

# Effet du chlore sur la colonisation bactérienne d'un réseau expérimental de distribution d'eau

Effect of chlorine on the bacterial colonisation of a model distribution system

J.L. PAQUIN<sup>1</sup>, J.C. BLOCK<sup>1</sup>, K. HAUDIDIER<sup>1</sup>,  
P. HARTEMANN<sup>1</sup>, F. COLIN<sup>1</sup>, J. MIAZGA<sup>2</sup>, Y. LEVI<sup>3</sup>

Reçu le 27 mars 1991, accepté pour publication le 22 janvier 1992\*.

## SUMMARY

**Bacterial accumulation in drinking water systems results both of cell deposition on the pipe walls and attached bacteria growth. The presence of a complex biofilm (cells embedded in a matrix of exopolymers) leads to a continuous contamination of the water phase resulting from the erosion of the attached growing biomass. Then, many tentatives to limit the formation of such a biofilm have been suggested as the removal of biodegradable organic matter from water or as the application of disinfectant. However, the efficiency of chlorination of the distribution system is debatable. Indeed, adhesion is often described as a factor of protection of attached bacteria which counterbalances the expected effect of disinfectant. Then, the aim of this experimental work is using a model distribution system to evaluate (i) the kinetics of biofilm accumulation on coupons of new materials (Polyvinyl chlorure : PVC, polyethylene : PE, cement) disposed in a constantly chlorinated system (residual total chlorine from 0.02 to 2.4 mg. l<sup>-1</sup>), (ii) the effect of chlorination on previously accumulated biofilms.**

The industrial pilot plant used in this study is comprised of five loops serially disposed (*fig.1*). From previous study of simulation, one may assume that each loop works like a perfectly mixed reactor when the whole pilot plant is equivalent to an infinite tubular reactor with high axial dispersion coefficient. During the experiment, the pilot was continuously fed with finished drinking water from the surface water treatment plant of city of Nancy (i.e. natural finished water with its own chlorine demand, organic nutrients and heterotrophic bacteria).

Total number of cells (epifluorescence counts) and heterotrophic plate count bacteria (15 days of incubation at 20° C) were enumerated both in the water and, after sonication, on the surface of the coupons of tested materials.

1. G.I.P. Stelor, 11 bis, rue G. Péri, 54500 Vandœuvre les Nancy, France.
2. Centre de Recherche de Pont à Mousson S.A., BP 109, 54704 Pont à Mousson, France.
3. Compagnie générale des eaux, 52, rue d'Anjou, 75008 Paris, France.

\* Les commentaires seront reçus jusqu'au 30 mars 1993.

The first experimentations show that chlorine slows down the kinetic of deposition of bacteria onto the pipe wall but never prohibits biofilm formation. When the drinking waters carried from 2.4 to 0.02 mg. l<sup>-1</sup> of chlorine and from 0.5 to 5 x 10<sup>5</sup> ml<sup>-1</sup> bacteria! cells, biofilm is observed after 24 hours of immersion of the coupons with at least 10<sup>1</sup> to 10<sup>6</sup> bacteria/cm<sup>2</sup>. Respectively, the deposition or/and growth rates of total cells are drastically affected only for chlorine residual as high as 1 to 2.4 mg. l<sup>-1</sup>. The number of heterotrophic plate count of the biofilm is affected with lower chlorine residual (around 0.3 mg. l<sup>-1</sup>) but residual concentration as low as 0.05 mg. l<sup>-1</sup> are ineffective.

The tentatives carried out in the second experience on preformed biofilms (2 months old biofilms, 8.7 x 10<sup>6</sup> cells/cm<sup>2</sup>) show that the continuous application of 2.3 to 3.4 mg. l<sup>-1</sup> of residual chlorine for 14 days, leads to the removal of only 90 % of attached total cells without modifications of the proportion of attached alive bacteria (around 1.7 %) into the biofilm. In other words, a highly chlorinated networks shows at minima 10<sup>6</sup> attached cells/cm<sup>2</sup>. Its generally takes several days to reply to the chlorine demand of the system and to have a quasi steady state reactor in terms of residual chlorine.

These assays carried out with three types of coupons (PVC, PE, cement lined cast iron) did not show any difference between the tested materials.

The limited efficiency of chlorine against the biofilm can be explained by transfert limitations within the visquous layer, high consumption of chlorine by the biopolymers of the attached matrix (proteins,...) or low sensitivity to the disinfectant of the slow growing attached bacteria. Then chlorination is really not a panacea in biofilm war but has to be applied in combination with other methods as biodegradable organic matter removal, hydraulic regime improvement...

**Key-words :** *biofilm, disinfection, chlorine, drinking water distribution system.*

## RÉSUMÉ

La contamination bactérienne de la phase eau d'un réseau de distribution résulte d'une multiplication des bactéries sur les parois des canalisations d'eau (biofilms) suivie de leur arrachage et de leur transport dans le flux circulant. Ce travail met en évidence l'effet du chlore, d'une part, sur la formation des biofilms et, d'autre part, sur des biofilms déjà constitués. Des éprouvettes de matériaux neufs introduites dans des eaux présentant des concentrations en chlore total variant de 2,4 à 0,02 mg/l et véhiculant entre 0,5 x 10<sup>5</sup> et 5 x 10<sup>5</sup> cellules bactériennes/ml (dont 1 à 10 % de bactéries cultivables) sont rapidement colonisées (10<sup>6</sup> à 10<sup>8</sup> cellules/cm<sup>2</sup>). L'effet du chlore est sensible sur les cellules totales pour des concentrations de l'ordre de 1 à 2,4 mg/l. Sur les bactéries cultivables, un ralentissement de la croissance du biofilm est observé dès 0,3 mg/l de chlore total. Par contre, des résiduels de 0,02 ou 0,05 mg/l sont sans effet sur la cinétique de formation des biofilms. Des résiduels moyens de chlore total compris entre 2,3 et 3,4 mg/l appliqués en continu pendant 14 jours sur un biofilm constitué d'environ 8,7 x 10<sup>6</sup> cellules par cm<sup>2</sup> (1,7 % de bactéries cultivables), entraînent l'élimination d'environ 90 % des bactéries fixées (abattement d'1 logarithme) durant les premiers jours d'exposition. L'altération du biofilm exposé à un résiduel de chlore total de l'ordre de 1,3 mg/l est identique, mais toutefois plus étalée dans le temps. Ces essais réalisés sur des éprouvettes de PVC, PE et mortier de ciment n'ont pas permis la mise en évidence de comportements différents de ces 3 supports.

