

La mesure du CODB : un index du potentiel de reviviscence bactérienne des eaux

The measurement of BDOC : an index of the bacterial
regrowth potential in water

C. VOLK¹, C. RENNER¹, J.C. JORET¹

Reçu le 12 novembre 1991, accepté pour publication le 24 août 1992*.

SUMMARY

Some attempts have been made to obtain an assessment of either the easily Assimilable Organic Carbon (AOC) or the total amount of Biodegradable Dissolved Organic Carbon (BDOC) in drinking water.

The first approach was developed in several methods.

One of these methods consists of seeding pasteurized samples of water with pure cultures of bacteria (*Pseudomonas fluorescens* P17, P17 + *Spirillum* NOX). The growth of bacteria is monitored by a spread plate technique. AOC is expressed as equivalent amount of carbon ($\mu\text{g C eq. acetate/l}$) by using known yield coefficients of these strains in acetate or in oxalate.

In the second approach, the BDOC content of water is evaluated by the reduction of Dissolved Organic Carbon (DOC) in a water sample incubated up to 30 days with suspended indigenous bacteria or 5-7 days with bacteria fixed on sand-particles.

This work was undertaken to determine the existing relationship between values of BDOC recorded by using fixed bacteria on sand and :

- the maximum growth of a pure strain of *Pseudomonas fluorescens* P17. Water samples (60 ml) were pasteurized and inoculated with a subculture of *Pseudomonas fluorescens* (initial concentration = 500 CFU/ml). The maximum growth at $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ was recorded by a pour plate method in PCA agar after 3-4 days of incubation.
- the maximum growth of strains P17 and NOX inoculated simultaneously in pasteurized water samples (40 ml) (500-1000 CFU/ml for each species). Each maximum growth at $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ after seven, eight and nine days of incubation was recorded (spread plate method on R2A agar) and converted in AOC (growth constants : $4.1\ 10^6$ CFU per $\mu\text{g C}$ for P17, $1.2\ 10^7$ CFU per $\mu\text{g C}$ for NOX).

1. Centre de recherche de la Compagnie générale des eaux, Chemin de la Digue, BP 76, 78600 Maisons Laffitte, France.

* Les commentaires seront reçus jusqu'au 30 juin 1993.

– the maximum growth of a mixed indigenous population of bacteria. Water samples (500 ml) were filtered (0,2 μm filter) and reinoculated with one percent of river water. The maximum growth was recorded after 3-4 days of incubation at $20\text{ }^\circ\text{C} \pm 1\text{ }^\circ\text{C}$ by microscopic epifluorescent counts (acridin orange coloration).

Comparisons were done with different types of water including river water (Seine, Oise and Marne), partially treated water (conventional treatments), fully treated water, ground water, mineral water and distilled water.

The study has demonstrated :

– a poor correlation ($r = 0.716$; $n = 28$) between BDOC values and the maximum growth of *Pseudomonas fluorescens*. This observation can be explained by the limited spectrum of activity and the low affinity of *Pseudomonas fluorescens* for organic molecules. Under these conditions, the growth yield was $5.9 \cdot 10^6$ CFU per mg C (BDOC).

– a better correlation ($r = 0.850$; $n = 31$) between BDOC and the maximum growth of P17 for water samples seeded simultaneously with P17 and NOX. Under these conditions, no correlation ($r = 0.264$; $n = 31$) was found between values of BDOC and maximum growth of NOX, demonstrating varying affinities of the NOX strain for ozonation by-products. In spite of this limit, the relation between BDOC and AOC values remained relatively good ($r = 0.769$; $n = 31$) with a factor of conversion of 1 mg BDOC for 90 μg C eq. acetate.

– a significative correlation ($r = 0.943$; $n = 30$) between values of BDOC (fixed bacteria on sand) and the maximum growth of indigenous bacteria by direct microscopic examination epifluorescent counts. The growth yield was then $1,7 \cdot 10^9$ cells per mg of BDOC.

In conclusion, the rapid estimation of BDOC by the technique using indigenous bacteria fixed on sand particles can be considered as a good predictor of the potential bacteria regrowth for different types of water.

Key-words : *Biodegradable Organic Matter, Biodegradable Dissolved Organic Carbon, Assimilable Organic Carbon, Regrowth, Pseudomonas fluorescens P17, Spirillum NOX, Natural mixed culture of bacteria.*

RÉSUMÉ

La mesure de la matière organique biodégradable dans l'eau est déterminée à partir de tests biologiques qui reposent sur deux concepts.

Le premier est basé sur le suivi de la croissance de souches pures ou d'une population bactérienne mixte dans un échantillon d'eau. Le maximum de croissance obtenu est converti en Carbone Organique facilement Assimilable (COA) et exprimé en μg de C eq. acétate/l en tenant compte du rendement de croissance de ces bactéries dans des solutions d'acétate de sodium.

Le second repose sur le suivi de la décroissance du Carbone Organique Dissous (COD) dans un échantillon d'eau ensemencé par une flore bactérienne indigène des eaux (flore en suspension ou flore fixée sur des particules de sable). La matière organique biodégradée est exprimée sous forme de Carbone Organique Dissous Biodégradable (CODB).

Des essais ont été réalisés sur différents types d'eau (eaux de rivière de la Seine, de l'Oise et de la Marne, eaux en cours de traitement de potabilisation, eaux distribuées et eaux distillées) afin de mettre en évidence la relation existant entre la mesure du CODB en présence de bactéries fixées sur du sable et le maximum de croissance bactérienne enregistré dans les mêmes échantillons stérilisés puis réensemencés par des souches pures (*Pseudomonas fluorescens* P17, *Pseudomonas fluorescens* P17 + *Spirillum* NOX) ou par un inoculum mixte de bactéries indigènes de l'eau.

