (22°C, 15j) (UFC/mL)	- -	4,55 10 ⁴ ± 9,19 10 ³	- -	- -	4,20 10 ³ ± 5,66 10 ²	- -	1,60 10 ³ -
ER + MOA-Cl ₂ + <i>E. coli</i> (expérience A-flacon 1)	NH ₄ (mg/L)	0,04	-	-	-	-	-	-
	NO ₂ (mg/L)	<0,10	-	-	-	-	-	-
	NO ₃ (mg/L)	5,8	-	-	-	-	-	-
	P total (mg/L)	0,02	-	-	-	-	-	-
	COD (mg/L)	1,61 ± 0,06	1,29 ± 0,08	-	-	-	-	1,26 ± 0,01
	pH	8,34	8,29	-	-	7,77	-	7,75
	conductivité (µS/cm)	184	181	-	-	184	-	185
	FISH-ENT1 (cellules/mL)	- -	6,23 10 ⁴ ± 8,49 10 ²	- -	- -	9,23 10 ⁴ -	- -	6,65 10 ⁴ ± 6,36 10 ²
	Bactéries totales (cellules/mL)	- -	1,22 10 ⁵ ± 7,78 10 ³	1,23 10 ⁵ ± 2,90 10 ⁴	1,22 10 ⁵ ± 1,56 10 ⁴	1,38 10 ⁵ ± 7,07 10 ³	1,29 10 ⁵ ± 0	1,80 10 ⁵ ± 9,19 10 ³
	Bactéries avec membrane intégrée (cellules/mL)	- -	1,22 10 ⁵ ± 7,78 10 ³	1,19 10 ⁵ ± 3,23 10 ⁴	1,09 10 ⁵ ± 1,68 10 ⁴	1,25 10 ⁵ ± 1,06 10 ⁴	1,12 10 ⁵ ± 7,07 10 ²	1,64 10 ⁵ ± 1,41 10 ⁴
	UFC TTC-Tergitol 7 (37°C, 24h) (UFC/mL)	- -	7,45 10 ⁴ ± 3,54 10 ³	2,50 10 ² ± 7,07 10 ¹	8,50 10 ⁰ ± 3,54 10 ⁰	3,00 10 ⁰ ± 0	1,85 10 ¹ ± 2,12 10 ⁰	1,64 10 ² ± 6,36 10 ⁰
	UFC PCA (22°C, 15j) (UFC/mL)	- -	5,30 10 ⁴ ± 4,24 10 ³	- -	- -	- -	- -	1,25 10 ² ± 2,83 10 ⁰

Tableau X.3 (suite).

		Paramètre mesuré	Temps d'incubation (j)					
			0*	0**	1	2	4	7
ER + MOA-Cl ₂ + <i>E. coli</i> (expérience A-flacon 2)	NH ₄ (mg/L)	0,03	-	-	-	-	-	-
	NO ₂ (mg/L)	<0,10	-	-	-	-	-	-
	NO ₃ (mg/L)	5,5	-	-	-	-	-	-
	P total (mg/L)	0,02	-	-	-	-	-	-
	COD (mg/L)	1,52 ± 0	1,55 ± 0,03	-	-	-	-	1,49 ± 0,02
	pH	8,34	8,32	-	-	7,67	-	7,70
	conductivité (µS/cm)	185	181	-	-	184	-	185
	FISH-ENT1 (cellules/mL)	-	7,36 10 ⁴	-	-	8,38 10 ⁴	-	7,91 10 ⁴
		-	± 1,16 10 ⁴	-	-	-	-	± 2,62 10 ⁴
	Bactéries totales (cellules/mL)	-	1,19 10 ⁵	1,34 10 ⁵	1,26 10 ⁵	1,19 10 ⁵	1,30 10 ⁵	1,53 10 ⁵
		-	± 1,56 10 ⁴	± 1,56 10 ⁴	± 1,20 10 ⁴	± 4,95 10 ³	± 7,78 10 ³	± 5,66 10 ³
	Bactéries avec membrane intégrè (cellules/mL)	-	1,19 10 ⁵	1,32 10 ⁵	1,17 10 ⁵	1,07 10 ⁵	1,20 10 ⁵	1,32 10 ⁵
	-	± 1,48 10 ⁴	± 1,48 10 ⁴	± 1,91 10 ⁴	± 7,07 10 ³	± 3,54 10 ³	± 0	
UFC TTC-Tergitol 7 (37°C, 24h) (UFC/mL)	-	5,85 10 ⁴	1,50 10 ²	2,00 10 ⁰	1,05 10 ¹	2,75 10 ¹	1,35 10 ²	
	-	± 4,95 10 ³	± 7,07 10 ¹	± 1,41 10 ⁰	± 7,07 10 ⁻¹	± 3,54 10 ⁰	± 1,13 10 ¹	
UFC PCA (22°C, 15j) (UFC/mL)	-	6,00 10 ⁴	-	-	-	-	1,04 10 ²	
	-	± 1,41 10 ⁴	-	-	-	-	± 4,88 10 ¹	
ER + MOA-O ₃ + <i>E. coli</i> (expérience B-flacon 1)	NH ₄ (mg/L)	0,96	-	-	-	-	-	-
	NO ₂ (mg/L)	0,01	-	-	-	-	-	-
	NO ₃ (mg/L)	4,1	-	-	-	-	-	-
	P total (mg/L)	0,09	-	-	-	-	-	-
	COD (mg/L)	1,80 ± 0,02	1,85 ± 0,02	-	-	-	-	1,55 ± 0,30
	pH	7,69	7,63	-	-	7,55	-	7,48
	conductivité (µS/cm)	263	255	-	-	276	-	273
	FISH-ENT1 (cellules/mL)	-	5,48 10 ⁴	-	-	7,84 10 ⁴	-	2,73 10 ⁵
		-	± 2,90 10 ³	-	-	-	-	± 5,87 10 ⁴
	Bactéries totales (cellules/mL)	-	1,17 10 ⁵	1,28 10 ⁵	1,14 10 ⁵	1,75 10 ⁵	3,71 10 ⁵	2,97 10 ⁵
		-	± 7,07 10 ³		± 4,24 10 ³	± 3,11 10 ⁴	± 1,98 10 ⁴	± 6,08 10 ⁴
	Bactéries avec membrane intégrè (cellules/mL)	-	5,90 10 ⁴	1,22 10 ⁵	9,77 10 ⁴	1,49 10 ⁵	9,05 10 ⁴	1,51 10 ⁵
	-	± 2,33 10 ⁴		± 6,08 10 ³	± 2,55 10 ⁴	± 2,20 10 ⁴	± 1,41 10 ³	
UFC TTC-Tergitol 7 (37°C, 24h) (UFC/mL)	-	3,60 10 ⁴	1,95 10 ⁴	1,80 10 ⁴	3,30 10 ⁴	1,35 10 ⁵	8,45 10 ⁴	
	-	± 7,07 10 ³	± 7,07 10 ²	± 2,83 10 ³	± 2,83 10 ³	± 1,48 10 ⁴	± 1,63 10 ⁴	
UFC PCA (22°C, 15j) (UFC/mL)	-	3,20 10 ⁴	-	-	4,10 10 ⁴	-	1,00 10 ⁵	
	-	± 7,07 10 ³	-	-	± 5,66 10 ³	-	± 0	
ER + MOA-O ₃ + <i>E. coli</i> (expérience B-flacon 2)	NH ₄ (mg/L)	0,06	-	-	-	-	-	-
	NO ₂ (mg/L)	0,01	-	-	-	-	-	-
	NO ₃ (mg/L)	4,3	-	-	-	-	-	-
	P total (mg/L)	0,14	-	-	-	-	-	-
	COD (mg/L)	1,93 ± 0,02	1,90 ± 0,01	-	-	-	-	1,52 ± 0,01
	pH	7,65	7,66	-	-	7,62	-	7,54
	conductivité (µS/cm)	267	259	-	-	270	-	268
	FISH-ENT1 (cellules/mL)	-	6,65 10 ⁴	-	-	5,84 10 ⁵	-	5,18 10 ⁵
		-	± 9,76 10 ³	-	-	-	-	± 7,78 10 ³
	Bactéries totales (cellules/mL)	-	1,02 10 ⁵	1,31 10 ⁵	1,57 10 ⁵	1,12 10 ⁶	1,15 10 ⁶	1,45 10 ⁶
		-	± 0	-	± 6,01 10 ⁴	± 6,36 10 ⁴	± 6,36 10 ⁴	± 2,05 10 ⁵
	Bactéries avec membrane intégrè (cellules/mL)	-	5,66 10 ⁴	1,19 10 ⁵	1,13 10 ⁵	1,06 10 ⁶	6,95 10 ⁵	1,37 10 ⁶
	-	± 2,47 10 ⁴	-	± 4,45 10 ⁴	± 8,77 10 ⁴	± 6,58 10 ⁴	± 1,70 10 ⁵	
UFC TTC-Tergitol 7 (37°C, 24h) (UFC/mL)	-	5,30 10 ⁴	4,05 10 ⁴	6,40 10 ⁴	6,40 10 ⁵	1,65 10 ⁵	1,90 10 ⁵	
	-	± 5,66 10 ³	± 7,78 10 ³	± 2,83 10 ³	± 5,94 10 ⁵	± 3,54 10 ⁴	± 0	
UFC PCA (22°C, 15j) (UFC/mL)	-	3,30 10 ⁴	-	-	7,90 10 ⁵	-	2,30 10 ⁵	
	-	± 5,66 10 ³	-	-	± 1,70 10 ⁵	-	± 5,66 10 ⁴	

Tableau X.3 (suite).

Paramètre mesuré	Temps d'incubation (j)							
	0*	0**	1	2	4	7	11	
ER + MOA-O ₃ + <i>E. coli</i> (expérience B-flacon 3)	NH ₄ (mg/L)	<0,05	-	-	-	-	-	
	NO ₂ (mg/L)	0,01	-	-	-	-	-	
	NO ₃ (mg/L)	4,1	-	-	-	-	-	
	P total (mg/L)	0,184	-	-	-	-	-	
	COD (mg/L)	2,15 ± 0,05	2,04 ± 0,01	-	-	-	1,64 ± 0,01	
	pH	7,73	7,64	-	-	7,50	-	7,39
	conductivité (µS/cm)	262	260	-	-	266	-	269
	FISH-ENT1	-	4,41 10 ⁴	-	-	6,90 10 ⁵	-	8,05 10 ⁵
	(cellules/mL)	-	± 1,41 10 ⁴	-	-	-	-	± 1,46 10 ⁵
	Bactéries totales	-	1,09 10 ⁵	1,39 10 ⁵	1,94 10 ⁵	1,08 10 ⁶	2,19 10 ⁶	2,84 10 ⁶
	(cellules/mL)	-	± 7,07 10 ²	-	± 3,82 10 ⁴	± 4,95 10 ⁴	± 3,25 10 ⁵	± 1,10 10 ⁶
	Bactéries avec membrane intègre	-	6,24 10 ⁴	1,20 10 ⁵	1,13 10 ⁵	9,90 10 ⁵	9,29 10 ⁵	2,68 10 ⁶
	(cellules/mL)	-	± 1,63 10 ⁴	-	± 1,41 10 ³	± 4,24 10 ⁴	± 1,56 10 ⁴	± 1,04 10 ⁶
	UFC TTC-Tergitol 7 (37°C, 24h)	-	4,75 10 ⁴	4,85 10 ⁴	1,17 10 ⁵	9,83 10 ⁵	1,40 10 ⁵	2,45 10 ⁵
	(UFC/mL)	-	± 7,07 10 ²	± 9,19 10 ³	± 9,90 10 ³	± 1,84 10 ⁴	-	± 7,07 10 ³
	UFC PCA (22°C, 15j)	-	4,70 10 ⁴	-	-	1,76 10 ⁶	-	2,10 10 ⁵
	(UFC/mL)	-	± 7,07 10 ³	-	-	± 3,68 10 ⁵	-	± 2,83 10 ⁴

X.2.2. Résultats présentés au § V.4

Tableau X.4. Evolution des paramètres physico-chimiques et microbiologiques dans les différents milieux testés (Eau de réseau stérile (ER) supplémentée ou non en MOD) inoculés avec *E. coli* (0*=T₀ avant injection d'*E. coli*, 0**=T₀ après injection d'*E. coli*, - : non mesuré).

Paramètre mesuré		Temps d'incubation (j)						
		0*	0**	1	2	4	7	11
ER + <i>E. coli</i> (essai 1 –flacon 1)	NH ₄ (mg/L)	0,1	-	-	-	-	-	-
	NO ₂ (mg/L)	<0,02	-	-	-	-	-	-
	NO ₃ (mg/L)	1	-	-	-	-	-	-
	P total (mg/L)	0,14	-	-	-	-	-	-
	COD (mg/L)	1,72	1,75	-	-	-	-	1,69
	pH	7,94	7,97	7,40	-	7,78	-	7,61
	conductivité (µS/cm)	509	504	-	-	-	-	506
	FISH-ENT1	-	1,91E+05	-	-	2,31E+05	-	1,17E+05
	(cellules/mL)	-	± 4,45E+04	-	-	± 1,49E+05	-	± 1,63E+04
	Bactéries totales	-	2,22E+05	2,41E+05	2,46E+05	2,74E+05	1,84E+05	1,95E+05
	(cellules/mL)	-	± 8,27E+04	± 9,19E+03	± 1,34E+04	± 3,04E+04	± 4,53E+04	± 7,78E+03
	Bactéries avec membrane intègre	-	1,89E+05	2,04E+05	2,18E+05	2,02E+05	1,56E+05	1,80E+05
	(cellules/mL)	-	± 4,81E+04	± 1,27E+04	± 2,47E+04	± 4,53E+04	± 3,96E+04	± 5,37E+04
	UFC TTC-Tergitol 7 (37°C, 24h)	-	6,20E+04	6,85E+04	1,22E+05	5,35E+04	2,70E+04	2,60E+04
	(UFC/mL)	-	± 5,66E+03	± 1,34E+04	± 2,83E+03	± 3,54E+03	± 5,66E+03	± 1,41E+03
UFC PCA (22°C, 15j)	-	6,25E+04	-	-	7,05E+04	-	1,70E+04	
(UFC/mL)	-	± 3,54E+03	-	-	± 1,34E+04	-	-	

Tableau X.4 (suite).

