

BTS METIERS DE L'EAU

SESSION 2002

EPREUVE : BIOCHIMIE, BIOLOGIE ET MICROBIOLOGIE DES EAUX

Durée : 4 heures

Coef : 4

Calculatrice interdite

Influence de la nature des matériaux des canalisations sur la prolifération bactérienne.

Ce sujet traite, à partir de l'article paru dans la revue Techniques Sciences et Méthodes de février 1998 (voir annexe 1), de l'évaluation de la prolifération bactérienne dans les réseaux d'adduction d'eau potable et de l'influence de la nature des matériaux des canalisations sur celle-ci. Pour certaines questions, il faudra se référer à l'article de l'annexe 1. La lecture de la totalité de l'article n'est pas nécessaire. Les paragraphes et tableaux auxquels il faudra se référer seront indiqués dans les questions.

1. Prolifération bactérienne (20 points).

1.1. Présenter, sous forme d'un schéma détaillé et légendé, l'organisation structurale d'un biofilm mature au niveau des parois des canalisations des réseaux d'adduction d'eau potable.

Citer des facteurs favorisant le développement du biofilm.

1.2. Indiquer les conséquences de la prolifération bactérienne sur la qualité de l'eau distribuée.

Comme il est indiqué dans l'introduction de l'article, certains matériaux favorisent le dépôt et la croissance de bactéries pathogènes spécifiques et/ou opportunistes dans le réseau.

1.3. Définir les termes "pathogène spécifique" et "opportuniste". Donner des exemples de bactéries pathogènes spécifiques et opportunistes responsables de pathologies d'origine hydrique.

1.4. Citer les moyens de lutte permettant de limiter la prolifération de ces bactéries et dégager, dans ce cadre, l'intérêt de l'étude présentée en annexe 1.

2. Mise en œuvre des tests d'évaluation de la prolifération bactérienne (48 points).

Afin d'évaluer la prolifération bactérienne induite par les matériaux des canalisations, deux méthodes sont utilisées et comparées : le test anglais et le test hollandais.

2.1. Le test anglais.

2.1.1 Déterminer, à l'aide des paragraphes 1 et 2 de l'article de l'annexe 1, les formes de complémentation de l'azote et du phosphore dans le test au cours des essais.

Justifier cette complémentation ainsi que l'incubation à l'obscurité des tests.

BTS METIERS DE L'EAU		SESSION : 2002
CODE : MTBBM	DUREE : 4 HEURES	COEFFICIENT : 4
EPREUVE : BIOCHIMIE, BIOLOGIE ET MICROBIOLOGIE DES EAUX		PAGE : 1 sur 9

2.1.2. Expliquer l'intérêt de la mesure de la consommation en oxygène dissous, MDOD (voir paragraphe 2.4) pour évaluer la prolifération bactérienne.

Décrire le rôle de l'oxygène dans le métabolisme énergétique des bactéries hétérotrophes aérobies.

Indiquer le site cellulaire responsable de l'utilisation de l'oxygène.

2.1.3. Préciser, en vous référant au paragraphe 2, le moyen utilisé pour éliminer les protozoaires prédateurs de l'inoculum.

Donner une définition des protozoaires et quelques exemples.

Expliquer la présence de ces protozoaires dans une eau de rivière en précisant leur rôle.

Donner un exemple précis de protozoaire prédateur pouvant être rencontré dans une eau de rivière.

2.1.4. Conclure par rapport au tableau II du paragraphe 3 sur l'influence des différents matériaux testés sur la prolifération bactérienne.

Remarque : Le verre est le témoin négatif et la paraffine le témoin positif de prolifération bactérienne.

2.2. Le test hollandais.

2.2.1. A partir du paragraphe 1 de l'article figurant en annexe 1

- Indiquer les différentes étapes du mode opératoire utilisé pour quantifier le biofilm présent sur les différents matériaux.

- Préciser l'intérêt de l'utilisation des ultrasons.

2.2.2. Donner la structure chimique simplifiée (formule chimique non obligatoire) de l'ATP et montrer la relation entre cette structure et le rôle de l'ATP dans la cellule.

Expliquer l'intérêt de la quantification de l'ATP pour évaluer la prolifération bactérienne.

