

BIOFILM ET MATÉRIAUX des canalisations des réseaux de distribution d'eau

*Docteur Fabien SQUINAZI
- Directeur du Laboratoire d'hygiène de la ville de Paris -*

Biofilm et matériaux des canalisations



des réseaux de distribution d'eau

SIGLES UTILISÉS 2

PREMIÈRE PARTIE

BIOFILM ET MATÉRIAUX AU CONTACT
DE L'EAU POTABLE
SYNTHÈSE DES ÉTUDES SCIENTIFIQUES 3RÈGLEMENTATION SUR L'EAU POTABLE 5
Qualité de l'eau au point d'usage
Règles d'hygiène pour les installationsLA CONSTITUTION DES RÉSEAUX 6
Matériaux métalliques
Matériaux de synthèse
Matériaux souplesBIOFILMS ET RÉSEAUX D'EAU POTABLE 7
Structure et fonctions du biofilm
Formation et facteurs favorisant des biofilms
Techniques d'analyses des biofilmsÉVALUATION DES BIOFILMS SUR LES MATÉRIAUX 9
Méthodes expérimentales
Méthode européenne harmoniséeCOMPARAISON DES MATÉRIAUX 10
Tests statiques
Tests dynamiquesDISCUSSION 12
Tests statiques
Tests dynamiques

CONCLUSION 13

DEUXIÈME PARTIE

BIOFILM ET MATÉRIAUX AU CONTACT
DE L'EAU POTABLE
PRÉSENTATION DES ÉTUDES SCIENTIFIQUES ... 15LE BIOFILM 15
Définition du biofilm
Formation du biofilm
- Adhésion des micro-organismes
- Colonisation
Propriétés des biofilms
- Propriétés liés à la matrice
- Présence de cellules dites viables non cultivables
- Résistance aux opérations de nettoyage et de désinfectionBIOFILMS ET DISTRIBUTION D'EAU POTABLE 17
Organisation des biofilms des réseaux de distribution
Activités des biofilms des réseaux de distribution
Paramètres contrôlant l'accumulation des biofilmsMÉTHODES DE MESURE DES BIOFILMS
SUR LES MATÉRIAUX 20
Test MDOD
Test de production d'un dépôt visqueux (SP)
Étude du pouvoir de production d'une biomasse (BPP)
Méthode autrichienne
Méthode européenne harmonisée (test BPP révisé)
Comparaison des méthodesCOMPARAISON DES PROPRIÉTÉS DE CROISSANCE
MICROBIENNE DES MATÉRIAUX 24
Résultats des essais statiques

- Pouvoir de formation du biofilm (BFP)
- Nombre de bactéries sur les matériaux
- Impact des matériaux sur la concentration de biomasse (BMC) dans l'eau
- Nombre de bactéries dans l'eau
- Distribution de la biomasse dans l'eau et sur les matériaux

- Résultats des mesures dans le système dynamique
- Biofilm sur la paroi interne des canalisations
 - Concentrations de fer et de cuivre sur la paroi interne des canalisations
 - Analyses de la qualité de l'eau dans les canalisations

- Résultats des mesures avec l'appareil "biofilm"
- Comparaison du PVC et du polyéthylène
- Comparaison des matériaux de canalisations habituellement utilisés

DISCUSSION 33

- Impact des conditions d'essai sur la formation de biofilm
- Choix de la méthode d'essai
- Paramètres et critères d'évaluation
- Paramètres et base de l'évaluation
 - Classes de qualité
 - Evaluation sur la base du risque sanitaire associé à la promotion de la croissance de bactéries pathogènes
 - Evaluation des matériaux de canalisations pour les installations domestiques

- Matériaux pour les canalisations des réseaux de distribution
- Matériaux de canalisations pour les réseaux intérieurs de distribution
- Optimisation et harmonisation des méthodes d'essai

CONCLUSIONS 38

- Pouvoir de formation de biofilm des matériaux (test BFP)
- Pouvoir de production de biomasse des matériaux (test BPP)
- Promotion de la croissance microbienne des matériaux (méthode européenne harmonisée ou test BPP révisé)
- Recommandations pour de futures recherches

ANNEXES 41

- ANNEXE 1 : Méthodes développées aux Pays-Bas (Kiwa) pour déterminer le pouvoir de croissance microbienne des matériaux de canalisations d'eau
- Essai statique (test BPP)
 - Essai dynamique
 - Détermination du biofilm

- ANNEXE 2 : Installation - test mise au point par l'Université technique du Danemark (DTU) pour des conditions d'écoulement d'eau en continu

- ANNEXE 3 : Évaluation du pouvoir de production de biomasse des matériaux au contact de l'eau potable
- Projet de méthode européenne harmonisée.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES 46

SIGLES UTILISÉS

ADN :	acide désoxyribonucléique
ATP :	adénosine triphosphate
BFP :	pouvoir de formation de biofilm
BP :	production de biomasse
BFR :	taux de formation de biofilm
BMC :	concentration de biomasse dans l'eau
BPP :	pouvoir de production de biomasse
DTU :	université technique du Danemark
HPC :	flore bactérienne hétérotrophe
Kiwa :	centre scientifique et technique des Pays-Bas
LegGP :	pouvoir de croissance des <i>Legionella</i>
SB :	biomasse en suspension dans l'eau
SBP :	production de biomasse en suspension dans l'eau
UFC :	unités formant colonies

PREMIÈRE PARTIE - BIOFILM ET MATÉRIAUX DES CANALISATIONS DES RÉSEAUX DE DISTRIBUTION D'EAU - SYNTHÈSE DES ÉTUDES SCIENTIFIQUES

Docteur Fabien SQUINAZI

- Directeur du Laboratoire d'hygiène de la ville de Paris -

Dans les environnements hydriques naturels, les micro-organismes ont l'aptitude d'adhérer aux supports inertes pour former une structure complexe appelée biofilm. Les densités microbiennes sur les matériaux utilisés pour la distribution de l'eau destinée à la consommation humaine peuvent atteindre jusqu'à 100 millions d'unités formant colonie par centimètre carré, même en présence d'un résiduel de chlore.

La production excessive de biomasses fixées sur les surfaces au contact de l'eau dans les réseaux de distribution peut provoquer une détérioration de la qualité de l'eau d'un point de vue organoleptique (goût, odeur). Surtout ces biofilms sont connus pour être responsables de contaminations bactériennes de l'eau circulante par libération des bactéries adhérentes. Parmi les micro-organismes décrochés, certains, tels que les légionelles ou *Pseudomonas aeruginosa*, peuvent porter atteinte à la santé des utilisateurs de l'eau, essentiellement vis-à-vis des populations fragilisées.

Plusieurs facteurs sont susceptibles de favoriser l'implantation des biofilms sur les canalisations au contact de l'eau destinée à la consommation humaine : conditions hydrauliques, température de l'eau, présence d'un résiduel en chlore, composition physico-chimique de l'eau.

Les matériaux sont tous potentiellement générateurs d'un développement bactérien du fait de leur composition mais aussi de l'âge et de l'état de la surface.

Dans un avis daté du 8 juillet 2003, considérant qu'il n'existe pas de méthode normalisée pour la mesure des biofilms, le Conseil supérieur d'hygiène publique de France (Section des eaux) a proposé de supprimer la mention relative à la propension des canalisations en polybutylène (PB), polypropylène (PP), polyéthylène réticulé (PER) et polychlorure de vinyle surchloré (C-PVC) à favoriser la formation de biofilms ainsi que la mention relative à l'action bactéricide des canalisations en cuivre, susceptible de limiter la formation de biofilms.

Des méthodes expérimentales ont été développées ces dernières années afin de déterminer les propriétés de promotion de la croissance microbienne des matériaux au contact de l'eau potable. Une méthode européenne harmonisée, basée sur le test développé aux Pays Bas, a été proposée pour évaluer la croissance microbienne sur les matériaux au contact de l'eau potable. Elle repose sur la mesure de l'adénosine triphosphate, composé riche en énergie présent dans les organismes vivants, en activité.

Ce document présente l'état des connaissances sur les méthodes de mesure des biofilms sur les matériaux et les résultats obtenus dans diverses expérimentations.

LA QUALITÉ DE L'EAU DÉPEND AUSSI DE LA QUALITÉ DES RÉSEAUX

L'eau, élément essentiel de la vie, est un enjeu capital de santé publique et la préservation de la qualité de l'eau dans les réseaux intérieurs de distribution des bâtiments devient une priorité absolue.

La prolifération des bactéries, et notamment des légionelles, dans les réseaux intérieurs de distribution d'eau des établissements recevant du public -hôtels et surtout établissements de santé- et des immeubles d'habitation, peut devenir un risque sanitaire, en particulier pour les personnes les plus fragiles.

La méconnaissance des paramètres de dégradation de la qualité de l'eau, et parfois même la totale ignorance des causes et des moyens de prévention ainsi que la propagation répétée de contre vérités évidentes ou de solutions miracles, peuvent conduire à de nombreuses erreurs aux conséquences fâcheuses

pour des établissements abritant notamment des personnes fragilisées (personnes âgées, malades,...).

Plusieurs facteurs participent à la dégradation de la qualité de l'eau dans les réseaux intérieurs de distribution : eaux stagnantes ou vitesses de circulation insuffisantes, bras morts ou boucles, températures entre 25 ° et 50 °C, dépôts et concentrations de tartre, boues et sédiments dus à la corrosion, concentrations, même faibles, de certains métaux tels que le fer, zinc et de substances chimiques comme le potassium, vieillissement des installations, entretien insuffisant, nature des matériaux...

Des recommandations ont été publiées ces dernières années^{1,2,3,4}, elles visent à réduire, voire supprimer les risques de contamination dans les réseaux intérieurs de distribution.

Biofilm et matériaux des canalisations des réseaux de distribution d'eau

Synthèse des études scientifiques

1) Gestion du risque lié aux légionelles – Conseil supérieur d'hygiène publique de France – Editions Tec et Doc, Lavoisier 2002

2) Réseaux d'eau destinée à la consommation humaine à l'intérieur des bâtiments – Partie 1 : Guide technique de conception et de mise en œuvre. CSTB 2003

3) L'eau dans les établissements de santé – Guide technique. Ministère de la santé, de la famille et des personnes handicapées (à paraître 2004)

4) Groupe Eau – Santé – Eaux des établissements de santé – Laboratoire Viatrix

La sécurité des réseaux passe par une bonne conception et une maintenance rigoureuse des installations afin de répondre parfaitement aux nouveaux impératifs sanitaires.

MIEUX VAUT PRÉVENIR QUE GUÉRIR

La bonne conception du réseau et le choix de matériaux limitant la corrosion et le tartre, permettent de réduire dès le départ les risques de prolifération des bactéries dans les circuits.

Les réseaux d'eau chaude sanitaire

La circulaire DGS/DHOS n° 2002-243 du 22 avril 2002, relative à la prévention du risque lié aux légionelles dans les établissements de santé, a fixé trois priorités :

- éviter la stagnation et assurer une bonne circulation de l'eau,
- lutter contre l'entartrage et la corrosion, par une conception et un entretien adapté à la qualité de l'eau et aux caractéristiques de l'installation,
- maintenir l'eau à une température élevée dans les installations, depuis la production et tout au long des circuits de distribution, et mitiger l'eau au plus près possible des points d'usage.

La mise en œuvre de ces actions préventives limite, voire supprime, la nécessité de réaliser des interventions curatives ponctuelles sur le réseau, tels que des traitements chocs par des désinfectants chimiques (chlore,...) ou des chocs thermiques, qui ne garantissent pas une réduction pérenne de la contamination.

En outre, ces traitements chocs à répétition peuvent avoir pour conséquence de modifier l'équilibre microbien et de dégrader les installations, conduisant ainsi à la création de nouveaux gîtes favorables à la colonisation des bactéries.

Ces actions curatives peuvent toutefois être nécessaires à la suite de la mise en évidence dans l'eau de concentrations excessives en micro-organismes (p. ex. légionelles) ou bien lors de l'apparition de cas de maladie(s) infectieuse(s) (p.ex. légionellose) dont l'origine peut être associée à la qualité de l'eau distribuée.

L'utilisation des désinfectants en continu, à faible dose, dans de l'eau chaude sanitaire est à éviter autant que possible (risques liés aux sous-produits toxiques éventuels, effets corrosifs sur les réseaux, apparition d'espèces résistantes). Cependant cette éventualité ne peut être écartée et doit être réservée à des situations exceptionnelles lorsque les mesures préventives ne peuvent être mises en œuvre de manière satisfaisante. Les produits et procédés de traitement disposent d'une autorisation du ministère chargé de la santé.

L'utilisation discontinue de désinfectants (p. ex. tous les mois) en traitement choc, précédée, à un rythme semestriel ou annuel, d'un nettoyage, n'a été validée que pour des petits réseaux.

Les réseaux intérieurs d'eau froide

Ils peuvent aussi être colonisés si les canalisations sont anormalement réchauffées soit par contact avec le réseau d'eau chaude, soit en raison d'une température élevée des locaux, soit par arrivée d'eau chaude dans l'eau froide au niveau des mitigeurs d'eau.

Il convient donc de veiller à ce que la température de l'eau froide ne dépasse pas 20 °C, et à ce que les canalisations d'eau froide et d'eau chaude soient calorifugées séparément.

NETTOYAGE ET DÉSINFECTION : DES PRÉCAUTIONS INDISPENSABLES

Les réseaux de distribution doivent être conçus de manière à limiter l'installation de biofilms et/ou de dépôts de produits de corrosion, qui, du fait de leur constitution, nuisent d'une part à l'action des désinfectants, et d'autre part, conduisent à limiter l'efficacité de certains traitements curatifs. En outre, les traitements mis en œuvre sont d'autant plus faciles à réaliser que le réseau a été bien conçu à l'origine et que les matériaux ont été choisis de manière raisonnée.

L'effet des produits de désinfection sur les matériaux doit faire l'objet d'une attention particulière. Par exemple, de nombreux matériaux synthétiques (comme les polyoléfines) et métalliques (y compris l'inox) ne résistent pas aux traitements avec des produits acides et, le cas échéant, un traitement de protection doit être envisagé après emploi.

Toutes les opérations de réparation via l'installation de nouvelles conduites doivent être effectuées de telle sorte qu'elles n'induisent pas une contamination du réseau. A l'achèvement des travaux, des purges permettent d'éliminer les particules et les souillures induites et une désinfection finale permet de garantir la qualité de l'eau séjournant dans le réseau.

Un avis du Conseil supérieur d'hygiène publique de France, en date du 8 juillet 2003, préconise pour les réparations sur des conduites en PVC ou C-PVC un séchage au minimum d'une heure suivi de 10 rinçages d'un volume équivalent à celui compris entre la réparation et le point de puisage.

Les réseaux d'eau, en particulier d'eau chaude sanitaire, nécessitent un entretien rigoureux et régulier. Les opérations d'entretien se font sur des réseaux hors service et comprennent le nettoyage des installations (lutte contre le tartre et la corrosion), et, souvent, la désinfection des installations. Ces opérations peuvent être suivies d'un traitement de protection si l'état du réseau le nécessite.

Traitements de nettoyage

Ils sont utilisés soit pour dissoudre les dépôts et incrustations (constitués de carbonates de calcium et/ou d'hydroxydes de fer), soit pour retirer tout ou partie du biofilm. Le réseau doit être impérativement détartré et nettoyé pour que la désinfection soit efficace.

Différentes techniques peuvent être utilisées : essentiellement par méthode chimique, plus rarement à l'air et à l'eau ou à l'eau seule.

Dans certains cas (réseau atteint par la corrosion), la meilleure solution peut être de procéder à la rénovation du réseau avec des matériaux présentant des risques d'entartrage moindres et insensibles à la corrosion.

Traitements de désinfection

Ils ne sont applicables qu'à la condition que le réseau traité soit en bon état (absence de tartre, de produits de corrosion, de bras morts).

Deux méthodes sont proposées :

• le traitement thermique

Il consiste à faire circuler de l'eau à une température de 70 °C environ pendant 30 minutes dans l'ensemble des réseaux de distribution de la production jusqu'au point de puisage. Cette opération doit être suivie d'un rinçage soigneux des canalisations.

Ce traitement nécessite :

- la présence de matériaux supportant le traitement thermique,
- une capacité thermique des installations pour atteindre 70 °C aux points les plus éloignés,
- des mesures importantes de protection pour éviter les brûlures pendant son utilisation (affichage, personnel présent au point de puisage...).

■ RÉGLEMENTATION SUR L'EAU POTABLE

La directive européenne 98/83/CE du Conseil du 3 novembre 1998 a été transposée en droit français par le décret n° 2001 – 1220 du 20 décembre 2001 (publié au Journal Officiel du 22 décembre 2001) relatif aux eaux destinées à la consommation humaine, à l'exclusion des eaux minérales naturelles.

Le champ d'application du décret couvre toutes les eaux qui, soit en l'état, soit après traitement, sont destinées à la boisson, à la cuisson, à la préparation des aliments ou à d'autres usages domestiques, qu'elles soient fournies par un réseau de distribution, à partir d'un camion-citerne ou d'un bateau citerne, en bouteilles ou en conteneurs, y compris les eaux de source.

Qualité de l'eau au point d'usage

Ces eaux destinées à la consommation humaine doivent :

- ne pas contenir un nombre ou une concentration de micro-organismes, de parasites ou de toutes autres substances constituant un danger potentiel pour la santé des personnes. Cette exigence sous -entend

• le traitement chimique

Les produits et procédés de traitement des installations de distribution utilisables sont :

- les composés chlorés générant des hypochlorites et les dichloroisocyanurates : 100 mg/l de chlore libre pendant 1 heure ou 50 mg/l de chlore libre pendant 12 heures ou 15 mg/l de chlore libre pendant 24 heures
- le peroxyde d'hydrogène mélangé à l'argent : 100 à 1000 mg/l jusqu'à 12 heures
- l'acide peracétique en mélange avec H₂O₂ : 1000 ppm en équivalent H₂O₂ pendant 2 heures
- la soude : pH > 12 au moins une heure.

Les résultats sont liés, d'une part aux conditions d'emploi, d'autre part aux caractéristiques de l'eau. Il convient de vérifier la parfaite compatibilité à certains produits chlorés du commerce pouvant contenir des additifs dont on devra s'assurer de leur neutralité vis-à-vis de certains matériaux.

Ce type de traitement peut ne pas présenter une efficacité satisfaisante vis-à-vis des bactéries situées dans le biofilm ou dans les dépôts de produits de corrosion. Afin d'obtenir un bon résultat, il peut être nécessaire de répéter ce traitement plusieurs fois.

Dans tous les cas, un rinçage suffisant doit être réalisé in fine jusqu'à disparition de toute trace de la solution désinfectante afin que le réseau remis en service délivre une eau conforme aux critères de potabilité en vigueur.

que lorsqu'une substance ou un micro-organisme non spécifié dans les annexes du décret est présent dans l'eau, il convient de quantifier sa présence et d'évaluer le risque qu'il est susceptible de présenter pour la santé.

- et respecter des valeurs inférieures ou égales aux limites de qualité définies au I de l'annexe 13-1 du code de la santé publique pour les paramètres dont la présence dans l'eau présente des risques immédiats ou à plus long terme pour la santé du consommateur.