Les résultats de cette étude mettent en évidence :

- une relation entre le CODB et le maximum de croissance (*Pseudomonas fluorescens* P17) médiocre ($r = 0,716$; $n = 28$) pour des échantillons d'eauensemencés par *Pseudomonas fluorescens* P17 seul (dénombrement en gélose) ;
- une relation entre le CODB et le maximum de croissance (*Pseudomonas fluorescens* P17) améliorée ($r = 0,850$, $n = 31$) pour des échantillonsensemencés simultanément avec un mélange de *Pseudomonas fluorescens* P17 et *Spirillum* NOX (dénombrement en gélose) ;
- une relation entre le CODB et le maximum de croissance (*Spirillum* NOX) très faible ($r = 0,264$; $n = 31$; corrélation non significative) pour des échantillonsensemencés simultanément avec un mélange de P17 + NOX (dénombrement en gélose) ;
- le coefficient de corrélation entre le CODB et le COA (*Pseudomonas fluorescens* P17 + *Spirillum* NOX) est de 0.769 ($n = 31$) avec une équivalence de 140 μg de COA (eq. acétate) par mg de CODB lorsque P17 est utilisé isolément et 90 μg de COA (eq. acétate) par mg de CODB lorsque P17 et NOX sont utilisés simultanément ;
- la relation entre le CODB et le maximum de croissance (flore naturelle mixte) est par contre très satisfaisante ($r = 0,943$; $n = 30$) lorsque les dénombrements bactériens sont effectués par microscopie en épifluorescence (coloration à l'acridine orange).

Le rendement de croissance est alors de $1,7 \cdot 10^9$ cellules pour 1 mg de CODB mesuré en présence de sable biologique.

En conclusion, la mesure du CODB au moyen de bactéries fixées, originellement décrite pour évaluer l'efficacité des filières de traitement de potabilisation vis-à-vis de l'élimination de la Matière Organique Biodégradable permet aussi de prédire le potentiel de recroissance bactérienne (bactéries indigènes) de différents types d'eau.

Mots clés : Matière Organique Biodégradable, Carbone Organique Dissous Biodégradable, Carbone Organique Assimilable, Recroissance, *Pseudomonas fluorescens* P17, *Spirillum* NOX, Flore bactérienne mixte.

INTRODUCTION

Le phénomène de reviviscence bactérienne entraînant une diminution de la qualité bactériologique de l'eau, l'apparition de goûts, d'odeurs ou de couleurs ainsi que l'accélération des processus de corrosion est lié à la présence d'un biofilm, sur la paroi des canalisations. Sa densité peut atteindre 10^9 bactéries par cm^2 (OLSON, 1982).

Les bactéries présentes dans le biofilm semblent particulièrement protégées de l'action des désinfectants tels que le chlore ou les chloramines. En effet, des taux élevés de l'ordre de 1 à 5 mg/l de résiduel de chlore libre ne pénètrent pas en totalité le biofilm (LECHEVALLIER *et al.*, 1988). Sous l'effet conjugué ou non des désinfectants et des forces de friction hydraulique du réseau, des bactéries peuvent se décrocher du biofilm. Ceci entraîne une augmentation du nombre de germes hétérotrophes et dans certains cas, l'appari-

tion de coliformes (COALLIER *et al.*, 1989 ; JORET *et al.*, 1990 ; LE CHEVALLIER *et al.*, 1989). Des résiduels de chlore importants peuvent, dans certaines conditions, inactiver la contamination bactérienne de l'eau de distribution par ces bactéries en suspension. Cependant l'utilisation de doses excessives de désinfectants peut entraîner la formation de sous produits organochlorés de toxicité mal connue et l'apparition de goûts désagréables (COALLIER *et al.*, 1989).

Les principaux facteurs influençant la reviviscence sont la température, l'âge et la nature des canalisations, l'éloignement de l'usine de traitement, le temps de résidence et la vitesse de l'eau, l'efficacité de la désinfection et la présence de nutriments. La traction biodégradable de la matière organique est, en effet, un élément important dans la recroissance bactérienne. La matière organique est composée d'acides humiques et fulviques, d'acides carboxyliques, d'acides aminés et de protéines, d'hydrates de carbone et d'éléments à l'état de traces. Du fait de sa faible concentration et de la multitude de ses constituants, l'évaluation de la matière organique biodégradable est impossible par les techniques de chimie classiques.

Il a été démontré que la mesure du Carbone Organique Total (COT) n'est pas un bon indicateur de la recroissance bactérienne (RIZET *et al.*, 1982). Différents tests biologiques visant à évaluer la quantité de matière organique biodégradable ont été mis au point. Ils sont basés sur deux principes :

Le premier repose sur le suivi de la croissance de souches pures ou d'une flore bactérienne mixte dans un échantillon d'eau. Cette approche a été décrite par différents auteurs.

La première méthode consiste à ensemencer un échantillon d'eau avec un mélange de souches pures de bactéries (*Pseudomonas fluorescens* P17, *Spirillum NOX*, *Flavobacterium...*) (VAN DER KOOIJ et HIJNEN, 1981) (VAN DER KOOIJ *et al.*, 1982) (VAN DER KOOIJ et HIJNEN, 1984). La croissance est suivie par dénombrement bactérien sur gélose. L'indice de biodégradabilité des eaux est transformé en Carbone Organique facilement Assimilable (COA) et exprimé en $\mu\text{g C eq. acétate par litre}$. Cette valeur de COA est déterminée à partir du maximum de croissance après calcul du rendement de croissance des bactéries dans des solutions d'acétate ou d'oxalate. Les mesures de COA enregistrées sur des eaux potables sont très basses (quelques $\mu\text{g C/l}$) et ne représentent qu'une très faible fraction ($< 1 \%$) du Carbone Organique Total (COT) (VAN DER KOOIJ *et al.*, 1982).

Dans un souci de simplification, la méthode a été modifiée et proposée pour standardisation (KAPLAN et BOTT, 1989) (KAPLAN et BOTT, 1990) (Supplement Standard Methods, 1991).

Deux variantes de cette approche visant à déterminer le COA ont été développées au Royaume-Uni : KEMMY *et al.* (1989) utilisent un mélange de quatre souches sélectionnées avec un rendement de croissance obtenu sur un mélange standard de composés organiques.

STANFIELD et JAGO (1987) (JAGO et SHARP, 1988) ensemencent l'eau par une flore bactérienne mixte naturelle. La croissance cellulaire est suivie par mesure de l'ATP.

Enfin, deux méthodes visant à évaluer le potentiel de recroissance bactérienne de différents types d'eau ont été décrites.

Une méthode est basée sur l'enregistrement en continu de la cinétique de croissance d'un inoculum naturel mixte par mesure de la turbidité (WERNER, 1985) (WERNER et HAMBACH, 1986). Deux paramètres sont retenus. L'évaluation du taux de croissance (μ) pendant la phase exponentielle de croissance renseigne sur la plus ou moins grande biodégradabilité du substrat, tandis que le rendement de croissance ($\log y/y_0$) traduit l'augmentation de la population bactérienne pendant la durée de l'expérience. Une autre méthode vise à déterminer spécifiquement l'aptitude d'une eau à favoriser le potentiel de recroissance des coliformes (REASONNER et RICE, 1989).