2.2.3. Le document réponse DR 1, détaille une des voies métaboliques les plus utilisées par les bactéries hétérotrophes pour dégrader le glucose.

Compléter le document à rendre avec la copie et :

- Préciser le numéro des étapes dans lesquelles intervient l'ATP.

- Faire le bilan en ATP de cette voie.

- Décrire, sans les détailler, les voies métaboliques complémentaires permettant aux bactéries aérobies hétérotrophes de produire de l'ATP supplémentaire.

Le test hollandais utilise le dénombrement bactérien par épifluorescence (voir paragraphe 2.7).

2.2.4. Décrire le principe du dénombrement des bactéries par épifluorescence.

Indiquer un avantage et un inconvénient de cette technique par rapport à la méthode normalisée de dénombrement des micro-organismes revivifiables par culture en milieu solide.

2.2.5. A partir du tableau III du paragraphe 4, déterminer :

- l'effet des différents matériaux sur la croissance bactérienne dans la phase eau ;

- l'effet des différents matériaux sur la croissance du biofilm.

Relier entre-elles ces deux observations.

BTS METIERS DE L'EAU		SESSION : 2002
CODE : MTBBM	DUREE : 4 HEURES	COEFFICIENT : 4
EPREUVE : BIOCHIMIE, BIOLOGIE ET MICROBIOLOGIE DES EAUX		PAGE : 2 sur 9

3. Conclusions de l'étude (12 points).

3.1. A l'aide des tableaux II et III et du paragraphe 4.1, comparer les résultats des deux tests d'évaluation. Justifier votre réponse.

Trois matériaux sont souvent utilisés ou rencontrés dans les réseaux d'adduction d'eau potable : le plomb, le ciment et le PEHD.

3.2. Indiquer les effets toxiques, chroniques, dus au plomb en citant la maladie qu'il entraîne chez les enfants en précisant le principal signe clinique.

3.3. Proposer une explication de la prolifération bactérienne à l'intérieur des conduits en PEHD.

BTS METIERS DE L'EAU		SESSION : 2002
CODE : MTBBM	DUREE : 4 HEURES	COEFFICIENT : 4
EPREUVE : BIOCHIMIE, BIOLOGIE ET MICROBIOLOGIE DES EAUX		PAGE : 3 sur 9

Examen ou concours :

Série :

Spécialité/option :

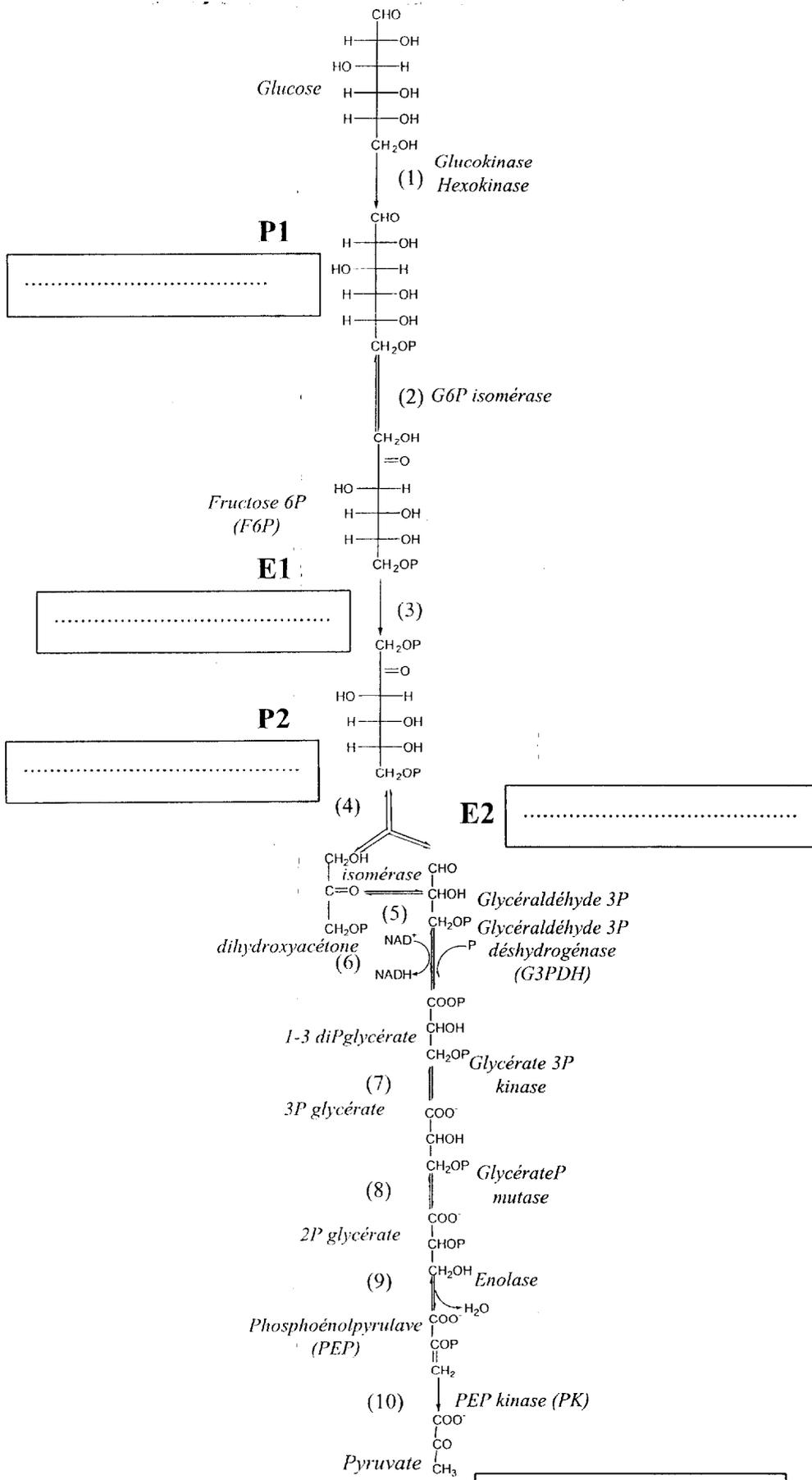
Repère de l'épreuve :