**Mots clés :** *biofilm, désinfection, chlore, réseau de distribution d'eau.*

## 1 - INTRODUCTION

La prolifération des micro-organismes dans les réseaux de distribution d'eau potable résulte le plus souvent d'une multiplication des bactéries sur les parois des tuyaux de distribution suivie de leur arrachage et de leur transport par l'eau (MAUL *et al.*, 1989 ; VAN DER WENDE *et al.*, 1989).

De fait, tout matériau immergé dans l'eau est colonisé très rapidement et la principale conséquence est l'accumulation à la surface des tuyaux d'une biomasse prise dans une matrice de polymères encore appelée biofilm (ALLEN *et al.*, 1980 ; HAUDIDER *et al.*, 1988 ; LECHEVALLIER *et al.*, 1987 PEDERSEN, 1990).

Limiter l'accumulation d'un tel biofilm est relativement compliqué et nécessite de diminuer les concentrations en matière organique biodégradable (LEVI, 1990) ou/et d'appliquer des biocides comme le chlore (NORRMAN *et al.*, 1977). Toutefois, la chloration en réseau semble d'une efficacité réelle mais limitée (CHARACKLIS *et al.*, 1980) car l'adhésion est décrite le plus souvent comme un facteur de protection vis-à-vis des oxydants (HERSON *et al.*, 1987 ; LECHEVALLIER *et al.*, 1988 a et b, 1984 ; MATHIEU *et al.*, 1990).

L'efficacité du chlore sur les micro-organismes fixés est en effet contrôlée par au moins quatre facteurs : la demande en chlore de l'eau, la quantité de biofilm accumulée, la concentration de chlore à l'interface eau-matériau, la dose de chlore appliquée (CHARACKLIS *et al.*, 1990). De fait, la difficulté réside dans l'impossibilité de prédire précisément les taux de traitement à appliquer pour éliminer ou limiter l'accumulation d'un biofilm responsable de la salissure continue de l'eau (BLOCK *et al.*, 1992) ; ceci impose le plus souvent une expérimentation *in situ* pour ajuster le traitement.

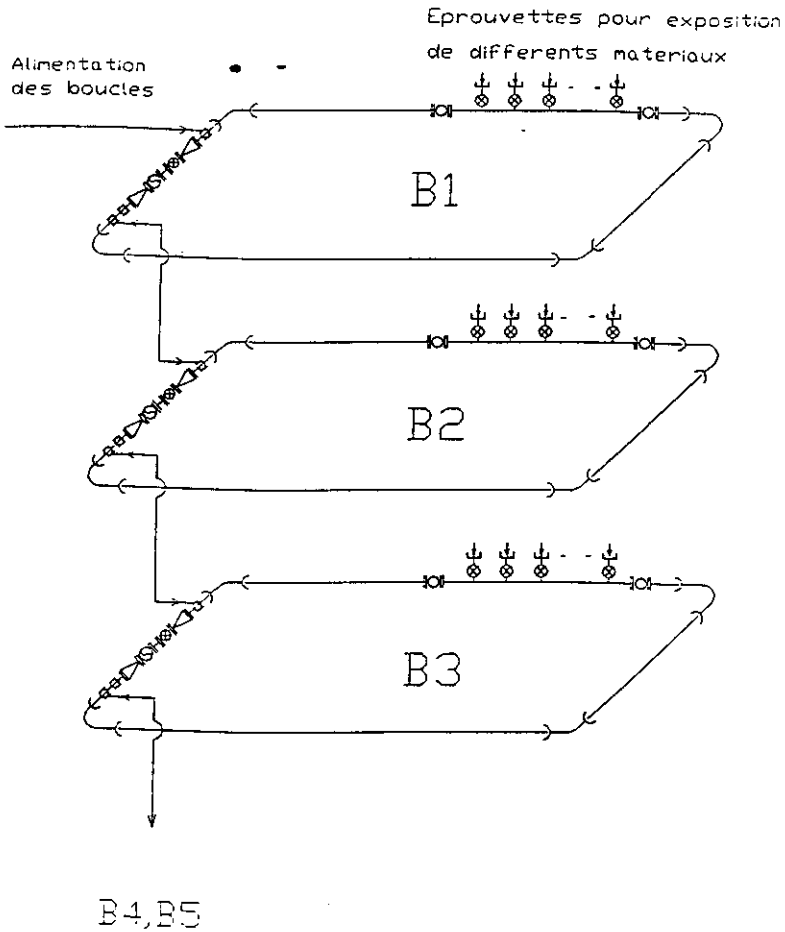
Aussi l'objet de cette étude est (i) d'évaluer, sur un réseau de distribution expérimental de taille industrielle, l'effet du chlore sur la formation de biofilms sur des échantillons de matériaux neufs (polychlorure de vinyle, mortier de ciment, polyéthylène) ou au contraire (ii), sur des biofilms déjà constitués, et par voie de conséquence (iii), tenter de définir une concentration de chlore résiduel efficace vis-à-vis des biofilms.

## 2 - MATÉRIEL ET MÉTHODES

### 2.1 Le réseau pilote expérimental

Le réseau expérimental sur lequel ont été réalisés les essais est constitué d'une succession de 3 à 5 boucles montées en série. Le système est alimenté par de l'eau traitée, à un débit variable selon les essais, dont l'importance détermine le temps de séjour de l'eau dans l'installation (*fig. 1*). Chaque boucle, d'une longueur de 31 m, est constituée de tuyaux de fonte à revête-

ment interne de mortier de ciment centrifugé, d'un diamètre de 100 mm. La vitesse de circulation de l'eau est de 1 m/s. Une étude préliminaire (COLIN *et al.*, 1987) a démontré que chaque boucle se comporte comme un réacteur parfaitement mélangé. La température de l'eau dans le réseau pilote a été maintenue aux environs de  $20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  tout au long des essais.



**Figure 1** Schéma du réseau pilote expérimental.  
*Schematic representation of the experimental distribution system.*

Durant les différentes expériences, le pilote a été alimenté par de l'eau potable provenant de la station de traitement Imbeaux de l'agglomération nancéienne dont les caractéristiques physicochimiques et bactériologiques moyennes sont présentées dans le tableau 1.