Elles doivent, en outre, satisfaire à des références de qualité, fixées au II de l'annexe 13-1 du code de la santé publique, pour des paramètres indicateurs de qualité, témoins du fonctionnement des installations de production et de distribution d'eau. Ces substances ou micro-organismes, sans incidence directe sur la santé aux teneurs normalement présentes dans l'eau, peuvent mettre en évidence un dysfonctionnement des installations de traitement ou être à l'origine d'inconfort ou de désagrément pour le consommateur (tableau 1).

Les limites et références de qualité doivent être respectées ou satisfaites aux robinets normalement utilisés pour la consommation humaine, aux points d'embouteillage et contenants, au point de production de glace alimentaire, au point de sortie des camions ou bateaux-citernes, au point de sortie d'un appareil distributeur.

Biofilm et matériaux des canalisations des réseaux de distribution d'eau

Synthèse des études scientifiques

Tableau 1. Critères de qualité microbiologique des eaux destinées à la consommation humaine et fournies par un réseau de distribution.

Paramètre	Unité	Limite de qualité	Référence de qualité
Germes aérobies revivifiables à 22 °C	/ml		Variation dans un rapport de 10 par rapport à la valeur habituelle
Germes aérobies revivifiables à 37 °C	/ml		idem
Coliformes	/100 ml		0
Escherichia coli	/100 ml	0	0
Entérocoques	/100 ml	0	
Bactéries sulfitoréductrices	/100 ml		0

La personne publique ou privée responsable de la distribution d'eau est tenue de surveiller en permanence la qualité des eaux destinées à la consommation humaine. Cette surveillance comprend notamment :

- un examen régulier des installations ;
- un programme de tests ou d'analyses effectués sur des points déterminés en fonction des risques identifiés que peuvent présenter les installations ;
- la tenue d'un fichier sanitaire recueillant l'ensemble des informations collectées à ce titre.

Règles d'hygiène pour les installations

La personne publique ou privée responsable de la distribution intérieure de locaux ou établissements où de l'eau est fournie au public doit répondre aux exigences de l'article L.1321-1 du code de la santé publique, notamment en respectant les règles d'hygiène.

Les matériaux utilisés dans les systèmes de production ou de distribution, au contact de l'eau destinée à la consommation humaine, ne doivent pas être susceptibles d'altérer la qualité de l'eau. Leur utilisation est soumise à une autorisation du ministre chargé de la santé, donnée après avis de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments.

Les installations de distribution d'eau doivent être conçues, réalisées et entretenues de manière à empêcher l'introduction ou l'accumulation de micro-organismes, de parasites ou de substances constituant un danger potentiel pour la santé des personnes ou susceptibles d'être à l'origine d'une dégradation de la qualité de l'eau destinée à la consommation humaine distribuée, telle qu'il ne soit plus satisfait aux exigences fixées.

Dans les conditions normales d'entretien, la circulation de l'eau dans les installations de distribution doit pouvoir être assurée en tout point.

Les installations doivent être nettoyées, rincées et désinfectées avant toute mise ou remise en service. La personne publique ou privée responsable de la distribution d'eau doit s'assurer de l'efficacité de ces opérations et de la qualité de l'eau avant la première

mise en service ainsi qu'après toute intervention susceptible d'être à l'origine d'une dégradation de cette qualité

Les réservoirs équipant ces réseaux et installations doivent être vidés, nettoyés et rincés au moins une fois par an. Le préfet est tenu informé par la personne publique ou privée responsable de la distribution d'eau des opérations de désinfection réalisées en cours d'exploitation.

LA CONSTITUTION DES RÉSEAUX

Les matériaux utilisés pour la réalisation des éléments constitutifs des réseaux sont particulièrement nombreux et ont, du fait de cette diversité, des comportements très différents au regard de la prolifération bactérienne et de la limitation de la croissance du biofilm, mais aussi par rapport aux traitements curatifs ou préventifs qui seront réalisés pour limiter les risques de croissance du biofilm. Il est clair que les observations réalisées par les diverses études scientifiques disponibles portent principalement sur des matériaux "jeunes" et les données relatives au comportement des mêmes matériaux après mise en situation réelle sont peu nombreuses et difficilement comparables du fait de la diversité des situations rencontrées : l'influence simultanée des caractéristiques de l'eau véhiculée (dureté, pH, etc...), de sa température, des traitements chimiques introduits, et de l'âge du réseau sont autant de variables qu'il est difficile de synthétiser pour obtenir un modèle prédictif universel. Pourtant, le vieillissement des interfaces eau/paroi (site dans lequel se développeront préférentiellement les organismes indésirables) pourra, à plus ou moins brève échéance, créer des conditions particulièrement favorables à la prolifération des légionelles, notamment par des développements de tartre ou de corrosion. Il est donc nécessaire d'appréhender, à la conception même du réseau, les caractéristiques des matériaux qui pourront influencer sur ce vieillissement et les prendre en compte pour diminuer les risques de développement incontrôlé du biofilm, dans le long terme.

Les matériaux cités dans ce documents sont principalement utilisés pour la réalisation d'éléments de réseaux. Leur diversité, associée à la multiplicité des applications et des fonctionnalités rencontrées sur ces réseaux, nécessite de bien différencier des produits dont les appellations sont parfois très proches.

Matériaux métalliques

- **Cu** : Cuivre (appelé aussi Koper (Hollandais) ou Copper (Anglais)). Ce métal, comme le plomb, constitue historiquement l'un des matériaux les plus utilisés dans les canalisations. Ses propriétés mécaniques et sa facilité de mise en oeuvre ont permis son utilisation dès l'antiquité et son développement avant l'arrivée des matériaux de synthèse. Aujourd'hui, la force de l'habitude en fait encore l'une des matières les plus fréquemment rencontrées dans les réseaux. Ses atouts : Une mise en oeuvre considérée comme

traditionnelle, Ses inconvénients : une mauvaise résistance aux traitements chimiques entraînant des problèmes de corrosion (notamment ceux liés aux traitements chlorés préventifs réalisés dans le cadre de la lutte contre les légionelles), une sensibilité à l'érosion, générant des surfaces propices à l'entartrage.

- **SS** : (Stainless Steel) Acier inoxydable. Ce métal est obtenu à partir d'acier, auquel l'adjonction de chrome apporte une moindre sensibilité à la corrosion. Sa résistance aux attaques chimiques est meilleure que celle des aciers galvanisés mais dépend de la variété d'inox retenue (notamment des teneurs en chrome et en carbone) ainsi que de la mise en œuvre des produits : dans certaines conditions, les échauffements dus aux soudures peuvent modifier la structure du métal et diminuer localement ses propriétés. La conservation des propriétés ne sera assurée que par une mise en œuvre précautionneuse.

- **Acier Galvanisé** : Ce matériau est constitué d'acier, sur lequel une couche superficielle (galvanisation à chaud) permet d'améliorer la résistance chimique de la paroi du matériau. Peu onéreux et de mise en œuvre aisée, ce produit a longtemps été retenu en alternative du cuivre ou de matériaux de synthèse plus coûteux. Sa grande sensibilité à la corrosion, et un état de surface favorisant l'accrochage du tartre constituent ses principales faiblesses en matière de lutte contre le développement des légionelles. Son usage est aujourd'hui fortement déconseillé.

Matériaux de synthèse

Les matériaux de synthèse ont fait leur apparition depuis quelques décennies et sont venus progressivement se substituer aux matériaux métalliques : Moins sensibles à l'entartrage, de mise en œuvre plus aisée (notamment sans utilisation de flamme). Leurs structures très diverses leur confèrent des propriétés appréciables dans la multiplicité des applications rencontrées dans les réseaux. Par contre, leur caractère innovant est parfois pénalisé par une relative méconnaissance des utilisateurs, entraînant des confusions entre les produits.

- **Les polyoléfines** : Ces matériaux, apparus depuis une vingtaine d'années, sont principalement utilisés pour la réalisation de canalisations semi-rigides, utilisées pour la petite distribution, ou pour les réseaux de chauffage (notamment par le sol). En règle générale, leur résistance aux traitements chimiques est satisfaisante, mais des conditions de traitement sévère (notamment en cas de choc chloré en température) peuvent entraîner à terme des pertes de propriétés mécaniques.

- PB : Polybutylène
- PP : Polypropylène
- PE : Polyéthylène : Utilisé uniquement en eau froide car l'augmentation de la température entraîne une perte des propriétés mécaniques.
- PE-X (ou PE-R) : Polyéthylène réticulé. Cette famille de matériau est la plus diffusée en France.
- Matériaux multicouches : en général constitués d'une couche interne (en contact avec l'eau) de matériau

polymère, d'une couche externe et d'un renfort en sandwich. Les propriétés au regard de l'eau potable sont alors conférées par la couche interne.

- **Les matériaux vinyliques** : Cette famille de matériaux recouvrant des produits tels que le PVC-U ou le C-PVC, est régulièrement mise en œuvre depuis les années 50 pour le transport d'eau froide ou chaude sanitaire.

- PVC-U : Polychlorure de Vinyle non Plastifié (PVC-unplasticized). Ce matériau est obtenu à partir de polychlorure de vinyle, sans adjonction de produits plastifiants. Matériau offrant de bonnes propriétés en matière de résistance chimique, notamment au chlore. Mais son domaine d'application est limité à l'eau froide (jusqu'à 45 °C), car l'élévation de la température entraîne une baisse des propriétés mécaniques.

- C-PVC : Polychlorure de Vinyle Chloré. Ce matériau, utilisable pour la réalisation de réseau d'eau chaude ou froide sanitaire, possède une bonne résistance chimique permettant la réalisation de traitements de désinfection au chlore.

Les matériaux souples

Ces matériaux, principalement caoutchoutiques, sont principalement utilisés pour la réalisation d'éléments d'étanchéité ou de membranes utilisées dans des vannes, des clapets ou des éléments de filtration.

- **Silicone** :
- **PVC-P** : à ne pas confondre avec les matériaux, PVC-U ou PVC-C. Ces types de matériaux sont obtenus à partir de polymère, auxquels sont ajoutés des quantités importantes de plastifiants, qui permettent de modifier fondamentalement leur comportement.
- **Caoutchouc** : plusieurs natures peuvent être rencontrées, conférant des propriétés chimiques ou mécaniques diverses (EPDM, NBR etc...).

■ BIOFILMS ET RÉSEAUX D'EAU POTABLE

L'eau potable des réseaux de distribution véhicule à la fois une flore microbienne extrêmement diversifiée mais quasiment non identifiée et de la matière organique complexe dont une fraction relativement importante est biodégradable.

Le transport de l'eau se traduit tout au long du réseau par une multiplication et une augmentation du nombre de micro-organismes dans l'eau. L'interface eau/matériau constitue le lieu privilégié d'accumulation de cellules et de matière organique et de multiplication des bactéries (formation de biofilm).

Cette prolifération est suivie de leur détachement ou de leur arrachage et de leur transport par l'eau circulante. Par ailleurs, la population bactérienne de l'eau potable est adaptée à cet environnement et représente le point de départ d'une chaîne trophique complexe.

Biofilm et matériaux des canalisations des réseaux de distribution d'eau

Synthèse des études scientifiques

Structure et fonctions des biofilms

Un biofilm mature est constitué d'un ensemble de cellules microbiennes uniques ou de micro-colonies adhérant à la surface et enchevêtrées au sein d'un réseau complexe d'exopolymères, hautement hydraté, comportant des fibres saccharidiques associées ou non à des lipides ou à des protéines. L'association avec des dépôts minéraux ou avec des produits de corrosion est fréquente.

Dans les biofilms présents sur les canalisations d'eau potable, les bactéries à Gram négatif semblent prédominer. Parmi les espèces microbiennes identifiées, on note des bactéries (*Pseudomonas*, *Sphingomonas*, *Flavimonas*, *Flavobacterium*, *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Legionella*, certains coliformes, mycobactéries atypiques, *Aquabacterium*), virus, amibes et parasites tels que *Cryptosporidium* et *Giarda*.

La matrice d'exopolymères piège les molécules assimilables et assure une quantité suffisante de nutriments aux micro-organismes fixés. Ces substances sont captées et assimilées par certains micro-organismes qui excrètent de nombreux métabolites pouvant servir de substrat à d'autres bactéries (co-métabolisme). Une quantité importante d'eau est également retenue dans le réseau d'exopolymères et garantit un environnement toujours hydraté aux micro-organismes.

Une autre propriété des exopolymères est de mettre les micro-organismes à l'abri des prédateurs, des biocides, de la chaleur.

Enfin, les biofilms facilitent la communication entre les cellules. Les bactéries possèdent la capacité de percevoir les signaux émis par l'environnement ou par d'autres micro-organismes et de s'adapter à de nouvelles conditions de vie.

Formation et facteurs favorisant des biofilms

Le développement d'un biofilm comprend trois étapes principales (figure 1).

l'adsorption

Les substances diluées et dissoutes présentes dans l'eau tendent à se concentrer au niveau des interfaces. Les premières bactéries capables de se fixer sur les surfaces sont les bactéries planctoniques (véhiculées par l'eau), mobiles par leurs flagelles et ayant une force d'adhésion suffisante par l'intermédiaire de leurs appendices protéiques (pili).

l'adhérence

Les bactéries fixées augmentent leur adhésion en sécrétant des organites spécifiques, les adhésines, qui conduisent à une fixation irréversible de la bactérie à son support. Les cellules se divisent pour donner naissance à des cellules filles qui se retrouvent reliées à l'intérieur du réseau d'exopolymères, conduisant ainsi au développement de micro-colonies.

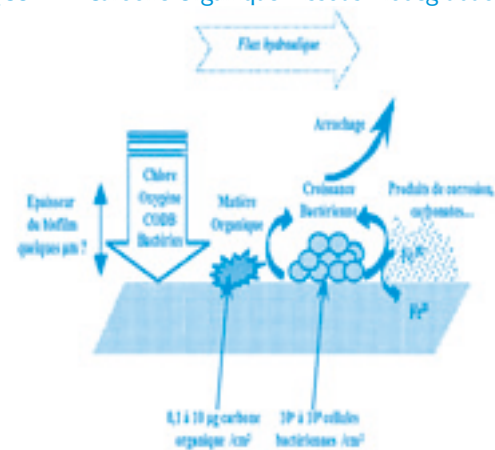
la multiplication

Les bactéries se multiplient de façon exponentielle puis lorsque la densité en biomasse augmente, la croissance des micro-organismes devient dépendante du transport de substrats de l'eau vers le biofilm. Il se crée des gradients de concentration en nutriments et en oxygène avec des poches sans oxygène favorisant le développement de bactéries anaérobies.

Le biofilm atteint un état d'équilibre dynamique avec confluence des micro-colonies séparées par des travées aqueuses assurant un apport constant de nutriments aux micro-organismes. Le biofilm continue à évoluer au cours du temps. Il existe d'une part, un détachement des micro-organismes présents en surface, qui correspond soit à une simple érosion, phénomène le plus fréquent, soit à un arrachage du biofilm, avec transfert des micro-organismes dans l'eau, et d'autre part, une adhérence des micro-organismes circulants.

Les biofilms présentent une grande diversité de communautés microbiennes et de larges différences dans leur composition chimique et dans l'épaisseur de la matrice. Leur constitution dépend des caractéristiques physico-chimiques de l'eau distribuée, des traitements de potabilisation préalablement appliqués, de la présence éventuelle d'un résiduel en chlore ainsi que des conditions de distribution.

Figure 1 : Schéma de quelques mécanismes réactionnels participant à l'accumulation de biofilms sur une surface en contact avec l'eau potable. (CODB = Carbone Organique Dissous Biodégradable).



Plusieurs facteurs sont susceptibles de favoriser l'implantation des biofilms sur les canalisations au contact de l'eau destinée à la consommation humaine.

Les matériaux sont tous potentiellement générateurs d'un développement bactérien du fait de leur composition et des adjuvants nécessaires à leur stabilisation. D'autres propriétés du matériau interviennent également dans la formation du biofilm : l'âge et l'état de la surface mais aussi le relargage de composés biodégradables. Un support hydrophobe formé d'anfractuosités et recouvert de dépôts est plus facilement colonisé.

Les conditions hydrauliques ont aussi un impact sur la formation des biomasses fixées : température et temps de séjour de l'eau, absence de variation du débit, présence d'un résiduel en chlore.

Certains nutriments possèdent un effet stimulant sur la croissance des micro-organismes du biofilm : matières organiques, carbone inorganique, fer, phosphates.

Techniques d'analyse des biofilms

Le comptage direct in situ des bactéries dans le biofilm se fait grâce à l'utilisation de deux marqueurs fluorescents et du microscope à épifluorescence. Les bactéries à activité respiratoire apparaissent colorées en rouge. Les autres cellules donnent une coloration verte. Cette technique est limitée par une pénétration insuffisante des colorants dans les biofilms épais et par la variabilité dans l'aptitude des micro-organismes à transporter et à réduire le marqueur fluorescent.

Une autre technique consiste à décrocher les biomasses fixées et à les analyser au laboratoire. Les matériaux sont grattés à l'aide d'écouvillons stériles ou de spatules puis soumis au traitement des ultra-sons. L'utilisation d'enzymes (glucosidases, lipases ou protéases) pour hydrolyser la matrice d'exopolymères permet aussi de libérer les micro-organismes. L'évaluation des biomasses libérées se fait soit par culture sur gélose (milieu R2A incubé 7 jours à 22 °C), soit par dosage de l'adénosine triphosphate microbien (ATP) par réaction enzymatique couplée à une détection par bioluminescence, soit par une méthode d'amplification de l'ADN par Polymérase Chain Réaction (PCR).

La culture en gélose a l'avantage de caractériser les micro-organismes cultivables et de pouvoir mettre en évidence des souches potentiellement pathogènes pour l'homme. Toutefois, elle n'est pas représentative de la biodiversité des communautés microbiennes présentes puisque seulement 0,01 à 30 % des micro-organismes des biofilms formés sur les matériaux au contact de l'eau potable sont cultivables.

Le dosage de l'ATP permet de mesurer exclusivement la biomasse active. C'est un test rapide et semi-automatisé, sensible (limite de détection : 1 ng/l). Mais il ne donne aucune information sur les micro-organismes présents et sur leur caractère pathogène potentiel.

La méthode d'amplification de l'ADN est la plus sensible (limite théorique de détection : un micro-organisme) ; c'est une technique rapide et automatisée mais qui ne donne aucune information sur la viabilité des souches.

■ ÉVALUATION DES BIOFILMS SUR LES MATÉRIAUX

Les réglementations actuelles européennes et nationales demandent que les matériaux au contact de l'eau destinée à la consommation humaine ne soient pas susceptibles d'altérer la qualité de l'eau durant son transport, son stockage et sa distribution. La formation de biomasse sur les matériaux est une cause de dégradation de la qualité microbiologique de l'eau destinée à la consommation humaine et à d'autres usages domestiques.

Méthodes expérimentales

Dans les deux dernières décennies, des méthodes expérimentales ont été développées pour déterminer l'aptitude des matériaux à promouvoir la croissance microbienne. L'activité microbienne est mesurée de différentes manières selon les méthodes proposées.