La seconde approche a été développée par des chercheurs travaillant avec la Compagnie Générale des Eaux. La matière organique biodégradable est exprimée sous forme de Carbone Organique Dissous Biodégradable (CODB). Ce paramètre est évalué par la réduction du Carbone Organique Dissous (COD) dans un échantillonensemencé par une flore bactérienne mixte indigène de l'eau, et incubé pendant 30 jours (SERVAIS *et al.*, 1987). Les valeurs de CODB enregistrées sont en parfaite correspondance avec les valeurs de matière organique biodégradée estimées à partir de la biomasse produite et du flux de mortalité bactérienne dans l'échantillon pendant cette même période d'incubation.

Les valeurs de CODB représentent de 10 à 30 % du COD total, pour des eaux de distribution ou en cours de traitement (SERVAIS *et al.*, 1987). Les concentrations qui correspondent à la partie minéralisée de la matière organique par les bactéries sont exprimées en mg C/l. Cette technique permet, par ailleurs, de connaître la quantité de Carbone Organique Dissous Réfractaire à la biodégradation dans l'échantillon (CODR). Cette technique a été modifiée et simplifiée afin de la rendre plus rapide (JORET et LEVI, 1986 ; JORET *et al.*, 1988 ; JORET *et al.*, 1989, JORET *et al.*, 1990). Cette technique est basée sur la décroissance du COD dans un échantillon d'eau inoculé par des bactéries fixées sur du sable (provenant d'un filtre à sable traitant une eau non préchlorée). La réponse est obtenue après 5-7 jours d'incubation du fait d'une population bactérienne abondante.

Les temps d'incubation peuvent être diminués grâce à un système en dynamique de recirculation de l'eau sur le sable (MOGREN *et al.*, 1990) ou par percolation lente de l'eau sur une colonne remplie d'un support colonisé par des bactéries (RIBAS *et al.*, 1991).

Le but de ce travail était d'évaluer la relation existant entre la mesure du CODB en présence de sable biologique et le potentiel de recroissance bactérienne de différents types d'eau (eaux de rivière, eaux en cours de traitement de potabilisation, eaux distribuées, eaux minérales et eaux distillées) évalué en utilisant :

- la recroissance d'une souche pure de *Pseudomonas fluorescens* P17 ;
- la recroissance de deux souches pures (P17 + *Spirillum* NOX). La recroissance des souches pures sera évaluée par dénombrement sur milieu gélosé ;
- la recroissance d'une flore bactérienne mixte indigène des eaux mesurée par comptage microscopique en épifluorescence après coloration à l'acridine orange. Le dénombrement en milieu gélosé ne révélant qu'une petite partie d'une flore bactérienne naturelle mixte.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Préparation de la verrerie

L'ensemble de la verrerie est chauffé à 550 °C pendant 4 heures afin d'éliminer toute trace de contamination carbonée.

Préparation des précultures de *Pseudomonas fluorescens* P17 et *Spirillum* NOX

A partir d'une gélose R2A, une colonie est repiquée dans 10 ml d'eau distillée autoclavée. La suspension bactérienne est incubée une semaine à 20 °C jusqu'à ce que la culture atteigne un état stationnaire. Les cultures en phase stationnaire sont ensuite stockées à 4 °C. Leur concentration bactérienne est comprise entre 10^6 et 10^7 UFC/ml (dénombrement sur milieu gélosé).

Suivi de la croissance bactérienne de *Pseudomonas fluorescens* P17

Les expériences sont réalisées en duplicat. Dans un flacon de 100 ml à bouchon en verre rodé, 60 ml d'eau déchlorée (0,1 ml de thiosulfate de sodium à 100 g/l pour 500 ml d'échantillon) sont pasteurisés (70 °C pendant 30 mn) puis inoculés à partir des précultures de *Pseudomonas fluorescens* à raison de 500 UFC/ml environ. Les échantillons sont incubés à 20°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) pendant 10 jours. Les dénombrements sont réalisés quotidiennement sur une gélose PCA (DIFCO), après ensemencement par inclusion de 1 ml d'échantillon pur ou dilué dans de l'eau distillée stérile. Les boîtes de dénombrement sont incubées 3 jours à 20 °C ($\pm 1^\circ\text{C}$). Les lectures sont effectuées sur les boîtes contenant entre 30 et 300 colonies. Les résultats sont exprimés en UFC/ml.

Suivi de la croissance de *Pseudomonas fluorescens* P17 + *Spirillum* NOX.

La technique utilisée est la méthode standardisée par Kaplan (Supplement Standard Methods, 1991). Les échantillons d'eau déchlorés (0,1 ml de thiosulfate de sodium à 100 g/l pour 500 ml d'eau) sont répartis dans 10 flacons de culture de 40 ml en verre (bouchon avec septum recouvert de téflon). Ils sont pasteurisés (70 °C pendant 30 mn) puis inoculés avec une seringue tuberculique successivement par une préculture de P17 et de NOX à raison de 500 à 1000 UFC/ml en concentration finale pour chaque souche. Les flacons sont incubés à 20 °C ($\pm 1^\circ\text{C}$). Au septième, huitième et neuvième jour, 3 ou 4 flacons de culture sont prélevés, et agités vigoureusement. Pour chaque échantillon, une série de dilutions dans l'eau distillée stérile est réalisée. Les dénombrements sont effectués sur 100 μl des dilutions 10^{-2} et 10^{-3} après étalement sur gélose R2A (DIFCO). Les boîtes de

dénombrement sont incubées 3 à 5 jours à 20 °C (± 1 °C). Les colonies de P17 et NOX sont comptées séparément, P17 formant des colonies de 3 à 4 mm de diamètre avec un halot de pigmentation jaune, NOX donnant des colonies bombées blanches de 1 à 2 mm de diamètre.

Le nombre maximum d'UFC/ml (N max) pour chaque jour est défini par la moyenne des valeurs obtenues dans 3 ou 4 flacons d'eau.

Le maximum de croissance est défini comme la moyenne des valeurs d'UFC/ml, au niveau du plateau de la courbe de croissance après 7, 8 et 9 jours d'incubation.