**Tableau 1** Caractéristiques physico-chimiques et bactériologiques moyennes (et écart-type) de l'eau alimentant le pilote avant l'injection de chlore ( $n = 5$  pour les bactéries,  $n = 9$  pour les autres paramètres).

**Table 1** *Physical, chemical and bacteriological characteristics (average values and standard deviations) of finished water before chlorination at the inlet of the pilot ( $n = 5$  or  $9$  for bacterial analysis and the other parameters respectively).*

Paramètre mesuré	Valeur moyenne
pH	8,6 (0,1)
Température de l'eau (° C)	11,4 (1,4)
Conductivité ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ )	292 (26,8)
Chlore total (mg/l)	0,63 (0,34)
Chlore libre (mg/l)	0,53 (0,38)
Bactéries totales (cellules/ml)	$1,62 (0,81) \times 10^5$
Bactéries cultivables (15 j - 20° C) (UFC/ml)	$2,04 (0,84) \times 10^3$

Une solution d'hypochlorite de sodium commerciale (Eau de Javel) a été injectée dans la première boucle de façon à obtenir des résiduels de chlore mesurables dans l'eau circulante des différentes boucles.

Pour l'étude de l'effet du chlore sur la formation du biofilm, le pH de l'eau de chaque boucle était voisin de 8,8.

Pour l'étude de l'effet du chlore sur un biofilm constitué, une correction de pH a été réalisée par addition d'acide chlorhydrique dans l'eau de la première boucle afin d'obtenir dans le réseau des valeurs de pH voisines de 7,5-7,8.

## 2.2 Dosage du chlore

Le chlore résiduel, libre et total, a été dosé par la méthode à la Diéthyl-para-Phénylène Diamine (D.P.D.) (PALIN, 1957) en utilisant des réactifs sous forme de pastilles à dissolution rapide. Les résultats ont été exprimés en mg/l par lecture de la réaction colorée obtenue par action du chlore sur la D.P.D. à l'aide d'un comparateur à lecture visuelle équipé d'une échelle d'étalons colorés permanents (Lovibond 2000 avec cuves de 13,5 ou 40 mm de profondeur).

## 2.3 Numération des bactéries

La numération des bactéries a été conduite sur les biofilms fixés sur les pastilles des matériaux et sur la phase eau.

a) Les pastilles des différents matériaux ont été retirées aseptiquement du réseau expérimental et placées dans 25 ml d'eau distillée stérile préfiltrée sur membrane de  $0,22 \mu\text{m}$  de porosité. Les bactéries fixées sont récupérées après 2 minutes de traitement par les ultra-sons (sonicateur Vibra-cell équipé d'une microsonde conique).

Deux types de populations bactériennes ont été dénombrées :

– les cellules bactériennes (nombre total de bactéries mortes et vivantes) ont été dénombrées par comptage au microscope (x 1 000 – lumière bleue – épifluorescence Olympus) après coloration par une solution d'acridine orange (0,01 % en concentration finale, pendant 30 mn) et filtration sur membrane noire en polycarbonate (Nuclepore) de porosité 0,22  $\mu\text{m}$ .

– les bactéries cultivables ou Unités Formant Colonies (U.F.C.) ont été dénombrées après ensemencement par incorporation dans une gélose nutritive (AFNOR NF T 90 – 401, formule sans glucose) et incubation 15 jours à 20-22° C.

b) Les teneurs en cellules bactériennes et bactéries cultivables ont été déterminées dans l'eau alimentant le réseau et dans chaque boucle sur des échantillons prélevés aseptiquement. Les mêmes méthodes que celles précédemment décrites pour les biofilms ont été utilisées.

## 2.4 Protocole expérimental

Deux séries d'expériences ont été conduites, la première ayant pour objet la mesure de l'influence du chlore sur la formation des biofilms, la seconde, l'étude des effets du chlore sur les biofilms constitués.

a) L'étude de l'influence du chlore sur la formation du biofilm a été réalisée sur les 5 premières boucles du réseau fonctionnant avec un débit de circulation interboucle de 30 l/h, ceci déterminant un temps de séjour théorique de l'eau de 8 heures par boucle.

Pour cette étude, 5 pastilles vierges de chaque matériau ont été placées dans chaque boucles (j0) après stabilisation des résiduels de chlore (demande en chlore du réseau satisfaite), soit 10 jours après la mise en œuvre de la chloration sur le réseau pilote fonctionnant depuis plusieurs mois. Après 24 h d'immersion (j1), puis les 3 jours suivants (j2, j3, j4), une pastille de chaque matériau a été prélevée par boucle.

b) L'étude de l'effet du chlore sur un biofilm constitué a été réalisée uniquement sur les 3 premières boucles du réseau avec un débit de circulation interne de 24 l/h, ceci déterminant un temps de séjour théorique de 10 heures par boucle.

Pour cette étude, les éprouvettes de P.V.C., P.E. et mortier de ciment ont été mises en place dans les boucles environ 40 jours avant le début de la chloration, de façon à obtenir sur les éprouvettes un biofilm à l'équilibre. Une solution d'hypochlorite de sodium a été ensuite injectée en continu pendant 18 jours dans la boucle 1. Une éprouvette de chaque matériau, dans chaque boucle, a été retirée et analysée avant chloration (j0), puis régulièrement 6, 8, 10, 13 et 15 jours après le début de l'étape de chloration.

### 3 - RÉSULTATS

#### 3.1 Effet du chlore sur la formation des biofilms

Le chlore injecté dans le réseau de distribution pour tenter de limiter l'accumulation d'un biofilm sur des éprouvettes de matériaux vierges a été maintenu à un résiduel moyen constant, dans chaque boucle, tout au long de l'essai. De fait, après avoir injecté l'hypochlorite de sodium pendant 10 jours, pour répondre à la demande immédiate en chlore du système, les concentrations moyennes de chlore total (75 % de chlore libre) mesurées au-delà de cette période (soit de j0 à j4) étaient respectivement, dans les boucles 1 à 5 de : 2,44 - 1,25 - 0,29 - 0,05 et 0,02 mg/l (*fig. 2*).