Par ailleurs, il faut également souligner que les études disponibles n'ont été réalisées que sur des matériaux neufs, et que l'influence des paramètres liés au vieillissement des réseaux (notamment de facteurs tels que le tartre et la corrosion, dont l'influence sur le développement du biofilm et des organismes indésirables est incontestable) n'ont donc pas été pris en compte. Il paraît donc également nécessaire de conduire des expérimentations complémentaires, qui permettront de garantir dans la durée la qualité de l'eau fournie par les réseaux.

Au Royaume Uni, Colbourne (1985) a mesuré la croissance microbienne sur les matériaux en déterminant la consommation additionnelle d'oxygène dans une cuve où l'eau est renouvelée deux fois par semaine. Selon la norme anglaise (BS 6920-2.4), les matériaux présentant une valeur supérieure à 2,3 mg/l sont considérés comme non acceptables pour leur utilisation au contact de l'eau destinée à la consommation humaine.

En Allemagne, Schoenen et Schoeler (1983) ont développé un test de formation d'un dépôt visqueux sur la surface du matériau au contact d'un écoulement lent et permanent d'une eau potable. Cette méthode normalisée (DVGW, 1998) mesure le volume du dépôt formé comme indicateur de biomasse. Les matériaux présentant une valeur supérieure à 0,1 ml sont considérés comme non acceptables pour leur utilisation au contact de l'eau potable.

En Autriche, selon une méthode normalisée (Önorm B5018, 2002), les tuyaux sont remplis d'eau du robinet, remplacée chaque semaine, et incubés à 22 ± 2 °C. Après un, deux et trois mois d'incubation, la flore bactérienne de l'eau des tuyaux est dénombrée et à la fin du test, la croissance du biofilm est évaluée, après sonication, par le dosage de l'adénosine triphosphate (ATP). Les matériaux ne sont pas recommandés pour l'utilisation au contact de l'eau potable si les dénombrements bactériens de l'eau sont 10 fois plus élevés que le témoin négatif (verre) ou lorsque le biofilm sur le matériau est 5 fois plus important que sur le verre.

Aux Pays-Bas, Van der Kooij et Veenendaal (1994) utilisent le dosage de l'ATP comme indicateur de biomasse active. Le test BPP (pouvoir de production de biomasse), développé par le Kiwa, est un test statique sans remplacement de l'eau. Il consiste à incuber dans l'obscurité à 25 ± 1 °C des échantillons de matériaux dans une eau potable biologiquement stable, à laquelle sont ajoutés des sels de potassium et des micro-organismes d'eau de rivière.

Le pouvoir de production de biomasse (BPP) des matériaux est déterminé par la mesure des

Biofilm et matériaux des canalisations des réseaux de distribution d'eau

Synthèse des études scientifiques

concentrations de biomasse active formée sur le matériau (pouvoir de formation du biofilm – BFP) et des concentrations de biomasse en suspension dans l'eau (SBP), après 56, 84 et 112 jours d'exposition. La valeur de BPP, exprimée en picogrammes d'ATP par centimètre carré de surface du matériau testé (pg ATP /cm²) est la moyenne des valeurs obtenues sur la période de 16 semaines du test. Une classification en classes de qualité a été proposée pour les matériaux selon leur pouvoir de formation du biofilm.

Des bactéries Legionella (ou d'autres bactéries), ajoutées à l'eau au démarrage du test. Une information complémentaire est alors obtenue sur le degré de capacité d'un matériau à favoriser la croissance de Legionella (ou d'autres bactéries) dans les conditions du test (Van der Kooij et Veenendaal, 2001).

Le taux de formation de biofilm (BFR) de l'eau est obtenu, grâce à un appareil spécifique développé par Van der Kooij et al. (1999), en déterminant la concentration de biofilm sur les parois des canalisations par le dosage de l'ATP.

Méthode européenne harmonisée

Le groupe de travail 1 (WP1) "Croissance microbienne" du projet de l'Union européenne "Développement de tests harmonisés utilisés pour les matériaux au contact de l'eau potable" (CPDW) a développé une méthode d'étude harmonisée pour évaluer les propriétés de promotion de la croissance microbienne des matériaux au contact de l'eau potable (juillet 2003). Cette méthode est dérivée du test BPP (test BPP révisé) et repose sur l'ATP comme indicateur de biomasse.

Des échantillons représentatifs du matériau sont incubés à l'obscurité à 30 ± 2 °C dans de l'eau potable renfermant des nutriments inorganiques définis et inoculée par un mélange de micro-organismes naturels d'une eau de rivière. L'eau est remplacée toutes les semaines. La biomasse produite sur la surface du matériau (biofilm) et dans l'eau est déterminée par des mesures d'ATP après 8, 12 et 16 semaines d'incubation. La production de biomasse par unité de surface (pg d'ATP/cm²) est calculée à partir de la concentration de la biomasse fixée et de la biomasse en suspension dans l'eau. La validation des résultats est obtenue en incluant des témoins négatifs (verre) et des matériaux de référence en parallèle des matériaux testés.

Le pouvoir de production de biomasse (BPP) est la concentration moyenne des valeurs de la production de biomasse observée sur la surface des matériaux et dans l'eau, mesurée par l'ATP, après 56, 84 et 112 jours d'incubation dans l'eau (en retranchant la valeur moyenne observée sur le verre, témoin négatif). La valeur de BPP est exprimée en pg d'ATP/cm².

Le test BPP révisé montre des valeurs de BPP allant de moins 50 pg d'ATP/cm² pour le verre, le C-PVC, et l'acier inoxydable, jusqu'à plus de 40 000 pg d'ATP/cm² pour le matériau souple (PVC-P).

La comparaison des méthodes, avec un nombre limité de matériaux, démontre clairement la complexité de l'évaluation de la production de biomasse sur la surface des matériaux au contact de l'eau potable et l'impact des conditions du test sur cette production.

■ COMPARAISON DES MATÉRIAUX

La récente mise au point de la méthode européenne harmonisée (juillet 2003), ou test BPP révisé, n'a pas permis d'évaluer une grande quantité de matériaux pour leurs propriétés de promotion de la croissance microbienne au contact de l'eau potable.

Les études, à la fois statiques, sans remplacement de l'eau, et dynamiques, menées par le Kiwa, se rapprochent le plus de la méthode européenne harmonisée. Leurs conclusions sont rapportées ci-dessous.

Tests statiques

Première étude (Kiwa)

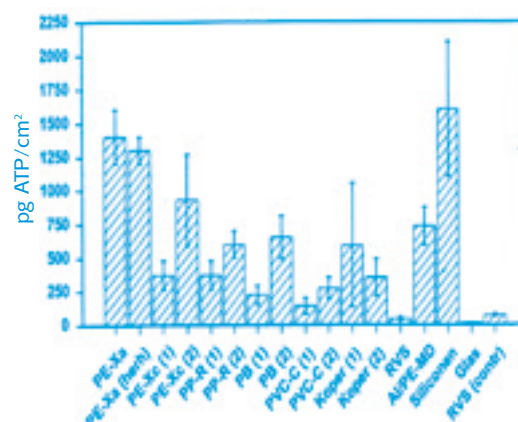
Plusieurs matériaux, présentés dans le tableau 2, ont été évalués selon le test du pouvoir de formation du biofilm (BFP).

Tableau 2 : Matériaux choisis pour le test BFP.

Matériau	Description
PE - Xa	Polyéthylène
PE - Xc (2 x)	Polyéthylène
Al / PE-MD	Polyéthylène, renforcé par une feuille interne d'aluminium
PP-R (2 x)	Polypropylène
PB (2 x)	Polybutylène
C-PVC (2 x)	Polychlorure de vinyle surchloré
Cu irradié	Cuivre
Cu désoxydé	Cuivre
Acier inoxydable AISI 316	Acier inoxydable

Les résultats montrent une différence notable entre les matériaux testés (figure 2).

Figure 2. Pouvoir de formation du biofilm (BFP) des matériaux en pg ATP/cm².



Une formation relativement forte de biofilm est observée avec les deux échantillons de cuivre testés (350 et 590 pg ATP/cm²). La présence d'huile minérale et l'effet de la corrosion peuvent en être la cause. Après une exposition à long terme (208 jours), la concentration de biomasse diminue jusqu'à une faible valeur, inférieure à 100 pg ATP/cm².

Pour les matériaux plastiques, les deux échantillons testés de C-PVC et un échantillon de polybutylène (PB) donnent les plus faibles valeurs de BFP, respectivement 140, 270 et 220 pg ATP/cm². Toutefois, la concentration de biofilm après 233 jours d'incubation, chute à un niveau inférieur à 100 pg ATP/cm² uniquement pour le C-PVC.

Les matériaux à base de polyéthylène donnent la formation de biofilm la plus forte, à plus de 1000 pg ATP/cm².

La concentration de biomasse dans l'eau du test montre la même distribution que la concentration de biofilm sur le matériau, mais la majorité de la biomasse (test BPP) est localisée sur les matériaux.

En présence de la plupart des matériaux, il apparaît au début une croissance forte de Legionella dans l'eau du test, mais le nombre de colonies décroît au cours du temps. Cette chute est moins prononcée sur les matériaux.

Des valeurs supérieures à 1000 UFC/ml sont observées dans l'eau du test, pour quelques matériaux, principalement le polyéthylène PE-Xa, le polyéthylène PE-Xc et le polyéthylène renforcé par une feuille interne d'aluminium.

Par contre, avec les deux échantillons de C-PVC, la croissance des Legionella dans l'eau est faible (10 UFC/ml) et inférieure à celle relevée en présence de cuivre (160 et 220 UFC/ml).

Après 112 jours, le nombre de colonies dans l'eau en présence de la plupart des matériaux diminue jusqu'à des valeurs autour de 100 UFC/ml, sauf en présence du polyéthylène Xa et du polyéthylène renforcé par une feuille interne d'aluminium pour lesquels le nombre de colonies est autour de 1000 UFC/ml.

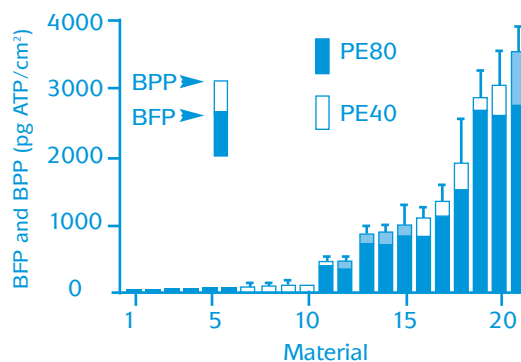
Deuxième étude (Kiwa)

Cinq matériaux de PVC et dix matériaux de polyéthylène PE (5 types de PE-40 et 5 types de PE-80) ont été étudiés en utilisant le test BPP.

Les valeurs moyennes BPP sont calculées sur la base des mesures des concentrations de biomasse sur les matériaux et dans l'eau après des périodes de 8, 12 et 16 semaines d'incubation (figure 3).

Figure 3. Pouvoir de production de biomasse (BPP = BFP + SBP) des matériaux en PVC et en polyéthylène.

La partie inférieure des barres montre la biomasse présente sur le matériau (pouvoir de formation de biofilm, BFP). La partie supérieure montre la fraction présente dans l'eau (SBP). L'écart type des valeurs BPP est aussi présenté.



N°1 et 2 : verre ; N° 3 et 4 : acier inoxydable ;
N° 5-10 : PVC - U ; N° 11 : polypropylène ;
N° 12-15 : PE-80 ; N° 16-20 : PE-40 ; N° 21 : PE-80

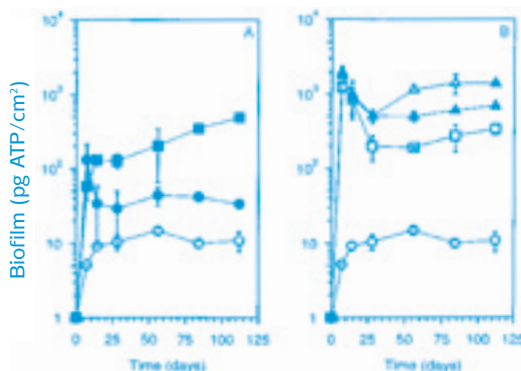
Le pouvoir de production de biomasse du PVC-U est faible (50 - 100 pg ATP/cm²). Celui des matériaux en polyéthylène est 10 à 30 fois plus élevé. Le pouvoir de production de biomasse pour le PE-40 est en général plus élevé que celui du PE-80. La majeure partie de la biomasse des matériaux en polyéthylène est présente en tant que biofilm sur le matériau.

Une croissance relativement forte de micro-organismes apparaît après quelques semaines suivie d'une diminution du contenu en ATP. Ce développement indique que des substances biodégradables sont présentes sur la surface du matériau et entraînent une rapide croissance des bactéries. Lorsque ces substances ont, pour la plus grande part, été utilisées, l'activité diminue et un équilibre s'instaure entre l'apport de substances biodégradables et l'activité des micro-organismes sur les matériaux.

Troisième étude (Kiwa)

Dix matériaux utilisés dans les systèmes de distribution d'eau ont été choisis pour être évalués par le test BPP. Sur le plan cinétique (figure 4), la concentration de biofilm sur les matériaux augmente rapidement et atteint sa valeur maximale en 1 à 2 semaines. Mais si pour la plupart des matériaux testés, la production de biomasse se stabilise, pour le cuivre testé, les concentrations de biofilm augmentent progressivement.

Figure 4. Formation de biofilm sur les matériaux durant l'incubation dans une eau biologiquement stable (filtration lente sur sable) à 25 °C.



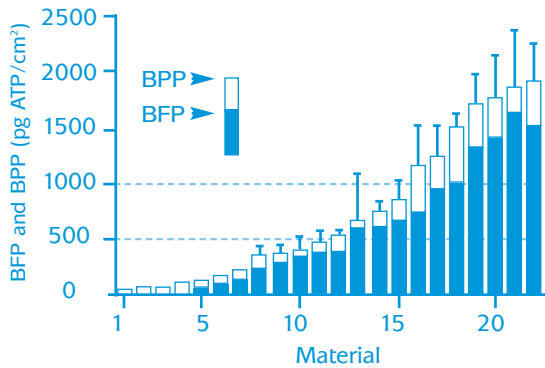
Symboles : ○ verre ; ● acier inoxydable ; ■ cuivre ; □ C-PVC ; △ PE-X ; ▲ PP

Biofilm et matériaux des canalisations des réseaux de distribution d'eau

Synthèse des études scientifiques

La figure 5 montre la répartition des valeurs de production de biomasse des matériaux testés.

Figure 5. Pouvoir de Production de Biomasse (BPP = BFP + SBP) des matériaux choisis et des matériaux de référence.



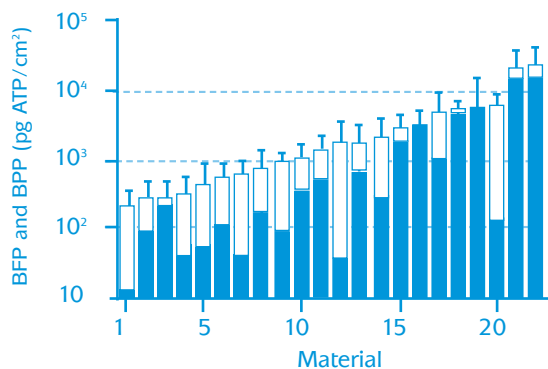
N° 1, 2 et 3 : verre ; N° 4, 5 et 6 : acier inoxydable ; N° 7 : C-PVC ; N° 8 : PB ; N° 9 : C-PVC ; N° 10 : cuivre ; N° 11 : PP-R ; N° 12 : PE-Xc ; N° 13 : cuivre ; N° 14 : PP-R ; N° 15 : PB ; N° 16 : PE-Xc ; N° 17 : Sil. ; N° 18 : PE-Xa ; N° 19 : PE-Xa ; N° 20 : Sil. ; N° 21 : Al/PE-Xb ; N° 22 : Sil.

La production de biomasse peut atteindre 1800 pg ATP/cm². Pour la plupart des matériaux, la grande majorité (> 80 %) de la biomasse produite est présente sur le matériau.

Les valeurs BPP de plusieurs matériaux synthétiques (C-PVC, polybutylène, polypropylène, et polyéthylène-Xc) sont plus faibles que celles du cuivre.

Le pouvoir de croissance des Legionella (Leg GP, UFC/cm²) sur les matériaux dans le test BPP est présenté sur la figure 6. Des valeurs jusqu'à 20 000 UFC/cm² ont été retrouvées pour certains matériaux en polyéthylène-X.

Figure 6. Pouvoir de croissance des Legionella des matériaux choisis après incubation à 25°C dans le test BPP.



Matériaux : N° 1 et 2 : verre ; N° 3 : C-PVC ; N° 4 : acier inoxydable ; N° 5 : verre ; N° 6 : PE-Xa ; N° 7 : silicone ; N° 8 : acier inoxydable ; N° 9 : cuivre a ; N° 10 : acier inoxydable ; N° 11 : PE-Xc ; N° 12 : silicone ; N° 13 : cuivre b ; N° 14 : PP-R ; N° 15 : PB ; N° 16 : C-PVC ; N° 17 : PE-Xc ; N° 18 : PB ; N° 19 : PP-R ; N° 20 : silicone ; N° 21 : PE-Xa ; N° 22 : Al/PE-Xb

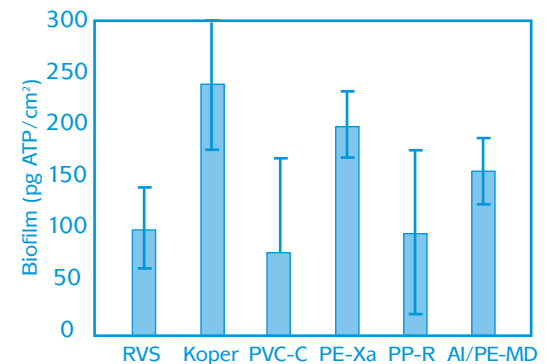
Tests dynamiques

Le degré de formation de biofilm sur les matériaux au contact de l'eau potable est testé dans des conditions hydrauliques correspondant à la situation d'installations domestiques (Kiwa). Les matériaux choisis sont donnés dans le tableau 3.

Tableau 3. Matériaux choisis pour les tests avec le système dynamique

Matériau	Description	Diamètre (mm) extérieur	Diamètre (mm) intérieur
RVS AISI 316	Acier inoxydable	18	16
Cuivre	Cuivre	15	13
C-PVC	Polychlorure de vinyle surchloré	16	12
PE - Xa	Polyéthylène	16	11,5
PP-R	Polypropylène	16	10,5
Al / PE-MD	Polyéthylène renforcé par une feuille interne d'aluminium	16	12

Figure 7. Concentrations moyennes de biofilm (en pg ATP/cm²) sur les matériaux dans le système dynamique.



La formation de biofilm est plus faible sur le C-PVC (80 pg ATP/cm²) que pour tous les autres matériaux testés (figure 7). Le taux de formation de biofilm, sur la période d'essai de 140 jours, est aussi bas que 2 pg ATP/cm² par jour pour l'ensemble des matériaux. Ces valeurs relativement faibles sont probablement la conséquence de l'alternance de périodes d'arrêt et d'écoulements d'eau.

Des numérations significativement élevées sont retrouvées sur le polyéthylène renforcé par une feuille interne d'aluminium (2500 UFC/cm²) à l'inverse des autres matériaux testés. Les numérations bactériennes montrent une tendance à la diminution sur la période d'essai de 140 jours.