La conversion en COA est effectuée avec un rendement de croissance de $4,1 \cdot 10^6$ UFC/ μ g C pour P17 et de $1,2 \cdot 10^7$ UFC/ μ g C pour NOX (VAN DER KOOIJ et HIJNEN, 1984) selon les formules suivantes :

$$\text{COA P17 } \mu\text{g C/l} = \frac{\text{moyenne N max P17 (J7+J8+J9)}}{\text{(UFC/ml)}} / \frac{4,1 \cdot 10^6}{\text{(UFC}/\mu\text{g eq. acétate)}} \times 1000$$

$$\text{COA NOX } \mu\text{g C/l} = \frac{\text{moyenne N max NOX (J7+J8+J9)}}{\text{(UFC/ml)}} / \frac{1,2 \cdot 10^7}{\text{(UFC}/\mu\text{g C eq. acétate)}} \times 1000$$

$$\text{COA total} = \text{COA P17} + \text{COA NOX}$$

Suivi de la croissance d'une flore mixte

Les expériences sont réalisées en duplicat.

500 ml d'eau déchlorée (0,1 ml de thiosulfate de sodium à 100 g/l pour 500 ml d'échantillon) sont filtrés sur membranes de porosité de 0,2 μ m (membrane en polycarbonate Nucléopore, diamètre = 47 mm), puisensemencés par 5 ml d'une eau de Seine préfiltrée sur membrane de porosité de 2 μ m (membranes en polycarbonate Nucléopore, diamètre = 47 mm).

Les échantillons sont incubés à 20 °C pendant 28 jours. Le dénombrement bactérien est effectué par comptage microscopique en épifluorescence après coloration à l'acridine orange. 1 ml d'échantillon pur ou dilué est filtré (membrane noire en polycarbonate, Millipore, porosité = 0,2 μ m, diamètre = 25 mm). Les bactéries retenues sur la membrane sont mises en contact pendant 10 mn avec une solution d'acridine orange (MERCK Ref 1333) à 30 μ g/ml. Les cellules sont comptées au microscope (Leitz, Dialux 20) sous excitation UV (lampe ORSAM HBO 50 W). Après dénombrement des bactéries (lecture de 20 champs répartis sur toute la membrane), le résultat est exprimé en nombre de bactéries/ml.

Mesure du CODB en présence de bactéries fixées sur du sable

300 ml d'eau déchlorée (0,1 ml de thiosulfate de sodium à 100 g/l pour 500 ml d'échantillon) sontensemencés par 100 g de sable biologique et incubés à 20 °C (± 1 °C) avec une aération de 4 l/h selon la méthode décrite par JORET et LEVI (1986).

Tous les jours, une mesure du COD est effectuée en duplicat à l'aide d'un analyseur de Carbone Organique Total (Oceanic Instrument Analytical, modèle 700). L'échantillon est acidifié par 400 μ l d'acide orthophosphorique à 5 % afin d'éliminer les bicarbonates. Le carbone organique est oxydé par addition de 1 ml de persulfate de sodium (100 g/l) à chaud pour une prise d'échantillon de 5 ml. Le COD est évalué par mesure du CO_2 produit détecté par spectrométrie infrarouge.

Le CODB correspond à la différence entre la valeur de COD initiale (CODi) et la valeur minimale (CODR) obtenue après quelques jours d'incubation.

$$\text{CODB mg/l} = \text{CODi} - \text{COD minimal}$$

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Relation entre CODB et maximum de croissance d'une souche pure de *Pseudomonas fluorescens* P17

Ces deux paramètres ont été comparés pour différentes dilutions d'un échantillon d'eau de Seine (CODi = 3,24 mg/l ; CODB = 1,37 mg/l). Ces dilutions (1/4, 1/2 et 3/4) ont été effectuées dans de l'eau ultrapure (Système de purification MILLI-Q, Millipore).

La figure 1 montre la relation entre les maxima de croissance et les valeurs de CODB pour les différentes dilutions de cet échantillon. Elle indique une bonne corrélation ($r = 0,989$) entre les deux méthodes analytiques utilisées en fonction de la dilution d'une eau de rivière.

L'étude a été poursuivie sur différents types d'eau (eaux de rivières, eaux en cours de traitement de l'usine de Méry sur Oise, eaux produites, eaux minérales, eaux distillées) (fig. 2).

Pour les eaux de rivières, les valeurs de CODB sont supérieures à 1,2 mg/l (CODi compris entre 3,10 et 4,03 mg/l) avec des valeurs du maximum de croissance de P17 supérieures à $7 \cdot 10^5$ UFC/ml.

Les eaux potables ou en cours de traitement présentent des valeurs de CODB qui varient de 0,2 mg/l jusqu'à 1 mg/l (CODi compris entre 0,90 et 2,89 mg/l). Les maxima de croissance de P17 sont compris entre $2 \cdot 10^5$ et $8 \cdot 10^5$ UFC/ml.

Pour les eaux pauvres en matière organique (CODi inférieur à 0,5 mg/l, CODB inférieur à 0,1 mg/l), les maxima de croissance sont compris entre $0,9 \cdot 10^5$ UFC/ml (eau distillée) à $2 \cdot 10^5$ UFC/ml (eau minérale).

Pour les 28 échantillons étudiés, les valeurs de CODB et les maxima de croissance de *Ps. fluorescens* P17 sont statistiquement liés ($p = 0,01$). Cependant le coefficient de corrélation est médiocre ($r = 0,716$). Pour des

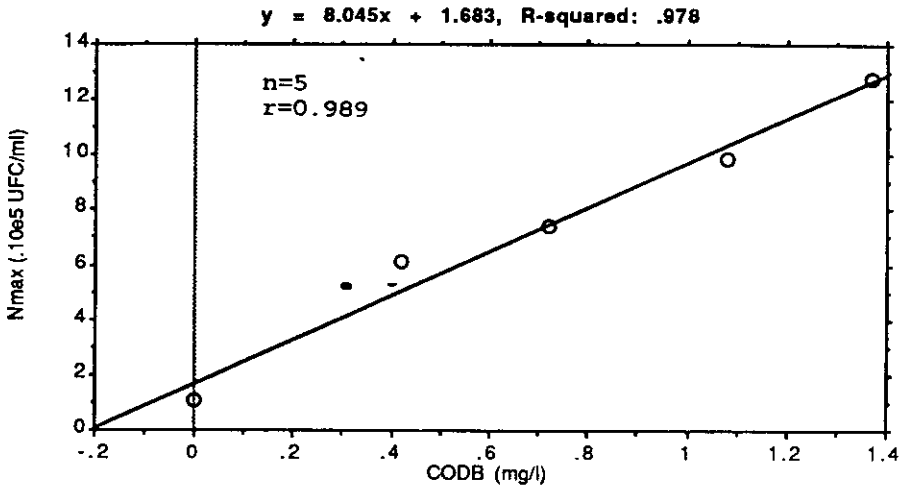


Figure 1 Relation entre le CODB (sable biologique) et le maximum de croissance (UFC/ml, gélose PCA ensemencée en inclusion) pour différentes dilutions d'eau de Seine. Inoculum : *Pseudomonas fluorescens* P17.