Ainsi le chlore total décroît régulièrement de boucle en boucle et sa cinétique de disparition en fonction du temps de rétention hydraulique  $x$  (en h) dans les boucles 1 à 5 est une fonction décrite par l'équation :  $\log [Cl_2 \text{ total}] = -0,069 x + 1,06$ .

Ce réseau expérimental en fonctionnement constant depuis plusieurs mois et soumis à cette chloration récente reste largement colonisé par des bactéries. Ceci se traduit par la présence dans l'eau de bactéries dont le nombre augmente significativement à partir de la boucle 3 (i.e. lorsque le résiduel en chlore total chute à une concentration voisine de 0,29 mg/l) (*fig.2*).

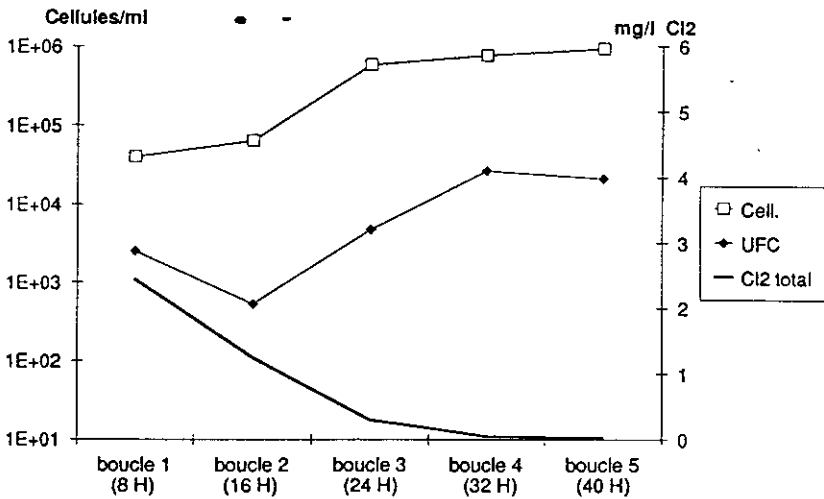
Ainsi les teneurs en bactéries de l'eau du réseau varient à la fois en fonction du temps de séjour de l'eau dans le réseau et de la concentration en chlore résiduel. Le nombre de bactéries totales mesurées par épifluorescence est en moyenne de  $0,5 \times 10^5$  / ml dans les boucles 1 et 2 pour des résiduels en chlore total supérieurs à 1 mg/l. Par contre dans l'eau de la boucle n° 3, où la concentration moyenne en chlore est de 0,29 mg/l, le nombre de bactéries totales augmente d'un facteur 9. Les concentrations bactériennes mesurées dans les boucle n° 4 et 5, où le résiduel de chlore est négligeable, continuent à augmenter très légèrement d'un facteur 1,6.

L'évolution des bactéries cultivables (U.F.C.) est semblable à celle des bactéries totales (*fig. 2*), excepté dans la 2<sup>e</sup> boucle, où le nombre d'U.F.C. diminue d'un facteur 5 par rapport à la boucle 1 bien que simultanément, la concentration en chlore résiduel diminue d'un facteur 2.

Tout au long du réseau (boucles 1 et 2 surchlorées, boucles 3, 4 et 5, chlore résiduel faible ou nul), l'eau véhicule une forte population bactérienne dont 1 à 7,5 % sont représentés par des bactéries cultivables capables de se multiplier sur milieu gélosé en 15 jours à 20° C.

Les pastilles de matériaux neufs mises en place dans ce pilote sont très rapidement colonisées par une biomasse résultant du dépôt des bactéries de l'eau sur le matériau et de la croissance des bactéries fixées. Après 24 h d'immersion (j1), les matériaux des boucles 1 et 2 sont colonisés par une biomasse faible (moins de  $10^4$  cellules /cm<sup>2</sup>, i. e. en dessous de la limite de détection de la méthode de dénombrement utilisée). Par contre, comme le montre à titre d'exemple la figure 3, les matériaux des boucles 3 à 5 sont en

moyenne colonisés par  $5,5 \times 10^5$  à  $2,5 \times 10^6$  cellules /cm<sup>2</sup>. Bien que ces valeurs apparaissent quasi constantes de j1 à j4, d'autres essais non rapportés ici montrent que l'état stationnaire ( $dX \text{ fixées} / dt = 0$ ) n'est obtenu qu'après plusieurs semaines d'immersion. Enfin en comparant les figures 2 et 3, il est notable que la densité des 3 populations fixées en 24 h est proportionnelle à la densité des bactéries dans l'eau et inversement proportionnelle au résiduel de chlore.



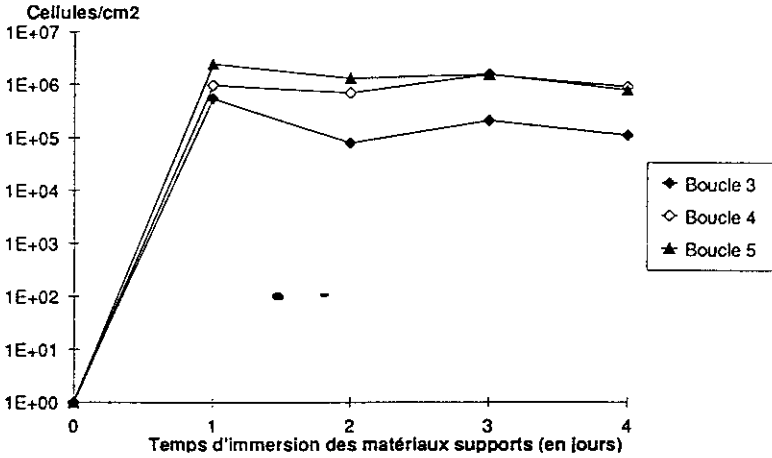
**Figure 2** Evolution des concentrations en chlore résiduel, cellules bactériennes (Cell.) et bactéries cultivables (UFC) dans l'eau circulant dans le réseau expérimental (valeurs moyennes,  $n = 4$ ). (NB :  $1E + 06 = 10^6$ ).