Épreuve/sous-épreuve :

(Précisez, s'il y a lieu, le sujet choisi)

Si votre composition comporte plusieurs feuilles, numérotez-les et placez les intercalaires dans le bon sens.

DOCUMENT REPONSE DR 1 (à remettre avec la copie).



SESSION : 2002	PAGE : 4 sur 9
COEFFICIENT : 4	
DUREE : 4 HEURES	
BTS METIERS DE L'EAU	
EPREUVE : BIOCHIMIE, BIOLOGIE ET MICROBIOLOGIE DES EAUX	
CODE : MTBBM	

Influence de la nature des matériaux des canalisations sur la prolifération bactérienne : mise en œuvre des tests anglais et hollandais

■ L. MATHIEU¹, J-L. PAQUIN¹, C. HENRIET², M. CAVARD³, P. HARTEMANN¹

A l'heure où le maître-mot est « stabilité biologique » des eaux distribuées, les traiteurs et distributeurs d'eau s'attachent, depuis quelques années déjà, à limiter la prolifération bactérienne dans les réseaux. Face à cette problématique, au moins deux orientations ont été prises :

- agir sur les traitements de l'eau, en instaurant des procédés capables d'éliminer efficacement la matière organique dissoute et biodégradable, facteur-clé gouvernant la prolifération bactérienne,
- évaluer l'impact des matériaux constitutifs des canalisations sur la prolifération bactérienne.

Il est en effet, reconnu que certains matériaux utilisés pour le transport de l'eau dans les réseaux de distribution, peuvent être à l'origine de développements microbiens, du fait de relargage de composés organiques potentiellement biodégradables donc utilisables par la biomasse présente (bactéries ou protozoaires). Aussi, maintenir la stabilité biologique des eaux au cours de la distribution nécessite, en plus de traitements adéquats, d'autres moyens d'action tels que le choix des matériaux des canalisations. Certains matériaux peuvent avoir une influence nuisible sur la qualité de l'eau. Les canalisations constituées de matériaux inorganiques sont depuis longtemps utilisés dans les réseaux de distribution (amiante-ciment, ciment, fonte, acier...). Mais, l'introduction de matériaux synthétiques dans les réseaux a fortement augmenté la possibilité de lessivage des composés organiques biodégradables [5, 6, 10]. Ainsi, le caoutchouc utilisé au niveau des joints est reconnu pour favoriser la croissance des actinomycètes.