Relationship between BDOC (sand) and maximum growth (CFU/ml, pour plate method, PCA medium) for different dilutions of river water (Seine). Inoculum : Pseudomonas fluorescens P17.

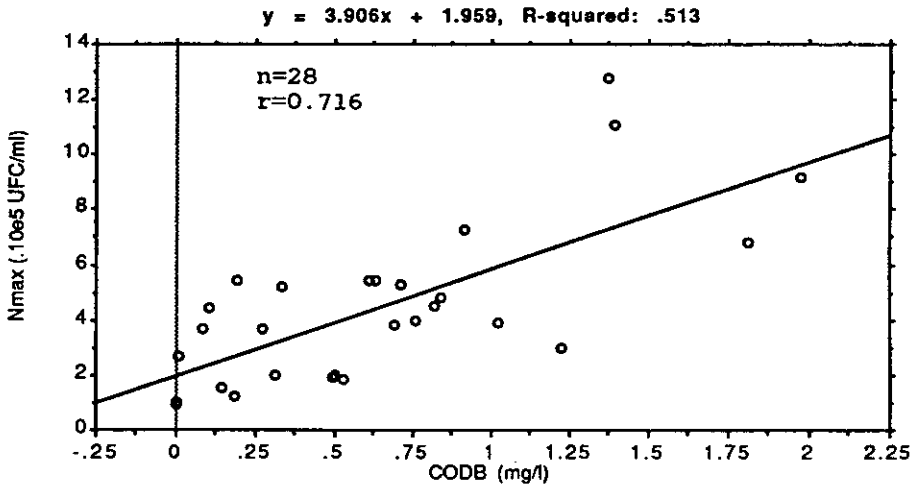


Figure 2 Relation entre le CODB (sable biologique) et le maximum de croissance (UFC/ml, gélose PCA ensemencée en inclusion) pour différents types d'eau. Inoculum : *Pseudomonas fluorescens* P17.

Relationship between BDOC (sand) and maximum growth (CFU/ml, pour plate method, PCA medium) for different types of water. Inoculum : Pseudomonas fluorescens P17.

eaux de diverses origines, l'observation du maximum de croissance de la souche de P17 ne traduit que dans 50 % des cas ($r^2 = 0.513$) les variations de CODB enregistrées. Ceci peut s'expliquer par le fait que cette souche de bactéries ne peut assimiler qu'un spectre limité de substrats, lesquels peuvent être présents en quantité très variable dans les différents échantillons d'eau.

D'après la pente de la droite, le rendement de croissance moyen de la souche de *Ps. fluorescens* P17 peut être estimé à $5,9 \cdot 10^8$ UFC par mg de CODB.

Le rendement de croissance de P17 en présence d'acétate de sodium étant de $4,1 \cdot 10^6$ UFC/ $\mu\text{g C eq. acétate}$ (VAN DER KOOIJ et HIJNEN, 1984), il en résulte que 1 mg de CODB mesuré en présence de sable biologique correspond en moyenne au cours de ces essais à une valeur de COA de 140 $\mu\text{g C eq. acétate}$.

Relation entre le CODB, la croissance de *Pseudomonas fluorescens* P17 et *Spirillum* NOX et le COA.

La relation existant entre les valeurs de CODB et le maximum de croissance de chacune des souches de P17 et NOX lorsque les échantillons d'eau sont ensemencés simultanément par ces deux souches bactériennes a été étudiée.

Pour différentes dilutions d'un échantillon d'eau de rivière (CODi = 5.60 mg/l ; CODB = 3,38 mg/l) dans de l'eau ultrapure (Système de purification MILLI-Q, Millipore) les valeurs de CODB sont en étroite corrélation avec les maxima de croissance obtenus pour chacune des souches de *Ps. fluorescens* P17 ($r = 0,998$) et de *Spirillum* NOX ($r = 0,987$) (fig. 3). Dans ces conditions, le calcul des valeurs de COA à partir des maxima de croissance conduit à une très bonne corrélation entre COA et CODB (fig. 4) en fonction de la dilution d'une eau de rivière ($r = 0,996$; $n = 5$).

La différence de pente des droites de croissance de *Pseudomonas fluorescens* P17 incubé seul (fig. 1 ; $y = 8,045 x + 1.683$) ou en présence de *Spirillum* NOX (fig. 3 ; $y = 5,204 x + 0,350$) traduit la compétition entre P17 et NOX vis-à-vis de la matière organique biodégradable quand ils sont incubés simultanément.

La même approche a été effectuée pour des eaux d'origines diverses (eaux de rivières avec des valeurs de CODi de 3,12 à 4,42 mg/l ; CODB compris entre 1,05 et 2,08 mg/l), des eaux en cours de traitement de potabilisation (CODi compris entre 1,49 et 3,58 mg/l ; CODB compris entre 0,34 et 1,32 mg/l), des eaux distribuées (CODi compris entre 0,38 et 2,25 mg/l ; CODB compris entre 0,1 et 0,9 mg/l), des eaux minérales (CODi compris entre 0,30 et 0,53 mg/l ; CODB inférieur à 0,15 mg/l) et des eaux distillées (CODi inférieur à 0,20 mg/l ; CODB inférieur à 0,1 mg/l).