	Paramètre mesuré	Temps d'incubation (j)						
		0*	0**	1	2	4	7	11
ER + <i>E. coli</i> (essai 1-flacon 2)	NH ₄ (mg/L)	<0,1	-	-	-	-	-	-
	NO ₂ (mg/L)	<0,02	-	-	-	-	-	-
	NO ₃ (mg/L)	0,6	-	-	-	-	-	-
	P total (mg/L)	0,12	-	-	-	-	-	-
	COD (mg/L)	1,67	1,68	-	-	-	-	1,69
	pH	7,92	7,98	-	-	7,90	-	7,60
	conductivité (µS/cm)	516	521	-	-	-	-	510
	FISH-ENT1 (cellules/mL)	-	1,69E+05 ± 1,41E+04	-	-	2,89E+05 ± 2,56E+05	-	1,54E+05 ± 5,94E+04
	Bactéries totales (cellules/mL)	-	2,00E+05 ± 3,25E+04	2,80E+05 ± 9,90E+03	2,48E+05 ± 7,07E+02	3,17E+05 ± 5,30E+04	2,37E+05 ± 6,58E+04	2,74E+05 ± 7,07E+03
	Bactéries avec membrane intégrée (cellules/mL)	-	1,91E+05 ± 2,26E+04	2,52E+05 ± 8,49E+03	2,29E+05 ± 2,40E+04	2,53E+05 ± 6,29E+04	2,07E+05 ± 6,43E+04	2,37E+05 ± 7,78E+03
	UFC TTC-Tergitol 7 (37°C, 24h) (UFC/mL)	-	6,75E+04 ± 1,91E+04	6,25E+04 ± 2,12E+03	8,45E+04 ± 7,07E+02	4,25E+04 ± 2,12E+03	2,15E+04 ± 2,12E+03	1,35E+04 ± 7,07E+02
	UFC PCA (22°C, 15j) (UFC/mL)	-	6,20E+04 ± 1,70E+04	-	-	5,75E+04 ± 1,77E+04	-	1,20E+04 -
ER + <i>E. coli</i> (essai 2)	NH ₄ (mg/L)	<0,1	-	-	-	-	-	-
	NO ₂ (mg/L)	<0,01	-	-	-	-	-	-
	NO ₃ (mg/L)	5,6	-	-	-	-	-	-
	P total (mg/L)	0,18	-	-	-	-	-	-
	COD (mg/L)	1,56	1,55	-	-	-	-	1,63
	pH	7,48	7,46	-	-	7,43	-	7,48
	conductivité (µS/cm)	294	291	-	-	293	-	292
	FISH-ENT1 (cellules/mL)	-	1,13E+05 ± 9,19E+03	-	-	1,19E+05 -	-	1,07E+05 ± 4,24E+03
	Bactéries totales (cellules/mL)	-	1,47E+05 ± 1,34E+04	1,36E+05 ± 1,84E+04	1,38E+05 ± 4,24E+03	1,45E+05 ± 2,40E+04	1,15E+05 ± 2,45E+04	1,50E+05 ± 6,36E+03
	Bactéries avec membrane intégrée (cellules/mL)	-	1,42E+05 ± 1,41E+04	1,26E+05 ± 1,70E+04	1,28E+05 ± 1,34E+04	1,21E+05 ± 2,19E+04	8,79E+04 ± 1,72E+04	1,11E+05 ± 4,24E+03
	UFC TTC-Tergitol 7 (37°C, 24h) (UFC/mL)	-	1,27E+05 ± 1,13E+04	9,55E+04 ± 1,34E+04	9,85E+04 ± 7,78E+03	5,05E+04 ± 4,95E+03	2,25E+04 ± 7,78E+03	1,59E+04 ± 2,12E+02
	UFC PCA (22°C, 15j) (UFC/mL)	-	9,00E+04 -	-	-	4,60E+04 -	-	2,05E+04 -
ER + <i>E. coli</i> (essai 3)	NH ₄ (mg/L)	<0,05	-	-	-	-	-	-
	NO ₂ (mg/L)	<0,01	-	-	-	-	-	-
	NO ₃ (mg/L)	12,2	-	-	-	-	-	-
	P total (mg/L)	0,14	-	-	-	-	-	-
	COD (mg/L)	1,70	1,69	-	-	-	-	1,805
	pH	7,42	7,40	-	-	7,44	-	-
	conductivité (µS/cm)	300	302	-	-	301	-	-
	FISH-ENT1 (cellules/mL)	-	1,89E+05 ± 1,70E+04	-	1,66E+05 ± 1,06E+04	1,87E+05 ± 1,63E+04	2,23E+05 ± 1,48E+04	2,49E+05 ± 2,83E+03
	Bactéries totales (cellules/mL)	-	2,13E+05 ± 1,06E+04	2,06E+05 ± 9,19E+03	1,90E+05 ± 1,41E+04	2,37E+05 ± 7,07E+03	2,60E+05 ± 1,41E+04	2,92E+05 ± 1,41E+04
	Bactéries avec membrane intégrée (cellules/mL)	-	1,41E+05 ± 1,84E+04	1,90E+05 ± 1,41E+03	1,68E+05 ± 1,41E+04	1,71E+05 ± 4,24E+03	1,95E+05 ± 1,56E+04	1,70E+05 ± 1,27E+04
	UFC TTC-Tergitol 7 (37°C, 24h) (UFC/mL)	-	1,90E+05 ± 4,24E+04	2,35E+05 ± 2,12E+04	1,75E+05 ± 2,12E+04	1,27E+05 ± 9,90E+03	1,21E+05 ± 4,24E+03	9,50E+04 ± 2,12E+04
	UFC PCA (22°C, 15j) (UFC/mL)	-	2,15E+05 ± 1,06E+05	2,50E+05 ± 7,07E+04	2,10E+05 ± 4,24E+04	2,45E+05 ± 4,95E+04	1,95E+05 ± 7,07E+03	1,60E+05 ± 2,83E+04

Tableau X.4 (suite).

	Paramètre mesuré	Temps d'incubation (j)						
		0*	0**	1	2	4	7	11
ER + MOA-NS + <i>E. coli</i> (essai 1-flacon 1)	NH ₄ (mg/L)	<0,1	-	-	-	-	-	-
	NO ₂ (mg/L)	<0,02	-	-	-	-	-	-
	NO ₃ (mg/L)	0,6	-	-	-	-	-	-
	P total (mg/L)	0,12	-	-	-	-	-	-
	COD (mg/L)	1,95	1,94	-	-	-	-	1,95
	pH	7,92	7,98	-	-	7,87	-	7,55
	conductivité (μS/cm)	520	517	-	-	-	-	508
	FISH-ENT1 (cellules/mL)	- -	1,28E+05 ± 8,49E+03	- -	- -	4,62E+05 ± 1,54E+05	- -	8,17E+05 ± 3,02E+05
	Bactéries totales (cellules/mL)	- -	1,96E+05 ± 1,20E+04	2,99E+05 ± 1,27E+04	2,60E+05 ± 2,97E+04	4,79E+05 ± 1,33E+05	4,55E+05 ± 6,08E+04	9,21E+05 ± 9,83E+04
	Bactéries avec membrane intégre (cellules/mL)	- -	1,86E+05 ± 2,26E+04	2,66E+05 ± 1,91E+04	2,24E+05 ± 1,48E+04	3,98E+05 ± 1,16E+05	4,31E+05 ± 7,00E+04	8,80E+05 ± 1,62E+05
	UFC TTC-Tergitol 7 (37°C, 24h) (UFC/mL)	- -	5,35E+04 ± 6,36E+03	7,00E+04 ± 1,13E+04	1,00E+05 ± 9,90E+03	8,25E+04 ± 3,54E+03	4,85E+04 ± 9,19E+03	4,40E+04 ± 4,24E+03
	UFC PCA (22°C, 15j) (UFC/mL)	- -	7,00E+04 ± 2,83E+04	- -	- -	6,65E+04 ± 9,19E+03	- -	6,20E+04 -
ER + MOA-NS + <i>E. coli</i> (essai 1-flacon 2)	NH ₄ (mg/L)	<0,1	-	-	-	-	-	-
	NO ₂ (mg/L)	<0,02	-	-	-	-	-	-
	NO ₃ (mg/L)	0,6	-	-	-	-	-	-
	P total (mg/L)	0,12	-	-	-	-	-	-
	COD (mg/L)	1,85	1,87	-	-	-	-	1,90
	pH	7,94	7,96	-	-	7,85	-	7,54
	conductivité (μS/cm)	517	517	-	-	-	-	509
	FISH-ENT1 (cellules/mL)	- -	1,38E+05 ± 6,87E+04	- -	- -	4,64E+05 -	- -	4,77E+05 ± 1,70E+05
	Bactéries totales (cellules/mL)	- -	2,15E+05 ± 1,06E+04	2,69E+05 ± 2,33E+04	2,97E+05 ± 5,09E+04	5,21E+05 ± 2,05E+04	4,64E+05 ± 6,65E+04	6,08E+05 ± 3,04E+04
	Bactéries avec membrane intégre (cellules/mL)	- -	2,04E+05 ± 2,40E+04	2,34E+05 ± 1,56E+04	2,80E+05 ± 7,00E+04	4,36E+05 ± 6,22E+04	4,33E+05 ± 9,19E+04	5,80E+05 ± 2,33E+04
	UFC TTC-Tergitol 7 (37°C, 24h) (UFC/mL)	- -	6,20E+04 ± 4,24E+03	7,40E+04 ± 0	1,74E+05 ± 9,90E+03	6,05E+04 ± 3,54E+03	6,05E+04 ± 6,36E+03	5,35E+04 ± 2,12E+03
	UFC PCA (22°C, 15j) (UFC/mL)	- -	4,90E+04 ± 1,41E+03	- -	- -	5,90E+04 -	- -	2,10E+04 -
ER + MOA-NS + <i>E. coli</i> (essai 2)	NH ₄ (mg/L)	<0,1	-	-	-	-	-	-
	NO ₂ (mg/L)	<0,01	-	-	-	-	-	-
	NO ₃ (mg/L)	5,4	-	-	-	-	-	-
	P total (mg/L)	0,18	-	-	-	-	-	-
	COD (mg/L)	1,79	1,79	-	-	-	-	1,89
	pH	7,37	7,46	-	-	7,40	-	7,46
	conductivité (μS/cm)	322	308	-	-	313	-	312
	FISH-ENT1 (cellules/mL)	- -	1,55E+05 ± 2,69E+04	- -	- -	7,98E+04 -	- -	2,65E+05 ± 4,38E+04
	Bactéries totales (cellules/mL)	- -	1,36E+05 ± 1,20E+04	1,45E+05 ± 3,96E+04	1,28E+05 ± 1,48E+04	1,44E+05 ± 1,13E+04	1,46E+05 ± 2,90E+04	3,91E+05 ± 4,24E+04
	Bactéries avec membrane intégre (cellules/mL)	- -	1,29E+05 ± 1,20E+04	1,23E+05 ± 2,97E+04	1,17E+05 ± 1,27E+04	1,17E+05 ± 7,07E+03	1,12E+05 ± 1,95E+04	3,62E+05 ± 5,89E+04
	UFC TTC-Tergitol 7 (37°C, 24h) (UFC/mL)	- -	1,16E+05 ± 9,19E+03	1,02E+05 ± 1,27E+04	8,50E+04 ± 8,49E+03	1,08E+05 ± 2,90E+04	6,80E+04 ± 9,90E+03	5,75E+04 ± 2,12E+03
	UFC PCA (22°C, 15j) (UFC/mL)	- -	1,08E+05 -	- -	- -	8,70E+04 -	- -	5,60E+04 -

Tableau X.4 (suite).

	Paramètre mesuré	Temps d'incubation (j)						
		0*	0**	1	2	4	7	11
ER + MOA-NS + <i>E. coli</i> (essai 3)	NH ₄ (mg/L)	0,08	-	-	-	-	-	-
	NO ₂ (mg/L)	<0,01	-	-	-	-	-	-
	NO ₃ (mg/L)	12,2	-	-	-	-	-	-
	P total (mg/L)	0,14	-	-	-	-	-	-
	COD (mg/L)	1,87	1,87	-	-	-	-	1,943
	pH	7,42	7,40	-	-	7,46	-	-
	conductivité (μS/cm)	286	283	-	-	293	-	-
	FISH-ENT1 (cellules/mL)	-	2,63E+05 ± 7,07E+03	-	2,06E+05 ± 1,41E+04	2,84E+05 ± 7,07E+03	3,06E+05 ± 1,41E+04	4,20E+05 ± 2,83E+03
	Bactéries totales (cellules/mL)	-	2,64E+05 ± 2,83E+04	2,65E+05 ± 4,24E+03	2,43E+05 ± 2,12E+04	3,81E+05 ± 1,56E+04	3,84E+05 ± 5,66E+03	5,03E+05 ± 4,24E+04
	Bactéries avec membrane intégrée (cellules/mL)	-	2,19E+05 ± 2,83E+04	2,37E+05 ± 8,49E+03	1,95E+05 ± 6,36E+03	2,35E+05 ± 1,70E+04	2,30E+05 ± 2,83E+03	2,19E+05 ± 1,41E+03
	UFC TTC-Tergitol 7 (37°C, 24h) (UFC/mL)	-	2,10E+05 ± 5,66E+04	2,25E+05 ± 7,07E+03	1,55E+05 ± 2,12E+04	1,14E+05 ± 5,66E+03	1,27E+05 ± 1,77E+04	1,60E+05 ± 2,83E+04
	UFC PCA (22°C, 15j) (UFC/mL)	-	3,00E+05 ± 1,41E+04	2,80E+05 0	2,70E+05 ± 4,24E+04	2,25E+05 ± 7,07E+03	1,80E+05 ± 2,83E+04	2,65E+05 ± 6,36E+04
ER + MOA-NS-Cl ₂ + <i>E. coli</i> (essai 1-flacon 1)	NH ₄ (mg/L)	<0,1	-	-	-	-	-	-
	NO ₂ (mg/L)	<0,02	-	-	-	-	-	-
	NO ₃ (mg/L)	0,6	-	-	-	-	-	-
	P total (mg/L)	0,32	-	-	-	-	-	-
	COD (mg/L)	1,90	1,91	-	-	-	-	1,92
	pH	7,94	7,97	-	-	7,90	-	7,60
	conductivité (μS/cm)	516	517	-	-	-	-	511
	FISH-ENT1 (cellules/mL)	-	1,02E+05 ± 4,31E+03	-	-	4,18E+05 -	-	4,09E+05 ± 2,51E+05
	Bactéries totales (cellules/mL)	-	2,20E+05 ± 4,60E+04	2,83E+05 ± 1,34E+04	2,35E+05 ± 3,25E+04	4,91E+05 ± 3,61E+04	4,27E+05 ± 4,17E+04	5,41E+05 ± 2,99E+05
	Bactéries avec membrane intégrée (cellules/mL)	-	2,05E+05 ± 2,62E+04	2,65E+05 ± 1,56E+04	2,18E+05 ± 1,84E+04	4,55E+05 ± 4,17E+04	4,06E+05 ± 8,84E+04	5,15E+05 ± 3,25E+05
	UFC TTC-Tergitol 7 (37°C, 24h) (UFC/mL)	-	6,55E+04 ± 7,78E+03	1,05E+04 ± 2,12E+03	1,60E+04 ± 4,24E+03	3,30E+04 ± 4,24E+03	5,05E+04 ± 1,63E+04	6,45E+04 ± 7,78E+03
	UFC PCA (22°C, 15j) (UFC/mL)	-	7,55E+04 ± 6,36E+03	-	-	4,00E+04 -	-	8,10E+04 -
ER + MOA-NS-Cl ₂ + <i>E. coli</i> (essai 1-flacon 2)	NH ₄ (mg/L)	<0,1	-	-	-	-	-	-
	NO ₂ (mg/L)	<0,02	-	-	-	-	-	-
	NO ₃ (mg/L)	0,7	-	-	-	-	-	-
	P total (mg/L)	0,23	-	-	-	-	-	-
	COD (mg/L)	1,93	1,92	-	-	-	-	1,75
	pH	7,94	7,67	-	-	7,91	-	7,64
	conductivité (μS/cm)	512	518	-	-	-	-	515
	FISH-ENT1 (cellules/mL)	-	1,23E+05 ± 2,76E+04	-	-	4,27E+05 -	-	5,46E+05 ± 3,70E+05
	Bactéries totales (cellules/mL)	-	1,56E+05 ± 7,78E+03	2,60E+05 ± 1,84E+04	2,40E+05 ± 1,06E+04	5,35E+05 ± 5,94E+04	4,71E+05 ± 8,70E+04	9,14E+05 ± 1,13E+04
	Bactéries avec membrane intégrée (cellules/mL)	-	1,41E+05 ± 2,05E+04	2,45E+05 ± 5,66E+03	2,28E+05 ± 2,19E+04	4,31E+05 ± 1,70E+04	4,41E+05 ± 9,19E+04	8,21E+05 ± 2,12E+03
	UFC TTC-Tergitol 7 (37°C, 24h) (UFC/mL)	-	5,60E+04 ± 5,66E+03	1,20E+04 ± 4,24E+03	2,00E+04 ± 5,66E+03	3,45E+04 ± 1,06E+04	4,90E+04 ± 1,13E+04	6,20E+04 ± 1,27E+04
	UFC PCA (22°C, 15j) (UFC/mL)	-	5,95E+04 ± 1,34E+04	-	-	6,10E+04 -	-	3,30E+04 -

Tableau X.4 (suite).