Des matériaux tels que le chlorure de polyvinyle (PVC), le polyéthylène (PE), les polyesters sont aussi susceptibles de promouvoir une croissance bactérienne [4, 8]. Sous certaines conditions, certains matériaux peuvent favoriser le

dépôt et la croissance de micro-organismes pathogènes et/ou pathogènes opportunistes tels que *Legionella*, *Mycobacterium*, *Pseudomonas* [4, 7, 9].

Les matériaux synthétiques et non synthétiques sont tous potentiellement générateurs d'un développement bactérien du fait de leur composition complexe qui inclut le(s) composé(s) de base (polymères organiques ou matière minérale) et, dans la majorité des cas, des adjuvants nécessaires à la stabilité du matériau [12]. Ces matériaux peuvent contribuer à la croissance bactérienne mais également à l'apparition de flaveurs, de couleur/turbidité (relargage de produits solubles ou particuliers dans l'eau ; formation de produits de corrosion...) ; à la dégradation de la qualité sanitaire de l'eau (par migration de produits toxiques, tels le plomb, le cadmium, le zinc...).

En conséquence, les matériaux organiques et inorganiques actuellement utilisés pour le transport de l'eau potable devraient être testés d'un point de vue innocuité microbiologique.

Dans ce contexte, et en l'absence de réglementation européenne à ce sujet, le Syndicat des Eaux d'Ile-de-France (SEDIF) a proposé une étude relative au potentiel de 5 matériaux (PEHD, ciment, inox 316L, plomb et caoutchouc) à induire la croissance de bactéries.

Deux types de tests en conditions statiques ont été réalisés conformément aux méthodologies utilisées en Grande-Bretagne (test anglais BS 6920) [1] et aux Pays-Bas (test hollandais BFP-method) [2] et qui se différencient entre autres par le paramètre de mesure de la prolifération bactérienne :

¹ Laboratoire d'hygiène et de recherche en santé publique - 11 bis rue Gabriel Péri - 54500 Vandœuvre lès Nancy

² Compagnie Générale des Eaux - Quartier Valmy - 32, place Ronde - 92982 Paris La Défense

³ Syndicat des Eaux d'Ile-de-France - Tour de Lyon - 185, rue de Bercy - 75579 Paris cedex 12

BTS METIERS DE L'EAU		SESSION : 2002
CODE : MTBBM	DUREE : 4 HEURES	COEFFICIENT : 4
EPREUVE : BIOCHIMIE, BIOLOGIE ET MICROBIOLOGIE DES EAUX		PAGE : 5 sur 9

- pour le test anglais : estimation de l'O₂ dissous (MDOD) consommé par la biomasse bactérienne présente dans l'eau au contact du matériau,
- pour le test hollandais : dosage de l'ATP des bactéries du biofilm développé sur le matériau qui permet l'estimation du potentiel de formation du biofilm (BFP).

Les objectifs de cette étude ont été :

- d'évaluer le potentiel de différents matériaux à générer une prolifération microbienne,
- de comparer les deux tests (c'est-à-dire classement des matériaux, sensibilité des paramètres de mesures),
- et d'apprécier le pouvoir discriminant d'autres paramètres de mesure classiquement utilisés pour quantifier une biomasse bactérienne (dénombrement par épifluorescence et ATP) par rapport aux paramètres imposés par les méthodes standards.

1. Protocoles

1.1. Le test anglais

Sept matériaux dont 3 matériaux témoins ont été testés selon les conditions du test anglais [1]. Le jour de la mise en œuvre du test, l'ensemble des éprouvettes de matériaux est rincé pendant 10 minutes avec l'eau de trempage (eau du robinet).

Pour chaque matériau, on dispose de 3 éprouvettes d'environ 16 cm² ; les matériaux à tester et les matériaux de référence sont placés dans des bocaux, à raison d'une éprouvette par bocal. 100 ml d'inoculum et 900 ml d'eau du robinet, partiellement déchlorée, préalablement dopée en azote et phosphore, sont ajoutés dans chaque bocal.

Trois bocaux sans matériaux sont préparés en parallèle et servent de contrôle. Les bocaux sont ensuite fermés et incubés à 30 °C (±1 °C) à l'obscurité pendant 7 semaines. Au cours de l'incubation, des changements de l'eau de trempage ont été effectués selon les directives de la norme BS 6920.