La relation entre les valeurs du maximum de croissance de *Ps. fluorescens* P17 et les valeurs de CODB est représentée sur la figure 5. Les valeurs de CODB et maxima de croissance sont statistiquement liées ($p = 0,01$). Le coefficient de corrélation obtenu ($r = 0,850$; $n = 31$) est meilleur que lors des

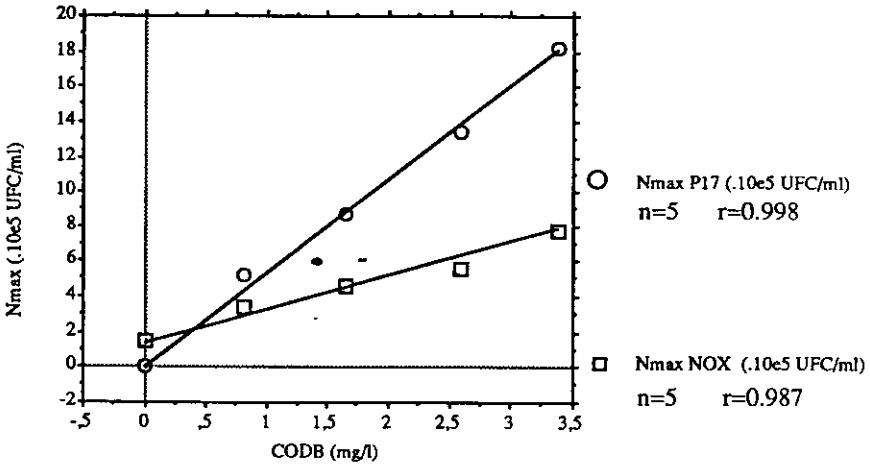


Figure 3 Relation entre le CODB (sable biologique) et le maximum de croissance de *Pseudomonas fluorescens* P17 (○) et de *Spirillum* NOX (□) (UFC/ml, gélose R2A ensemencée en surface) pour différentes dilutions d'eau de Seine. Inoculum : P17 + NOX.

Relationship between BDOC (sand) and maximum growth of Pseudomonas fluorescens P17 (○) and Spirillum NOX (□) (CFU/ml, spread plate method, R2A medium) for different dilutions of river water (Seine). Inoculum : P17 + NOX.

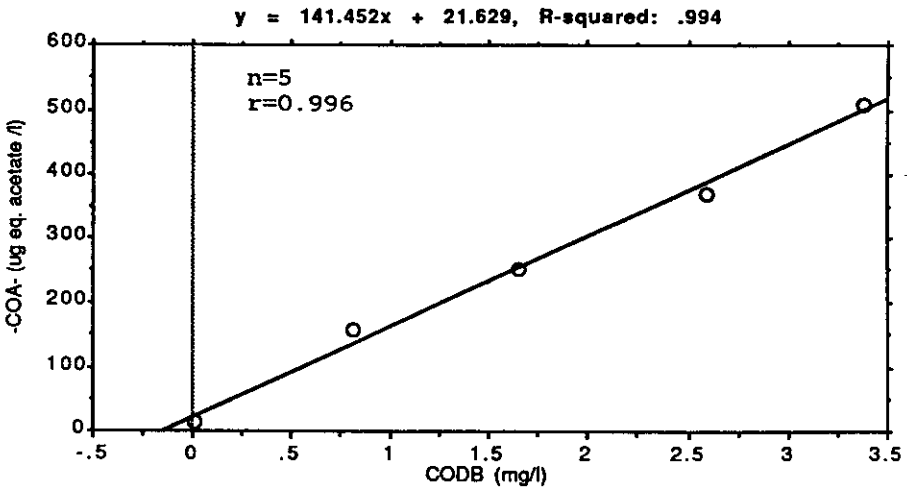


Figure 4 Relation entre le CODB (sable biologique) et le COA (µg C eq. acétate/l) pour différentes dilutions d'eau de Seine. Inoculum : P17 + NOX.

Relationship between BDOC (sand) and AOC (µg C eq. acetate/l) for different dilutions of river water (Seine). Inoculum : P17 + Nox.

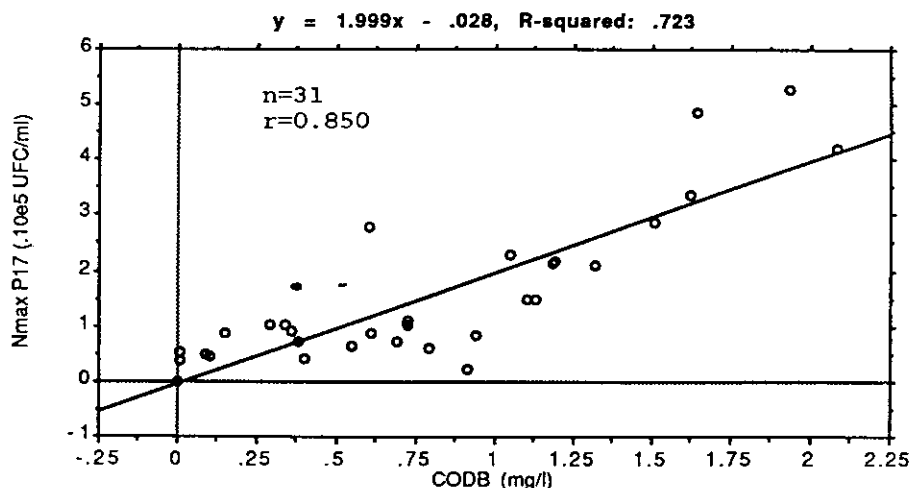


Figure 5 Relation entre le CODB (sable biologique) et le maximum de croissance (UFC/ml, gélose R2A ensemencée en surface) de *Pseudomonas fluorescens* P17 dans différents types d'eau. Inoculum : P17 + NOX.

Relationship between BDOC (sand) and maximum growth (CFU/ml, spread plate method, R2A medium) of Pseudomonas fluorescens P17 for different types of water. Inoculum : P17 + NOX.

essais précédents (ensemencement des échantillons par P17 seul). Cela peut traduire la capacité de la souche P17 à utiliser des sous produits de biodégradation de la souche NOX. Il faut toutefois noter que dans ces conditions expérimentales, le rendement de croissance n'est que de $2,0 \cdot 10^8$ UFC par mg de CODB contre $5,9 \cdot 10^8$ UFC par mg de CODB lorsque cette souche est ensemencée isolément dans les échantillons d'eau. Ces résultats sont l'expression du phénomène de compétition pour le substrat entre les deux souches bactériennes. Par ailleurs, on note une discontinuité des maxima de croissance de part et d'autre de la valeur de $0,70$ mg/l de CODB.