	Paramètre mesuré	Temps d'incubation (j)						
		0*	0**	1	2	4	7	11
ER + MOA-NS-O ₃ + <i>E. coli</i> (essai 1-flacon 1)	NH ₄ (mg/L)	0,29	-	-	-	-	-	-
	NO ₂ (mg/L)	<0,02	-	-	-	-	-	-
	NO ₃ (mg/L)	0,7	-	-	-	-	-	-
	P total (mg/L)	0,23	-	-	-	-	-	-
	COD (mg/L)	1,92	1,95	-	-	-	-	1,88
	pH	7,96	7,66	-	-	7,90	-	7,49
	conductivité (μS/cm)	513	516	-	-	-	-	502
	FISH-ENT1 (cellules/mL)	-	1,46E+05 ± 7,52E+04	-	-	4,22E+05 -	-	3,48E+05 ± 5,23E+04
	Bactéries totales (cellules/mL)	-	2,02E+05 ± 2,47E+04	3,03E+05 ± 6,58E+04	2,98E+05 ± 5,16E+04	5,86E+05 ± 3,65E+05	5,43E+05 ± 7,07E+02	6,14E+05 ± 4,53E+04
	Bactéries avec membrane intégrée (cellules/mL)	-	1,92E+05 ± 1,63E+04	2,76E+05 ± 5,94E+04	2,61E+05 ± 5,59E+04	4,92E+05 ± 3,15E+05	4,90E+05 ± 7,07E+02	5,93E+05 ± 2,47E+04
	UFC TTC-Tergitol 7 (37°C, 24h) (UFC/mL)	-	6,85E+04 ± 1,63E+04	8,15E+04 ± 2,76E+04	8,40E+04 ± 1,84E+04	7,45E+04 ± 7,78E+03	2,00E+04 ± 4,24E+03	1,80E+04 ± 7,07E+03
	UFC PCA (22°C, 15j) (UFC/mL)	-	9,30E+04 ± 9,90E+03	-	-	4,90E+04 ± 4,10E+04	-	2,10E+04 -
ER + MOA-NS-O ₃ + <i>E. coli</i> (essai 1-flacon 2)	NH ₄ (mg/L)	0,1	-	-	-	-	-	-
	NO ₂ (mg/L)	<0,02	-	-	-	-	-	-
	NO ₃ (mg/L)	0,7	-	-	-	-	-	-
	P total (mg/L)	0,14	-	-	-	-	-	-
	COD (mg/L)	1,90	1,87	-	-	-	-	2,00
	pH	7,95	7,72	-	-	7,96	-	7,64
	conductivité (μS/cm)	518	515	-	-	-	-	494
	FISH-ENT1 (cellules/mL)	-	1,57E+05 ± 4,24E+03	-	-	3,74E+05 -	-	4,47E+05 ± 3,68E+04
	Bactéries totales (cellules/mL)	-	1,93E+05 ± 1,41E+03	3,16E+05 ± 1,77E+04	2,54E+05 ± 9,90E+03	5,40E+05 ± 3,27E+05	6,88E+05 ± 1,77E+05	6,21E+05 ± 1,27E+04
	Bactéries avec membrane intégrée (cellules/mL)	-	1,78E+05 ± 2,19E+04	2,90E+05 ± 5,66E+03	2,49E+05 ± 4,95E+03	4,37E+05 ± 2,55E+05	6,43E+05 ± 2,35E+05	6,12E+05 ± 1,63E+04
	UFC TTC-Tergitol 7 (37°C, 24h) (UFC/mL)	-	7,50E+04 ± 2,83E+03	7,75E+04 ± 3,54E+03	1,05E+05 ± 7,07E+03	7,60E+04 ± 2,83E+03	3,50E+04 ± 0	3,10E+04 ± 2,83E+03
	UFC PCA (22°C, 15j) (UFC/mL)	-	6,25E+04 ± 1,77E+04	-	-	4,70E+04 ± 2,40E+04	-	2,20E+04 -
ER + Acétate + <i>E. coli</i> (essai 1)	NH ₄ (mg/L)	<0,1	-	-	-	-	-	-
	NO ₂ (mg/L)	<0,02	-	-	-	-	-	-
	NO ₃ (mg/L)	0,5	-	-	-	-	-	-
	P total (mg/L)	0,35	-	-	-	-	-	-
	COD (mg/L)	1,94	1,96	-	-	-	-	1,85
	pH	7,90	7,68	7,45	-	7,94	-	7,54
	conductivité (μS/cm)	498	506	-	-	-	-	487
	FISH-ENT1 (cellules/mL)	-	1,57E+05 ± 6,51E+04	-	-	5,31E+05 -	-	3,84E+05 ± 7,00E+04
	Bactéries totales (cellules/mL)	-	1,94E+05 ± 1,84E+04	3,05E+05 ± 1,20E+04	3,78E+05 ± 6,29E+04	6,50E+05 ± 2,83E+04	6,46E+05 ± 2,88E+05	5,45E+05 ± 9,55E+04
	Bactéries avec membrane intégrée (cellules/mL)	-	1,88E+05 ± 1,06E+04	2,57E+05 ± 1,84E+04	3,54E+05 ± 3,89E+04	5,59E+05 ± 3,11E+04	6,39E+05 ± 2,98E+05	4,65E+05 ± 3,18E+04
	UFC TTC-Tergitol 7 (37°C, 24h) (UFC/mL)	-	9,25E+04 ± 2,62E+04	1,66E+05 ± 4,60E+04	1,60E+05 ± 1,41E+04	1,15E+05 ± 7,07E+03	1,12E+05 ± 4,24E+03	9,80E+04 ± 4,24E+03
	UFC PCA (22°C, 15j) (UFC/mL)	-	1,13E+05 ± 1,06E+04	-	-	4,00E+04 -	-	1,82E+05 ± 5,44E+04

Tableau X.4 (suite).

	Paramètre mesuré	Temps d'incubation (j)						
		0*	0**	1	2	4	7	11
ER + Acétate + <i>E. coli</i> (essai 2)	NH ₄ (mg/L)	<0,1	-	-	-	-	-	-
	NO ₂ (mg/L)	<0,01	-	-	-	-	-	-
	NO ₃ (mg/L)	5,5	-	-	-	-	-	-
	P total (mg/L)	0,28	-	-	-	-	-	-
	COD (mg/L)	1,78	1,76	-	-	-	-	1,84
	pH	7,51	7,43	-	-	7,40	-	7,46
	conductivité (μS/cm)	279	282	-	-	282	-	282
	FISH-ENT1 (cellules/mL)	- -	1,15E+05 ± 7,79E+04	- -	- -	1,09E+05 -	- -	9,63E+04 ± 4,24E+03
	Bactéries totales (cellules/mL)	- -	1,38E+05 ± 6,36E+03	1,16E+05 ± 2,59E+04	1,43E+05 ± 1,27E+04	1,10E+05 ± 4,09E+04	1,28E+05 ± 3,25E+04	1,42E+05 ± 4,95E+03
	Bactéries avec membrane intégrée (cellules/mL)	- -	1,33E+05 ± 9,19E+03	1,12E+05 ± 2,45E+04	1,24E+05 ± 7,78E+03	9,60E+04 ± 4,96E+04	9,80E+04 ± 3,39E+04	1,07E+05 ± 1,30E+04
	UFC TTC-Tergitol 7 (37°C, 24h) (UFC/mL)	- -	9,10E+04 ± 8,49E+03	9,05E+04 ± 1,20E+04	7,75E+04 ± 2,12E+03	3,70E+04 ± 1,41E+03	2,75E+04 ± 2,12E+03	1,65E+04 ± 7,07E+02
	UFC PCA (22°C, 15j) (UFC/mL)	- -	1,17E+05 -	- -	- -	3,90E+04 -	- -	1,58E+04 -
ER + Acétate + <i>E. coli</i> (essai 3)	NH ₄ (mg/L)	0,05	-	-	-	-	-	-
	NO ₂ (mg/L)	<0,01	-	-	-	-	-	-
	NO ₃ (mg/L)	11,8	-	-	-	-	-	-
	P total (mg/L)	0,14	-	-	-	-	-	-
	COD (mg/L)	1,92	1,90	-	-	-	-	1,904
	pH	7,38	7,39	-	-	7,43	-	-
	conductivité (μS/cm)	277	273	-	-	275	-	-
	FISH-ENT1 (cellules/mL)	- -	2,14E+05 ± 9,90E+03	- -	2,31E+05 ± 1,27E+04	2,39E+05 ± 1,41E+04	4,73E+05 ± 8,49E+03	4,21E+05 ± 4,24E+03
	Bactéries totales (cellules/mL)	- -	2,39E+05 ± 2,83E+03	3,33E+05 ± 1,41E+04	2,96E+05 ± 5,66E+03	3,25E+05 ± 1,70E+04	4,00E+05 ± 4,24E+03	6,04E+05 ± 4,24E+03
	Bactéries avec membrane intégrée (cellules/mL)	- -	2,23E+05 ± 4,24E+03	3,08E+05 ± 1,56E+04	2,01E+05 ± 3,46E+04	2,84E+05 ± 1,56E+04	3,58E+05 ± 7,07E+02	4,80E+05 ± 4,95E+04
	UFC TTC-Tergitol 7 (37°C, 24h) (UFC/mL)	- -	2,45E+05 ± 3,54E+04	1,55E+05 ± 3,54E+04	1,75E+05 ± 3,54E+04	1,19E+05 ± 1,27E+04	1,38E+05 ± 1,34E+04	1,65E+05 ± 7,78E+04
	UFC PCA (22°C, 15j) (UFC/mL)	- -	3,00E+05 ± 4,24E+04	1,90E+05 -	2,50E+05 ± 4,24E+04	2,10E+05 ± 4,24E+04	2,45E+05 ± 6,36E+04	2,60E+05 ± 5,66E+04

X.3. Chapitre VI

X.3.1. Résultats présentés au § VI.2

Tableau X.5. Comportement d'*E. coli* injecté dans de l'eau de réseau déchlorée non stérile (0*=T₀ avant injection d'*E. coli*, 0=T₀ juste après injection d'*E. coli*).**

temps (j)	0	0	1	2	4	7	11	15
NO ₂ (mg/L)	<0,01	-	-	-	-	-	-	-
NO ₃ (mg/L)	11,1	-	-	-	-	-	-	-
NH ₄ (mg/L)	<0,05	-	-	-	-	-	-	-
P (mg/L)	<0,14	-	-	-	-	-	-	-
pH	7,45	7,46	-	-	7,49	-	-	-
conductivité (μS/cm)	261	262	-	-	256	-	-	-
COD (mg/L)	1,19	1,25	-	-	-	-	1,303	-
Bactéries totales (kit Baclight) (cellules/mL)	3,12E+05 ± 2,69E+04	4,38E+05 ± 2,83E+03	5,98E+05 ± 2,69E+04	9,98E+05 ± 2,83E+04	1,99E+06 ± 1,41E+04	1,10E+06 ± 1,41E+05	9,84E+05 ± 2,83E+04	4,46E+05 ± 4,38E+04
Bactéries avec membrane Intègre (cellule/mL)	2,07E+05 ± 1,41E+04	2,56E+05 ± 4,24E+03	5,03E+05 ± 1,70E+04	7,71E+05 ± 4,67E+04	1,24E+06 ± 1,77E+05	9,31E+05 ± 1,20E+04	8,18E+05 ± 3,25E+04	3,98E+05 ± 4,38E+04
FISH-EUB338 (cellules/mL)	2,31E+05 ± 1,13E+04	4,10E+05 ± 2,26E+04	- -	6,82E+05 ± 7,07E+03	1,69E+06 ± 2,69E+05	1,29E+06 ± 1,27E+05	5,86E+05 ± 4,24E+03	4,00E+05 ± 7,07E+03
FISH-ENT1 (cellules/mL)	- -	2,15E+05 ± 1,13E+04	- -	2,43E+05 ± 2,69E+04	1,62E+05 ± 7,07E+03	8,11E+04 ± 1,56E+03	8,11E+04 ± 1,27E+03	3,01E+04 ± 1,41E+03
UFC PCA (15j, 22°C) (UFC/mL)	4,20E+02 ± 2,83E+01	2,85E+05 ± 1,06E+05	1,80E+05 ± 0,00E+00	3,00E+05 ± 8,49E+04	2,60E+05 ± 5,66E+04	1,52E+05 ± 1,63E+04	4,45E+04 ± 2,12E+03	3,20E+04 ± 0
UFC TTC-tergitol 7 (24h, 37°C) (UFC/mL)	<0,01 ± 0	2,45E+05 ± 3,54E+04	1,30E+05 ± 1,41E+04	1,85E+05 ± 6,36E+04	1,43E+05 ± 3,89E+04	6,05E+04 ± 9,19E+03	2,45E+04 ± 3,54E+03	3,35E+03 ± 4,95E+02