1.2. Le test hollandais

Le protocole mis en œuvre est celui décrit dans le document intitulé « BFP method » [2]. Après avoir rincé les éprouvettes de matériaux pendant une heure sous un courant d'eau du robinet puis rinçage final avec l'eau de trempage (eau Evian), 2 x 15 éprouvettes de chaque matériau sont placées dans 2 erlenmeyers (A et B) remplis avec 600 ml d'eau d'Evian inoculée avec 5 ml d'eau de rivière, préalablement filtrés sur 5 µm pour éliminer la majeure partie des protozoaires. Deux récipients sans matériau sont réalisés en parallèle et servent de témoin. Ces flacons sont fermés et mis à incuber à l'obscurité à 25 °C (± 1 °C) pendant

16 semaines, sans agitation et sans aucun renouvellement d'eau. La densité bactérienne de l'eau (flacon B) et du biofilm (flacon A) est estimée par la mesure de l'ATP bactérien, après 7, 14, 28, 56, 84 et 111 jours d'incubation.

En ce qui concerne le biofilm, deux éprouvettes de chaque matériau sont placées dans 2 tubes contenant 10 ml d'eau stérile. Le décrochage du biofilm est effectué par utilisation d'ultrasons (bain à ultrason) pendant deux minutes, puis 5 ml sont retirés de chacun des deux tubes et placés dans un flacon en verre préalablement traité ; les 5 ml restants sont jetés. Le tube contenant l'éprouvette de matériau est à nouveau rempli avec 10 ml d'eau stérile puis soniqué deux minutes... Cette opération est répétée 6 fois de suite pour chaque éprouvette de matériau. Sur les 30 ml de sonicat collectés, de 10 à 1 ml sont utilisés pour le dosage de l'ATP (3 dosages par éprouvette), les 20 à 29 ml restants servent au dénombrement des bactéries par microscopie en épifluorescence. Par calcul, les résultats sont exprimés en pg ATP.cm⁻² et en cellules.cm⁻².

Concernant l'analyse de l'eau de trempage, 30 ml sont prélevés stérilement à l'aide d'une pipette en verre, avec la même périodicité que les analyses de biofilm. Les concentrations en ATP et dénombrement bactérien par épifluorescence ont été déterminés et les résultats sont exprimés respectivement en pg ATP . ml⁻¹ et en cellules . ml⁻¹.

2. Matériel et méthodes

2.1. Les matériaux

Sept matériaux, dont trois matériaux témoins, ont été soumis aux tests anglais et hollandais vis-à-vis de leur aptitude à promouvoir un développement bactérien. Il s'agit du polyéthylène haute densité (PEHD), du ciment, du plomb, de l'inox 316L, du caoutchouc (témoin positif du test hollandais), du verre (témoin négatif des tests anglais et hollandais) et de la paraffine (témoin positif du test anglais). Les principales caractéristiques des éprouvettes de matériaux sont présentées dans le *tableau I*.

Caractéristiques	Test anglais	Test hollandais
Surface des éprouvettes (cm ²)	De l'ordre de 160	8
Surface / Volume (cm ² . ml ⁻¹)	0,16	0,013
Préparation des éprouvettes	Rinçage pendant 10 min. avec l'eau de trempage utilisée pour le test	Rinçage pendant 1 h. sous courant d'eau du robinet froide, le jour de démarrage du test
Nombre d'éprouvettes par matériau	3 A raison d'une éprouvette par récipient de trempage	30 A raison de 15 éprouvettes réparties dans 2 récipients de trempage

Tableau I. Caractéristiques des éprouvettes de matériaux imposées par les tests anglais et hollandais

BTS METIERS DE L'EAU		SESSION : 2002
CODE : MTBBM	DURÉE : 4 HEURES	COEFFICIENT : 4
EPREUVE : BIOCHIMIE, BIOLOGIE ET MICROBIOLOGIE DES EAUX		PAGE : 6 sur 9

2.2. L'inoculum

Les tests de prolifération bactérienne sur matériaux sont basés sur la mise en contact d'éprouvette de matériaux avec une eau dopée en micro-organismes.