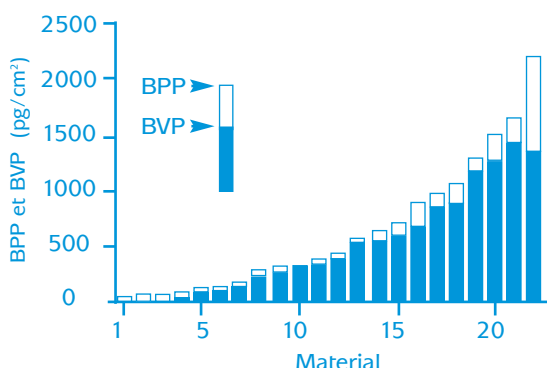
DISCUSSION

Tests statiques

Les résultats des études menées dans le cadre du Kiwa montrent clairement que le pouvoir de formation de biofilm sur les matériaux, mesuré par le test statique BFP,

diffère significativement d'un matériau à l'autre (figure 8). Les détails seront donnés dans la deuxième partie.

Figure 8. Distribution des matériaux testés, y compris les matériaux témoins, selon leur degré de formation de biofilm.



N° 1, 2 et 3 : verre ; N° 4, 5 et 6 : acier inoxydable ; N° 7 : PVC-1 ; N° 8 : PB (1) ; N° 9 : C-PVC (2) ; N° 10 : cuivre (2) ; N° 11 : PP-R (1) ; N° 12 : PE-Xc (2) ; N° 13 : cuivre (1) ; N° 14 : PP-R (2) ; N° 15 : PB (2) ; N° 16 : Al/PE-MD ; N° 17 : PE-Xc (2) ; N° 18 : silicones ; N° 19 et 20 : PE-Xa ; N° 21 et 22 : silicones

La quantité de biomasse formée sur la surface du matériau au contact de l'eau dépend du relargage de composés biodégradables par le matériau et de la mort microbienne (y compris la phagocytose par des protozoaires prédateurs). La croissance peut apparaître aussi du fait de la détérioration du matériau. Certains des matériaux testés ont des scores équivalents ou meilleurs que le cuivre. Les canalisations en cuivre présentent une formation de biofilm relativement forte et les concentrations augmentent de manière linéaire en fonction du temps. Cette formation de biofilm est probablement le résultat de la présence d'huile minérale sur les tuyaux de cuivre. Si la corrosion joue aussi un rôle par l'apport de composés organiques, la composition de l'eau (pH, carbone organique et inorganique) peut avoir un impact sur la promotion de la croissance microbienne par le cuivre.

Ces observations montrent que les scores du cuivre sont bien moindres que ce qui était attendu pour un matériau qui ne relargue aucun composé favorisant la croissance et qui serait même inhibiteur de croissance. Les souches de *Pseudomonas* et d'*Aeromonas* sont relativement sensibles au cuivre mais de faibles concentrations de cuivre ont peu d'effet sur les *Legionella* et des souches de *Mycobacterium*.

La classification en classes de qualité ne permet pas d'indiquer les domaines d'application des matériaux. Dans la définition des domaines d'application, des facteurs tels que la longueur de la canalisation, le diamètre (rapport surface/volume) et la température de l'eau jouent un rôle important.

Tests dynamiques

Dans le système dynamique développé par le Kiwa, les concentrations les plus importantes de biofilm sont

observées sur les matériaux en polyéthylène (PE) et sur le cuivre (240 pg ATP/cm²) et les concentrations les plus faibles sur le C-PVC (80 pg ATP/cm²), l'acier inoxydable et le polypropylène (PP-R). Après 28 jours d'essai, une concentration relativement élevée de biofilm est déjà observée sur le cuivre et le polyéthylène. Après une période d'essai de 140 jours, aucun équilibre n'a été atteint pour la plupart des matériaux.

La quantité de biomasse formée sur la surface du matériau au contact de l'eau dépend de plusieurs processus : relargage de composés biodégradables par le matériau et leur apport par l'eau, mort microbienne et libération de la biomasse par le flux d'eau. Le relargage des composés biodégradables par les matériaux dans le système dynamique est probablement plus faible que dans le test BFP, car la température de l'eau est plus basse (18,6 °C) que dans le test BFP qui est effectué à 25 °C.

CONCLUSION

Une trentaine de matériaux constitutifs des canalisations, utilisés dans les installations de distribution d'eau potable, ont été testés pour leur promotion de la croissance bactérienne. Les études ont utilisé deux systèmes d'essai différents, c'est à dire le test statique du pouvoir de formation de biofilm (BFP) et du pouvoir de production de biomasse (BPP) et le système dynamique (système à flux continu).

Les études menées par le Kiwa permettent de tirer les conclusions suivantes :

1. Le test statique (Kiwa), avec la mesure de production d'ATP pour apprécier rapidement la biomasse formée, est utile pour la sélection des matériaux. Toutefois, une réponse plus rapide pour la formation de biofilm est obtenue dans le système dynamique, qui est plus représentatif des conditions réelles.
2. Les matériaux synthétiques diffèrent nettement entre eux par leurs propriétés de promotion de la croissance des micro-organismes. La croissance la plus élevée a été observée pour les matériaux en polyéthylène et la plus faible a été trouvée pour les matériaux en C-PVC.
3. Sur le cuivre, une formation de biofilm relativement importante (en comparaison des matériaux synthétiques et de l'acier inoxydable) a été observée. Cette promotion de la croissance est probablement liée à la présence d'une couche résiduelle d'huile ou d'un processus de corrosion, qui rend disponibles des composés organiques pour la croissance des micro-organismes.
4. Une relation significative a été observée entre le degré de promotion de la croissance des matériaux, par le test statique, et la promotion de la croissance de *Legionella*.
5. Le degré de formation du biofilm dépend en pratique des propriétés du matériau mais aussi de la qualité de l'eau et des conditions hydrauliques du système de distribution d'eau.

Synthèse des études scientifiques

Une méthode européenne harmonisée ou test BPP révisé a été développée et évaluée pour déterminer les propriétés de promotion de la croissance des matériaux au contact de l'eau potable. Ce test détermine le pouvoir de production de biomasse (BPP) des matériaux en utilisant l'ATP comme indicateur de biomasse. Les échantillons de matériaux sont incubés à 30 °C dans de l'eau du robinet remplacée une fois par semaine.

Des expérimentations complémentaires sont nécessaires pour améliorer la qualité de la procédure d'essai proposée et pour établir des critères discriminants.

Par ailleurs, il faut également souligner que les études disponibles n'ont été réalisées que sur des matériaux neufs, et que l'influence des paramètres liés au vieillissement des réseaux (notamment de facteurs tels que le tartre et la corrosion, dont l'influence sur le développement du biofilm et des organismes indésirables est incontestable) n'ont donc pas été pris en compte. Il paraît également nécessaire de conduire d'autres essais qui permettront de garantir dans la durée la qualité de l'eau fournie par les réseaux.

DEUXIÈME PARTIE - BIOFILM ET MATÉRIAUX DES CANALISATIONS DES RÉSEAUX DE DISTRIBUTION D'EAU - PRÉSENTATION DES ÉTUDES SCIENTIFIQUES

Docteur Fabien SQUINAZI

- Directeur du Laboratoire d'hygiène de la ville de Paris -

Les micro-organismes dans la nature n'existent pas comme des cellules isolées mais plutôt sous la forme de communautés. Dans ces groupements ou microcolonies, la vie est soumise en permanence à une compétition pour l'accès aux nutriments mais aussi à une interaction entre tous ces êtres vivants. Ces communautés parfois stables, appelées micro-associations ou microconsortia, sont souvent structurées en biofilms.

Les biofilms sont un sujet extrêmement vaste intéressant de très nombreux domaines. On les rencontre dans tous les milieux naturels et dans ceux liés à l'activité humaine.

Toutes les surfaces sont susceptibles d'être colonisées : les matériaux inorganiques, minéraux, verres, aciers, bétons, etc., les matériaux organiques comme les polymères, mais aussi les tissus animaux et végétaux.

Il y a d'une part les biofilms désirables, ayant des fonctions utiles à l'homme, comme dans l'épuration des eaux résiduaires par les boues activées, et d'autre part, les biofilms indésirables, qui causent des dommages aux installations humaines, médicales ou industrielles, par l'encrassement des appareils ou des installations au contact de l'eau ou de solutions aqueuses.

UN EXEMPLE DE BIOFILM DANS LE DOMAINE MÉDICAL

*Les sondes urinaires à demeure sont souvent bouchées par des concrétions du fait d'une infection par *Proteus mirabilis* ou par une autre bactérie productrice d'uréase (*Providencia* ou *Morganella*). Ces organismes colonisent les surfaces de la sonde, forment des biofilms entourés d'une matrice de*

polysaccharides ; l'uréase induit la formation d'ammoniac et élève le pH des urines et du biofilm ; il se forme des cristaux de phosphate d'ammonium et de calcium qui, captés par la matrice, peuvent boucher la sonde (The Lancet du 26 avril 2003, pp. 1435-1436).

■ LE BIOFILM⁴

Définition du biofilm

"Un biofilm est une communauté microbienne adhérant à une surface et fréquemment incluse dans une matrice de polymères exocellulaires" (Characklis 1989). Cette définition n'implique aucune notion d'âge, ni de densité.

Les cellules microbiennes sont emballées dans une matrice formée de biopolymères, généralement polysaccharidiques et protéiques, excrétés par certains de ces micro-organismes à certains moments de leur cycle cellulaire. Cette matrice extracellulaire fortement hydratée, appelée aussi couche muqueuse, permet la survie des micro-organismes, favorise leur nutrition et leur développement, surtout en milieu oligotrophe, en piégeant les nutriments.

Le biofilm est aussi une structure dynamique évoluant avec le métabolisme microbien. Par conséquent, il est

soumis à une succession de flores selon les variations des conditions physico-chimiques du milieu interne qui résultent elles-mêmes de l'action des micro-organismes.

L'observation microscopique révèle que les biofilms sont le plus souvent hétérogènes et formés de micro-colonies séparées par des espaces qui sont soit non colonisés, soit recouverts de cellules éparses ou en tapis.

Les cellules microbiennes des biofilms montrent une résistance accrue aux agents antimicrobiens. Cette propriété majeure des biofilms apparaît dans les heures suivant l'adhésion des micro-organismes.

Formation du biofilm

La formation du biofilm se déroule en deux étapes principales : l'adhésion des micro-organismes et la colonisation de la surface. L'adhésion est un événement purement physico-chimique qui est suivi de phénomènes biologiques aboutissant à la colonisation de la surface.

⁴ d'après Brigitte Carpentier, Les biofilms dans l'industrie agro-alimentaire, Bulletin de la Société Française de Microbiologie, Vol. 14, N°2, Juin 1999, pp. 105-111

Adhésion des micro-organismes

L'adsorption des molécules, en solution dans le liquide où la surface inerte est immergée, engendre la formation d'un film conditionnant qui modifie les propriétés physico-chimiques (l'énergie de surface) de la surface extrême du matériau. C'est en présence de ce film conditionnant que se fait l'adhésion des micro-organismes. Parmi les molécules adsorbées, se trouvent des éléments nutritifs qui sont plus concentrés aux interfaces que dans la phase liquide.

Pour pouvoir adhérer, les micro-organismes doivent arriver à proximité de la surface. La gravité, le thermo- ou chimiotactisme, les forces engendrées par le fluide en mouvement, concourent à transporter les micro-organismes vers les surfaces.

Trois types d'interactions interviennent dans l'adhésion qui a lieu lorsque les micro-organismes arrivent à faible distance de la surface (de l'ordre du nanomètre ou de quelques dizaines de nanomètres) : les forces attractives de Van der Waals, les interactions électrostatiques et les interactions acido-basiques. Ces dernières impliquent des groupements donneurs d'électrons et des groupements accepteurs d'électrons. Les caractéristiques de surface des micro-organismes sélectionnent, parmi les micro-organismes entrants, ceux qui vont adhérer.

Colonisation

L'adhésion provoque l'activation de l'expression de nombreux gènes promoteurs entraînant une synthèse accrue d'exopolymères. Les bactéries adhérentes sont, phénotypiquement, profondément différentes des bactéries en suspension. Après adhésion, les micro-organismes se multiplient et produisent des polymères exocellulaires. La production d'exopolymères n'a lieu que si le micro-organisme possède l'information génétique correspondante. En l'absence de production d'exopolymères, il ne peut vraisemblablement pas se former de microcolonies.

Au cours de la croissance microbienne, une partie des nouvelles cellules reste au sein du biofilm dont la population augmente pour atteindre des concentrations bien supérieures à celles atteintes en suspension dans le fluide.

Le biofilm peut être considéré comme un tissu dans lequel les bactéries peuvent communiquer entre elles. Un biofilm alimenté régulièrement en éléments nutritifs peut n'atteindre son état d'équilibre qu'au bout de plusieurs mois. L'arrêt de l'augmentation de la population du biofilm ne correspond pas à un état d'équilibre, la synthèse d'exopolymères continue et l'état physiologique des bactéries au sein du biofilm évolue. L'accumulation d'un biofilm est évaluée par la mesure d'adénosine triphosphate (ATP).

Toutes les souches bactériennes n'ont pas la même capacité à coloniser les surfaces ; de grandes différences existent au sein d'une même espèce microbienne. La capacité colonisatrice d'une bactérie peut améliorer celle d'une autre bactérie qui, seule, a une faible aptitude à coloniser les surfaces. Selon la ou les souches microbiennes en présence et selon les conditions de

culture des biofilms, on obtient des architectures très variables. L'architecture "en gruyère" obtenue dans un biofilm de *Pseudomonas aeruginosa* est due à la présence d'une molécule signal (une homosérine lactone). Cette molécule est efficace à partir d'une concentration seuil obtenue lorsque la population bactérienne atteint une valeur suffisante (un quorum). Lorsque cette molécule est absente, le biofilm obtenu est plat, fin et uniforme.

Propriétés des biofilms

Propriétés liées à la matrice

L'eau représente jusqu'à 99% de la masse humide de la couche muqueuse. La matière sèche est composée de polysides, de protéines et d'acides nucléiques.

Les polymères exocellulaires jouent vraisemblablement un rôle dans l'intensité de l'adhésion d'un biofilm. Cependant, compte tenu de la diversité des molécules, il est probable que certains polymères aient un rôle favorisant l'adhésion et d'autres un rôle anti-adhésif.

La forte teneur en eau de la couche muqueuse a probablement une conséquence sur la résistance à la dessiccation des bactéries. L'eau de la couche muqueuse permettrait la survie des bactéries qui se trouvent sur des surfaces sèches de façon intermittente.

Les polymères chargés négativement piègent les cations et notamment les métaux lourds. Le piégeage d'éléments nutritifs est vraisemblablement obtenu par l'augmentation de l'aire de l'interface solide-liquide après colonisation par un biofilm au relief tourmenté, les interfaces étant des zones de concentration des molécules présentes dans le fluide environnant.

Présence de cellules dites viables non cultivables

Sur les surfaces, la proportion de cellules cultivables peut être très faible par rapport au nombre total de cellules ou par rapport au nombre de cellules montrant une activité métabolique. Ceci semble dû aux différentes agressions subies par les micro-organismes des surfaces : l'apport discontinu de nutriments, la dessiccation, le nettoyage et la désinfection.

Une population de cellules actives de biofilms de *Salmonella typhi* murium, soumis pendant 4 jours à des cycles quotidiens de choc au chlore, remise en culture compte 20 % de salmonelles cultivables.

Cependant le statut réel des cellules métaboliquement actives, aussi appelées cellules viables non cultivables (VNC), ne fait pas à ce jour l'unanimité. Il est probable que les milieux et les conditions de culture de laboratoire ne sont pas toujours appropriés. Les micro-organismes des surfaces inertes subissent de nombreuses agressions et il est possible qu'au moins une partie de ceux qui nous échappent à ce jour pourrait être récupérée en mettant en œuvre de meilleures conditions de culture.

Résistance aux opérations de nettoyage et de désinfection

Le nettoyage et la désinfection sont les moyens habituels utilisés pour éliminer les biofilms. La première opération vise à éliminer les souillures aussi bien que les micro-organismes, la seconde vise à inactiver les micro-organismes restants.

Nettoyage

Seuls les détergents alcalins sont efficaces pour détacher un biofilm tandis que les produits acides ne sont pas plus efficaces que de l'eau chaude. Cette efficacité n'est cependant pas très forte puisqu'à elle seule l'action chimique détache difficilement plus de 90 % de la contamination. La complexation des cations peut entraîner le détachement du biofilm. L'action mécanique (brosse, jet moyen et haute pression), bien que responsable de la production d'aérosols contaminés, est reconnue comme étant performante pour l'élimination du biofilm. Toutefois, la réduction par décrochement de la contamination microbienne est de l'ordre de 1 à 2 puissances de 10. Compte tenu des populations initiales rencontrées, jusqu'à 107 UFC/cm², cela signifie que les contaminations après nettoyage sont, en réalité, loin d'être négligeables.

Désinfection

Les micro-organismes qui sont inclus dans un biofilm sont beaucoup plus résistants aux désinfectants que lorsqu'ils se trouvent dispersés dans un milieu liquide.

La concentration en désinfectant doit être multipliée de 10 à 100 fois pour obtenir sur des biofilms la même efficacité que sur des cellules en suspension. Les désinfectants les plus performants contre des suspensions bactériennes ne sont pas les plus performants contre les bactéries incluses dans un biofilm : les désinfectants tensio-actifs (ammoniums quaternaires, agents amphotères) perdent beaucoup plus d'efficacité après fixation des cellules au sein d'un biofilm que les désinfectants oxydants (chlore, acide peracétique, peroxyde d'hydrogène). Ces derniers ont, en plus de leur activité bactéricide, la capacité de décrocher une partie des bactéries adhérentes.

La résistance aux désinfectants, d'une part disparaît rapidement après le détachement des cellules de leur support, et d'autre part, augmente avec l'âge du biofilm. Enfin, la résistance aux désinfectants est très variable selon le matériau support.

Plusieurs composantes sont impliquées dans le phénomène de résistance des cellules des biofilms aux agents antimicrobiens : l'agrégation des bactéries entre elles, les exopolymères sécrétés dans le biofilm qui peuvent protéger la cellule microbienne, les modifications physiologiques chez les micro-organismes, entraînées par l'adhésion des cellules, dont certaines pourraient être à l'origine des phénomènes de résistance des micro-organismes des biofilms.

Notion de flore résidente et de flore transitoire

La forte résistance aux opérations de nettoyage et

de désinfection a pour conséquence l'installation d'une flore résidente sur les surfaces. L'ensemble des bactéries éliminées est appelé flore transitoire.

BIOFILMS ET DISTRIBUTION D'EAU POTABLE⁵

L'eau potable des réseaux de distribution véhicule à la fois une flore microbienne extrêmement diversifiée mais quasiment non identifiée et de la matière organique complexe dont une fraction relativement importante est biodégradable.