Tableau X.6. Comportement d'*E. coli* injecté dans de l'eau de réseau déchlorée non stérile + MOA-NS (0*=T₀ avant injection d'*E. coli*, 0=T₀ juste après injection d'*E. coli*).**

temps (j)	0	0	1	2	4	7	11	15
NO ₂ (mg/L)	<0,01	-	-	-	-	-	-	-
NO ₃ (mg/L)	11,1	-	-	-	-	-	-	-
NH ₄ (mg/L)	<0,05	-	-	-	-	-	-	-
P (mg/L)	<0,14	-	-	-	-	-	-	-
pH	7,4	7,43	-	-	7,46	-	-	-
conductivité (μS/cm)	259	261	-	-	255	-	-	-
COD (mg/L)	1,60	1,56	-	-	-	-	1,745	-
Bactéries totales (kit Baclight) (cellules/mL)	3,27E+05 ± 1,56E+04	6,37E+05 ± 2,83E+04	8,79E+05 ± 4,53E+04	1,01E+06 ± 1,41E+05	1,74E+06 ± 1,56E+05	2,33E+06 ± 1,56E+05	1,07E+06 ± 8,49E+04	7,33E+05 ± 4,24E+03
Bactéries avec membrane Intègre (cellule/mL)	9,86E+04 ± 6,36E+02	2,74E+05 ± 2,55E+04	6,70E+05 ± 3,39E+04	5,66E+05 ± 1,06E+05	1,31E+06 ± 2,55E+05	1,95E+06 ± 8,49E+04	7,21E+05 ± 1,41E+04	6,47E+05 ± 7,07E+03
FISH-EUB338 (cellules/mL)	2,27E+05 ± 2,97E+04	5,07E+05 ± 1,27E+04	- -	8,69E+05 ± 5,66E+03	1,41E+06 ± 1,56E+05	1,11E+06 ± 2,83E+04	4,36E+05 ± 2,97E+04	1,01E+05 ± 2,33E+03
FISH-ENT1 (cellules/mL)	- -	2,30E+05 ± 2,97E+04	- -	2,08E+05 ± 1,84E+04	2,98E+05 ± 2,83E+04	1,56E+05 ± 2,97E+04	5,85E+04 ± 1,56E+03	6,49E+03 ± 1,27E+02
UFC PCA (15j, 22°C) (UFC/mL)	1,40E+02 ± 1,41E+01	2,90E+05 ± 1,41E+04	1,80E+05 ± 1,41E+04	2,20E+05 ± 4,24E+04	2,65E+05 ± 3,54E+04	9,95E+04 ± 1,77E+04	9,40E+03 ± 1,13E+03	4,20E+03 ± 1,41E+02
UFC TTC-tergitol 7 (24h, 37°C) (UFC/mL)	<0,01 ± 0	2,15E+05 ± 7,78E+04	1,30E+05 ± 5,66E+04	1,15E+05 ± 7,07E+03	1,11E+05 ± 1,34E+04	5,25E+04 ± 3,54E+03	4,95E+03 ± 2,12E+02	9,45E+02 ± 4,88E+02

Tableau X.7. Comportement d'*E. coli* injecté dans de l'eau de réseau déchlorée non stérile + MOA-Cl₂ (0*=T₀ avant injection d'*E. coli*, 0=T₀ juste après injection d'*E. coli*).**

temps (j)	0	0	1	2	4	7	11	15
NO ₂ (mg/L)	<0,01	-	-	-	-	-	-	-
NO ₃ (mg/L)	10,4	-	-	-	-	-	-	-
NH ₄ (mg/L)	<0,05	-	-	-	-	-	-	-
P (mg/L)	<0,14	-	-	-	-	-	-	-
pH	7,41	7,44	-	-	7,43	-	-	-
conductivité (μS/cm)	252	255	-	-	245	-	-	-
COD (mg/L)	1,57	1,54	-	-	-	-	1,589	-
Bactéries totales (kit Baclight) (cellules/mL)	2,90E+05 ± 1,27E+04	5,83E+05 ± 2,12E+04	8,46E+05 ± 3,39E+04	1,22E+06 ± 1,56E+05	2,82E+06 ± 2,97E+05	1,33E+06 ± 2,55E+05	1,01E+06 ± 1,41E+05	6,65E+05 ± 2,97E+04
Bactéries avec membrane Intègre (cellule/mL)	1,51E+05 ± 2,47E+04	4,16E+05 ± 7,07E+03	7,13E+05 ± 2,55E+04	8,42E+05 ± 1,41E+04	2,13E+06 ± 1,27E+05	1,11E+06 ± 1,13E+05	7,32E+05 ± 1,15E+05	5,81E+05 ± 1,98E+04
FISH-EUB338 (cellules/mL)	2,45E+05 ± 2,97E+04	3,77E+05 ± 2,69E+04	- -	1,37E+06 ± 2,97E+05	2,01E+06 ± 1,56E+05	1,08E+06 ± 1,17E+05	5,40E+05 ± 5,66E+03	4,00E+05 ± 1,56E+04
FISH-ENT1 (cellules/mL)	- -	2,81E+05 ± 2,97E+04	- -	3,13E+05 ± 1,56E+04	1,89E+05 ± 5,66E+03	3,99E+04 ± 5,52E+03	2,32E+04 ± 1,41E+02	6,49E+03 ± 1,56E+02
UFC PCA (15j, 22°C) (UFC/mL)	1,20E+02 ± 0	2,30E+05 ± 4,24E+04	2,00E+05 ± 2,83E+04	2,45E+05 ± 7,07E+03	2,00E+05 ± 1,41E+04	2,45E+04 ± 6,36E+03	9,10E+03 ± 4,24E+02	8,10E+03 ± 1,41E+02
UFC TTC-tergitol 7 (24h, 37°C) (UFC/mL)	<0,01 ± 0	3,60E+05 ± 8,49E+04	1,65E+05 ± 2,12E+04	1,60E+05 ± 0	9,45E+04 ± 7,78E+03	2,45E+03 ± 6,36E+02	8,10E+02 ± 2,12E+02	2,16E+02 ± 7,78E+00

Tableau X.8. Comportement d'*E. coli* injecté dans de l'eau de réseau déchlorée non stérile + MOA-O₃ (0*=T₀ avant injection d'*E. coli*, 0=T₀ juste après injection d'*E. coli*).**

temps (j)	0	0	1	2	4	7	11	15
NO ₂ (mg/L)	<0,01	-	-	-	-	-	-	-
NO ₃ (mg/L)	10,6	-	-	-	-	-	-	-
NH ₄ (mg/L)	0,11	-	-	-	-	-	-	-
P (mg/L)	<0,14	-	-	-	-	-	-	-
pH	7,37	7,39	-	-	7,46	-	-	-
conductivité (μS/cm)	251	255	-	-	245	-	-	-
COD (mg/L)	1,45	1,47	-	-	-	-	1,329	-
Bactéries totales (kit Baclight) (cellules/mL)	2,33E+05 ± 1,56E+04	5,95E+05 ± 1,27E+04	6,63E+05 ± 2,97E+04	8,45E+05 ± 7,64E+04	3,29E+06 ± 1,56E+05	1,09E+06 ± 2,83E+05	1,85E+06 ± 1,56E+05	8,11E+05 ± 1,41E+03
Bactéries avec membrane Intègre (cellule/mL)	1,48E+05 ± 3,21E+04	4,65E+05 ± 4,38E+04	4,51E+05 ± 4,81E+04	5,63E+05 ± 5,52E+04	1,80E+06 ± 3,04E+05	1,01E+06 ± 2,12E+05	1,58E+06 ± 2,76E+05	6,98E+05 ± 1,56E+04
FISH-EUB338 (cellules/mL)	1,32E+05 ± 3,04E+04	4,42E+05 ± 1,56E+04	- -	7,14E+05 ± 4,10E+04	2,67E+06 ± 5,66E+04	9,11E+05 ± 1,41E+04	9,65E+05 ± 1,27E+04	7,70E+05 ± 2,97E+04
FISH-ENT1 (cellules/mL)	- -	2,08E+05 ± 8,49E+03	- -	2,65E+05 ± 1,56E+04	7,38E+05 ± 2,97E+04	3,87E+04 ± 2,97E+03	1,95E+04 ± 2,83E+02	5,87E+03 ± 1,41E+02
UFC PCA (15j, 22°C) (UFC/mL)	1,20E+02 ± 1,41E+01	3,55E+05 ± 2,12E+04	1,80E+05 ± 0,00E+00	3,45E+05 ± 7,78E+04	3,05E+05 ± 7,07E+03	2,80E+04 ± 0	7,45E+03 ± 7,78E+02	1,57E+04 ± 1,41E+03
UFC TTC-tergitol 7 (24h, 37°C) (UFC/mL)	<0,01 ± 0	3,55E+05 ± 3,54E+04	1,75E+05 ± 7,07E+03	1,90E+05 ± 1,41E+04	1,14E+05 ± 8,49E+03	1,50E+03 ± 2,12E+03	8,50E+02 ± 2,12E+02	8,70E+02 ± 1,41E+01

Tableau X.9. Comportement d'*E. coli* injecté dans de l'eau de réseau déchlorée non stérile + Acétate (0*=T₀ avant injection d'*E. coli*, 0=T₀ juste après injection d'*E. coli*).**

temps (j)	0	0	1	2	4	7	11	15
NO ₂ (mg/L)	<0,01	-	-	-	-	-	-	-
NO ₃ (mg/L)	10,5	-	-	-	-	-	-	-
NH ₄ (mg/L)	<0,05	-	-	-	-	-	-	-
P (mg/L)	<0,14	-	-	-	-	-	-	-
pH	7,45	7,43	-	-	7,43	-	-	-
conductivité (μS/cm)	255	259	-	-	237	-	-	-
COD (mg/L)	1,43	1,45	-	-	-	-	1,258	-
Bactéries totales (kit Baclight) (cellules/mL)	3,20E+05 ± 4,24E+04	6,16E+05 ± 2,97E+04	1,36E+06 ± 2,69E+05	2,73E+06 ± 2,97E+05	3,12E+06 ± 5,66E+05	9,76E+05 ± 4,24E+03	7,87E+05 ± 4,38E+04	6,41E+05 ± 5,80E+04
Bactéries avec membrane Intègre (cellule/mL)	2,48E+05 ± 2,69E+04	4,38E+05 ± 3,96E+04	8,34E+05 ± 4,10E+04	2,24E+06 ± 4,74E+05	2,69E+06 ± 2,47E+05	8,57E+05 ± 3,46E+04	7,54E+05 ± 3,39E+04	5,08E+05 ± 5,80E+04
FISH-EUB338 (cellules/mL)	2,03E+05 ± 1,27E+04	5,84E+05 ± 4,10E+04	- -	2,22E+06 ± 2,97E+05	2,41E+06 ± 2,83E+04	8,20E+05 ± 2,97E+04	5,41E+05 ± 3,11E+04	4,34E+05 ± 9,90E+03
FISH-ENT1 (cellules/mL)	- -	2,27E+05 ± 1,56E+04	- -	2,14E+05 ± 1,56E+04	3,03E+05 ± 2,97E+04	3,37E+04 ± 4,38E+03	1,80E+04 ± 8,49E+02	6,49E+03 ± 2,69E+02
UFC PCA (15j, 22°C) (UFC/mL)	1,59E+02 ± 2,12E+00	3,50E+05 ± 1,41E+04	1,60E+05 ± 4,24E+04	4,55E+05 ± 2,12E+04	3,90E+05 ± 2,83E+04	7,25E+04 ± 4,95E+03	1,40E+04 ± 1,56E+03	1,48E+04 ± 1,13E+03
UFC TTC-tergitol 7 (24h, 37°C) (UFC/mL)	<0,01 ± 0	4,10E+05 ± 5,66E+04	2,00E+05 ± 1,41E+04	1,45E+05 ± 3,54E+04	9,90E+04 ± 2,97E+04	4,30E+03 ± 2,83E+02	4,10E+02 ± 5,66E+01	1,21E+02 ± 7,07E-01

X.3.2. Résultats présentés au § VI.3

- Essais préliminaires pour vérifier la stabilité biologique de l'eau (durant les 24 h de temps de séjour) dans les réservoirs alimentant les deux Propella™.

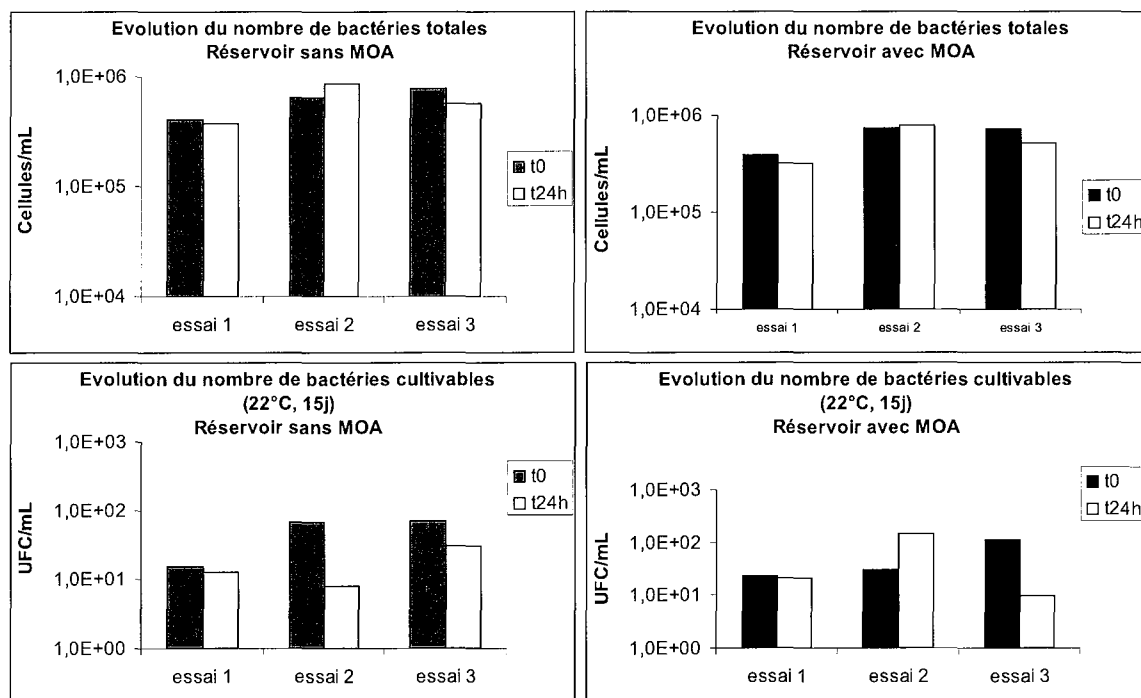


Figure X.1. Evolution du nombre de bactéries totales et cultivable (gélose PCA, 15j, 22°C) dans les réservoirs servant à alimenter les deux réacteurs (avec et sans MOA).

● Effet de la MOA-NS sur la survie d'*E. coli* en conditions dynamiques (Propella™).

Eaux d'entrée

Tableau X.10. Evolution dans le temps des paramètres physico-chimiques et microbiologiques de l'eau d'entrée du Propella sans MOA-NS (T=0 : juste avant injection d'*E. coli*).