En ce qui concerne la relation obtenue entre les valeurs de maximum de croissance de *Spirillum* NOX et les valeurs du CODB (fig. 6), le coefficient de corrélation sur ces mêmes types d'eau est très faible ($r = 0,264$; $n = 31$; valeurs de CODB et maxima de croissance de NOX statistiquement indépendantes ($p = 0,01$)). La dispersion des points est à l'évidence principalement liée aux échantillons d'eau ayant subi une étape d'ozonation (fig. 6). La corrélation étant meilleure pour les échantillons non ozonés ($r=0,915$; $n=19$), la bactérie *Spirillum* NOX semble donc avoir une affinité très variable selon la nature des sous produits d'ozonation. L'utilisation de cette bactérie préconisée pour évaluer la biodégradabilité des eaux après ozonation (VAN DER KOOIJ et HIJNEN, 1984) semble donc présenter des limites, particulièrement pour ce type d'eau.

Les valeurs cumulées des maxima de croissance de P17 et NOX et les valeurs de CODB sont liées ($p = 0,01$), mais le coefficient de corrélation est assez faible ($r = 0,510$; $n = 31$).

Une meilleure relation ($r = 0,769$; $n = 31$) est par contre obtenue lorsque l'on exprime les valeurs de CODB et de COA (fig. 7). Ces deux paramètres varient de la même manière dans 60 % des cas.

D'après la pente de la droite, 1 mg de CODB correspond alors à 90 μg C eq. acétate ($r^2 = 0,592$). Sa valeur est proche de celle obtenue lorsque les échantillons d'eau sont ensemencés avec *Ps. fluorescens* P17 seul (140 μg eq. acétate ; $r^2 = 0,513$).

Relation entre CODB et \bar{r} croissance d'une flore bactérienne mixte

La figure 8 montre la relation entre les valeurs de maximum de croissance d'une flore bactérienne mixte et les valeurs de CODB pour différentes dilutions d'eau de rivière (CODi = 3,24 mg/l ; CODB = 1,23 mg/l) dans de l'eau ultrapure. Le coefficient de corrélation obtenu est de 0,984.

L'étude sur des eaux de différentes origines est montrée dans la figure 9.

Les eaux de rivières (CODi compris entre 2,69 et 4,04 mg/l ; CODB supérieur à 1 mg/l) ont un maximum de croissance supérieur à $2 \cdot 10^6$ bactéries/ml.

En ce qui concerne les eaux en cours de traitement et les eaux potables (CODi compris entre 1,05 et 3,00 mg/l ; CODB compris entre 0,10 et 1,10 mg/l), les maxima de croissance varient de $5 \cdot 10^5$ à $1,5 \cdot 10^6$ bactéries/ml.

Pour les eaux pauvres en matière organique, le maximum de croissance se situe entre 3,5 et $5 \cdot 10^5$ bactéries/ml (CODi inférieur à 0,5 mg/l ; CODB inférieur à 0,1 mg/l).

La relation entre les deux paramètres, CODB et maximum de croissance, est alors très bonne ($r = 0,943$; $n = 30$). Ces résultats démontrent que le CODB prédit à 90 % la recroissance d'une flore bactérienne mixte, celle-ci étant capable d'utiliser un plus large spectre de composés organiques que des souches pures, utilisées seules ou en mélange. Le rendement de croissance est de $1,7 \cdot 10^9$ bactéries/mg de CODB soit trois fois plus important que celui de *Ps. fluorescens* seul.

CONCLUSION

Le test biologique d'évaluation du CODB faisant appel à des bactéries fixées sur du sable est une technique simple, rapide et facile à mettre en œuvre. Il ne nécessite pas de dénombrements bactériens fastidieux.

Cette méthode donne une information quantitative précieuse sur les fractions biodégradables et réfractaires à la biodégradation de la matière organique dissoute de différents types d'eau.

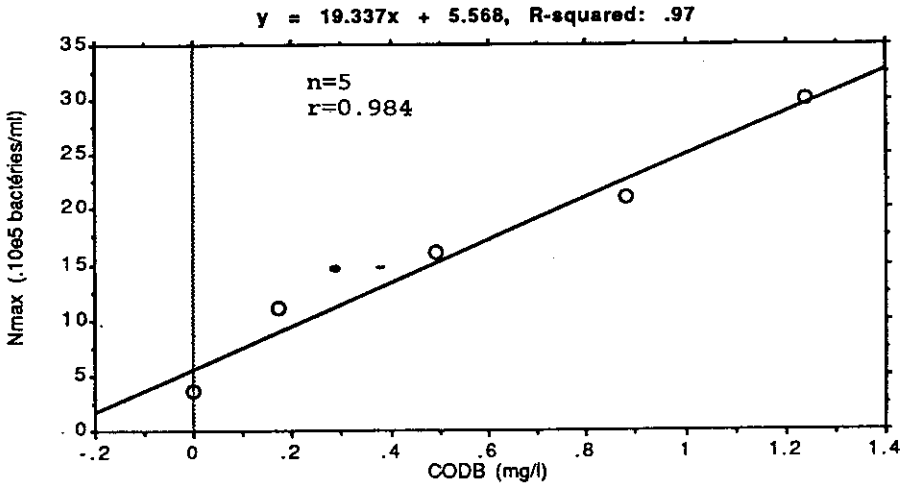


Figure 8 Relation entre le CODB (sable biologique) et le maximum de croissance (bactéries/ml, comptage microscopique en épifluorescence) pour différentes dilutions d'eau de Seine. Inoculum : flore naturelle mixte (eau de Seine).

Relationship between BDOC (sand) and maximum growth (bacteria/ml, epifluorescent counts) for different dilutions of river water (Seine). Inoculum : mixed indigenous bacteria (Seine).

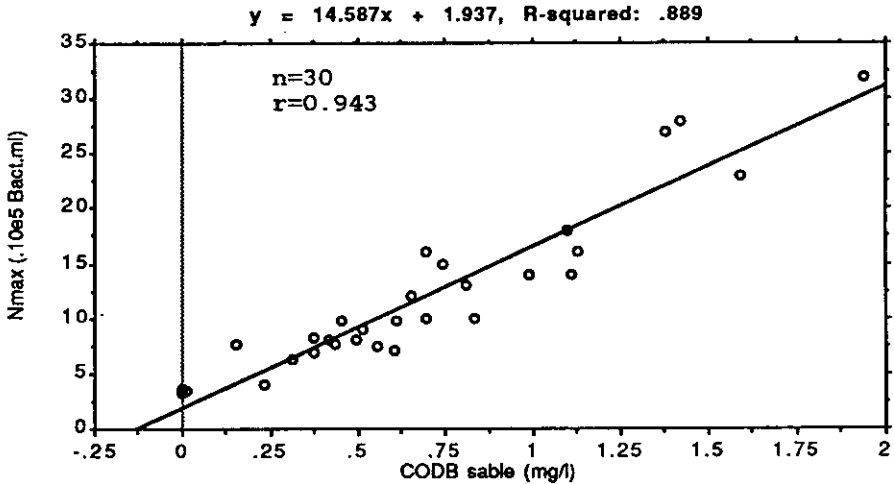


Figure 9 Relation entre le CODB (sable biologique) et le maximum de croissance (bactéries/ml, dénombrement microscopique en épifluorescence) pour différents types d'eau. Inoculum : flore naturelle mixte (eau de Seine).