*Residual total chlorine concentration, number of bacterial cells (Cell.) and culturable bacteria (UFC) in the water phase of the experimental distribution system (average values,  $n = 4$ ).*

Même en présence de concentrations élevées en chlore résiduel (boucles 1 et 2), le nombre de bactéries cultivables fixées augmente régulièrement durant les 3 premiers jours d'immersion des matériaux (fig. 4). Le chlore a cependant une certaine efficacité car à j3, par exemple, les matériaux portent entre 150 et 900 UFC/cm<sup>2</sup> pour les boucles 1, 2 et 3, soit environ 100 fois moins que dans les boucles 4 et 5 sans chlore résiduel.

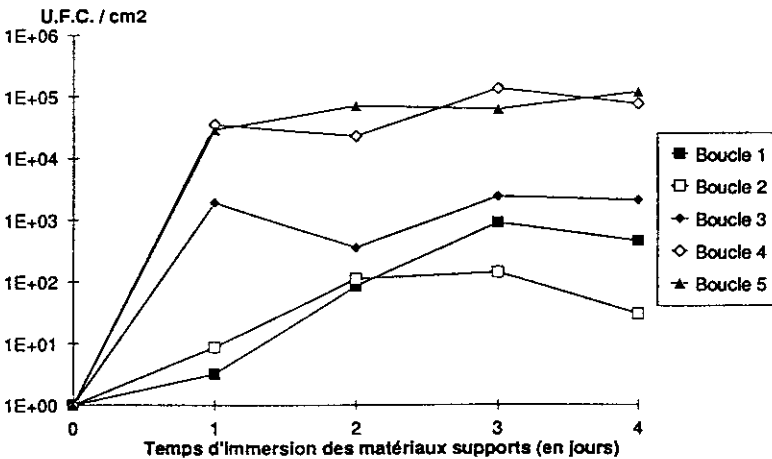
La proportion de bactéries cultivables au sein de ces biomasses fixées (qui n'ont pas encore atteint l'état d'équilibre) varie selon les boucles de 0,5 % à 18,5 % sans relation directe avec la proportion de bactéries cultivables de l'eau.





**Figure 3** Cinétique de colonisation des matériaux immergés (moyenne des numérations sur matériaux PVC, PE, mortier de ciment) dans les boucles 3 à 5 : résultats exprimés en nombre total de cellules/cm<sup>2</sup>. (NB : pour les boucles 1 et 2 les valeurs sont inférieures au seuil de détection).

*Kinetic of bacterial colonization of tested materials in the loops 3 to 5 : the results are expressed as the average number of cells attached to PVC, PE and cement. (NB : the results for loops 1 and 2 are below the limit of sensitivity of the method).*



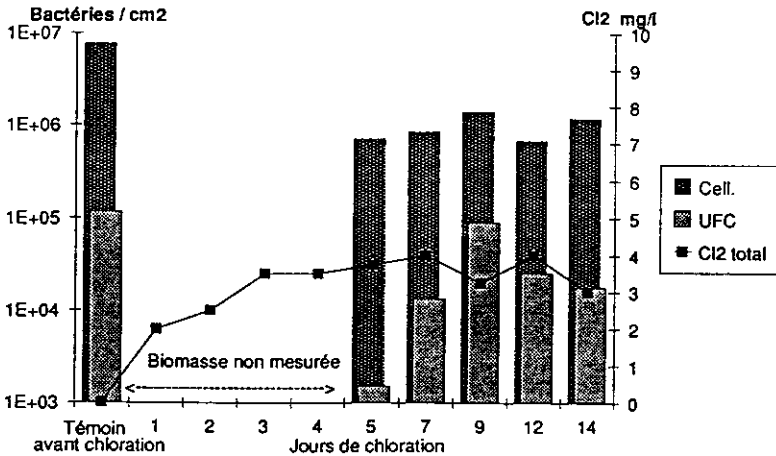
**Figure 4** Cinétique de colonisation des matériaux immergés (moyenne des numérations sur matériaux PVC, PE, mortier de ciment) dans les boucles 1 à 5 : résultats exprimés en nombre de bactéries cultivables (UFC après 15 jours à 20-22° C).

*Kinetic of bacterial colonization of tested materials in the loops 1 to 5 : the results are expressed as average of number of culturable bacteria (CFU after 15 days at 20-22° C) attached to PVC, PE and cement.*

### 3.2 Effet du chlore sur un biofilm constitué

Le réseau pilote fonctionnant en continu sans chloration depuis 2 mois est colonisé par un biofilm constitué en moyenne (tous matériaux et toutes boucles confondus) de  $7,6 \times 10^6$  cellules/cm<sup>2</sup> dont 1,7 % de bactéries cultivables sur gélose en 15 jours à 20° C (fig. 5 et 6). L'application d'une chloration en continu permet d'obtenir un résiduel de chlore quasi constant au bout de 3 jours (i. e. après avoir répondu à la demande dite immédiate en chlore du réseau).

Les données bactériologiques obtenues entre le 5<sup>e</sup> et le 14<sup>e</sup> jour de chloration montrent une diminution significative mais faible de ce biofilm dans la boucle 1 en présence d'un résiduel moyen de chlore total voisin de 3,4 mg/l (83 % sous forme de chlore libre) (fig. 5). Ainsi le nombre de cellules fixées passe de  $7,6 \times 10^6$ /cm<sup>2</sup> à  $0,9 \times 10^6$ /cm<sup>2</sup> (moyenne des prélèvements réalisés à j5, j7, j9, j12, j14), la proportion de bactéries cultivables étant légèrement supérieure (3,6 % contre 1,75 % chez le témoin avant chloration) (tableau 2). Le nombre de bactéries totales évolue peu entre j6 et j15 (fig. 5). En fait, l'effet du chlore sur le biofilm s'effectue au cours des premiers jours de « désinfection » (entre j1 et j5).



**Figure 5** Evolution d'un biofilm constitué, cellules bactériennes (Cell.) et bactéries cultivables (UFC), sur les matériaux (moyenne des numérations sur PVC, PE, mortier de ciment) immergés dans la boucle 1 chlorée en continu pendant les 14 jours de l'expérience.

*Effect of chlorine on quasi steady state biofilm – bacterial cells (Cell.) and culturable bacteria (UFC) – accumulated on PVC, PE and cement coupons (average values) in loop 1 (continuous chlorination for 14 days).*

**Tableau 2** Nombre total de cellules et proportions d'UFC fixées sur les matériaux soumis ou non à une chloration (moyennes des dénombrements effectués entre j5 et j14 pour l'ensemble des matériaux ; n = 15).