Le transport de l'eau se traduit tout au long du réseau par une multiplication et une augmentation du nombre de micro-organismes dans l'eau. Trois faits expliquent cette situation :

- Dans la plupart des réseaux d'eau potable, l'interface eau/matériau constitue le lieu privilégié d'accumulation de cellules et de matière organique et de multiplication des bactéries. Cette prolifération est suivie de leur détachement ou de leur arrachage et de leur transport par l'eau circulante.

- Cette population bactérienne est adaptée à l'environnement oligotrophe que représentent les eaux potables (moins de 2 mg/L de matière organique biodégradable dans de très nombreux cas). L'écosystème microbien apparaît très difficile à éradiquer et même lorsque le flux de nutriments est réduit (moins de 200 µg de matière organique biodégradable/L), la biomasse bactérienne n'est que faiblement diminuée.

- La biomasse bactérienne importée et celle qui se multiplie dans le réseau (système biologiquement instable) représentent le point de départ d'une chaîne trophique complexe au sein de laquelle les plus forts consommateurs de bactéries aquatiques sont les plus petits membres du zooplancton.

L'entrée de biomasse dans le réseau de distribution et sa multiplication posent deux interrogations complémentaires du point de vue de santé publique :

- Le système est constammentensemencé avec des germes inconnus, saprophytes mais aussi pathogènes opportunistes, avec une probabilité élevée de présence de coliformes non cultivables (estimés de 0,1 à 1 % de la biomasse totale) qui, en certaines occasions, peuvent trouver dans le réseau des conditions favorables à leur survie ou leur croissance et entraîner le non-respect des critères de potabilité.

- Une fraction des micro-organismes introduits dans le réseau (et s'y multipliant principalement au niveau du biofilm) représente un danger pour le consommateur, conduisant à une fréquence relativement élevée de symptômes gastro-entériques (diarrhées et vomissements). Ces données épidémiologiques à faible bruit, sans caractère épidémique lié à un accident

Biofilm et matériaux des canalisations des réseaux de distribution d'eau

Présentation des études scientifiques

⁵ d'après Jean-Claude Block et Brice Marc René Appenzeller, *Biofilms et distribution d'eau potable*, Bulletin de la Société Française de Microbiologie, Vol.16, N°1, Mars 2001, pp. 7-12

et une contamination massive, ne sont pas identifiées par le système médical classique et ne sont mises en évidence qu'au travers d'études spécifiques des populations exposées.

En limitant l'instabilité biologique des systèmes de distribution et la prolifération des micro-organismes au niveau des biofilms, on apporte un bénéfice certain à la fois pour les utilisateurs et pour les distributeurs d'eau.

Les problèmes de qualité d'eau les plus fréquemment observés causés par la multiplication des micro-organismes dans les réseaux de distribution d'eau sont :

- des dénombrements élevés de la flore bactérienne hétérotrophe. Les numérations élevées de micro-organismes aérobies revivifiables, dépassant les critères définis dans les réglementations nationales, sont le signal le plus communément observé d'une dégradation de la qualité microbiologique de l'eau des systèmes de distribution. Dans plusieurs situations, les enduits relarguant des solvants biodégradables ont été identifiés comme la cause d'un accroissement des valeurs de la flore bactérienne hétérotrophe dans les réservoirs et les canalisations. Des valeurs élevées ont aussi été observées avec des matériaux tels que le polyéthylène, le PVC et des ciments avec des constituants organiques (Burman et Colbourne, 1977 ; Schoenen et Schöler, 1983 ; Frensch et al. 1987 ; Bernhardt et Liesen, 1988) ;

- la présence de bactéries coliformes. Elle a été fréquemment observée dans des systèmes de distribution d'eau avec une concentration résiduelle de désinfectant (Wieringa, 1985 ; Smith et al. 1990). La croissance des coliformes peut être favorisée par des sédiments et des interactions entre les composés organiques de l'eau et la surface de canalisations corrodées (Baylis 1930 ; Camper et al. 1999). Certains matériaux tels que le bois, le cuir, les enduits, les lubrifiants favorisent également la croissance des bactéries coliformes (Burman et Colbourne, 1977 ; Seidler et al. 1997 ; Ellgas et Lee, 1980 ; Schoenen et Schöler, 1983) ;

- la présence de micro-organismes pathogènes comprenant Legionella pneumophila, Pseudomonas aeruginosa et Mycobacterium spp. L'exposition à des numérations élevées de ces bactéries dans l'eau est un risque sanitaire potentiel, notamment pour les personnes aux défenses immunitaires altérées.

En 1980, Legionella présente dans l'eau chaude a été identifiée comme agent en cause dans des cas de pneumonies liées à l'eau (Tobin et al. 1980 ; Cordes et al. 1981). Le nombre maximal de cas de légionellose (pneumonie) rapportés annuellement est voisin de 20 par million de personnes dans certains pays d'Europe en 1999 (OMS, 2000). Toutefois, tous les cas ne sont pas diagnostiqués et/ou déclarés et tous les cas rapportés ne sont pas liés à des Legionella des systèmes de distribution d'eau. Les Legionella se multiplient dans certains protozoaires pour former des biofilms (Rowbotham, 1980 ; Abu

Kwaik, 1998). Certains composants en caoutchouc, d'autres élastomères et des matériaux plastiques peuvent entraîner la multiplication des Legionella en favorisant la formation de biofilm (Colbourne et al. 1984 ; Hengesbach et al. 1993 ; Nideveld et al. 1986 ; Rogers et al. 1994 ; Schoenen et al. 1988 ; Schofield et Locci 1984).

Pseudomonas aeruginosa est aussi un agent en cause dans des infections liées à l'eau, principalement dans des pneumonies nosocomiales (Anaissie et al. 2002).

Mycobacterium spp. (avium complex) qui se multiplie dans les systèmes de distribution d'eau peuvent infecter des patients atteints de SIDA (Von Reyn et al. 1994). Les mycobactéries ont été observées dans des biofilms sur les surfaces de matériaux (Falkinham et al. 2001 ; Schultze - Röbbecke et Fischeider, 1989).

- Des problèmes esthétiques. La croissance microbienne peut être la cause de problèmes esthétiques, par exemple la présence de flocons, de turbidité, d'organismes invertébrés, ou peut altérer le goût et l'odeur de l'eau (Burman et Colbourne, 1977 ; Schoenen et Schöler, 1983 ; Van Lieverloo et al. 1994).

Organisation des biofilms des réseaux de distribution

La structure des biofilms des réseaux d'eau potable est mal décrite et incertaine (colonies dispersées sur la surface ou/et films de quelques micromètres, ...) du fait de la grande difficulté à explorer sans déformer cette biomasse fixée en très faible quantité. Elle est de plus compliquée par la présence de débris, de produits de corrosion, de dépôts minéraux, et par la formation de tubercules de corrosion offrant de nouvelles niches ou surfaces à coloniser.

Les biofilms des réseaux peuvent être décrits selon plusieurs approches :

- Le biofilm est composé d'un mélange de micro-organismes d'activité variable en fonction de leur position dans l'agrégat. Même des microcolonies (50 cellules) peuvent représenter une association de plusieurs espèces. Les échanges plasmidiques sont possibles au sein de ces biofilms.

- Lorsque le biofilm (ou les microcolonies) est fin, inférieur à 40 µm, le transfert des nutriments et de l'oxygène ne serait pas limité et les grandeurs traduisant l'activité de l'ensemble seraient identiques à celles des bactéries en suspension. Lorsque le biofilm (ou la colonie) est épais, supérieur à 80 µm, l'activité respiratoire est plus faible dans les couches profondes. Cela explique qu'une fraction des bactéries fixées est peu active.

- Les biofilms présentent une structure hétérogène et discontinue qui se traduit par une dispersion non uniforme à la surface des matériaux en contact avec

l'eau. Les agrégats, qui se différencient au sein des biofilms, sont environnés par des canaux qui occupent jusqu'à 50 % du volume du film et au sein desquels circulent eau, particules, protozoaires, ...

- L'accumulation des biofilms à la surface des matériaux se réalise de fait dans une zone où la circulation de l'eau est freinée par les frottements sur la paroi qui créent une couche visqueuse. Celle-ci peut atteindre par exemple 70 μm dans un tuyau en fonte recouvert de mortier de ciment où l'eau circule à 1 m/s. Le transfert au travers de cette couche de différentes molécules (oxygène, désinfectant, éléments nutritifs) est limité par leur vitesse de diffusion.

- Le nombre de cellules microbiennes qui peuvent être comptées sur ces surfaces en contact avec de l'eau potable est généralement élevé, de l'ordre de 10^6 à 10^8 cellules par cm^2 . Cette biomasse est faible en terme de carbone organique : de 0,1 à quelques μg de carbone organique par cm^2 .

- L'état stationnaire n'est sans doute jamais atteint dans un réseau réel du fait des discontinuités fréquentes : variations du régime hydraulique, changement de la nature et de la concentration des nutriments et des désinfectants, introduction de nouveaux micro-organismes. Les résultats de Zacheus et al. (2000) montrent une accumulation lente de biomasse mais continue après 5 mois d'exposition à l'eau potable. Percival et al. (1998) observent un changement des populations bactériennes dominantes entre les "pionniers" qui colonisent un matériau acier en moins d'un mois et les espèces présentes après cinq mois d'immersion dans l'eau. Enfin, par analogie avec les concepts actuels de différenciation des biofilms au cours de leur vieillissement, on peut estimer qu'il y a obligatoirement réorganisation constante du système biofilm au cours de son développement (formation de microagrégats, de canaux, etc.).

Activités des biofilms des réseaux de distribution

Si dans la plupart des réseaux d'eau potable, la densité des micro-organismes fixés est voisine de 10^6 à 10^8 cellules par cm^2 , la diversité des espèces en présence et leur activité sont extrêmement variables et mal appréciées du fait de limitations techniques évidentes.

En premier lieu, la difficulté à cultiver ces micro-organismes limite pour l'heure la connaissance précise des espèces présentes. La méthode de culture sur milieu nutritif gélosé reste cependant une technique de référence encore largement utilisée, qu'il est possible de relativiser par le comptage de bactéries présentant une activité respiratoire (marquage par les sels de tétrazolium INT ou CTC) et le nombre total de cellules. D'autres outils d'exploration des biofilms sont utilisés : les sondes oligonucléotidiques et l'analyse des acides gras des phospholipides.

En second lieu, la production cellulaire peut varier dans une large fourchette. Servais (1988) et Servais

et al. (1992) mesurent, par incorporation de thymidine, des productions bactériennes entre 0,001 et 0,008 $\mu\text{g C cm}^{-2} \text{ h}^{-1}$ selon les réseaux étudiés. Block et al. (1993) calculent des temps de doublement de la biomasse fixée de quelques jours à plusieurs dizaines de jours selon le statut nutritif des eaux. Donlan et al. (1994) rapportent des taux de formation des biofilms entre 0,1 et 5,5 $\log \text{cellules cm}^{-2} \text{ j}^{-1}$ marqués par l'effet saisonnier.

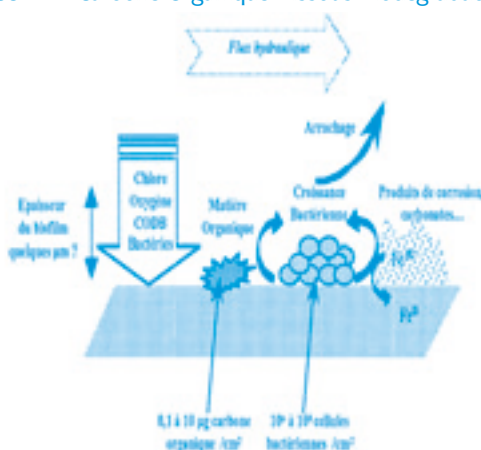
Paramètres contrôlant l'accumulation des biofilms

L'accumulation et la prolifération des bactéries fixées sous forme de biofilms est contrôlée par un grand nombre de paramètres plus ou moins bien étudiés en laboratoire et plus rarement sur site : hydraulique, température, nature et concentration des éléments nutritifs, densité des bactéries et espèces introduites dans le réseau, nature des matériaux de distribution, prédateurs (figure 2.1).

Il n'est pas vraiment démontré que la concentration en matière organique biodégradable des eaux distribuées contrôle directement la densité cellulaire du biofilm ; par contre, son rôle sur l'activité est bien vérifié.

Le biofilm apparaît comme un système *métastable* :
- d'une part "alimenté" par l'arrivée de cellules de la phase eau (la vitesse de dépôt/adhésion des cellules à la surface des matériaux est corrélée à la densité cellulaire des eaux circulantes) et par la multiplication des bactéries,
- d'autre part, "raboté" par l'arrachage et le relargage constants des bactéries du biofilm dans la phase eau.

Figure 1 : Schéma de quelques mécanismes réactionnels participant à l'accumulation de biofilms sur une surface en contact avec l'eau potable. (CODB = Carbone Organique Dissous Biodégradable).



Dans ces conditions, l'organisation du biofilm et la structure des peuplements dépendent principalement de plusieurs autres facteurs :

- le régime hydraulique du système et ses variations ;
- les espèces bactériennes introduites dans le réseau à partir de la ressource traitée ou non traitée ;
- la compétition et l'avantage donné à certaines espèces du fait de leurs exigences nutritionnelles ;

Biofilm et matériaux des canalisations des réseaux de distribution d'eau

Présentation des études scientifiques

- la nature des matériaux utilisés en distribution d'eau potable. Ils sont tous largement colonisés par des micro-organismes mais les matériaux supports jouent un rôle considérable dans la sélection de la biomasse et son organisation. En effet, ils conditionnent l'efficacité d'adhésion des "pionniers" et peuvent être une source de nutriments ou de facteurs de croissance ;
- la résistance aux oxydants des biomasses fixées qui s'explique en large partie par le pouvoir réducteur du biofilm, de la matière organique fixée et parfois du matériau support ainsi que la mauvaise diffusion de l'oxydant. L'exposition des bactéries du biofilm à ces stress oxydants sublétaux entraîne une défense cellulaire marquée (surproduction de glutathion intracellulaire) et une résistance accrue des bactéries aux oxydants.

Les réseaux de distribution d'eau potable fonctionnent comme des réacteurs alimentés en continu au sein desquels s'opèrent dans l'eau et à l'interface eau-matériau des réactions physico-chimiques (corrosion, consommation de chlore, floculation, sédimentation de particules, etc.) et biologiques (prolifération de biomasse) souvent mal comprises et toujours difficiles à maîtriser.

■ MÉTHODES DE MESURE DES BIOFILMS SUR LES MATÉRIAUX

L'eau potable peut perdre sa qualité durant son transport, son stockage et sa distribution. Une contamination externe peut survenir lors de branchements, de siphonages et d'autres types d'introduction de contaminations. La formation de biomasse (recroissance) dans l'eau des systèmes de distribution d'eau potable est aussi une cause de dégradation de la qualité microbiologique de l'eau destinée à la consommation humaine et à d'autres usages domestiques.

La multiplication des micro-organismes dans ces systèmes dépend d'une combinaison de conditions (facteurs de risque), c'est à dire (1) la concentration de composés biodégradables, (2) une température élevée et (3) le temps de séjour de l'eau dans les canalisations. La recroissance microbienne est limitée essentiellement en maintenant une concentration résiduelle de désinfectant durant la distribution et/ou en limitant la concentration de composés biodégradables. Ces composés présents dans l'eau traitée peuvent avoir comme origine l'eau brute ou certains processus de traitement de l'eau (par exemple l'oxydation). L'accroissement de la flore microbienne durant la distribution est aussi favorisée par l'accumulation de sédiments, des interactions entre la corrosion du fer et des composés colloïdaux mais également du relargage de composés biodégradables par des matériaux naturels ou synthétiques au contact avec l'eau.

Dans les deux dernières décennies, des méthodes ont été développées pour déterminer les propriétés de promotion de la croissance microbienne de l'eau de consommation, par exemple le carbone organique assimilable (COA) ou le carbone organique dissous biodégradable (CODB) (Van der Kooij et al. 1982 ; Joret et Levy 1986). Les réglementations actuelles européennes et nationales demandent que les matériaux

au contact de l'eau potable ne devraient pas réduire la protection de la santé humaine, comme le précise la Directive du Conseil 98/83/EC (Union européenne, 1998) transposée en droit Français par le décret n°2001-1220 du 20 décembre 2001 relatif à la qualité de l'eau destinée à la consommation humaine à l'exclusion des eaux minérales naturelles.

En conséquence, étant donné le pouvoir de certains matériaux à favoriser la croissance des micro-organismes et le nombre toujours croissant (et l'application) de matériaux synthétiques, il est nécessaire d'avoir une méthode généralement acceptée et des critères discriminants pour permettre le choix des matériaux sur la base de leurs propriétés de promotion de la croissance microbienne.

Ainsi, des méthodes ont été développées dans plusieurs pays européens afin de déterminer les propriétés de promotion de la croissance microbienne des matériaux au contact de l'eau potable (Tableau 3.1).

Le test de la différence en oxygène dissous (MDOD), tel qu'il a été décrit par Colbourne et Brown (1979), est devenu la méthode normalisée au Royaume Uni (BS 6920-2.4 ; British Standard 2000). Le test de production d'un dépôt visqueux, tel qu'il a été développé par Schoenen (Schoenen et Scholer, 1983) est la méthode normalisée en Allemagne (DVGW, 1998). Aux Pays Bas, le test BPP a été proposé (Van der Kooij et Veenendaal, 1994 ; Van der Kooij et Veenendaal, 2001). Plus récemment, une méthode a été proposée pour déterminer les propriétés de promotion de la croissance des matériaux de canalisations au contact de l'eau potable (Önorm B5018, 2002).

Tableau 3.1. Méthodes d'essais pour déterminer les caractéristiques de promotion de la croissance microbienne des matériaux au contact d'une eau traitée.

Pays	Méthode	Principe	Statut
Royaume Uni	Différence en oxygène dissous (MDOD)	Détermination de la consommation d'oxygène en présence du matériau dans une cuve où l'eau est renouvelée deux fois par semaine	British Standard 6920-2.4
Allemagne	Formation d'un dépôt visqueux (SP)	Formation d'un dépôt sur la surface au contact d'un écoulement lent d'une eau de boisson	Arbeitsblatt DVGW W270
Pays-Bas	Pouvoir de production d'une biomasse (BPP)	Formation d'une biomasse sur le matériel et dans l'eau dans une cuve test sans renouvellement de l'eau	Draft NEN
Autriche	Détermination de la flore bactérienne hétérotrophe et de l'ATP	Détermination de la flore bactérienne hétérotrophe et de l'ATP sur le biofilm formé dans des tuyaux remplis d'eau avec renouvellement de l'eau	Önorm B 5018

Test MDOD

Dans le test MDOD, la consommation additionnelle d'oxygène en présence du matériau testé est utilisée comme indicateur de l'activité microbienne. Cette méthode est utilisée depuis des dizaines d'années et un grand nombre de matériaux ont été testés (Colbourne, 1985). Les valeurs typiques vont de 0,5 mg/l pour le verre (témoin négatif) jusqu'à des valeurs de 8 mg/l pour la paraffine (témoin positif). Les matériaux présentant une valeur supérieure à 2,3 mg/l sont considérés comme non acceptables pour leur utilisation au contact de l'eau destinée à la consommation humaine (Colbourne, 1985).