Pour les deux tests utilisés ici, le dopage en micro-organismes s'est effectué à l'aide d'un inoculum d'eau de rivière (la Moselle), préalablement filtré sur 5 µm pour éliminer au maximum les protozoaires prédateurs de bactéries, et dont les caractéristiques sont conformes aux recommandations des tests anglais et hollandais.

2.3. L'eau de trempage

Les caractéristiques des eaux de trempage sont conformes aux exigences des deux tests.

L'eau de trempage utilisée pour le test anglais (BS 6920) est de l'eau prélevée au robinet du laboratoire. Par contre, compte-tenu des faibles teneurs en matières organiques imposées par le test hollandais (BFP method), l'eau de trempage des matériaux est de l'eau d'Evian.

Selon les recommandations des deux normes, des compléments d'azote et de phosphore ont été réalisés par ajout d'une solution de KNO_3 à $10 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ et d'une solution de KH_2PO_4 à $2 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$.

2.4. Estimation de la consommation moyenne en O_2 dissous : MDOD

2.4.1. La mesure de l'oxygène dissous

La mesure de l'oxygène dissous dans l'eau est réalisée selon la norme européenne NF EN 25814. L'ensemble des dosages d' O_2 dissous a été effectué à l'aide d'un oxymètre WTW96B, préalablement étalonné et pourvu d'un dispositif de compensation de température. Les résultats sont exprimés en $\text{mg} \cdot \text{O}_2 \cdot \text{l}^{-1}$.

2.4.2. Calcul du MDOD

La consommation moyenne d'oxygène dissous correspond à la différence entre la concentration moyenne d' O_2 dissous⁴ de l'eau en contact avec les matériaux et la concentration moyenne en O_2 dissous⁴ du contrôle sans matériau.

$\text{MDOD} = [\text{O}_2 \text{ dissous}]_{\text{matériaux}} - [\text{O}_2 \text{ dissous}]_{\text{contrôle}}$
La moyenne des 3 valeurs de MDOD (3 bocal/matériau) est ensuite calculée pour chaque matériau et exprimée en

$\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$. Une valeur de MDOD < $2,3 \text{ mg} \cdot \text{O}_2 \cdot \text{l}^{-1}$ traduit l'innocuité microbiologique du matériau mis en contact de l'eau [1].

2.5. Le dosage de l'adénosine triphosphate (ATP)

Les protocoles suivis pour toutes les étapes sont ceux préconisés par la société LUMAC.

2.5.1. Préconcentration des échantillons à doser

L'échantillon est filtré sur membrane de cellulose préalablement rincée avec de l'eau distillée stérile apyrogène. Les bactéries retenues par la membrane subissent ensuite une phase de réactivation, préconisée par le protocole LUMAC, par ajout sur la membrane de 500 µl de bouillon peptoné exempt d'ATP (LUMACULT, réf. 9233-1) pendant un temps de contact de 15 minutes.

Dans nos expérimentations, des volumes d'échantillon variant de 1 à 10 ml ont été filtrés sur membrane stérile en acétate de cellulose de porosité 0,2 µm. La préconcentration a été appliquée à la fois aux eaux de trempage des matériaux testés (tests anglais et hollandais) et sur les sonicats de biofilm développés sur les matériaux (tests hollandais uniquement).

2.5.2. Extraction de l'ATP

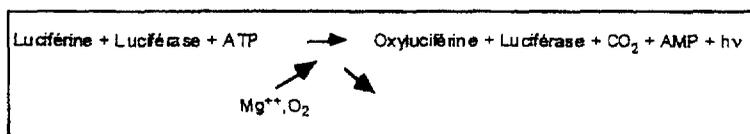
L'ATP des cellules bactériennes a été extrait à l'aide d'un détergent, le NRB, commercialisé par la société LUMAC (LUMAC, réf. 9231-5) et dont la composition reste un secret de fabrication.

Sur la membrane préalablement immergée dans 500 µl de LUMACULT, 500 µl d'extractant sont ajoutés et répartis par agitation douce pendant 30 secondes. Le dosage de l'ATP est ensuite réalisé sur 200 µl de ce mélange.

Un témoin négatif est effectué dans les mêmes conditions, en remplaçant l'échantillon par 10 ml d'eau distillée stérile apyrogène.