**Table 2** Number of attached cells and percentage of attached CFU onto materials submitted or not to chlorination (average values of data collected between days 5 and 14 for all tested materials ; n = 15).

	Chlore total résiduel moyen (mg/l)	Cellules/cm <sup>2</sup> (% UFC)		Cellules éliminées par chloration (log No/N)
		Matériaux témoins avant chloration (No)	Matériaux soumis à chloration (N)	
Boucle 1	3,40	7,63 x 10 <sup>6</sup> (1,75 %)	0,92 x 10 <sup>6</sup> (3,60 %)	0,92
Boucle 2	2,29	12,04 x 10 <sup>6</sup> (1,93 %)	0,71 x 10 <sup>6</sup> (9,52 %)	1,23
Boucle 3	1,28	7,08 x 10 <sup>6</sup> (1,42 %)	0,86 x 10 <sup>6</sup> (5,40 %)	0,91

Pour la boucle 2, où le résiduel de chlore total est en moyenne de 2,3 mg/l, la même observation peut être faite (*tableau 2*) : le nombre total de cellules fixées diminue d'un facteur 17 (1,23 log) et la proportion de bactéries cultivables est également plus élevée en moyenne sur les biofilms soumis à une chloration (respectivement 9,52 % contre 1,93 %).

Enfin dans la boucle 3, avec un résiduel de chlore total en moyenne de 1,28 mg/l, l'altération du biofilm est plus étalée dans le temps (*fig. 6*) puisque le nombre total de cellules fixées, tous matériaux confondus, diminue régulièrement entre j5 (1,5 x 10<sup>6</sup> /cm<sup>2</sup>) et j 12 (0,5 x 10<sup>6</sup>/cm<sup>2</sup>).

Le bilan global est toutefois similaire à celui observé dans les boucles 1 et 2 puisque le nombre de cellules totales fixées diminue d'un facteur 8 (0,91 log), avec également une plus grande proportion de bactéries cultivables sur les pastilles exposées au chlore.

Les densités bactériennes fixées sur chaque type de matériaux (toutes boucles confondues) sont présentées figure 7. La comparaison de chaque type de population rappelle l'effet faible mais sensible du chlore (concentrations comprises entre 1,28 mg/l et 3,40 mg/l de chlore total) mais ne montre pas de différence significative entre les matériaux testés pour les deux situations étudiées (réseau chloré ou non chloré). Toutefois des essais ultérieurs en cours de publication mettent en lumière un effet supérieur du chlore sur les biofilms fixés sur mortier de ciment.

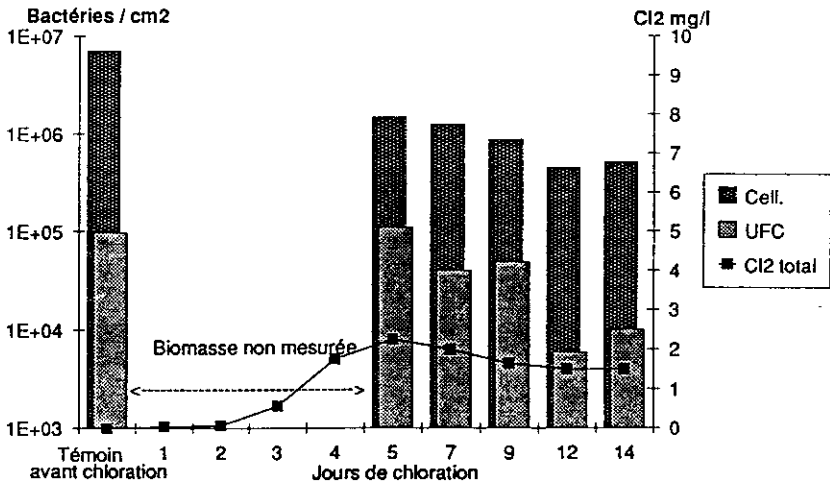
#### 4 - DISCUSSION – CONCLUSION

Un système de distribution d'eau est un réacteur biphasique largement et systématiquement colonisé par des micro-organismes (bactéries, champignons, protozoaires) pour la plupart parfaitement adaptés à l'écosystème que représentent l'eau pauvre en nutriments et la surface des canalisations. De

*facto*, la biomasse est retrouvée aussi bien dans la phase eau, que sur les parois de ces canalisations dans un rapport moyen de 1 à 10. Cette biomasse fixée (biofilm) représente non seulement la plus grande masse de micro-organismes présents dans le réseau mais, comme le prouvent les travaux de VAN DER WENDE *et al.* (1989) et les calculs réalisés à partir des données publiées de HAUDIDIER *et al.* (1988), elle est la seule fraction active, c.a.d. réellement capable de se multiplier à partir des molécules nutritives apportées par l'eau avec des taux de doublement (g) compris entre 1 et 11 jours.

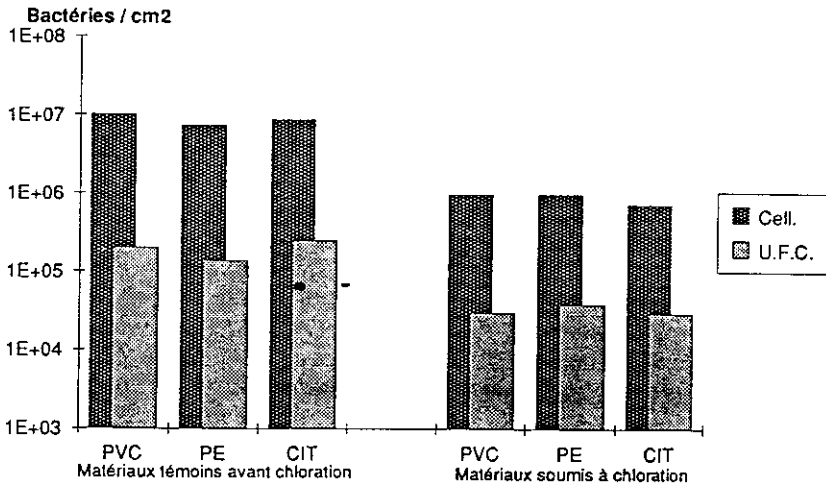
La quantité de bactéries fixées par unité de surface est relativement faible, de l'ordre de  $10^7$  cellules/cm<sup>2</sup>, valeurs généralement rapportées dans la littérature (MAUL *et al.*, 1989). Dans ces conditions, le biofilm peut être assimilé conceptuellement à un biofilm mince ou à un ensemble de microcolonies plus ou moins régulièrement dispersées à la surface du matériau. Ainsi, il peut paraître surprenant que le produit toxique [HOCl / OCl<sup>-</sup>] soit si peu efficace vis-à-vis des biomasses fixées comme le montrent nos essais et ceux de la littérature (HERSON *et al.*, 1987 ; LECHEVALLIER *et al.*, 1988 a ; VAN DER WENDE *et al.*, 1989). En fait, trois raisons au moins peuvent expliquer cette observation :

– d'une part la biomasse fixée en couche mince à la surface des tuyaux (« l'épaisseur réfractaire » selon CHARACKLIS, 1990) se situe, même en régime turbulent, dans la couche dite visqueuse où la diffusion du produit chimique est la plus lente (BRYERS *et al.*, 1987).