Temps (j)	COD (mg/L)	CODB (mg/L)	pH	conductivité (μS/cm)	FISH-ENT1 (cellules/mL)	Bactéries totales (cellules/mL)	UFC PCA (22°C, 15j) (UFC/mL)	UFC TTC-tergitol 7 (37°C, 24h) (UFC/mL)
-7	1,90	0,13	7,26	480	-	-	2,18E+02	<0,01
-5	-	-	-	-	-	-	-	<0,01
-3	-	-	7,18	370	-	5,03E+04	6,97E+01	<0,01
0	-	-	7,53	445	2,84E+02	6,03E+04	1,11E+04	<0,01
1h	-	-	-	-	-	-	-	<0,01
6h	-	-	-	-	-	-	-	<0,01
1	1,93	0,48	-	-	-	-	-	<0,01
1,1	-	-	-	-	-	-	-	<0,01
2	2,90	-	-	-	8,11E+01	1,54E+05	5,14E+02	<0,01
3	-	-	7,35	399	2,03E+02	7,30E+04	1,36E+02	<0,01
4	-	-	-	-	-	-	-	<0,01
5	-	-	-	-	-	-	-	<0,01
7	-	-	-	-	8,11E+01	9,57E+04	1,31E+02	<0,01
9	-	-	-	-	-	-	-	<0,01
13	1,52	0,09	-	-	-	-	-	<0,01
17	-	-	-	-	2,43E+02	8,25E+04	4,93E+02	<0,01
23	1,71	0,11	-	-	8,11E+01	-	-	<0,01
30	-	-	6,86	440	-	-	-	<0,01
33	-	-	-	-	-	-	-	<0,01
37	2,78	-	-	-	-	-	-	<0,01

- : non mesuré

Tableau X.11. Evolution dans le temps des paramètres physico-chimiques et microbiologiques de l'eau d'entrée du Propella avec MOA-NS (T=0 : juste avant injection d'*E. coli*).

Temps (j)	COD (mg/L)	CODB (mg/L)	pH	conductivité (μS/cm)	FISH-ENT1 (cellules/mL)	Bactéries totales (cellules/mL)	UFC PCA (22°C, 15j) (UFC/mL)	UFC TTC-tergitol 7 (37°C, 24h) (UFC/mL)
-7j	1,90	0,13	7,26	480	-	-	2,18E+02	<0,01
-5j	-	-	-	-	-	-	-	<0,01
-3j	-	-	7,18	370	-	5,03E+04	6,97E+01	<0,01
0	-	-	7,53	445	2,84E+02	6,03E+04	1,11E+04	<0,01
1h	-	-	-	-	-	-	-	<0,01
6h	-	-	-	-	-	-	-	<0,01
1j	1,93	0,48	-	-	-	-	-	<0,01
1,1j	-	-	-	-	-	-	-	<0,01
2j	2,90	-	-	-	8,11E+01	1,54E+05	5,14E+02	<0,01
3j	-	-	7,65	399	2,03E+02	7,92E+04	1,69E+02	<0,01
4j	-	-	-	-	-	-	-	<0,01
5j	-	-	-	-	-	-	-	<0,01
7j	2,24	0,61	-	-	8,11E+01	6,98E+04	6,65E+02	<0,01
9j	-	-	-	-	-	-	-	<0,01
13j	2,02	0,55	-	-	-	-	-	<0,01
17j	-	-	-	-	2,03E+02	7,19E+04	8,37E+01	<0,01
23j	2,16	0,09	-	-	1,62E+02	8,71E+04	-	<0,01
30j	-	-	6,94	424	-	-	-	<0,01
33j	-	-	-	-	-	-	-	<0,01
37j	-	-	-	-	-	-	-	<0,01

- : non mesuré

Eaux de sortie

Tableau X.12. Evolution dans le temps des paramètres physico-chimiques et microbiologiques dans l'eau de sortie du Propella sans MOA-NS (T=0 : juste avant injection d'*E. coli*).

Temps (j)	UFC TTC-tergitol 7 (37°C, 24h) (UFC/mL)	UFC PCA (22°C, 15j) (UFC/mL)	FISH-ENT1 (cellules/mL)	Bactéries totales (Kit Baclight) (cellules/mL)	COD (mg/L)	CODB (mg/L)	pH	Conductivité (µS/cm)
-7	1,00E-02	2,42E+04	-	-	1,50	<0,1	6,85	341
-5	1,00E-02	2,71E+04	2,03E+02	-	-	-	6,98	399
-3	1,00E-02	3,47E+04	-	-	-	-	7,17	437
0	1,00E-02	9,82E+03	-	1,03E+05	-	-	7,56	441
1h	1,50E+08	4,97E+08	2,79E+08	5,07E+08	-	-	7,36	445
6h	1,20E+08	5,78E+08	1,31E+08	5,62E+07	-	-	-	-
1	9,08E+07	2,17E+08	9,00E+07	3,75E+07	3,65	1,71	-	-
1,1	8,42E+07	1,90E+08	1,23E+08	6,78E+07	-	-	-	-
2	6,00E+07	7,36E+07	6,71E+07	3,03E+07	-	-	-	-
3	9,10E+06	2,00E+07	9,59E+06	5,15E+06	2,61	1,11	7,43	412
4	1,00E+05	2,00E+05	3,47E+05	1,50E+06	-	-	-	-
5	3,95E+04	1,08E+05	1,87E+05	2,74E+05	-	-	-	-
7	5,71E+02	1,05E+05	2,23E+04	1,18E+05	1,70	0,26	-	-
9	1,82E+02	1,86E+04	6,09E+03	1,34E+05	-	-	7,14	401
13	2,86E+00	-	2,03E+03	-	1,77	0,27	-	-
17	1,41E+00	3,44E+04	1,01E+03	1,96E+05	-	-	-	-
23	2,09E-01	-	1,42E+03	-	1,59	0,04	-	-
30	1,80E-01	-	-	6,36E+04	-	-	7,10	431
33	-	-	-	-	1,72	-	-	-
37	1,40E-01	-	-	-	-	-	-	-

- : non mesuré

Tableau X.13. Evolution dans le temps des paramètres physico-chimiques et microbiologiques dans l'eau de sortie du Propella avec MOA-NS (T=0 : juste avant injection d'*E. coli*).

Temps (j)	UFC TTC-tergitol 7 (37°C, 24h) (UFC/mL)	UFC PCA (22°C, 15j) (UFC/mL)	FISH-ENT1 (cellules/mL)	Bactéries totales (Kit Baclight) (cellules/mL)	COD (mg/L)	CODB (mg/L)	pH	Conductivité (µS/cm)
-7	<0,01	1,00E+04	-	-	1,48	0,01	6,86	414
-5	<0,01	5,43E+03	2,03E+02	-	-	-	6,99	424
-3	<0,01	4,52E+03	-	-	-	-	7,21	407
0	<0,01	1,86E+03	-	7,18E+04	-	-	7,56	422
1h	2,00E+08	9,10E+07	3,04E+08	5,07E+08	-	-	7,35	445
6h	1,20E+08	5,71E+08	1,75E+08	7,04E+07	-	-	-	-
1	-	2,37E+08	1,24E+08	3,86E+07	3,20	0,90	-	-
1,1	7,75E+07	2,04E+08	9,14E+07	6,18E+07	-	-	-	-
2	2,75E+07	6,23E+07	5,68E+07	2,44E+07	-	-	-	-
3	2,00E+07	2,73E+07	1,11E+07	8,18E+06	1,93	0,32	7,39	445
4	5,41E+06	8,51E+06	5,69E+06	2,24E+06	-	-	-	-
5	1,00E+06	7,38E+05	1,42E+06	1,32E+06	-	-	-	-
7	2,64E+04	8,51E+04	3,65E+04	2,52E+05	2,01	0,44	-	-
9	1,38E+04	-	1,62E+04	2,41E+05	-	-	7,14	384
13	5,91E+01	4,21E+04	3,04E+03	2,13E+05	2,04	0,24	-	-
17	7,27E+00	2,53E+04	2,03E+03	2,85E+05	-	-	-	-
23	1,45E+00	-	1,01E+03	-	1,86	0,29	-	-
30	1,20E-01	-	-	9,82E+04	-	-	6,91	414
33	9,00E-02	-	-	-	2,08	-	-	-
37	-	-	-	-	-	-	-	-

- : non mesuré

Biofilms

Tableau X.14. Evolution dans le temps des paramètres microbiologiques dans le biofilm du Propella sans MOA-NS (T=0 : juste avant injection d'*E. coli*).

Temps (j)	UFC TTC-tergitol 7 (37°C, 24h) (cellules/mL)	UFC PCA (22°C, 15j) (cellules/mL)	FISH-ENT1 (cellules/mL)	Bactéries totales (Kit Baclight) (cellules/mL)
-7	1,42E+00	3,70E+05	-	-
-5	1,42E+00	1,77E+05	7,18E+03	-
-3	1,42E+00	1,23E+05	-	-
0	1,42E+00	6,90E+04	-	1,93E+06
1h	1,59E+07	4,95E+07	1,07E+07	2,21E+07
6h	1,09E+07	3,85E+07	7,87E+06	1,81E+07
1	6,40E+06	1,71E+07	9,76E+06	1,60E+07
1,1	7,84E+06	1,86E+07	1,02E+07	1,44E+07
2	2,50E+06	2,77E+07	9,53E+06	1,84E+07
3	1,55E+06	3,49E+06	-	6,06E+06
4	3,86E+05	6,17E+05	8,90E+05	3,62E+06
5	-	-	-	-
7	4,12E+03	1,38E+05	2,87E+05	2,56E+06
9	2,37E+03	2,25E+05	7,18E+05	2,84E+06
13	3,51E+03	1,27E+06	1,00E+05	3,14E+06
17	1,42E+02	2,36E+05	4,31E+04	2,93E+06
23	-	-	-	-
30	2,83E+00	-	-	-
33	-	-	-	-
37	-	-	-	-

- : non mesuré

Tableau X.15. Evolution dans le temps des paramètres microbiologiques dans le biofilm du Propella avec MOA-NS (T=0 : juste avant injection d'*E. coli*).

Temps (j)	UFC TTC-tergitol 7 (37°C, 24h) (cellules/mL)	UFC PCA (22°C, 15j) (cellules/mL)	FISH-ENT1 (cellules/mL)	Bactéries totales (Kit Baclight) (cellules/mL)
-7	1,42E+00	1,39E+05	-	-
-5	1,42E+00	5,42E+04	7,18E+03	-
-3	1,42E+00	2,08E+04	-	-
0	1,42E+00	2,41E+04	-	1,57E+06
1h	3,34E+07	6,56E+07	1,17E+07	2,62E+07
6h	9,13E+06	3,28E+07	-	2,45E+07
1	7,90E+06	2,20E+07	1,74E+07	2,01E+07
1,1	-	2,77E+07	-	2,68E+07
2	6,17E+06	1,26E+07	1,32E+07	1,54E+07
j	2,32E+06	3,12E+06	3,85E+06	5,91E+06
4	6,43E+04	5,38E+05	1,41E+06	2,33E+06
5	1,18E+05	6,95E+05	-	7,12E+06
7	1,84E+04	1,55E+05	9,76E+05	3,73E+06
9	4,89E+03	2,48E+05	2,01E+05	4,97E+06
13	5,60E+02	4,34E+05	2,87E+04	2,80E+06
17	7,08E+02	2,34E+05	5,74E+04	1,29E+06
23	1,95E+02	-	4,31E+04	9,49E+06
30	1,42E+00	-	-	-
33	-	-	-	-
37	-	-	-	-

- : non mesuré

X.4. Chapitre VII

X.4.1. Résultats présentés au § VII.2

- **Caractéristiques physicochimiques et microbiologiques de l'eau brute (Moselle), l'eau CAG et l'eau traitée (Usine Edouard Imbeaux de Nancy)**

Tableau X.16. Paramètres de fonctionnement de l'usine sur les douze mois d'analyses.

Date prélèvement	Température (°C)	Débit usine (m³/h)	Préchloration (mg/L)	Chlore résiduel en entrée d'usine (mg/L)	Postchloration appliquée (mg/L)
19/05/03	17,4	3500	2,9	0,24	1,18
27/05/03	17,2	3500	2,9	0,25	0,8
02/06/03	22,4	3600	2,8	0,27	1
10/06/03	23,9	3400	3,5	0,53	1,1
16/06/03	25,2	3300	4,2	0,14	1,27
23/06/03	24	3650	5	0,5	1,34
30/06/03	24,4	2900	5,5	0,29	1,24
08/07/03	22,4	3100	5,4	0,3	1
29/07/03	22,2	2800	4,18	0,38	1,1
04/08/03	25,5	2916	0,99	0,46	1,2
11/08/03	25,4	2600	4,57	0,4	1,22
19/08/03	24	2500	4,25	1,4	1,21
25/08/03	23	3200	4,2	0,47	1,25
01/09/03	20,4	2500	3,4	0,47	0,89
08/09/03	22	3100	2,81	0,43	0,86
15/09/03	21	3000	3,5	0,4	0,8
22/09/03	21	2400	3,04	0,5	0,85
29/09/03	17,3	3200	2,8	0,47	0,85
07/10/03	14,5	3100	2,7	0,4	0,75
13/10/03	14,4	3000	3,25	0,37	0,71
20/10/03	15,4	3200	2,1	0,29	0,65
28/10/03	12,3	3000	2,1	0,9	0,65
17/11/03	11	3600	1,8	0,21	0,65
24/11/03	10	2600	1,9	0,2	0,65
08/12/03	9	3000	2,1	0,21	0,6
23/12/03	9	3200	2,9	0,25	0,5
13/01/04	10	2900	6,5	0,2	0,55
27/01/04	4,7	3600	1,9	0,3	0,5
10/02/04	6	3200	2,1	0,4	0,5
24/02/04	8,5	3000	2,4	0,16	0,5
09/03/04	6,4	3300	1,7	0,27	0,5
23/03/04	7,3	3400	2,4	0,45	0,6
14/04/04	16,1	3300	2,1	0,32	0,55
27/04/04	12	3200	2,6	0,35	0,7
11/05/04	14	3400	4	0,47	0,6
02/06/04	18,5	2200	3,4	0,29	0,8

Tableau X.17. Paramètres physico-chimiques et microbiologiques de l'eau brute sur les douze mois d'analyse (CT=coliformes totaux cultivables, - : non mesuré).