Test de production d'un dépôt visqueux (SP)

Le test SP, développé en Allemagne, est aussi utilisé depuis longtemps (Schoenen et Schoeler, 1983). Cette méthode est appliquée dans un système dynamique, avec des plaques de matériaux de 800 cm² au contact d'une eau en écoulement permanent. Le volume du dépôt sur la surface du matériau testé est utilisé comme indicateur de biomasse. Des résultats typiques vont de valeurs inférieures à 0,1 ml pour l'inox (témoin négatif) jusqu'à plus de 15 ml pour le bitume ou le PVC plastifié. Les matériaux présentant une valeur supérieure à 0,1 ml sont considérés comme non acceptables pour leur utilisation au contact de l'eau potable (DVGW, 1998).

Les tests MDOD et SP ont été comparés sur plusieurs matériaux PVC (Schoenen et Colbourne, 1987). A l'exception d'un matériau, les résultats des tests ont fourni la même conclusion selon le critère de définition. Des tests complémentaires utilisant une plus grande variété de matériaux n'ont pas montré le même degré de réponse.

Etude du pouvoir de production d'une biomasse (BPP)

Le test BPP est dérivé du test développé par Van der Kooij et Veenendaal (1994), nommé "le pouvoir de formation d'un biofilm". Dans ces tests, l'adénosine triphosphate (ATP) est utilisée comme indicateur de biomasse active. L'ATP est un composé riche en énergie, qui est présent dans les organismes vivants (en activité). L'analyse de l'ATP permet de détecter des concentrations très faibles de micro-organismes. La limite de détection du test, appliqué à l'eau du robinet, est de 1 ng/l. En outre, l'analyse peut être réalisée en quelques minutes.

Le test BPP est réalisé en laboratoire en incubant dans l'obscurité à 25 ± 1 °C des échantillons de matériau (d'une surface totale d'environ 100 cm²) dans une eau de boisson biologiquement stable (600 ml), à laquelle sont ajoutés des sels de potassium et des micro-organismes d'eau de rivière. Dans ce test, les concentrations de biomasse active formée sur le matériau (biofilm) et dans l'eau (biomasse en suspension)

sont mesurées sur une période de 16 semaines, après 56, 84 et 112 jours d'exposition. La biomasse est détachée du matériau par un appareil à ultra-sons (40 KHz).

Dans le test BPP, on mesure la production de biomasse active (ATP) en fonction du temps, en présence du matériau testé. Le test BPP est un test statique sans remplacement de l'eau. Dans cette situation, la concentration de la biomasse active, mesurée par l'ATP, dépend de la quantité de composés biodégradables provenant du matériau. La production de biomasse (BP, en pg d'ATP /cm²) est calculée à partir de la concentration de biomasse fixée (biofilm) et de la concentration de la biomasse planctonique (en suspension dans l'eau) en utilisant le rapport Surface/Volume. La production maximale de biomasse (BP max) est la valeur maximale de BP habituellement observée après 2 semaines d'incubation. La valeur de BPP est la moyenne des valeurs de BP obtenues aux jours 56, 84 et 112.

Cette valeur de BPP comprend le pouvoir de formation de biofilm (BFP), qui représente la biomasse fixée, et le pouvoir de formation d'une biomasse en suspension (SBP). Ainsi, BPP = BFP + SBP. Ces paramètres sont tous exprimés comme la quantité de biomasse active par unité de surface du matériau testé (pg ATP/cm²).

Des bactéries Legionella (ou d'autres bactéries) peuvent être ajoutés à l'eau au démarrage du test. De cette manière, une information complémentaire est obtenue sur le degré de capacité d'un matériau particulier à favoriser la croissance de Legionella (ou d'autres bactéries) dans les conditions du test (Van der Kooij et Veenendaal, 2001).

L'analyse d'ATP est aussi utilisée pour déterminer la concentration de biofilm sur les parois des canalisations et dans un appareil spécifique afin d'obtenir le taux de formation de biofilm (BFR) de l'eau potable (Van der Kooij et al., 1999). Une banque de données des concentrations dans l'eau, dans les biofilms et sur les matériaux facilite l'interprétation de mesurages individuels (analyse unifiée des biofilms) (Van der Kooij et al., 2003).

La méthode d'étude est présentée de manière plus détaillée dans l'annexe 1.

Méthode autrichienne

Une méthode alternative pour tester les matériaux des canalisations au contact de l'eau potable a récemment été publiée en Autriche (Önorm B5018, 2002). Le diamètre intérieur recommandé pour les échantillons tests est de 4 cm, ce qui donne un rapport Surface/Volume de 1 cm⁻¹. La longueur de l'échantillon de tuyau est de 100 cm. Les tuyaux sont fixés en position verticale et leurs extrémités sont fermées par des bouchons de polyéthylène. Ces tuyaux sont remplis d'eau du robinet et leur extrémité supérieure est recouverte d'une boîte de Pétri stérile.

Les tuyaux sont incubés à 22 ± 2 °C en remplaçant l'eau chaque semaine. Une aération de l'eau est pratiquée à une pression de 0,3 bar. Les dénombrements de la

Biofilm et matériaux des canalisations des réseaux de distribution d'eau

Présentation des études scientifiques

flore bactérienne hétérotrophe (HPC) de l'eau des tuyaux sont déterminées selon la norme EN ISO 6222 à 22 °C après un, deux et trois mois d'incubation. A la fin du test, après trois mois d'incubation, la croissance du biofilm sur la paroi interne du tuyau est évaluée en utilisant la méthode de l'ATP. Les échantillons tests sont des anneaux de 1 cm de hauteur, qui sont découpés, dans des conditions stériles, à 20 cm au-dessus de l'extrémité des tuyaux testés. La biomasse est détachée par une sonication légère.

L'évaluation est effectuée par rapport à un témoin négatif (verre) et un témoin positif (matériau souple (PVC-P)). Les canalisations ne sont pas recommandées pour l'utilisation au contact de l'eau potable si les dénombrements de la flore bactérienne hétérotrophe (HPC) de l'eau testée au contact du matériau est 10 fois plus élevée que le témoin négatif (verre) ou lorsque la concentration de biofilm sur l'échantillon de tuyau est 5 fois plus élevée que pour le verre. Les résultats ne sont valables si la valeur de HPC du témoin matériau souple (PVC-P) est au minimum 100 fois plus élevée que la valeur du témoin verre et que la quantité de biofilm observée sur le matériau souple (PVC-P) est au minimum 10 fois plus élevée que celle observée sur le verre.

Le tableau 3.2. donne un aperçu des principales caractéristiques de ces méthodes.

Tableau 3.2. Caractéristiques des méthodes de détermination du pouvoir de croissance des matériaux au contact de l'eau potable.

Condition paramètre	MDOD (UK)	W270 (D)	BPP (NL)	Önorm (A)
Température (°C)	30 ± 1	Ambiante (> 6 °C)	25 ± 1	22 ± 2
Surface (S) (cm ²) du matériau	150	800	12 x 8	1256 - 3140*
Volume (V) (cm ³) de l'eau	1000	> 100 000	600	1256 - 7850*
S/V (cm-1)	0,15	n.a.***	0,16	1
Remplacement de l'eau	2 fois/sem.	continu	aucun	1 fois/sem.
Type d'eau	eau potable §	eau potable §	SSF §§	eau potable §
Durée (semaines)	7,5	26	16	12
Activité microbienne	oxygène	volume du dépôt	ATP	ATP/HPC

*dépend du diamètre des tuyaux (4 ou 10 cm respectivement), **flux continu (20 l/h), ***non applicable, § déchloration (par filtration sur charbon actif ou addition de thiosulfate) si nécessaire, §§ SSF : filtration lente sur sable.

Méthode européenne harmonisée (test BPP révisé)

Les différentes méthodes utilisées pour tester les matériaux gênent le développement du marché européen. Ainsi, le Comité européen de normalisation a défini

dans son organisation des méthodes européennes normatives. Le groupe de travail 1 (WP1) "Croissance microbienne" du projet de l'Union européenne "Développement de tests harmonisés utilisés pour les matériaux au contact de l'eau potable (CPDW), dans le cadre du plan européen approuvé" a développé une méthode d'étude harmonisée pour évaluer les propriétés de promotion de la croissance microbienne des matériaux au contact de l'eau potable (juillet 2003). Cette méthode repose sur l'ATP comme indicateur de biomasse.

La procédure est applicable pour tous types de matériaux avec une surface solide et qui ne relarguent pas de composés toxiques pour les micro-organismes. Ces matériaux comprennent les produits naturels et synthétiques, organiques et inorganiques (avec ou sans ajout de composés organiques). Les matériaux au contact d'autres types d'eau (eau de piscine, eaux industrielles), les matériaux utilisés dans les équipements médicaux et ceux utilisés au contact des aliments (boissons) ne peuvent être testés par la procédure décrite dans ce projet.

Des échantillons représentatifs du matériau testé sont incubés dans de l'eau potable renfermant des nutriments inorganiques définis et inoculée par un mélange de micro-organismes naturels provenant d'une eau de rivière. Les échantillons de matériaux sont incubés jusqu'à 16 semaines à un rapport constant surface/volume de 0,16 cm-1. Des anneaux de verre, soigneusement lavés, servent de témoin négatif pour mesurer les effets de promotion de la croissance de l'eau. Le matériau souple (PVC-P) est utilisé comme un témoin positif. L'eau du test est remplacée à une fréquence d'une fois par semaine.

La formation de biomasse sur la surface du matériau (biofilm) et dans l'eau est déterminée par des mesures d'ATP après 8, 12 et 16 semaines d'incubation. Les échantillons de matériaux sont recueillis périodiquement et la biomasse est détachée à l'aide d'ultra-sons. La concentration d'ATP est utilisée comme une mesure de la présence d'une biomasse microbienne active et la production de biomasse par unité de surface (pg d'ATP/cm²) est calculée à partir de la concentration de la biomasse fixée et en suspension dans l'eau. La validation des résultats est obtenue en incluant des témoins négatifs (verre) et des matériaux de référence en parallèle aux matériaux testés.

Le pouvoir de production de biomasse (BPP) est la concentration moyenne des valeurs de production de biomasse observée sur la surface du matériau et dans l'eau, mesurée par l'adénosine triphosphate (ATP) par cm² de matériau, après 56, 84 et 112 jours d'incubation dans l'eau du test, en retranchant la valeur moyenne observée sur le témoin négatif (verre). La valeur de BPP est exprimée en pg d'ATP/cm².

Des détails complémentaires sur la méthode d'étude harmonisée sont donnés dans l'annexe 3.

Les données recueillies par des expérimentations réalisées dans plusieurs pays européens ont démontré que le test BPP avec le remplacement de l'eau toutes les semaines durant 16 semaines est une méthode

prometteuse pour déterminer les propriétés de promotion de la croissance microbienne des matériaux au contact de l'eau potable. Le test révèle des valeurs de BPP allant de moins de 50 pg ATP/cm² (tel qu'observé pour le verre, l'acier inoxydable et le C-PVC) jusqu'à plus de 40 000 pg ATP/cm² pour le matériau souple (PVC-P). L'utilisation de l'ATP pour déterminer les concentrations de biomasse dans l'eau potable et sur les surfaces au contact de l'eau potable dans les systèmes de distribution facilite l'interprétation des valeurs de BPP des matériaux au contact de l'eau potable.

Comparaison des méthodes

Un certain nombre de matériaux qui ont été choisis et testés pour déterminer la reproductibilité du test BPP ont été aussi testés avec les méthodes décrites dans le tableau 3.1. et dans deux situations d'écoulement en continu. L'objectif de ces expérimentations était d'obtenir une base de données nécessaire pour l'interprétation des valeurs BPP obtenues avec le test BPP révisé.

Les résultats obtenus dans des conditions différentes de test avec un nombre limité de matériaux démontrent clairement la complexité de l'évaluation de la production de biomasse sur la surface des matériaux au contact de l'eau potable (Van der Kooij et al. 2003). Les conditions du test ont un grand impact sur la production de biomasse d'un matériau. L'utilisation d'un seul paramètre, qui permet d'évaluer la concentration de biomasse dans différentes situations, facilite la compréhension de l'impact des différentes conditions du test et des conditions pratiques. Toutefois, le nombre limité de données obtenues dans ces études donne seulement des indications sur ces effets.

Le test MDOD (Royaume uni)

Les relations entre les test MDOD et BPP ne semblent pas proportionnelles, mais une relation linéaire peut être obtenue en reportant les valeurs de BPP sur une échelle logarithmique et les valeurs de MDOD sur une échelle numérique. Les réductions de croissance liées aux concentrations en oxygène dissous dans l'eau du test pourraient aboutir à la suppression d'une croissance si le système s'approche de conditions d'anaérobiose. Cette limitation en oxygène dans le test MDOD a eu un impact sur l'évaluation des valeurs obtenues. Cet effet était moindre pour les valeurs de BPP, malgré une fréquence plus basse de remplacement de l'eau (une fois par semaine) dans le test BPP révisé. Une gamme d'environ un facteur 1000, telle que celle couverte par le test BPP, ne peut être observée avec le test MDOD. Les résultats de l'étude suggèrent que le critère discriminant MDOD de 2,3 mg/l correspond à une valeur BPP d'environ 1600 pg/cm² d'ATP.

Il est difficile de définir la relation entre les concentrations d'ATP et les valeurs de MDOD jusqu'à ce qu'une plus grande quantité de matériaux soient testés. La relation entre MDOD et BPP mérite aussi plus d'études.

Le test W270 (Allemagne)

L'interprétation de la comparaison entre le test de formation d'un dépôt (SP) et le test BPP est compliquée

par plusieurs facteurs. Seulement trois matériaux ont été testés et les valeurs de BPP déterminées pour des matériaux identiques dans deux laboratoires sont différentes. Ces différences sont plus grandes que les valeurs du coefficient de variation de la reproductibilité (CVR) rapportées dans les tests de reproductibilité avec d'autres matériaux. La nature des matériaux et la procédure appliquée pour la préparation des échantillons peuvent avoir eu un impact sur la reproductibilité. Aussi, les valeurs SP de matériaux observées par deux laboratoires ont montré des différences relativement grandes. A partir des données obtenues, aucune indication pour une relation entre les valeurs SP et les valeurs BPP ne peut être présentée. Le critère discriminant pour le test W270 dépassait les valeurs BPP obtenues avec les matériaux de monomères d'éthylène et propylène.

La méthode autrichienne

La comparaison entre la méthode autrichienne et le test BPP révisé a été compliquée par le fait que les diamètres des matériaux testés n'étaient pas en accord avec le diamètre prescrit (4 cm). En conséquence, le rapport S / V dans l'expérimentation était plus élevé que celui prescrit et aucun apport d'air n'était possible dans ces conditions. Les valeurs BP pour le matériau souple (PVC-P) et pour le polyéthylène haute densité étaient plus basses que les valeurs BPP rapportées dans le test BPP révisé. Toutefois pour le caoutchouc siliconé, les valeurs BP étaient plus élevées que dans le test BPP. Les valeurs faibles de matériau souple (PVC-P) peuvent être liées à la limitation de nutriments et/ou d'oxygène, en relation avec un rapport S/V élevé.

Les valeurs de la flore bactérienne hétérotrophe dans l'eau ont montré des différences nettes entre les matériaux. Les valeurs de la flore dans l'eau au contact du polyéthylène haute densité étaient d'environ 100 à 1000 fois inférieures à celles observées en présence du caoutchouc siliconé et du matériau souple (PVC-P), mais les valeurs de BP de ces matériaux ont montré une moins grande différence. Les différences de relargage de composés biodégradables dans l'eau peuvent expliquer ce phénomène. Un facteur de complication avec ce paramètre est que les différences dans la composition de la communauté microbienne ont un impact sur la valeur de la flore bactérienne, même lorsque les nombres totaux de bactéries viables sont similaires. Cet aspect ne joue aucun rôle avec l'analyse d'ATP.

La méthode originale BPP

La comparaison entre le test BPP révisé et la méthode originale BPP (aucun remplacement de l'eau, flacons d'Erlenmeyer en verre bouchés) a montré des similitudes et des différences. Les matériaux avec des valeurs BPP basses ont donné des valeurs plus élevées dans le test BPP révisé que par la méthode originale. Cet effet est probablement dû à l'introduction de composés biodégradables par le remplacement de l'eau et la fonction de fermeture moins efficace du couvercle des récipients (en comparaison aux flacons d'Erlenmeyer bouchés). Les valeurs BPP intermédiaires étaient similaires dans les deux tests, mais à des valeurs BPP élevées, le protocole révisé a donné des valeurs beaucoup plus élevées que dans le test BPP original. La différence observée avec le matériau souple (PVC-P)

est probablement liée à la limitation de croissance entraînée par un manque d'oxygène. Avec le caoutchouc nitrile, des facteurs supplémentaires peuvent avoir joué un rôle du fait que la valeur BPP de ce matériau dans le test sans remplacement de l'eau était beaucoup plus basse que la valeur BPP observée avec le matériau souple (PVC-P) dans ces conditions. Cette différence peut être due aux disparités entre les joints utilisés (par exemple de différents lots) et/ou à la présence de composés inhibiteurs de croissance observée avec ce matériau dans les tests sans remplacement de l'eau.

Les conditions d'écoulement en continu

Des conditions d'écoulement en continu ont été appliquées à l'"appareil biofilm" (Kiwa), décrit dans l'annexe 1, et à l'installation-test mise au point par l'Université technique du Danemark (DTU), décrit dans l'annexe 2. Les données observées avec l'"appareil biofilm" montrent que les matériaux testés ont clairement des propriétés différentes par rapport à la production de biomasse. La production de biomasse (biofilm) sur le caoutchouc siliconé et le matériau souple (PVC-P) est le reflet de la production de biomasse observée dans le test BPP (semi) statique ; un taux d'écoulement continu de 0,2 m/s ne réduit manifestement pas la formation de biomasse sur ces matériaux. Les concentrations de biofilm sur le matériau dans l'appareil biofilm sont le résultat de l'effet combiné de l'eau (taux de formation de biofilm) et du matériau. Avec l'eau utilisée (valeur BFR – taux de formation du biofilm – de 5 pg ATP /cm² . jour), il n'a pas été possible de déterminer l'effet du C-PVC (avec une valeur BPP < 100 pg ATP/cm²) mais des impacts nets ont été observés pour le caoutchouc siliconé et le matériau souple (PVC-P).

Après environ 70 jours, la concentration de biofilm sur le caoutchouc siliconé a atteint une valeur minimale, indiquant que ce matériau avait besoin de cette période avant que le relargage des composés biodégradables soit stabilisé. Après cette période, la valeur BFR du caoutchouc siliconé était environ de deux fois celle du verre. Ces observations montrent que l'appareil biofilm pourrait servir de méthode alternative pour déterminer la valeur BPP (seulement le biofilm) des matériaux. Un désavantage de cette approche est le relatif grand impact de la qualité de l'eau sur la formation de biofilm. En outre, la maîtrise de la température n'est pas possible et des températures différentes donneront des valeurs BP différentes.

Avec l'installation-test du DTU, seules des données préliminaires ont été obtenues. Dans ce système, avec un écoulement d'eau de 0,08 m/s et un temps de stagnation d'un jour, la concentration de biomasse sur le matériau souple (PVC-P) est resté relativement basse, suggérant que l'absence de nutriments et/ou d'oxygène ont limité la croissance. Les différences entre les valeurs BP des matériaux dans les différentes parties de l'installation démontrent que les conditions (hydrauliques) en pratique peuvent avoir un grand impact sur la production de biomasse. La période de test courte (40 jours) associée à une température basse de l'eau ne permet pas de tirer des conclusions à partir des observations rapportées.