**Figure 6** Evolution d'un biofilm constitué, cellules bactériennes (Cell.) et bactéries cultivables (UFC), sur les matériaux (moyenne des numérations sur PVC, PE, mortier de ciment) immergés dans la boucle 3 (la chloration est effectuée en continu pendant les 14 jours de l'expérience au niveau de la boucle 1).

*Effect of chlorine on quasi steady state biofilm – bacterial cells (Cell.) and culturable bacteria (UFC) – accumulated on PVC, PE and cement coupons (average values) in loop 3 (continuous chlorination for 14 days in loop 1).*



**Figure 7** Cellules bactériennes (Cell.) et bactéries cultivables (UFC) fixées sur PVC, PE et mortier de ciment : témoins avant chloration (j0) puis soumis à chloration pendant 14 jours dans une eau chlorée (moyenne toutes boucles confondues des dénombrements effectués de j5 à j14 ; chlore résiduel total compris entre 1,28 mg/l et 3,4 mg/l).

*Bacteria cells (Cell.) and culturable bacteria (UFC) attached onto PVC, PE and cement coupons before (Jo) and after 14 days of chlorination (average values of the data collected from samples analysed in all loops between days 5 and 14 ; residual chlorine between 1.28 mg.l<sup>-1</sup> and 3.4 mg.l<sup>-1</sup>).*

– d'autre part le biofilm est un système organique complexe (cellules + exopolymères) capable de piéger de nombreuses molécules organiques ou inorganiques (CHARACKLIS *et al.*, 1987) et se comportant globalement comme un réducteur « consommant » le réactif chlore. Il s'oppose ainsi au transfert de l'entité oxydante au sein de la biomasse et lui interdit d'atteindre toutes les cibles.

– enfin, les taux de croissance de ces micro-organismes fixés étant relativement faibles, la résistance de ces bactéries est plus élevée que celles à fort taux de croissance (BERG *et al.*, 1982 ; LECHEVALLIER *et al.*, 1988 a).

En conséquence, l'action du produit désinfectant est obligatoirement superficielle. Le chlore peut ainsi agir sur quelques micromètres d'épaisseur, diminuer le taux de croissance et augmenter le taux de mortalité de la biomasse fixée. Si l'on admet que les taux de dépôts et d'arrachage ne sont pas affectés par la chloration, la densité d'un biofilm chloré diminue obligatoirement (environ 1 logarithme dans nos essais) et le nombre de cellules bactériennes dans la phase eau ne peut pas augmenter (*fig. 2*, boucles 1 et 2).

Par contre, et nos résultats le prouvent clairement, la diffusion de l'oxydant au sein de la biomasse fixée est faible ou du moins sans efficacité. Environ 3 à 10 % des bactéries fixées sont cultivables (capables de se multiplier sur gélose en 15 jours) soit une fraction égale ou supérieure à celle d'un biofilm

non chloré ! En bref, malgré la chloration en continu du réseau, un biofilm s'y maintient avec des cellules vivantes (LECHEVALLIER *et al.*, 1990) utilisant une partie du flux de matière organique biodégradable (MATHIEU *et al.*, 1991).

De même, dans la phase eau, malgré la présence constante de 1 ou 2 mg/l de chlore total (dont 75 % sous forme libre) il est possible de mettre en évidence plus de  $10^3$  bactéries cultivables/ml (soit environ 1 % du nombre total de cellules en suspension). Ces valeurs apparemment élevées, bien qu'elles recourent les observations de RIDGWAY et OLSON (1982), peuvent s'expliquer à la fois par l'arrachage « récent » de bactéries du biofilm, par la présence d'agrégats protecteurs et par la technique de mise en évidence elle-même (ici incubation pendant 15 jours) qui permet aux bactéries à cinétique de croissance lente et/ou aux bactéries blessées par le chlore, de réparer leur lésions et de se multiplier sur gélose (McFETERS *et al.*, 1986). La diminution du chlore résiduel au cours de la circulation de l'eau se traduit par une prolifération des bactéries dans le réseau même pour des concentrations en chlore résiduel total équivalentes à 0,3 mgCl<sub>2</sub>/l.

L'introduction de tuyaux neufs dans un réseau ancien déjà largement colonisé, chloré ou non, se traduit obligatoirement par l'accumulation d'un biofilm. Ce phénomène est d'autant plus facile que les phases initiales d'adhésion sont régies par des lois physiques indépendantes de toute référence au caractère « vivant » ou « mort » des cellules (BRYERS *et al.*, 1987). Nos essais montrent que la cinétique de colonisation initiale est simplement ralentie sans doute par action sur le terme « croissance cellulaire ».

Ainsi, le chlore est un désinfectant acceptable (au sens où il n'y a pas de désinfectant alternatif parfaitement efficace dans les mêmes conditions) limitant la prolifération bactérienne mais ne l'interdisant pas. La chloration en réseau ne résout pas le problème fondamental de l'accumulation d'une biomasse vivante fixée à la surface des canalisations, dont l'élimination demanderait en théorie un résiduel de chlore total d'au moins 1,8 mg/l ! (MATHIEU *et al.*, 1992). De plus, lors de toute discontinuité dans l'utilisation du désinfectant, ce qui arrive quotidiennement en de multiples points du système de distribution, le distributeur assiste à une prolifération significative des bactéries du biofilm avec concomitamment une contamination bactérienne de l'eau distribuée.