Date de prélèvement	Algues/L	pH	Conductivité (μS/cm)	COD (mg/L)	CODB (mg/L)	PCA 3j (UFC/mL)	PCA 15j (UFC/mL)	CT (UFC/mL)	FISH-EUB338 (cellules/mL)	FISH-ENT1 (cellules/mL)	DAPI (cellules/mL)
19/05/03	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
27/05/03	3,20E+07	7,09	239	3,49	0,92	7,55E+02	1,87E+03	0,00E+00	-	-	5,44E+06
02/06/03	5,70E+07	7,02	240	3,32	-	1,08E+03	1,39E+03	0,00E+00	-	-	7,56E+06
10/06/03	1,20E+08	7,02	240	3,19	0,62	3,25E+02	6,70E+02	1,00E+00	-	-	1,06E+07
16/06/03	3,04E+08	8,32	341	3,58	-	8,70E+01	2,80E+02	2,50E+00	4,49E+06	4,06E+04	1,20E+07
23/06/03	7,42E+07	8,51	373	3,43	1,12	4,50E+02	9,65E+02	1,00E+00	3,55E+06	5,68E+04	1,86E+07
30/06/03	1,35E+08	8,48	432	3,92	-	1,25E+02	3,65E+02	3,50E+00	3,61E+06	7,99E+04	1,97E+07
08/07/03	1,41E+08	8,05	318	3,27	0,87	9,50E+02	1,52E+03	2,50E+00	1,54E+06	2,84E+04	1,19E+07
29/07/03	1,14E+08	7,81	500	3,45	1,10	3,20E+03	4,10E+03	4,50E+00	1,02E+06	6,70E+04	1,89E+07
04/08/03	9,00E+07	8,6	460	4,11	-	2,95E+03	1,93E+04	0,00E+00	5,15E+06	1,28E+05	2,32E+07
11/08/03	6,98E+07	8,52	458	3,50	0,77	3,30E+03	4,05E+03	3,50E+00	2,55E+06	7,25E+04	2,03E+07
19/08/03	2,92E+08	7,66	484	3,71	-	2,55E+02	4,55E+02	1,20E+01	1,37E+06	6,29E+04	1,52E+07
25/08/03	2,00E+08	7,98	489	3,23	0,33	2,40E+02	4,15E+02	1,00E+01	1,87E+06	5,08E+04	1,42E+07
01/09/03	1,50E+08	7,68	468	3,41	-	9,70E+02	1,23E+03	6,00E+00	1,34E+06	6,29E+04	1,13E+07
08/09/03	1,02E+08	7,83	445	3,19	0,53	1,25E+03	1,68E+03	8,00E+00	1,97E+06	5,89E+04	9,96E+06
15/09/03	8,40E+07	7,89	431	3,29	-	9,80E+01	1,42E+02	4,00E+00	8,11E+05	2,64E+04	8,16E+06
22/09/03	6,75E+07	7,74	478	2,71	1,25	1,73E+02	4,35E+02	5,00E-01	1,44E+06	5,28E+04	1,02E+07
29/09/03	4,20E+07	7,51	455	3,44	-	6,00E+02	9,00E+02	3,50E+00	2,26E+06	3,25E+04	5,12E+06
07/10/03	2,68E+07	7,71	341	4,08	1,68	5,50E+02	9,00E+02	5,00E+00	5,32E+06	3,66E+04	7,70E+06
13/10/03	8,92E+07	7,03	218	2,46	-	7,95E+02	1,46E+03	7,00E+00	4,06E+06	1,32E+05	4,93E+06
20/10/03	4,00E+07	7,39	345	2,97	0,50	5,35E+02	8,65E+02	3,00E+00	4,67E+06	1,63E+04	2,26E+06
28/10/03	3,20E+07	7,58	322	4,05	-	4,30E+02	8,80E+02	1,05E+01	5,26E+06	2,84E+04	6,15E+06
17/11/03	2,70E+07	7,31	295	3,13	0,71	3,50E+02	8,60E+02	3,00E+00	4,18E+06	3,02E+04	8,23E+06
24/11/03	3,80E+07	7,43	282	3,14	0,71	1,18E+03	3,30E+03	1,50E+00	3,41E+06	2,30E+04	5,41E+06
08/12/03	1,00E+07	7,39	274	3,09	-	3,45E+02	7,55E+02	2,50E+00	-	-	5,50E+06
23/12/03	1,92E+07	7,16	162	4,03	0,93	1,31E+04	1,23E+04	2,50E+02	4,18E+06	4,67E+04	2,01E+07
13/01/04	8,40E+06	7,18	164	6,36	1,84	2,24E+04	8,75E+04	1,60E+02	5,97E+06	1,80E+04	2,25E+07
27/01/04	1,20E+06	7,45	228	2,99	0,34	4,90E+02	1,36E+03	7,00E+01	2,56E+06	1,36E+04	1,43E+08
10/02/04	2,00E+06	7,02	198	2,68	0,13	2,32E+03	3,40E+03	8,00E+00	2,73E+06	3,79E+04	1,10E+08
24/02/04	4,00E+06	7,25	228	2,76	0,46	2,45E+03	3,70E+03	6,00E+01	2,15E+06	-	1,90E+07
09/03/04	3,60E+06	7,52	288	4,23	2,05	1,71E+03	1,71E+03	1,70E+01	3,21E+06	4,90E+04	5,78E+06
23/03/04	3,80E+06	6,94	159	4,17	1,29	1,80E+03	2,90E+03	5,50E+01	1,91E+06	2,23E+04	2,28E+06
14/04/04	4,00E+06	7,02	189	4,84	2,65	4,85E+03	6,10E+03	4,00E+01	2,46E+06	4,60E+04	5,17E+06
27/04/04	-	6,89	257	3,76	1,07	2,00E+03	2,30E+03	6,50E+00	7,16E+06	1,49E+04	7,89E+06
11/05/04	4,00E+06	6,92	124,7	4,65	1,05	6,00E+03	7,80E+03	5,00E+01	1,87E+06	3,86E+04	1,97E+06
02/06/04	1,94E+07	7,57	275	3,944	1,44	3,75E+03	4,70E+03	2,00E+00	1,48E+06	1,01E+04	1,73E+06

Tableau X.18. Paramètres physico-chimiques et microbiologiques de l'eau en sortie de filtre CAG sur les 12 mois d'analyse (CT=coliformes cultivables, - : non mesuré).

Date prélèvement	pH	conductivité (µS/cm)	Age du filtre (h)	COD (mg/L)	PCA 3j (UFC/mL)	PCA 15j (UFC/mL)	CT (UFC/mL)	FISH-EUB338 (cellules/mL)	FISH-ENT1 (cellules/mL)	DAPI (cellules/mL)
19/05/03	7,05	366	43	1,49	3,20E+01	3,80E+03	<0,01	1,58E+05	2,64E+02	1,98E+05
27/05/03	6,62	250	80	1,45	1,20E+01	3,90E+01	<0,01	7,85E+04	7,51E+02	2,19E+05
02/06/03	6,39	253	61,7	-	3,35E+02	1,84E+02	<0,01	1,51E+05	9,22E+02	4,00E+05
10/06/03	6,39	253	9,2	1,56	2,60E+02	3,35E+02	<0,01	3,02E+05	3,32E+02	6,27E+05
16/06/03	6,8	344	5,9	1,58	0,00E+00	1,00E+00	<0,01	3,60E+05	3,43E+03	5,42E+05
23/06/03	7,03	376	28,3	1,64	1,21E+02	1,25E+02	<0,01	1,80E+05	1,50E+03	7,83E+05
30/06/03	7,02	436	39	1,95	4,15E+01	4,70E+01	<0,01	1,98E+05	7,10E+02	4,85E+05
08/07/03	6,88	324	74,3	-	7,00E+01	9,80E+01	<0,01	1,30E+05	1,25E+03	3,69E+05
29/07/03	7,19	507	33	-	4,85E+01	3,15E+02	<0,01	6,96E+04	2,84E+02	2,70E+05
04/08/03	7,05	487	12,3	1,49	1,60E+01	3,05E+01	<0,01	1,61E+05	9,35E+02	5,18E+05
11/08/03	6,98	473	31,3	2,10	2,15E+01	3,30E+01	<0,01	1,64E+05	5,13E+02	4,51E+05
19/08/03	6,85	481	5,5	1,56	4,50E+00	3,65E+01	<0,01	1,86E+05	4,97E+02	5,37E+05
25/08/03	6,91	530	62,9	1,71	3,65E+01	4,90E+01	<0,01	1,27E+05	1,43E+03	3,88E+05
01/09/03	6,86	475	3,9	1,51	1,95E+02	4,10E+02	<0,01	3,11E+05	4,16E+02	4,67E+05
08/09/03	7,03	471	17,4	1,58	7,90E+01	1,69E+02	<0,01	1,88E+05	1,05E+03	3,15E+05
15/09/03	6,92	430	35,6	1,65	1,50E+00	4,00E+00	<0,01	7,30E+04	2,03E+02	1,94E+05
22/09/03	7,02	566	53,6	1,74	1,12E+02	1,58E+02	<0,01	1,02E+05	2,24E+02	2,90E+05
29/09/03	7,24	563	58,5	2,03	1,64E+02	3,75E+02	<0,01	1,21E+05	3,15E+02	2,64E+05
07/10/03	7,1	346	13,2	1,96	2,60E+01	6,20E+01	<0,01	1,26E+05	1,93E+02	1,91E+05
13/10/03	6,45	225	4,5	1,76	5,00E-01	1,00E+00	<0,01	-	-	2,14E+04
20/10/03	6,96	340	13	1,75	5,00E+00	1,15E+02	<0,01	9,72E+04	6,39E+02	1,54E+05
28/10/03	7,16	331	29,1	1,81	5,00E-01	2,00E+00	<0,01	8,72E+04	9,17E+03	2,52E+05
17/11/03	6,97	311	32,3	1,61	5,00E-01	1,00E+00	<0,01	5,05E+04	1,19E+02	8,28E+04
24/11/03	7,03	287	39	1,79	2,00E+00	1,15E+01	<0,01	7,61E+04	7,92E+01	1,43E+05
08/12/03	7,07	275	17	1,71	3,00E+00	7,00E+00	<0,01	-	-	1,95E+04
23/12/03	6,32	177	55	1,50	1,50E+00	2,00E+01	<0,01	4,34E+04	8,11E+01	2,90E+04
13/01/04	6,97	225	50	2,55	2,00E+00	2,44E+02	<0,01	8,04E+04	4,06E+01	9,42E+04
27/01/04	6,88	238	60	1,81	5,00E-01	5,00E-01	<0,01	5,88E+04	7,01E+01	6,14E+04
10/02/04	6,26	190	10,7	1,42	5,00E-01	4,10E+01	<0,01	7,55E+04	9,79E+01	7,08E+04
24/02/04	6,76	281	-	1,80	0,00E+00	2,50E+00	<0,01	4,39E+04	-	8,20E+04
09/03/04	7,11	287	58,7	1,85	8,75E+01	1,21E+02	<0,01	1,06E+05	1,01E+02	1,19E+05
23/03/04	6,54	176	90	1,56	5,50E+00	2,63E+02	<0,01	1,84E+05	1,15E+02	2,75E+05
14/04/04	-	-	76	1,67	4,00E+01	8,20E+02	<0,01	1,24E+05	1,42E+02	1,70E+05
27/04/04	8,97	242	23,5	0,67	1,50E+00	3,50E+00	<0,01	1,62E+05	6,60E+01	1,77E+05
11/05/04	6,44	144,1	38,4	1,48	7,64E+02	7,90E+02	<0,01	1,36E+05	2,20E+01	1,73E+05
02/06/04	7,04	290	69	1,30	7,16E+03	7,90E+03	<0,01	1,47E+05	9,66E+01	1,65E+05

Tableau X.19. Paramètres physico-chimiques et microbiologiques de l'eau traitée (sortie usine) sur les 12 mois d'analyse (CT=coliformes cultivables, - : non déterminé).

Date prélèvement	pH	conductivité (μS/cm)	COD (mg/L)	CODB (mg/L)	PCA 3j (UFC/mL)	PCA 15j (UFC/mL)	CT (UFC/mL)	FISH-EUB338 (cellules/mL)	FISH-ENT1 (cellules/mL)	DAPI (cellules/mL)
19/05/03	7,74	381	1,29	-	2,50E+00	1,10E+02	<0,01	5,93E+04	2,30E+02	2,62E+05
27/05/03	7,21	239	1,21	0,15	1,00E+00	3,00E+00	<0,01	5,13E+03	9,13E+02	2,88E+05
02/06/03	7,1	261	1,42	-	1,00E+00	1,50E+00	<0,01	8,75E+03	1,13E+03	2,96E+05
10/06/03	7,1	261	1,45	0,09	0,00E+00	5,00E-01	<0,01	6,70E+04	2,43E+02	4,10E+05
16/06/03	7,45	355	1,50	-	2,00E+00	4,00E+00	<0,01	9,18E+04	2,07E+03	2,11E+05
23/06/03	7,56	401	1,44	0,16	2,00E+00	5,00E+00	<0,01	6,70E+04	5,99E+02	9,55E+05
30/06/03	7,43	452	1,80	-	1,50E+00	3,00E+00	<0,01	3,98E+04	3,96E+02	5,32E+05
08/07/03	7,38	341	1,51	0,19	3,00E+00	4,50E+00	<0,01	3,41E+04	4,26E+02	4,92E+05
29/07/03	7,65	524	1,35	0,07	0,00E+00	9,50E+00	<0,01	1,33E+04	5,84E+02	2,36E+05
04/08/03	7,35	492	1,37	-	1,00E+00	1,25E+01	<0,01	1,03E+05	3,96E+02	2,57E+05
11/08/03	7,58	493	1,70	0,36	5,00E-01	1,00E+00	<0,01	9,56E+04	2,08E+02	1,63E+05
19/08/03	7,36	503	1,52	-	0,00E+00	5,50E+00	<0,01	8,52E+04	2,23E+02	1,87E+05
25/08/03	7,64	520	1,61	0,17	5,00E-01	6,50E+00	<0,01	1,26E+05	5,99E+02	3,61E+05
01/09/03	7,38	504	1,52	-	0,00E+00	3,50E+00	<0,01	1,52E+05	3,86E+02	3,08E+05
08/09/03	7,59	496	1,87	0,41	5,00E-01	3,00E+00	<0,01	5,14E+04	5,38E+02	3,55E+05
15/09/03	7,48	457	1,46	-	1,00E+00	2,00E+00	<0,01	6,04E+04	2,54E+02	1,60E+05
22/09/03	7,42	514	1,70	0,12	2,50E+00	3,00E+00	<0,01	8,44E+04	2,33E+02	3,88E+05
29/09/03	7,56	537	2,05	-	0,00E+00	5,00E-01	<0,01	4,30E+04	2,64E+02	6,36E+04
07/10/03	7,68	359	1,79	0,40	5,00E-01	2,00E+00	<0,01	7,99E+04	2,44E+02	2,33E+05
13/10/03	7,68	237	1,35	-	0,00E+00	1,50E+00	<0,01	-	-	2,40E+04
20/10/03	7,48	371	1,62	0,20	0,00E+00	3,50E+00	<0,01	3,19E+04	6,60E+02	3,63E+04
28/10/03	7,71	350	1,73	-	0,00E+00	0,00E+00	<0,01	3,67E+04	1,08E+02	5,63E+04
17/11/03	7,56	318	1,56	0,24	0,00E+00	1,00E+00	<0,01	2,34E+04	1,56E+02	3,60E+04
24/11/03	7,56	315	1,52	0,20	5,00E-01	5,00E-01	<0,01	1,94E+04	1,42E+02	2,49E+04
08/12/03	7,63	301	1,60	-	0,00E+00	5,00E-01	<0,01	-	-	2,84E+04
23/12/03	7,21	197	1,46	0,12	0,00E+00	5,00E-01	<0,01	2,68E+04	6,09E+01	3,29E+04
13/01/04	7,19	247	2,08	0,29	5,00E-01	5,00E-01	<0,01	1,76E+04	2,03E+01	2,25E+04
27/01/04	7,34	254	1,82	0,44	5,00E-01	3,00E+00	<0,01	2,97E+04	3,38E+01	3,80E+04
10/02/04	7,32	208	1,25	0,02	0,00E+00	0,00E+00	<0,01	4,99E+04	7,78E+01	1,02E+05
24/02/04	7,23	253	1,93	0,00	0,00E+00	0,00E+00	-	6,94E+04	-	1,15E+05
09/03/04	7,4	308	2,16	0,77	0,00E+00	0,00E+00	<0,01	5,64E+04	7,76E+01	7,84E+04
23/03/04	7,06	198	1,47	0,15	5,00E-01	5,00E-01	<0,01	8,16E+04	5,41E+01	1,69E+05
14/04/04	-	-	1,41	0,13	0,00E+00	2,50E+00	<0,01	1,18E+05	8,11E+01	1,94E+05
27/04/04	7,52	267	2,05	0,58	5,00E-01	1,00E+00	<0,01	6,53E+04	5,07E+01	9,32E+04
11/05/04	7,27	159,1	1,80	0,57	0,00E+00	2,00E+00	<0,01	6,90E+04	5,58E+01	1,00E+05
02/06/04	7,7	316	1,66	0,49	1,00E+00	2,50E+00	<0,01	8,02E+04	4,06E+01	1,17E+05