■ COMPARAISON DES PROPRIÉTÉS DE CROISSANCE MICROBIENNE DES MATÉRIAUX (selon la méthode développée par le Kiwa)

Un test européen harmonisé, dérivé du test BPP développé par le Kiwa, ou test BPP révisé, a été récemment mis au point pour évaluer les propriétés de promotion de la croissance microbienne des matériaux au contact de l'eau potable (cf 3.4 et annexe 3). Le faible nombre de données obtenues à ce jour par ce nouveau test ne permet pas de comparer les matériaux entre eux.

Nous présentons ici les résultats des travaux menés par le Kiwa dont les essais se rapprochent le plus de la méthode européenne harmonisée. La méthode, développée par le Kiwa, est présentée en détail dans l'annexe 1.

Les matériaux testés sont présentés dans le tableau 4.1. Leur diamètre externe est d'environ 15 mm. Les pièces (anneaux) des matériaux sont découpées avec une surface totale d'environ 8 cm². Ces pièces sont rincées durant une heure sous un flux d'eau froide du robinet. Les matériaux témoins, verre et acier inoxydable (et pièces d'acier inoxydable pour maintenir les matériaux) sont nettoyés par chauffage durant 4 heures à 550 °C.

Tableau 4.1 : Matériaux choisis pour le test BFP.

Matériau	Description
PE - Xa	Polyéthylène
PE - Xc (2 x)	Polyéthylène
Al/PE-MD	Polyéthylène, renforcé par une feuille interne d'aluminium
PP-R (2 x)	Polypropylène
PB (2 x)	Polybutylène
C-PVC (2 x)	Polychlorure de vinyle surchloré
Cu irradié	Cuivre
Cu désoxydé	Cuivre
Acier inoxydable AISI 316	Acier inoxydable

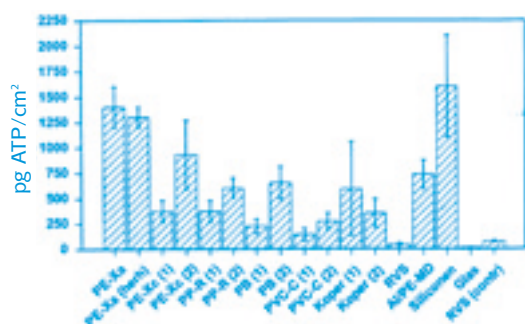
Résultats des essais statiques

Pouvoir de formation du biofilm (BFP)

Les valeurs de BFP des matériaux sont présentés sur la figure 4.1. Elles correspondent à la moyenne des concentrations en biofilm aux jours 56, 84 et 112.

Pour l'acier inoxydable et le verre, la valeur du BFP est plus faible que 100 pg ATP/ cm². Pour certains matériaux, notamment le polyéthylène PE-Xc, le polypropylène PP-R, le polybutylène PB, et les deux C-PVC testés, les valeurs du BFP sont plus faibles que 500 pg ATP/scm². Seul le polyéthylène PE-Xa a un pouvoir de formation du biofilm plus grand que 1000 pg ATP/cm².

Figure 4.1. Pouvoir de formation du biofilm (BFP) des matériaux en pg ATP/cm².



Pour plusieurs matériaux, la concentration de biofilm est au début relativement élevée. Une stabilisation apparaît après 56 jours d'exposition à l'eau testée. Toutefois, pour les deux échantillons de cuivre et le polypropylène PP-R, la densité du biofilm continue à diminuer après 56 jours. La valeur relativement élevée du BFP des deux types de cuivre peut être rattachée soit à la présence de résidus d'huile minérale à la surface de la canalisation, soit à l'apparition d'une corrosion. La valeur du BFP de l'acier inoxydable est plus élevée que celle du verre. Pour ces matériaux, une corrosion a été observée, conséquence probable du chauffage préalable à 550 °C. Les valeurs de BFP de l'acier inoxydable n'ont pas d'impact sur les valeurs de BFP des matériaux qui sont maintenus avec les pièces d'acier inoxydable.

Les résultats des mesures aux jours 233, 208 et 190 (tableau 4.2) montrent que les concentrations de biofilm sur le cuivre et l'acier inoxydable diminuent jusqu'à des valeurs inférieures à 100 pg ATP/cm². Ceci est aussi le cas pour les C-PVC.

La reproductibilité des trois tests séparés semble bonne. Il existe une bonne corrélation entre les valeurs de BFP des témoins, mais aussi celles du PE - Xa inclus dans deux tests. Ainsi, les valeurs de BFP des matériaux qui sont évalués dans trois tests séparés peuvent être comparées entre elles.

Tableau 4.2. Pouvoir de formation du biofilm (BFP) (moyenne des concentrations de biofilm aux jours 56, 84 et 112) et résultats des mesures aux jours 233, 208 et 190.

Matériau Test 1	BFP ± ds (pg ATP/ cm ²)	Concentration de biofilm ± ds (pg ATP/ cm ²) après 233 jours
PE-Xa	1400 ± 200	350 ± 60
PE - Xc (1)	400 ± 60	390 ± 100
PP - R (1)	370 ± 110	200 ± 50
PP - R (2)	600 ± 100	230 ± 30
PB (1)	220 ± 70	180 ± 40
C-PVC (1)	140 ± 60	45 ± 4
C-PVC (2)	270 ± 80	82 ± 18
Silicone (témoin)	1600 ± 500	210 ± 50
Verre (témoin)	12 ± 2	9,6 ± 3,7
Acier inoxydable (témoin)	70 ± 10	45 ± 8

Matériau Test 2	BFP ± ds (pg ATP/ cm ²)	Concentration de biofilm ± ds (pg ATP/ cm ²) après 208 jours
PE - Xc (2)	930 ± 340	640 ± 60
PE - Xa (répété)	1300 ± 100	300 ± 80
PB (2)	650 ± 160	190 ± 10
Cuivre (1)	590 ± 460	120 ± 10
Cuivre (2)	350 ± 140	76 ± 19
Silicone (témoin)	990 ± 290	280 ± 20
Verre (témoin)	13 ± 2	236 ± 1
Acier inoxydable (témoin)	93 ± 15	51 ± 2

Matériau Test 3	BFP ± ds (pg ATP/ cm ²)	Concentration de biofilm ± ds (pg ATP/ cm ²) après 190 jours
Al / PE- MD	730 ± 140	920 ± 90
Silicone (témoin)	1500 ± 60	1200 ± 500
Verre (témoin)	17 ± 6	200 ± 50

Nombres de bactéries sur les matériaux

Les dénombrements de colonies de divers types de bactéries sur les matériaux (moyenne des numérations mesurées aux jours 56, 84 et 122) sont présentés dans le tableau 4.3.

Tableau 4.3. Dénombrements des colonies de divers types de micro-organismes sur les matériaux (moyenne des valeurs mesurées aux jours 56, 84 et 112). N.A. : non analysé ou non observé

Matériau Test 1	<i>Legionella</i> (UFC/cm ²) ± ds	<i>Pseudomonas</i> (UFC/cm ²) ± ds	Coliformes (UFC/cm ²) ± ds
PE-Xa	120 ± 90	55 ± 41	160 ± 270
PE - Xc (1)	560 ± 450	48 ± 38	41 ± 71
PP - R (1)	300 ± 190	160 ± 90	280 ± 480
PP - R (2)	6200 ± 8700	300 ± 320	600 ± 1000
PB (1)	4800 ± 1600	230 ± 150	550 ± 950
C-PVC (1)	250 ± 30	150 ± 140	300 ± 520
C-PVC (2)	3400 ± 2200	160 ± 90	250 ± 30
Silicone (témoin)	40 ± 27	130 ± 110	120 ± 210
Verre (témoin)	9,2 ± 11,5	7,4 ± 12,8	3,7 ± 6,4
Acier inoxydable (témoin)	190 ± 80	120 ± 110	N.A.

Matériau Test 2	<i>Legionella</i> (UFC/cm ²) ± ds	<i>Pseudomonas</i> (UFC/cm ²) ± ds	Coliformes (UFC/cm ²) ± ds
PE - Xc (2)	1100 ± 800	310 ± 110	N.A.
PE - Xa (répété)	16000 ± 16000	180 ± 200	N.A.
PB (2)	2000 ± 1100	440 ± 190	N.A.
Cuivre (1)	770 ± 1210	N.A.	N.A.
Cuivre (2)	61 ± 25	N.A.	N.A.
Acier inoxydable	38 ± 24	200 ± 90	
Silicone (témoin)	35 ± 18	220 ± 90	N.A.
Verre (témoin)	92 ± 95	13 ± 22	N.A.
Acier inoxydable (témoin)	350 ± 150	12 ± 11	N.A.

Biofilm et matériaux des canalisations des réseaux de distribution d'eau

Présentation des études scientifiques

Matériau Test 3	Legionella (UFC/cm ²) ± ds	Pseudomonas (UFC/cm ²) ± ds	Coliformes (UFC/cm ²) ± ds
Al / PE- MD	12000 ± 14000	N.A.	N.A.
Silicone (témoin)	130 ± 80	N.A.	N.A.
Verre (témoin)	58 ± 20	N.A.	N.A.

Les dénombrements bactériens sur les divers matériaux révèlent une image moins claire que les valeurs de BFP.

Les valeurs maximales des dénombrements de Legionella sont plus élevées que 104 UFC/cm² pour le polypropylène PP-R, le polyéthylène PE-Xa et le polyéthylène renforcé par une feuille interne d'aluminium. Sur le polyéthylène PE-Xc, le polybutylène PB, le C-PVC (2) et le cuivre (1), le nombre maximal de colonies de Legionella est supérieur à 103 UFC/cm². Sur le cuivre (2) et l'acier inoxydable, le nombre maximal de colonies reste inférieur à 100 UFC/cm². Pour certains matériaux, le polyéthylène PE-Xc, et le cuivre (1), le nombre de colonies décroît après 112 jours à une valeur inférieure à 1000 UFC/cm². Sur le polyéthylène PE-Xa (premier test) et le polypropylène PP-R (2), le nombre de colonies de Legionella augmente avec la durée d'incubation dans l'eau testée.

Les dénombrements de Pseudomonas montrent une image totalement différente. Aucun Pseudomonas n'a été observé sur les deux échantillons de cuivre. Des bactéries coliformes ont été seulement observées sur le premier test (au jour 56). Dans les deux autres séries de tests, des bactéries coliformes ont été inoculées, mais ces bactéries n'ont pas été observées sur les matériaux. La raison en est inconnue.

La croissance de mycobactéries n'a pas été observée. Une seule mycobactérie a été trouvée, une seule fois, sur un matériau.

Impact des matériaux sur la concentration de biomasse (BMC) dans l'eau

Les valeurs de BMC dans l'eau testée sont présentées dans le tableau 4.4 et montrent la même distribution que les valeurs de BFP sur les matériaux (figure 4.2). Des valeurs élevées de BMC sont plus observées avec les matériaux plastiques qu'avec le verre ou l'acier inoxydable.

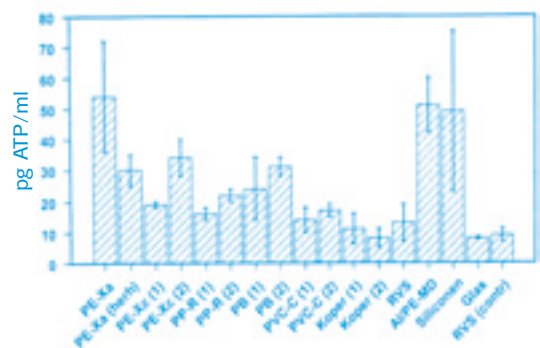
Tableau 4.4. Concentration de biomasse (BMC) dans l'eau du test (moyenne des concentrations mesurées aux jours 56, 84 et 112).

Matériau Test 1	Concentration de biomasse ± ds (pg ATP/ml)
PE - Xa	54 ± 18
PE - Xc (1)	19 ± 1
PP - R (1)	16 ± 2
PP - R (2)	22 ± 2
PB (1)	24 ± 10
C-PVC (1)	14 ± 4
C-PVC (2)	17 ± 2
Eau testée (témoin)	5,9 ± 2,0
Silicone (témoin)	4 ± 26
Verre (témoin)	8,0 ± 0,4
Acier inoxydable (témoin)	9,0 ± 2,2

Matériau Test 2	Concentration de biomasse ± ds (pg ATP/ml)
PE - Xc (2)	34 ± 6
PE - Xa (répété)	30 ± 5
PB (2)	31 ± 3
Cuivre (1)	11 ± 5
Cuivre (2)	8,0 ± 3,1
Acier inoxydable	13 ± 6
Eau testée (témoin)	6,6 ± 2,6
Silicone (témoin)	39 ± 8
Verre (témoin)	8,0 ± 1,8
Acier inoxydable (témoin)	12 ± 1

Matériau Test 3	Concentration de biomasse ± ds (pg ATP/ml)
Al / PE - MD	51 ± 9
Eau testée (témoin)	6,5 ± 1,3
Silicone (témoin)	170 ± 80
Verre (témoin)	6,8 v 1,9

Figure 4.2. Concentration de biomasse (BMC, en pg ATP/ml) dans l'eau du test.



Nombre de bactéries dans l'eau

Tableau 4.5. Dénombrements des colonies de divers types de micro-organismes dans l'eau testée (moyenne des valeurs mesurées aux jours 56, 84 et 112). N.A. : non analysé ou non observé.

Matériau Test 1	Legionella (UFC/ml) ± ds	Pseudomonas (UFC/ml) ± ds	Coliformes (UFC/ml) ± ds
PE - Xa	89 ± 67	22 ± 21	80 ± 93
PE - Xc (1)	168 ± 104	63 ± 75	170 ± 190
PP - R (1)	330 ± 320	3,0 ± 3,3	5,0 ± 5,8
PP - R (2)	17 ± 10	46 ± 55	70 ± 80
PB (1)	170 ± 80	99 ± 10	67 ± 77
C-PVC (1)	14 ± 16	8,0 ± 8,4	3,0 ± 3,8
C-PVC (2)	8,0 ± 1,9	29 ± 30	55 ± 64
Eau testée (témoin)	110 ± 40	2,0 ± 1,9	2,0 ± 1,9
Silicone (témoin)	110 ± 60	24 ± 34	42 ± 48
Verre (témoin)	20 ± 15	N.A.	2,0 ± 1,9
Acier inoxydable (témoin)	110 ± 100	N.A.	5,0 ± 5,8

Matériau Test 2	<i>Legionella</i> (UFC/ml) ± ds	<i>Pseudomonas</i> (UFC/ml) ± ds	Coliformes (UFC/ml) ± ds
PE - Xc (2)	680 ± 810	78 ± 62	NA.
PE - Xa (répété)	1200 ± 600	72 ± 64	NA.
PB (2)	200 ± 110	32 ± 34	NA.
Cuivre (1)	220 ± 40	NA.	NA.
Cuivre (2)	160 ± 60	NA.	NA.
Acier inoxydable	54 ± 41	22 ± 20	NA.
Eau testée (témoin)	71 ± 55	12 ± 14	NA.
Silicone (témoin)	300 ± 340	10 ± 9	NA.
Verre (témoin)	33 ± 44	3,0 ± 3,8	NA.
Acier inoxydable (témoin)	130 ± 140	110 ± 110	NA.

Matériau Test 3	<i>Legionella</i> (UFC/ml) ± ds	<i>Pseudomonas</i> (UFC/ml) ± ds	Coliformes (UFC/ml) ± ds
Al / PE - MD	1500 ± 900	NA.	NA.
Eau testée (témoin)	13 ± 5	NA.	NA.
Silicone (témoin)	1200 ± 1000	NA.	NA.
Verre (témoin)	7 ± 7	NA.	NA.

En présence de la plupart des matériaux, il apparaît au début une croissance (forte) de *Legionella*, mais le nombre de colonies décroît au cours du temps. Pour quelques matériaux, principalement le polyéthylène PE-Xa, le polyéthylène PE-Xc et le polyéthylène renforcé par une feuille d'aluminium interne, des valeurs supérieures à 1000 UFC/ml sont observées. En présence des deux échantillons de C-PVC, la croissance des *Legionella* dans l'eau est faible. Après 112 jours, le nombre de colonies dans l'eau en présence de la plupart des matériaux diminue jusqu'à des valeurs autour de 100 UFC/ml, sauf en présence du polyéthylène PE-Xa et du polyéthylène renforcé à l'intérieur par une feuille d'aluminium pour lesquels le nombre de colonies est autour de 1000 UFC/ml.

Aucune croissance n'a été observée pour l'acier inoxydable servant à maintenir les matériaux ; il ne peut donc avoir un impact sur le nombre de colonies dans l'eau avec les matériaux maintenus par des anneaux d'acier inoxydable.

En présence des deux échantillons de cuivre, aucun *Pseudomonas* n'a été trouvé dans l'eau. L'explication doit être probablement la sensibilité des *Pseudomonas* aux ions cuivre. *Legionella* est moins sensible à cet égard (Habitch et Müller, 1988).

Des bactéries coliformes ont été retrouvées dans l'eau en présence des matériaux testés, uniquement dans la première série de tests, les numérations sont généralement plus élevées que pour le témoin négatif (verre et eau testée sans le matériau). La croissance de mycobactéries n'a pas été observée. Une seule mycobactérie a été trouvée, une seule fois, dans l'eau testée.

Distribution de la biomasse dans l'eau et sur les matériaux

Tableau 4.6. Pouvoir de formation du biofilm (BFP), concentration en biomasse (BMC) et pouvoir de production de biomasse (BPP) des matériaux dans le test BFP.

Matériau	BFP (pg ATP/cm ²)	BMC (ng ATP/l)	BPP (pg ATP/cm ²)	BPP dans l'eau (pg ATP/cm ²)	% matériau	% eau
Eau (blanc)(1)	0	5,9	35,4	0		
Verre (1)	12	8	60	24,6	48,8	51,2
Acier inox. Témoin (1)	70	9	124	88,6	79,0	21,0
Silicone (1)	1600	49	1894	1858,6	86,1	13,9
PE - Xa	1400	54	1724	1688,6	82,9	17,1
PE - Xc (1)	400	19	514	478,6	83,6	16,4
PP - R (1)	370	16	466	430,6	85,9	14,1
PP - R (2)	600	22	732	696,6	86,1	13,9
PB (1)	220	24	364	328,6	67,0	33,0
C-PVC (1)	140	14	224	188,6	74,2	25,8
C-PVC (2)	270	17	372	336,6	80,2	19,8
Eau (blanc) (2)	0	6,6	39,6	0		
Verre (2)	13	8	61	21,4	60,7	39,3
Acier inox. témoin (2)	93	12	165	125,4	74,2	25,8
Silicone (2)	990	39	1224	1184,4	83,6	16,4
PE - Xc (2)	930	34	1134	1094,4	85,0	15,0
PE-Xa (répété)	1300	30	1480	1440,4	90,3	9,7
PB (2)	650	31	836	796,4	81,6	18,4
Cuivre (1)	590	11	656	616,4	95,7	4,3
Cuivre (2)	350	8	398	358,4	97,7	2,3
Acier inox.	41	13	119	79,4	51,6	48,4
Eau (blanc) (3)	0	6,5	39	0		
Verre (3)	17	7	59	20	85,0	15,0
Silicone (3)	1500	170	2520	2481	60,5	39,5
Al/PE-MD (1)	730	51	1036	997	73,2	26,8

Le BPP dans l'eau est le pouvoir de production de biomasse (BPP) corrigé par la production de biomasse dans l'eau (blanc) ; le % matériau est la contribution en pourcentage de la biomasse sur le matériau au BPP net ; le % eau, la contribution en pourcentage de la biomasse dans l'eau au BPP net.