Aussi les pratiques actuelles de chloration (maintien d'un résiduel de chlore total de 0,1 mg/l à 0,3 mg/l) semblent réellement désuètes. En fait, la chloration en réseau doit être fondamentalement reconnue comme un pis-aller et combinée, sinon remplacée, par une stratégie visant à limiter drastiquement les flux de matière organique biodégradable et de cellules bactériennes introduites dans le réseau.

## Remerciements :

Ce travail a été réalisé dans le cadre d'un large programme de recherche associant le Centre International de l'Eau, le G.I.P. Stelor, Pont à Mousson S.A., la Compagnie Générale des Eaux, le District Urbain de l'Agglomération Nancéienne, Anjou Recherche, l'Agence de Bassin Seine Normandie et le Syndicat des Eaux de l'Île de France.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ALLEN M.J., TAYLOR R.H., GELDREICH E.E., 1980. The occurrence of microorganisms in water main incrustations. *J. Am. Wat. Wks Ass.*, 72, 614-625.
- BERG J.D., MATIN A., ROBERTS P.V., 1982. Effect of antecedent growth conditions on sensitivity of *Escherichia coli* to chlorine dioxide. *Appl. Environ. Microbiol.*, 44, 814-819.
- BLOCK J.C., HAUDIDIER K., PAQUIN J.L., MIAZZGA J., LEVI Y., 1992. Biofilm accumulation in drinking water distribution systems. *Biofouling* (in press).
- BRYERS J.D., 1987. Biologically active surfaces : processes governing the formation and persistence of biofilms. *Biotechnol. Progress*, 3, 57-68.
- CHARACKLIS W.G., TRULEAR M.G., STATHOPOULOS N.A., CHANG L.C., 1980. Oxidation and destruction of microbial films, in Jolley R.L., W.A. Brungs and Cumming R.B. (Ed.). *Water chlorination : environmental impact and health*, vol. 3, 349-368, Ann Arbor Science, Ann Arbor, MI.
- CHARACKLIS W.G. WILDERER P.A., 1989 (Ed.). *Structure and function of biofilms*. John Wiley and sons, New York, 387 pages.
- CHARACKLIS W.G., 1990. Microbial biofouling control, in W.G. Characklis and K.C. Marshall (Ed.), *Biofilms* : 585-633, John Wiley and Sons, New York.
- COLIN F., GRAPIN G., CHERON J. et al., 1987. Etude de l'évolution de la qualité de l'eau potable dans les réseaux de distribution : une approche et des moyens nouveaux. *Tech. Sci. Meth. l'Eau*, 12, 565-574.
- HAUDIDIER K., PAQUIN J.L., FRANCAIS T. et al., 1988. Biofilm growth in a drinking water network : a preliminary industrial pilot-plant experiment. *Wat. Sci. Technol.*, 20, 109-115.
- HERSON D.S., MAC GONIGLE B., PRAYER M.A., BAKER K.H., 1987. Attachment as a factor in the protection of *Enterobacter cloacae* from chlorination. *Appl. Environ. Microbiol.*, 53, 1178-1180.
- LECHEVALLIER M.W., CAWTHON C.D., LEE R.G., 1988a. Factors promoting survival of bacteria in chlorinated water supplies. *Appl. Environ. Microbiol.*, 54, 649-654.
- LECHEVALLIER M.W., CAWTHON C.D., LEE R.G., 1988b. Inactivation of biofilm bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 54, 2492-2499.
- LECHEVALLIER M.W., HASSENAUER T.S., CAMPER A.K., McFETERS G.A., 1984. Disinfection of bacteria attached to granular activated carbon. *Appl. Environ. Microbiol.*, 48, 918-923.
- LECHEVALLIER M.W., LEE R.G., MOSER R.H., 1987. Examination and characterization of distribution system biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.*, 53, 2714-2724.
- LECHEVALLIER M.W., LOWRY C.D., LEE R.G., 1990. Disinfecting biofilms in a model distribution system. *J. Am. Wat. Wks Ass.*, 82, 87-99.
- LEVI Y., 1990. Importance du contrôle du carbone organique dissous biodégradable

- (CODB) dans la stratégie de maintien de la qualité de l'eau potable en cours de distribution. Compte rendu du 13<sup>e</sup> Symposium International sur le traitement des eaux usées et 2<sup>e</sup> atelier sur l'eau potable, AQTE, Montréal, 273-282.
- MATHIEU L., DOLLARD M.A., BLOCK J.C., JOURDAN-FAFORTE E., 1990. Effet de l'acide peracétique sur des bactéries fixées et en suspension. *J. Fr. Hydrol.*, 21, 101-111.
- MATHIEU L., PAQUIN J.L., BLOCK J.C., HARTEMANN P., COLIN F., 1992. Paramètres contrôlant l'accumulation de bactéries dans les réseaux de distribution : approche expérimentale Séminaire International « Matière organique biodégradable dans les réseaux de distribution », Nancy (Soumis à *Sci. de l'Eau*).
- MAUL A., VAGOST D., BLOCK J.C., 1989. *Stratégies d'échantillonnage pour analyse microbiologique sur réseaux de distribution d'eau*, Tec & Doc - Lavoisier, Paris, 115 pages.
- McFETERS G.A., KIPPIN J.S., LECHEVALIER M.W., 1986. Injured coliforms in drinking water. *Appl. Environ. Microbiol.*, 51, 1-5.
- NORRMAN G., CHARACKLIS W.G., BRYERS J.D., 1977. Control of microbial fouling in circular tubes with chlorine. *Developments in industrial microbiology*, vol. 18, chap. 48 ; 581-590.
- PALIN A.T., 1957. The determination of free and combined chlorine in water by the use of diéthyl-p-phénylène diamine. *J. Am. Wat. Wks Ass.*, 873-880.
- PEDERSEN K., 1990. Biofilm development on stainless and PVC surfaces in drinking water. *Wat. Res.*, 24, 239-243.
- RIDGWAY H.F., OLSON B.H., 1982. Chlorine resistance patterns of bacteria from two drinking water distribution systems. *Appl. Environ. Microbiol.*, 44, 972-987.
- VAN DER WENDE, CHARACKLIS W.G., SMITH D.B., 1989. Biofilms and bacterial drinking water quality. *Wat. Res.*, 23, 1313-1322.