- Evolution des concentrations en bactéries totales, *Enterobacteriaceae* et coliformes cultivables dans l'eau CAG

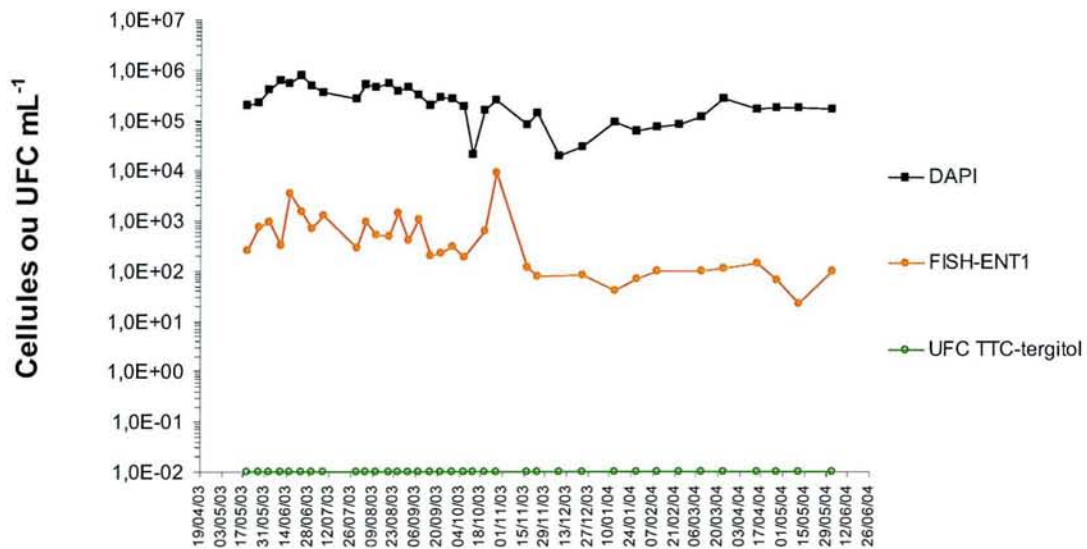


Figure X.2. Evolution des paramètres microbiologiques entre mai 2003 et juin 2004 dans l'eau CAG. Chaque point correspond à deux mesures.

• Matrice de corrélation des principaux paramètres mesurés sur l'eau brute et l'eau traitée

Tableau X.20. Matrice de corrélation des principaux paramètres mesurés sur l'eau brute (EB) et l'eau traitée (ET). Les valeurs soulignées une fois sont significatives au risque de 5%, les valeurs soulignées deux fois sont significatives au risque de 1% (CT=coliformes totaux cultivables).

	T° ET	préCl ₂ EB	postCl ₂ ET	COD EB	CODB EB	log Dapi EB	log PCA EB	log CT EB	pH EB	Conduct EB	log ENT1 EB	log EUB338 EB	log algues EB	COD ET	CODB ET	log Dapi ET	log PCA ET	pH ET	conduct ET	log ENT ET	log EUB ET
T° ET	1																				
préCl ₂ EB	0,48	1																			
postCl ₂ ET	0,9	<u>0,49</u>	1																		
COD EB	0,1	0,31	-0,13	1																	
CODB EB	-0,05	0,09	-0,19	<u>0,74</u>	1																
log Dapi EB	-0,01	0,13	0,15	-0,15	-0,4	1															
log PCA EB	-0,33	0,004	<u>-0,36</u>	<u>0,59</u>	0,35	0,08	1														
log CT EB	<u>-0,59</u>	0,04	<u>-0,56</u>	<u>0,48</u>	0,18	0,16	<u>0,47</u>	1													
pH EB	<u>0,66</u>	<u>0,35</u>	<u>0,74</u>	-0,07	-0,11	-0,02	-0,11	-0,31	1												
Conduct EB	<u>0,68</u>	0,18	<u>0,69</u>	-0,28	-0,2	-0,15	-0,27	<u>-0,49</u>	<u>0,75</u>	1											
log ENT1 EB	<u>0,51</u>	0,11	<u>0,51</u>	0,17	0,05	0,21	-0,07	-0,2	<u>0,43</u>	<u>0,44</u>	1										
log EUB338 EB	-0,31	-0,19	-0,17	0,27	0,11	0,05	0,27	0,08	-0,09	<u>-0,36</u>	-0,07	1									
Log algues EB	<u>0,85</u>	<u>0,42</u>	<u>0,82</u>	-0,24	-0,22	-0,06	-0,45	<u>-0,58</u>	<u>0,58</u>	<u>0,71</u>	<u>0,47</u>	-0,15	1								
COD ET	-0,28	0,08	-0,3	0,33	0,22	-0,05	0,27	0,16	-0,02	0,01	-0,35	0,25	-0,23	1							
CODB ET	-0,17	-0,08	-0,18	0,34	0,3	-0,07	0,02	-0,09	0,02	-0,06	-0,2	0,26	-0,24	<u>0,7</u>	1						
log Dapi ET	<u>0,73</u>	<u>0,34</u>	<u>0,71</u>	-0,09	0,03	0,11	-0,32	<u>-0,43</u>	<u>0,49</u>	<u>0,46</u>	<u>0,4</u>	<u>-0,41</u>	<u>0,47</u>	-0,27	-0,21	1					
log PCA ET	<u>0,5</u>	0,13	<u>0,58</u>	-0,12	-0,06	0,18	-0,19	-0,3	<u>0,57</u>	<u>0,57</u>	<u>0,38</u>	-0,31	<u>0,46</u>	<u>-0,37</u>	-0,04	<u>0,52</u>	1				
pH ET	0,14	-0,05	0,21	-0,23	0,02	-0,17	-0,28	<u>-0,43</u>	<u>0,4</u>	<u>0,48</u>	0,13	0,07	0,11	0,05	0,27	-0,03	0,29	1			
Conduct ET	<u>0,67</u>	0,19	<u>0,64</u>	-0,17	-0,06	-0,18	-0,18	<u>-0,43</u>	<u>0,73</u>	<u>0,99</u>	0,34	-0,33	<u>0,53</u>	0,04	-0,08	<u>0,36</u>	0,12	<u>0,47</u>	1		
log ENT1 ET	<u>0,73</u>	0,14	<u>0,7</u>	0,34	-0,33	-0,03	<u>-0,53</u>	<u>-0,67</u>	<u>0,5</u>	<u>0,58</u>	<u>0,53</u>	-0,15	<u>0,77</u>	<u>-0,41</u>	-0,39	<u>0,6</u>	<u>0,44</u>	0,14	<u>0,51</u>	1	
log EUB338 ET	0,22	-0,01	0,21	0,01	0,16	-0,03	-0,17	0,08	0,31	0,28	0,32	-0,19	0,09	0,14	0,17	0,3	0,16	0,22	<u>0,34</u>	-0,1	1

X.4.2. Résultats présentés au § VII.3

Tableau X.21. Evolution de la population bactérienne dans l'eau traitée déchlorée incubée à 22°C pendant 11 j.

	Temps (j)	0	1	2	4	7	11
EXPERIENCE A	NH ₄ (mg/L)	<0,05	-	-	-	-	-
	NO ₂ (mg/L)	<0,01	-	-	-	-	-
	NO ₃ (mg/L)	3,00	-	-	-	-	-
	P (mg/L)	0,36	-	-	-	-	-
	pH	7,30	-	-	-	-	-
	Conductivité (μS/cm)	207	-	-	-	-	-
	COD (mg/L)	1,52 ± 0,01	-	-	-	-	3,16
	Bactéries totales (cellules/mL)	3,26E+05	4,50E+05	4,12E+05	9,63E+05	1,22E+06	2,06E+06
	Bactéries avec membrane intègre (cellules/mL)	9,99E+04	1,51E+05	1,43E+05	3,61E+05	7,00E+05	1,55E+06
	FISH-EUB338 (cells/mL)	8,72E+04	1,87E+05	1,46E+05	7,81E+05	1,22E+06	1,65E+06
	FISH-ENT1 (cells/mL)	2,84E+01	3,25E+01	3,65E+01	4,87E+01	1,62E+01	2,03E+01
	DVC-FISH-ENT1 (cells/mL)	2,43E+01	4,06E+01	2,43E+01	7,71E+01	5,27E+01	3,65E+01
	UFC PCA 15j (UFC/mL)	2,15E+01 ± 2,12E+00	1,39E+02 ± 2,83E+00	3,30E+02 ± 2,83E+01	3,24E+04 ± 1,44E+04	2,90E+04 ± 8,49E+03	3,35E+03 ± 2,12E+02
	UFC TTC-tergitol (UFC/mL)	<0,1 ± 0	<0,1 ± 0	<0,1 ± 0	<0,1 ± 0	<0,1 ± 0	<0,1 ± 0
EXPERIENCE B	NH ₄ (mg/L)	<0,05	-	-	-	-	-
	NO ₂ (mg/L)	<0,01	-	-	-	-	-
	NO ₃ (mg/L)	4,00	-	-	-	-	-
	P (mg/L)	0,12	-	-	-	-	-
	pH	7,33	-	-	-	-	-
	Conductivité (μS/cm)	237	-	-	-	-	-
	COD (mg/L)	1,55	-	-	-	-	2,12
	Bactéries totales (cellules/mL)	5,01E+05	5,15E+05	5,20E+05	6,65E+05	1,23E+06	1,27E+06
	Bactéries avec membrane intègre (cellules/mL)	1,98E+05	1,50E+05	2,48E+05	3,61E+05	8,22E+05	1,15E+06
	FISH-EUB338 (cells/mL)	2,11E+05	2,87E+05	3,78E+05	6,12E+05	1,01E+06	1,22E+06
	FISH-ENT1 (cells/mL)	52,7	32,5	60,9	64,9	69	40,6
	DVC-FISH-ENT1 (cells/mL)	5,68E+01	4,06E+01	5,68E+01	7,30E+01	9,33E+01	5,68E+01
	UFC PCA 15j (UFC/mL)	7,00E+00 -	1,39E+02 -	3,30E+02 -	9,40E-03 -	3,10E+04 -	1,70E+04 -
	UFC TTC-tergitol (UFC/mL)	<0,01 -	<0,01 -	<0,01 -	<0,01 -	<0,01 -	<0,01 -

Tableau X.22. Evolution de la population bactérienne dans de l'eau traitée déchlorée supplémentée avec de la MOA-NS et incubée à 22°C pendant 11 j.

	Temps (j)	0	1	2	4	7	11
EXPERIENCE A	NH ₄ (mg/L)	<0,05	-	-	-	-	-
	NO ₂ (mg/L)	<0,01	-	-	-	-	-
	NO ₃ (mg/L)	3,00	-	-	-	-	-
	P (mg/L)	0,12	-	-	-	-	-
	pH	7,39	-	-	-	-	-
	Conductivité (μS/cm)	218	-	-	-	-	-
	COD (mg/L)	1,94 ± 0,003	-	-	-	-	3,59
	Bactéries totales (cellules/mL)	2,98E+05	4,00E+05	3,78E+05	1,10E+06	1,95E+06	3,80E+06
	Bactéries avec membrane intègre (cellules/mL)	5,60E+04	1,30E+05	1,26E+05	3,99E+05	8,00E+05	2,04E+06
	FISH-EUB338 (cells/mL)	1,18E+05	1,60E+05	1,24E+05	1,05E+06	1,54E+06	3,53E+06
	FISH-ENT1 (cells/mL)	36,5	36,5	40,6	44,6	77,1	40,6
	DVC-FISH-ENT1 (cells/mL)	28,4	24,3	44,6	52,7	93,3	73
	UFC PCA 15j (UFC/mL)	4,85E+01 ± 1,48E+01	4,05E+01 ± 6,36E+00	2,25E+02 ± 6,36E+01	3,76E+03 ± 4,53E+02	2,54E+04 ± 5,37E+03	1,20E+04 ± 1,41E+02
	UFC TTC-tergitol (UFC/mL)	<0,1 ± 0	<0,1 ± 0	<0,1 ± 0	<0,1 ± 0	<0,1 ± 0	<0,1 ± 0

Tableau X.22 (suite).

EXPERIENCE B	Temps (j)	0	1	2	4	7	11
	NH ₄ (mg/L)	<0,05	-	-	-	-	-
	NO ₂ (mg/L)	<0,01	-	-	-	-	-
	NO ₃ (mg/L)	4,20	-	-	-	-	-
	P (mg/L)	0,14	-	-	-	-	-
	pH	7,38	-	-	-	-	-
	Conductivité (µS/cm)	246	-	-	-	-	-
	COD (mg/L)	1,86E+00	-	-	-	-	2,09E+00
	Bactéries totales (cellules/mL)	4,81E+05	5,21E+05	5,59E+05	1,25E+06	3,27E+06	4,23E+06
	Bactéries avec membrane intégrée (cellules/mL)	1,24E+05	1,78E+05	2,39E+05	7,21E+05	1,16E+06	3,64E+06
	FISH-EUB338 (cells/mL)	2,31E+05	2,97E+05	3,45E+05	1,01E+06	3,02E+06	3,53E+06
	FISH-ENT1 (cells/mL)	40,6	48,7	60,9	56,8	73	89,3
	DVC-FISH-ENT1 (cells/mL)	3,65E+01	5,27E+01	4,46E+01	6,49E+01	1,30E+02	1,14E+02
	UFC PCA 15j (UFC/mL)	5,00E+00	5,50E+01	3,09E+02	3,25E+03	4,80E+04	4,40E+04
	UFC TTC-tergitol (UFC/mL)	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1

Tableau X.23. Evolution de la population bactérienne dans de l'eau traitée déchlorée supplémentée avec de la MOA-Cl₂ et incubée à 22°C pendant 11 j.