Relationship between BDOC (sand) and maximum growth (bacteria/ml, epifluorescent counts) for different types of water. Inoculum : mixed indigenous bacteria (Seine).

Cette étude démontre que :

— Le paramètre CODB traduit dans 90 % des cas le potentiel de recroissance bactérienne des eaux d'origines très diverses ($r = 0,943$) lorsque celles-ci sontensemencées par une flore bactérienne mixte, indigène des eaux.

— La relation entre ce paramètre et les maxima de croissance obtenus avec des souches pures de bactéries telles que *Pseudomonas fluorescens* P17 utilisé seul ($r = 0,716$) ou en mélange avec *Spirillum* NOX ($r = 0,850$) est plus faible. La souche de bactéries *Spirillum* NOX a une affinité très variable selon la nature des sous produits d'ozonation. La comparaison des valeurs de CODB et de COA obtenues avec deux souches bactériennes (P17 + NOX) conduit à des résultats concordants dans 60 % des cas ($r^2 = 0,592$).

— pour les échantillons d'eau testés, 1 mg de CODB correspond à 90-140 µg de COA eq. acétate.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- COALLIER J., LAFRANCE P., DUCHESNE D., LAVOIE D., 1989. La recroissance bactérienne dans les réseaux de distribution d'eau potable : *Sc. Tech. eau* ; 22 : 63-72.
- JAGO P., SHARP D.E., 1988. Proceedings of AOC meeting held at WRC (feb. 15) ; Medmenham, UK. 38 p.
- JORET J.C., LEVI Y., 1986) Méthode rapide d'évaluation du carbone éliminable des eaux par voie biologique. *Trib. Cebedeau*, 39 : 3-9.
- JORET J.C., LEVI Y., DUPIN T., GIBERT M., 1988. Rapid method for estimating bioeliminable organic carbon in water. AWWA, Annual Conf. ; Orlando, Fla.
- JORET J.C., LEVI Y., GIBERT M., 1989. The measurement of bioeliminable dissolved organic carbon (BDOC) : a tool in water treatment. *Water Supply* ; 7 : 41-45.
- JORET J.C., LEVI Y., VOLK C., 1990. Biodegradable dissolved organic carbon (BDOC) content of drinking water and potential regrowth of bacteria. IAWPRC, International Symposium on Health Related Water Microbiology (apr. 1-6) ; Tubingen (F.R.G.).
- KAPLAN L.A., BOTT T.L., 1989. Implementation and evaluation of a simplified bioassay for assimilable organic carbon in water distribution systems. Project of Stroud Water Research center of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia. 22 p.
- KAPLAN L.A., BOTT T.L., 1990. Nutrients for bacterial growth in drinking water : Bioassay evaluation. Project summary, US EPA. 8 p.
- KEMMY F.A., ERY J.C., BREACH R.A., 1989. Development and operational implementation of a modified and simplified method for determination of assimilable organic carbon (AOC) in drinking water. *Water Sci. Technol.*, 21, 3 : 155-159.
- LECHEVALLIER M.W., CAWTHON C.D., LEE R.G., 1988. Inactivation of biofilm bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 54, 10 2492-2499.
- LECHEVALLIER M.W., LEE R.G., MOSER R.M., 1989. Bacterial nutrients in drinking water. American Water Works Service Company, INC. 53 p.
- MOGREN R.M., SCARPINO P., SUMMERS R.S., 1990. Measurement of biodegradable dissolved organic carbon in drinking water. Proc. Annual AWWA Conf. (june 18-24) ; Cincinnati, OH.
- OLSON B.H., 1982. Assessment and implications of bacterial regrowth in water distribution systems. EPA 600/52-82-072. US. Environmental Protection Agency.
- REASONER D.J., RICE E.W., 1989. US EPA experiences with AOC and coliforms

- growth response assays. Workshop on measurement of AOC in the field of drinking water treatment (nov. 89) ; Karlsruhe, RFA.
- RIBAS F., ERIAS J, LUCENA F., 1991. A new dynamic method for the rapid determination of the biodegradable dissolved organic carbon in drinking water, *Jour. Appl. Bact.*, 71. à paraître.
- RIZET M., FIESSINGER F., HOUEL N., 1982. Bacterial regrowth in a distribution system and its relationship with the quality of the feed water : cases studies. Proceeding of the American Water Works Technology Conference, 1982, Miami Beach, pp. 1199-1274.
- SERVAIS P., BILLEN G., HASCOET M.C., 1987. Determination of the biodegradable fraction of dissolved organic matter in waters. *Water Res* ; 21 : 445-450.
- STANFIELD G., JAGO P.H., 1987. The development and use of a method for measuring the concentration of assimilable organic carbon in water. WRC Environment. 43 p.
- Supplement Standard Methods for the examination of water and wastewater, (1991). Assimilable Organic Carbon (Proposed standard method). Supplement 18^e édition. APHA. AWWA WPCF. sous presse.
- VAN DER KOOIJ D., HIJNEN W.A.M., 1981. Utilisation of low concentrations of starch by a flavobacterium species isolated from tap water. *Appl. Envir. Microbiol.* : 41 : 216-221.
- VAN DER KOOIJ D., WISSER A., HIJNEN W.A.M., 1982. Determining the concentration of easily assimilable organic carbon in drinking water. *J. AWWA* ; 74 : 540-545.
- VAN DER KOOIJ D., HIJNEN W.A.M., 1984. Substrate utilisation by an oxalate consuming Spirillum species in relation to its growth in ozonated water. *Appl. Environ. Microbiol.* ; 47 : 551-559.
- WERNER P., 1985. Eine Methode zur Bestimmung der Verkeimungsneigung von Trinkwasser. *Vom Wasser* ; 65 : 257-270.
- WERNER P., HAMBSCH B., 1986. Investigations on the growth of bacteria in drinking water. *Water Supply* ; 4 : 227-232.