2.5.3. Dosage enzymatique de l'ATP

La méthode de quantification de l'ATP bactérien la plus couramment utilisée est basée sur une réaction enzymatique et une détection par bioluminescence. La méthode de dosage de l'ATP est basée sur l'utilisation de la luciférase (enzyme) extraite et purifiée du ver luisant (*Photinus pyralis*) et de son substrat, la luciférine. Le principe de dosage est le suivant :



⁴ Moyenne des mesures d' O_2 dissous au cours des semaines 5, 6 et 7

BTS METIERS DE L'EAU		SESSION : 2002
CODE : MTBBM	DUREE : 4 HEURES	COEFFICIENT : 4
EPREUVE : BIOCHIMIE, BIOLOGIE ET MICROBIOLOGIE DES EAUX		PAGE : 7 sur 9

En présence d'ions Mg^{++} , d'oxygène et d'ATP, la luciférine est oxydée, la luciférase servant de catalyseur. La réaction est endergonique : elle consomme des molécules d'ATP en produisant des photons. L'émission de ceux-ci est proportionnelle à la quantité d'ATP consommée, la réaction étant strictement spécifique de l'ATP.

Un photomètre (LUMAC, réf. M2500) quantifie les photons émis lors de la réaction enzymatique et fournit des unités relatives de lumière (Relative Light Unit : RLU). La conversion des RLU en concentration d'ATP de l'échantillon est obtenue par ajouts dosés d'ATP standard.

La quantité d'ATP de l'échantillon est calculée de la manière suivante :

$$ATP (\mu\text{mol}) = \frac{[C (RLU) - B (RLU)]}{[I (RLU)]} \times [ATP] \text{ standard } (\mu\text{mol})$$

où :

B = RLU correspondant au bruit de fond de l'appareil

C-B = RLU correspondant à la quantité d'ATP dans l'échantillon (RLU_1)

K = RLU_2 (lecture après ajout dosé)

I = K-(C-B) = RLU correspondant à la quantité d'ATP standard ajouté.

2.6. Détermination du potentiel de formation du biofilm (BFP)

Le potentiel de formation du biofilm sur un matériau correspond à la moyenne des densités du biofilm (DB) (exprimées en pg ATP par cm^2) après 8, 12 et 16 semaines d'incubation à 25 °C.

$$BFP = \frac{DB_{\text{jour 56}} + DB_{\text{jour 84}} + DB_{\text{jour 111}}}{3}$$

La détermination du potentiel de formation du biofilm sur matériaux (BFP dans le test hollandais), qui permet seule de conclure sur la conformité des matériaux testés : 500 pg ATP . cm^{-2} est une valeur indicative au dessus de laquelle les matériaux peuvent être considérés comme non conformes.

2.7. Le dénombrement des bactéries par épifluorescence

Le nombre total de cellules bactériennes (mortes et vivantes) a été déterminé par microscopie en épifluorescence après coloration des cellules bactériennes avec un fluorochrome marquant le DNA, le DAPI. Le protocole utilisé est celui décrit par SABA et al. [14]. La numération au mi-

croscopie est réalisée sous lumière UV, à l'objectif 100 et à l'immersion. Trente champs microscopiques sont examinés et les résultats sont exprimés en nombre de cellules bactériennes par ml, ou par cm^2 de support.

3. Résultats du test anglais

	MDDO ($mg O_2 \cdot l^{-1}$)			
	Première série d'essais		Deuxième série d'essais	
Verre	0,01	(0,02)	0	(0)
Paraffine	4,5	(0,07)	4,2	(0,75)
Inox 316 L	0	(0)	/	
Plomb	0,1	(0,07)	/	
Ciment	/		0	(0)
PEHD	/		0	(0)
Caoutchouc	/		2,97	(0,71)

Les chiffres entre parenthèses correspondent aux écarts-types des moyennes de MDDO.

Tableau 2. Consommations moyennes en O_2 dissous (MDDO) mesurées pour chaque matériau (n = 3) lors de la mise en œuvre du test anglais (BS 6820)

BTS METIERS DE L'EAU		SESSION : 2002
CODE : MTBBM	DUREE : 4 HEURES	COEFFICIENT : 4
EPREUVE : BIOCHIMIE, BIOLOGIE ET MICROBIOLOGIE DES EAUX		PAGE : 8 sur 9

4. Résultats du test hollandais

4.1. Estimation du potentiel de formation d'un biofilm (BFP)

Les concentrations en ATP des bactéries issues du biofilm développé sur les divers matériaux sont comprises entre 9 et $1,8 \cdot 10^4$ pg ATP par cm^2 (figure 1). Ces concentrations moyennes présentent des coefficients de variations de 18 à 45 % ; coefficients non négligeables pouvant être expliqués à la fois par la mesure même de l'ATP et, par le mode de calcul du BFP (moyenne des concentrations en ATP sur trois semaines consécutives).