EXPERIENCE A	Temps (j)	0	1	2	4	7	11
	NH ₄ (mg/L)	<0,05	-	-	-	-	-
	NO ₂ (mg/L)	0,01	-	-	-	-	-
	NO ₃ (mg/L)	3,00	-	-	-	-	-
	P (mg/L)	0,12	-	-	-	-	-
	pH	7,33	-	-	-	-	-
	Conductivité (µS/cm)	210	-	-	-	-	-
	COD (mg/L)	1,74 ± 0,01	-	-	-	-	2,96
	Bactéries totales (cellules/mL)	3,80E+05	4,10E+05	3,51E+05	1,20E+06	2,84E+06	4,10E+06
	Bactéries avec membrane intégrée (cellules/mL)	1,32E+05	1,27E+05	1,10E+05	7,20E+05	1,20E+06	1,87E+06
	FISH-EUB338 (cells/mL)	1,24E+05	1,68E+05	1,40E+05	1,03E+06	2,23E+06	4,00E+06
	FISH-ENT1 (cells/mL)	32,5	32,5	44,6	40,6	56,8	77,1
	DVC-FISH-ENT1 (cells/mL)	32,5	32,5	48,7	56,8	142	134
	UFC PCA 15j (UFC/mL)	1,50E+01 ± 4,24E+00	8,70E+01 ± 8,49E+00	3,95E+02 ± 3,54E+01	5,52E+04 ± 1,34E+03	1,49E+05 ± 2,12E+04	1,52E+05 ± 5,66E+03
	UFC TTC-tergitol (UFC/mL)	<0,1 ± 0	<0,1 ± 0	<0,1 ± 0	<0,1 ± 0	<0,1 ± 0	<0,1 ± 0
EXPERIENCE B	Temps (j)	0	1	2	4	7	11
	NH ₄ (mg/L)	<0,05	-	-	-	-	-
	NO ₂ (mg/L)	0,01	-	-	-	-	-
	NO ₃ (mg/L)	4,20	-	-	-	-	-
	P (mg/L)	0,17	-	-	-	-	-
	pH	7,31	-	-	-	-	-
	Conductivité (µS/cm)	230	-	-	-	-	-
	COD (mg/L)	1,80E+00	-	-	-	-	1,99
	Bactéries totales (cellules/mL)	4,60E+05	4,25E+05	4,98E+05	2,61E+06	8,38E+06	5,01E+06
	Bactéries avec membrane intégrée (cellules/mL)	2,54E+05	2,22E+05	3,10E+05	1,65E+06	4,91E+06	3,82E+06
	FISH-EUB338 (cells/mL)	1,98E+05	1,72E+05	2,29E+05	1,87E+06	4,45E+06	4,67E+06
	FISH-ENT1 (cells/mL)	60,9	69	101	122	191	158
	DVC-FISH-ENT1 (cells/mL)	6,90E+01	6,49E+01	1,14E+02	1,58E+02	2,60E+02	2,72E+02
	UFC PCA 15j (UFC/mL)	9,00E+00	9,90E+01	5,40E+02	8,50E+04	1,89E+05	1,99E+05
	UFC TTC-tergitol (UFC/mL)	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1

Tableau X.24. Evolution de la population bactérienne dans de l'eau traitée déchlorée supplémentée avec de la MOA-O₃ et incubée à 22°C pendant 11 j.

EXPERIENCE A	Temps (j)	0	1	2	4	7	11
	NH ₄ (mg/L)	<0,05	-	-	-	-	-
	NO ₂ (mg/L)	0,01	-	-	-	-	-
	NO ₃ (mg/L)	2,90	-	-	-	-	-
	P (mg/L)	0,12	-	-	-	-	-
	pH	7,33	-	-	-	-	-
	Conductivité (μS/cm)	197	-	-	-	-	-
	COD (mg/L)	1,87 ± 0,02	-	-	-	-	3,23
	Bactéries totales (cellules/mL)	2,46E+05	4,36E+05	4,49E+05	5,20E+06	4,36E+07	2,40E+07
	Bactéries avec membrane intègre (cellules/mL)	5,40E+04	1,09E+05	1,42E+04	3,01E+06	2,54E+07	1,59E+07
	FISH-EUB338 (cells/mL)	1,16E+05	1,95E+05	2,80E+05	3,98E+06	1,50E+07	2,28E+07
	FISH-ENT1 (cells/mL)	28,4	40,6	28,4	81,1	134	126
	DVC-FISH-ENT1 (cells/mL)	24,3	28,4	60,9	138	2,11E+02	312
	UFC PCA 15j (UFC/mL)	5,65E+01 ± 2,12E+00	4,48E+02 ± 1,41E+02	1,95E+04 ± 2,69E+03	7,95E+04 ± 3,54E+03	1,80E+05 ± 4,53E+04	1,40E+05 ± 6,36E+03
	UFC TTC-tergitol (UFC/mL)	<0,1 ± 0	<0,1 ± 0	<0,1 ± 0	<0,1 ± 0	<0,1 ± 0	<0,1 ± 0
EXPERIENCE B	Temps (j)	0	1	2	4	7	11
	NH ₄ (mg/L)	<0,05	-	-	-	-	-
	NO ₂ (mg/L)	<0,01	-	-	-	-	-
	NO ₃ (mg/L)	3,90	-	-	-	-	-
	P (mg/L)	0,12	-	-	-	-	-
	pH	7,34	-	-	-	-	-
	Conductivité (μS/cm)	228	-	-	-	-	-
	COD (mg/L)	1,85E+00	-	-	-	-	1,92
	Bactéries totales (cellules/mL)	5,24E+05	6,21E+05	9,84E+05	8,78E+06	5,04E+07	7,49E+07
	Bactéries avec membrane intègre (cellules/mL)	1,07E+05	1,10E+05	2,53E+05	3,11E+06	2,42E+06	5,58E+07
	FISH-EUB338 (cells/mL)	1,94E+05	2,85E+05	4,86E+05	5,62E+06	3,74E+07	5,99E+07
	FISH-ENT1 (cells/mL)	52,7	85,2	118	130	276	321
	DVC-FISH-ENT1 (cells/mL)	6,09E+01	8,93E+01	1,30E+02	1,83E+02	2,23E+02	4,26E+02
	UFC PCA 15j (UFC/mL)	5,00E+00 -	5,31E+02 -	2,21E+04 -	1,59E+05 -	2,76E+05 -	1,85E+05 -
	UFC TTC-tergitol (UFC/mL)	<0,1 -	<0,1 -	<0,1 -	<0,1 -	<0,1 -	<0,1 -

Tableau X.25. Evolution de la population bactérienne dans de l'eau traitée déchlorée supplémentée avec de l'acétate et incubée à 22°C pendant 11 jours.

EXPERIENCE A	Temps (j)	0	1	2	4	7	11
	NH ₄ (mg/L)	<0,05	-	-	-	-	-
	NO ₂ (mg/L)	0,01	-	-	-	-	-
	NO ₃ (mg/L)	2,90	-	-	-	-	-
	P (mg/L)	0,12	-	-	-	-	-
	pH	7,30	-	-	-	-	-
	Conductivité (μS/cm)	207	-	-	-	-	-
	COD (mg/L)	2,13 ± 0,02	-	-	-	-	3,26
	Bactéries totales (cellules/mL)	2,21E+05	2,99E+05	4,00E+05	4,75E+05	5,89E+05	1,01E+06
	Bactéries avec membrane intègre (cellules/mL)	6,01E+04	1,15E+05	2,03E+04	3,12E+05	3,37E+05	8,45E+05
	FISH-EUB338 (cells/mL)	1,10E+05	1,01E+05	1,66E+05	3,04E+05	4,53E+05	9,97E+05
	FISH-ENT1 (cells/mL)	24,3	36,5	40,6	52,7	64,9	24,3
	DVC-FISH-ENT1 (cells/mL)	20,3	40,6	40,6	64,9	77,1	64,9
	UFC PCA 15j (UFC/mL)	2,10E+01 ± 1,41E+00	5,25E+01 ± 6,36E+00	1,99E+02 ± 9,19E+00	5,00E+04 ± 0	1,96E+05 ± 5,66E+03	1,96E+05 ± 5,66E+03
	UFC TTC-tergitol (UFC/mL)	<0,1 ± 0	<0,1 ± 0	<0,1 ± 0	<0,1 ± 0	<0,1 ± 0	<0,1 ± 0

Tableau X.25 (suite).

EXPERIENCE B	Temps (j)	0	1	2	4	7	11
	NH ₄ (mg/L)	<0,05	-	-	-	-	-
	NO ₂ (mg/L)	0,01	-	-	-	-	-
	NO ₃ (mg/L)	3,10	-	-	-	-	-
	P (mg/L)	0,14	-	-	-	-	-
	pH	7,32	-	-	-	-	-
	Conductivité (μS/cm)	229	-	-	-	-	-
	COD (mg/L)	1,83E+00	-	-	-	-	2,1
	Bactéries totales (cellules/mL)	3,62E+05	3,59E+05	3,20E+05	6,53E+05	1,87E+06	1,01E+06
	Bactéries avec membrane intègre (cellules/mL)	1,20E+05	2,27E+05	1,81E+05	5,05E+05	8,63E+05	7,03E+05
	FISH-EUB338 (cells/mL)	1,33E-05	1,98E+05	2,76E+05	4,52E+05	5,77E+05	8,41E+05
	FISH-ENT1 (cells/mL)	48,7	73	60,9	69	77,1	81,1
	DVC-FISH-ENT1 (cells/mL)	6,49E+01	7,71E+01	4,87E+01	9,33E+01	8,11E+01	1,34E+02
	UFC PCA 15j (UFC/mL)	4,00E-00	5,90E+01	7,80E-02	4,10E+04	1,45E+05	1,51E+05
	UFC TTC-tergitol (UFC/mL)	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1



Prénom, Nom : **Céline BOUTELEUX**

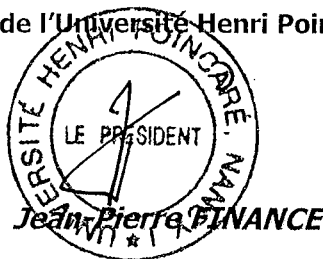
Nature de la thèse :

**Doctorat de l'Université Henri Poincaré, Nancy 1
en Biologie - Santé - Environnement**

VU, APPROUVE et PERMIS D'IMPRIMER N° J055

Nancy, le 6 juin 2005

Le Président de l'Université Henri Poincaré, Nancy I



Résumé

Parmi les microorganismes présents dans l'eau de distribution, les Entérobactéries revêtent une importance particulière puisque la plupart présente un pouvoir pathogène ou pathogène opportuniste et que certaines (les coliformes) sont utilisées comme indicateur de contamination fécale des eaux. La survie de ces microorganismes, comme toute bactérie hétérotrophe, est fortement dépendante de la matière organique dissoute biodégradable présente dans les eaux. Ce travail a donc eu pour objectif d'étudier l'influence d'une matière organique particulière - la matière organique d'origine algale (MOA) - sur la survie de ces bactéries dans les eaux potables. Le comportement des Entérobactéries (croissance, cultivabilité, intégrité membranaire et hybridation avec une sonde oligonucléotidique) dans des eaux de distribution stériles ou non stériles et supplémentées avec de la MOA (+0,2 mg CODB L⁻¹) a donc été étudié en conditions statiques et dynamiques. Deux origines de MOA, susceptibles d'être retrouvées en eau potable, ont été testées : (i) la MOA issue de la sécrétion naturelle des algues au cours de leur croissance (MOA-NS), (ii) la MOA relarguée par des algues suite à un stress oxydant, soit au chlore (MOA-Cl₂), soit à l'ozone (MOA-O₃).

L'analyse de la MOA obtenue dans nos essais à partir d'une culture de laboratoire (algues issues d'eau de rivière) a montré que, quelle que soit son origine, la MOA contient une forte proportion de sucres (47-71%), quelques acides aminés (2-8%), peu de composés aromatiques (SUVA₂₅₄ faible) et des quantités négligeables de protéines (0-0,1%). Cette composition confère à la MOA un fort potentiel biodégradable (54%<CODB<81%).

L'effet de la MOA a tout d'abord été apprécié sur une souche d'*E. coli*, choisie comme modèle d'Entérobactérie, massivement injectée dans une eau de réseau (10⁵ cellules mL⁻¹). En conditions statiques, l'ajout de MOA dans de l'eau de réseau déchlorée stérile favorise la survie d'*E. coli* en augmentant sa croissance et/ou sa cultivabilité. En présence des bactéries autochtones, l'ajout de MOA s'est au contraire avéré défavorable à la survie d'*E. coli* (perte de la cultivabilité 2 à 3 fois plus rapide), sans doute à cause de phénomènes de compétition avec la population autochtone. Seule la MOA-O₃ a permis une augmentation transitoire du nombre d'*E. coli* détectés par FISH (+0,6 log).

En conditions dynamiques (réacteurs Propella™), aucun effet significatif de la MOA-NS n'a été mis en évidence sur la population d'*E. coli* fixés dans le biofilm. Par contre, elle a permis de réduire la vitesse de disparition des *E. coli* planctoniques (totaux et cultivables), sans permettre pour autant une colonisation durable des pilotes.

Finalement, l'effet de la MOA sur la population d'*Enterobacteriaceae* naturellement présentes dans les eaux de distribution et mises en évidence grâce à la méthode FISH a confirmé l'effet favorable de la MOA : selon son origine, la MOA a permis de multiplier par 2 à 5 le nombre d'*Enterobacteriaceae* de l'eau, démontrant qu'une fraction de cette population est viable et capable d'utiliser cette MOA comme substrat.

Quelles que soient les conditions testées, l'ajout de MOA a toujours permis une survie des Entérobactéries soit comparable soit meilleure que celle mesurée dans de l'acétate, pris comme référence de molécule facilement biodégradable, suggérant la facilité d'utilisation de la MOA par les bactéries. Cependant, les différences de comportement observées selon l'origine de la MOA, malgré des ajouts équivalents en terme de CODB, mettent en évidence l'importance de la nature des composés organiques et montrent que la mesure du CODB n'est pas suffisante pour prédire la stabilité biologique d'une eau potable.

Mots clés : matière organique algale, COD, CODB, Entérobactéries, coliformes, *E. coli*, hybridation *in situ*, eau potable.