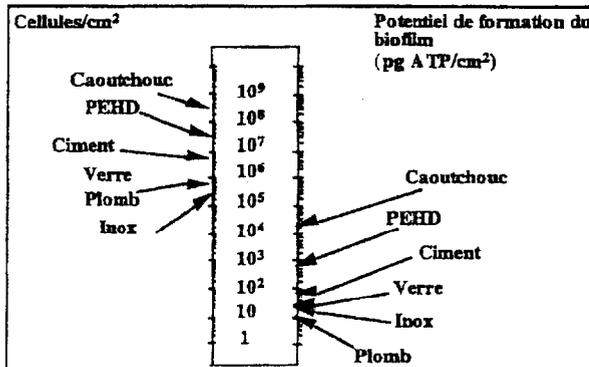


Figure 1. Classement comparatif des matériaux en fonction des paramètres d'évaluation de la prolifération bactérienne (nombre total de cellules marquées au DAPI par cm^2 et potentiel de formation d'un biofilm exprimé en pg ATP par cm^2), dans les conditions du test hollandais (BFP method)

Le biofilm développé sur les matériaux plomb, inox 316 L et ciment présente des concentrations moyennes en ATP proches de celles du verre, compte-tenu des variations sur les mesures d'ATP.

Par contre, le PEHD et le caoutchouc semblent se détacher, puisque la teneur en ATP des bactéries fixées est très supérieure à celles des autres matériaux, respectivement 600 et $1,8 \cdot 10^4$ pg ATP $\cdot \text{cm}^{-2}$.

Toutefois, les tests statistiques par analyse de variance ne permettent pas d'établir de différence significative entre les matériaux pris deux à deux, excepté pour la paraffine (témoin positif) qui seule présente des concentrations en ATP significativement supérieures aux autres matériaux.

En résumé, ces résultats aboutissent à deux types de conclusions qui sont fonction de la référence prise :

- soit le classement est basé sur le seuil de conformité de 500 pg ATP $\cdot \text{cm}^{-2}$, auquel cas la hiérarchie des matériaux est :

Pb	Inox 316L	Verre	Ciment	PEHD	Caoutchouc
CONFORME				NON CONFORME	
< 500 pg ATP $\cdot \text{cm}^{-2}$				> 500 pg ATP $\cdot \text{cm}^{-2}$	

- soit le classement est basé sur les résultats de l'analyse statistique et la hiérarchie devient :

Plomb	Inox 316L	Verre	Ciment	PEHD	Caoutchouc
Aucune différence Statistique					Statistiquement supérieur aux autres matériaux

	Eau		Biofilm	
	(Bactéries $\times 10^5 \cdot \text{ml}^{-1}$)		(Bactéries $\times 10^5 \cdot \text{cm}^{-2}$)	
Contrôle	3,3	(1)	/	
Verre	5,5	(1,7)	7,4	(7)
Inox 316 L	7,03	(0,95)	6,8	(6,1)
Plomb	2,5	(0,25)	7,7	(1,9)
Ciment	3,3	(0,85)	70	(12,3)
PEHD	41,3	(4,7)	247	(60,3)
Caoutchouc	91	(13,9)	3030	(709)

Les chiffres entre parenthèses correspondent aux écarts-types sur les moyennes.

Tableau III. Densités moyennes de bactéries dans l'eau et le biofilm développé sur différents matériaux (dénombrement par microscopie en épifluorescence) ($n = 3$) lors de la mise en œuvre du test hollandais (BFP method)

BTS METIERS DE L'EAU		SESSION : 2002
CODE : MTBBM	DUREE : 4 HEURES	COEFFICIENT : 4
EPREUVE : BIOCHIMIE, BIOLOGIE ET MICROBIOLOGIE DES EAUX		PAGE : 9 sur 9