L'impact d'un matériau sur la croissance bactérienne peut être déduit, dans le test BFP, de la concentration de biomasse sur le matériau (BFP) et la concentration de biomasse dans l'eau (BMC).

Le pouvoir de production de biomasse (BPP) peut être calculé à partir de ces paramètres. Ainsi, BPP (pg ATP/cm²) = BFP (pg ATP/cm²) + [BMC (pg ATP/ml) x volume d'eau/surface du matériau].

Le volume d'eau étant de 600 ml, la surface extérieure des matériaux étant de 100 cm², la valeur de BPP est

ainsi une mesure de la quantité de biomasse active (exprimée en ATP) qui est présente par unité de surface durant la période définie (56 - 112 jours). Les calculs du pouvoir de production de biomasse (BPP) sont présentés dans le tableau 4.6. Ce tableau donne également le pourcentage de distribution de la biomasse dans l'eau (% eau) et sur le matériau (% matériau). Dans les conditions des essais, en général plus de 70 à 80 % de la biomasse est retrouvée sur le matériau (BFP). Pour le verre et l'acier inoxydable, le pourcentage est inférieur à 30 à 40 %.

Un calcul similaire est réalisé avec le nombre de *Legionella* sur le matériau et dans l'eau. De cette manière, la croissance totale des *Legionella* (pouvoir de croissance des *Legionella*) est calculée par unité de surface du matériau concerné (tableau 4.7.). La majeure partie des *Legionella* est présente sur le matériau (dans le biofilm) pour seulement 6 matériaux. Pour certains matériaux, y compris le silicone, (témoin positif), la part de la croissance des *Legionella* sur les matériaux est inférieure à 6 % de la croissance totale des *Legionella*.

Tableau 4.7. Pouvoir de croissance des *Legionella* (LegGP) sur les matériaux dans le test BFP.

Matériau	Leg sur mat. UFC/cm ²	Leg dans eau UFC.ml	LegGP UFC/cm ²	% matériau	% eau
PE - Xa	120	89	654	18,3	81,7
PE - Xc (1)	560	168	1568	35,7	64,3
PP - R (1)	300	330	2280	13,2	86,8
PP - R (2)	6200	17	6302	98,4	1,6
PB (1)	4800	170	5820	82,5	17,5
C-PVC (1)	250	14	334	74,9	25,1
PVC -C (2)	3400	8	3448	98,6	1,4
Silicone (1)	40	110	700	5,7	94,3
Verre (1)	9	20	129	7,0	93,0
Acier inox. témoin (1)	190	110	850	22,4	77,6
PE - Xc (2)	1100	680	5180	21,2	78,8
PE - Xa (rép)	16000	1200	23200	69,0	31,0
PB (2)	2000	200	3200	62,5	37,5
Cuivre (1)	770	220	2090	36,8	63,2
Cuivre (2)	61	160	1021	6,0	94,0
Acier inox.	38	54	362	10,5	89,5
Silicone (2)	35	300	1835	1,9	98,1
Verre (2)	92	33	290	31,7	68,3
Acier inox. témoin (2)	350	130	1130	31,0	69,0
AL / PE - MD (1)	12000	1500	21000	57,1	42,9
Silicone (3)	130	1200	7330	1,8	98,2
Verre (3)	58	7	100	58	42

Conclusions des essais statiques

Les résultats des essais du pouvoir de formation du biofilm avec les matériaux choisis peuvent être résumés comme suit :

- Grâce au test BFP, des différences notables sont démontrées sur l'effet de promotion de la croissance des matériaux au contact de l'eau de boisson. Le test

BFP donne des résultats avec une bonne reproductibilité.

- Tous les matériaux testés entraînent la formation d'un biofilm plus important que le verre.

- Parmi les matériaux testés, les canalisations en acier inoxydable donnent le pouvoir de formation du biofilm le plus faible. Ce matériau ne favorise pas la croissance de *Legionella*, *Pseudomonas aeruginosa*, et des bactéries coliformes.

- Une formation relativement forte de biofilm est observée avec les deux échantillons de cuivre. La présence d'huile minérale peut en être la cause mais l'effet de la corrosion ne peut être exclu. Après une exposition à long terme (208 jours), la concentration de biomasse diminue jusqu'à une faible valeur (<100 pg ATP/cm²).

- Parmi les matériaux plastiques, les deux C-PVC et le polybutylène PB, donnent les plus faibles valeurs de BFP (pouvoir de production de biofilm). Seulement pour les deux échantillons de C-PVC, la concentration de biofilm chute après environ 200 jours à un niveau inférieur à 100 pg ATP/cm².

- Les matériaux à base de polyéthylène donnent la formation de biofilm la plus forte et la plus forte promotion de la croissance de *Legionella*.

- La majorité de la biomasse est localisée sur les matériaux, les *Legionella* sont souvent localisées pour leur plus grande part dans l'eau.

- La croissance des *Legionella* donne des corrélations positives significatives avec la concentration de biomasse dans l'eau, sur le matériau et avec la production totale de biomasse (BPP).

- Après une croissance initiale (dépendant du type de matériau) le nombre de *Pseudomonas* et de *Legionella* dans l'eau montre une chute nette après une période de 56 jours ; cette chute est moins prononcée sur les matériaux.

- Aucun *Pseudomonas aeruginosa* n'a été observé sur le cuivre et dans l'eau en présence de cuivre.

- La croissance des mycobactéries n'a pas été observée dans les conditions du test.

- Les bactéries coliformes ne sont seulement observées que dans la première mesure de la première série de tests.

Résultats des mesures dans le système dynamique

Le degré de formation de biofilm sur les matériaux est testé dans des conditions hydrauliques correspondant à la situation d'installations domestiques. Un système dynamique est utilisé (annexe 1) pour tester six matériaux choisis d'après les résultats obtenus dans les tests du pouvoir de formation du biofilm (BFP). Les matériaux sont choisis sur la base de leur composition, et par matériau type, les échantillons sont testés avec la

plus forte valeur BFP et la plus grande numération de *Legionella*. Les matériaux choisis sont donnés dans le tableau 4.8.

Tableau 4.8. Matériaux de canalisations choisis pour les tests avec le système dynamique.

Matériau	Description	Diamètre (mm) extérieur	Diamètre (mm) intérieur
RVS AISI 316	Acier inoxydable	18	16
Cuivre (1)	Cuivre	15	13
C-PVC (2)	Polychlorure de vinyle surchloré	16	12
PE - Xa	Polyéthylène	16	11,5
PP-R (1)	Polypropylène	16	10,5
Al / PE-MD	Polyéthylène renforcé par une feuille interne d'aluminium	16	12

Biofilm sur la paroi interne des canalisations

Les valeurs moyennes de la concentration de biofilm mesurées sur la paroi interne des canalisations sont présentées dans le tableau 4.9. Les résultats des numérations des colonies bactériennes sont présentés dans le tableau 4.10. La concentration de biofilm sur les matériaux est présentée sur la figure 4.3.

Tableau 4.9. Concentration de biofilm sur les canalisations (moyenne des valeurs mesurées après 4, 8, 12 et 20 semaines) et taux moyen de formation de biofilm.

Matériau	Concentration moyenne de biofilm (pg ATP/cm ²) ± ds	Tendance	Taux de formation du biofilm (pg ATP/cm ² .dag) ± ds
Acier inoxydable	100 ± 40	≠	1,47 ± 0,32
Cuivre (1)	240 ± 60	-	0,80 ± 1,05
C-PVC (2)	80 ± 90	≠	0,93 ± 0,35
PE - Xa	200 ± 30	-	1,61 ± 0,37
PP - R (1)	100 ± 80	≠	1,15 ± 0,31
Al / PE - MD	160 ± 30	-	0,86 ± 0,53

La concentration de biofilm la plus élevée a été observée sur le cuivre, la concentration de biofilm la plus faible sur le C-PVC. La quantité de biofilm formé sur le PE-Xa et l'Al/PE-MD est aussi nettement plus élevée que celle formée sur le C-PVC. L'acier inoxydable, le C-PVC et le PP-R ont montré une tendance à l'augmentation de la concentration de biofilm durant la période d'essai de 140 jours.

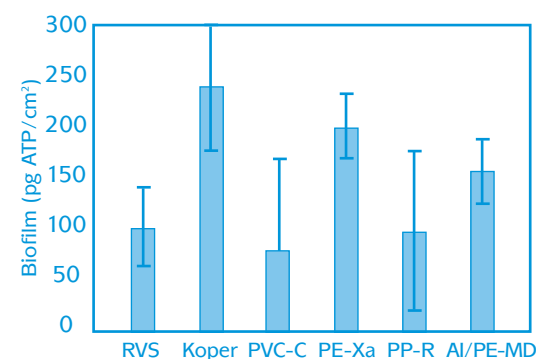
Les valeurs moyennes de taux de formation de biofilm, sur la période d'essai, étaient toutes aussi basses que 2 pg ATP/cm² jour. Ces valeurs relativement faibles sont probablement la conséquence de l'alternance de périodes d'arrêts et d'écoulements d'eau.

Tableau 4.10. Nombre de colonies du biofilm sur les canalisations sur gélose glucosée à l'extrait de levure à 22° et 37 °C (moyenne des valeurs mesurées après 4, 8, 12, 16 et 20 semaines).

Matériau	Nombre de colonies à 22 °C (UFC/cm ²) ± ds	Tendance	Nombre de colonies à 37 °C (UFC/cm ²) ± ds	Tendance
Acier inoxydable	170 ± 150	↓	24 ± 33	↓
Cuivre (1)	110 ± 150	↓	10 ± 17	↓
C-PVC (2)	430 ± 650	↓	120 ± 180	↓
PE-Xa	320 ± 580	↓	47 ± 49	↓
PP - R (1)	150 ± 180	↓	9 ± 8	↓
Al / PE - MD	2500 ± 3400	↓	2500 ± 3300	↓

Des numérations significativement élevées sont retrouvées sur l'Al/PE-MD à l'inverse des autres matériaux testés. Toutes les numérations bactériennes montrent une tendance à la diminution sur la période d'essai de 140 jours. Aucune bactérie coliforme, *Legionella*, *Pseudomonas aeruginosa* et mycobactérie n'ont été trouvées sur les parois des canalisations.

Figure 4.3. Concentrations moyennes de biofilm (en pg ATP/cm²) sur les matériaux dans le système dynamique.



Concentrations de fer et de cuivre sur la paroi interne des canalisations

Du fer et du manganèse peuvent s'accumuler dans le biofilm. Le détachement du biofilm peut être à l'origine de plaintes au sujet de la couleur et du trouble de l'eau. Les concentrations observées de fer sur la paroi interne des canalisations sont données dans le tableau 4.11.

Tableau 4.11. Concentrations de fer et de cuivre sur la paroi interne des canalisations (moyenne des valeurs mesurées après 4, 8, 12, 16 et 20 semaines).

Matériau	Fer (mg/cm ²) ± ds	Tendance	Cuivre (mg/cm ²) ± ds	Tendance
Acier inoxydable	0,40 ± 0,26	-	< 0,1	-
Cuivre (1)	1,95 ± 1,10	-	54 ± 24	-
C-PVC (2)	0,50 ± 0,52	-	< 0,1	-
PE-Xa	0,54 ± 0,44	-	< 0,1	-
PP - R (1)	0,36 ± 0,36	-	< 0,1	-
Al / PE-MD	0,57 ± 0,28	-	< 0,1	-

Biofilm et matériaux des canalisations des réseaux de distribution d'eau

Présentation des études scientifiques

La concentration de fer sur les matériaux est faible et aucune différence n'a pu être démontrée entre les matériaux testés pour ce paramètre. Du cuivre a été seulement retrouvé dans le biofilm des canalisations en cuivre.

Analyses de la qualité de l'eau dans les canalisations

Après 4, 8, 12, 16 et 20 semaines de fonctionnement du système dynamique, des analyses de la qualité de l'eau dans les canalisations ont été effectuées au même moment où les segments de canalisation étaient retirés. Les échantillons ont toujours été prélevés immédiatement après une période d'arrêt d'eau (8 heures) et immédiatement après une période d'écoulement d'eau. Les résultats des analyses (moyenne des résultats aux semaines 4, 8, 12, 16 et 20, valeur médiane et valeur maximale pour les numérations des colonies bactériennes après incubation à 22 et 37 °C), sont présentés dans tableau 4.12.

Aucune bactérie coliforme, *Legionella*, *Pseudomonas aeruginosa* ou mycobactérie n'ont été trouvées dans l'eau après arrêt d'eau (8 heures) et après que les canalisations aient été rincées, malgré leur recherche après 4 et 12 semaines.

Tableau 4.12. Résultats des analyses de la qualité de l'eau dans le système dynamique après arrêt (8 heures) de l'eau dans les canalisations et après écoulement de l'eau (moyenne des résultats après 4, 8, 12, 16 et 20 semaines de circulation d'eau). Les valeurs médiane et maximale (max) sont présentées pour les numérations bactériennes (UFC/ml).

Paramètres	Acier inoxydable	Cuivre (1)	C-PVC (2)
ATP (ng/l) après stagnation après écoulement	4,0 ± 1,8 9,0 ± 5,9	12 ± 10 4,8 ± 1,7	4,0 ± 1,0 4,4 ± 0,6
Numération à 22 °C après stagnation après écoulement	10 (72) 48 (630)	7 (123) 12 (290)	30 (230) 32 (160)
Numération à 37 °C après stagnation après écoulement	1 (16) 4 (420)	< 1 (16) 3 (12)	1 (18) 2 (25)
Fer (mg/l) après stagnation après écoulement	< 0,1 0,2 ± 0,2	< 0,1 0,2 ± 0,2	0,1 ± 0,1 0,1 ± 0,0
Cuivre (mg/l) après stagnation après écoulement	< 0,1 < 0,1	2,1 ± 0,8 0,2 ± 0,1	< 0,1 < 0,1
NPOC (mg C/l) après stagnation après écoulement	1,6 ± 0,2 1,8 ± 0,2	1,6 ± 0,3 1,8 ± 0,2	1,7 ± 0,2 1,9 ± 0,2
pH après stagnation après écoulement	7,9 ± 0,1 7,8 ± 0,0	7,9 ± 0,1 7,9 ± 0,0	7,9 ± 0,1 7,9 ± 0,1

Tableau 4.12. (suite) Résultats des analyses de la qualité de l'eau dans le système dynamique après arrêt (8 heures) de l'eau dans les canalisations et après écoulement de l'eau (moyenne des résultats après 4, 8, 12, 16 et 20 semaines de circulation d'eau). Les valeurs médiane et maximale (max) sont présentées pour les numérations bactériennes (UFC/ml).

Paramètres	PE- Xa	PP - R (1)	Al / PE-MD
ATP (ng/l) après stagnation après écoulement	4,3 ± 1,1 4,9 ± 1,0	4,3 ± 1,1 5,1 ± 1,2	6,7 ± 1,6 5,5 ± 1,0
Numération à 22 °C après stagnation après écoulement	24 (480) 37 (200)	39 (170) 44 (170)	50 (5000) 55 (260)
Numération à 37 °C après stagnation après écoulement	1 (69) 3 (60)	2 (26) 2 (39)	17 (5900) 11 (48)
Fer (mg/l) après stagnation après écoulement	0,1 ± 0,0 0,1 ± 0,1	0,3 ± 0,5 0,1 ± 0,1	0,4 ± 0,6 1,3 ± 2,0
Cuivre (mg/l) après stagnation après écoulement	< 0,1 < 0,1	< 0,1 < 0,1	< 0,1 < 0,1
NPOC (mg C/l) après stagnation après écoulement	1,8 ± 0,2 1,7 ± 0,2	1,8 ± 0,2 1,9 ± 0,2	1,8 ± 0,3 1,8 ± 0,1
pH après stagnation après écoulement	7,9 ± 0,1 7,9 ± 0,1	7,9 ± 0,1 8,0 ± 0,1	7,9 ± 0,1 7,9 ± 0,1

Des résultats présentés dans le tableau 4.12, il apparaît que durant la période d'arrêt de l'eau (8 heures) aucune augmentation significative (ou diminution) n'a eu lieu pour les paramètres étudiés. Pour aucune des canalisations testées, sauf pour la canalisation en cuivre, du cuivre n'a été détecté dans l'eau (avant et après stagnation de l'eau). Les numérations bactériennes maximales étaient toujours rencontrées après 4 semaines de circulation de l'eau dans le système dynamique.

Résultats des mesures avec l'appareil "biofilm"

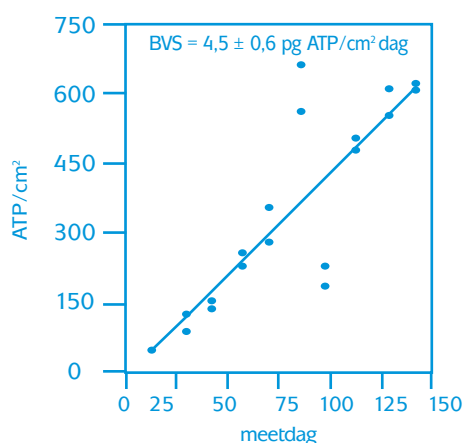
Les caractéristiques de la formation de biofilm de l'eau testée, mesurées grâce à l'appareil spécifique "biofilm", sont présentées dans le tableau 4.13. Le taux de formation de biofilm (BFR) sur les anneaux de verre est présenté sur la figure 4.4.

Tableau 4.13 . Taux de formation de biofilm (BFR), taux d'accumulation du fer (FeAR) et du manganèse (MnAR) observés dans l'appareil "biofilm" .

Paramètres	PE- Xa
Biofilm (pg ATP/cm ² .jour)	4,5 ± 0,6
Fer (mg/cm ² .jour)	0,07 ± 0,01
Manganèse (mg/cm ² .jour)	11 ± 3

Les concentrations de biofilm dans l'appareil après environ 75 jours sont plus élevées que celles observées dans le système dynamique, même avec des matériaux pour lesquels il a été démontré avec le test BFP (pouvoir de formation du biofilm) qu'ils promouvaient la formation de biofilm. La valeur de BFR observée pour l'eau est relativement faible en comparaison avec les observations d'un grand nombre de types d'eau de boisson. Le contenu en ATP de l'eau avec laquelle l'appareil a été alimenté était également faible ($3,9 \pm 0,7$ ng/l). Ce niveau est équivalent aux concentrations d'ATP observées dans l'eau du système dynamique (tableau 4.12).

Figure 4.4. Formation de biofilm dans l'appareil "biofilm".



Conclusions des essais dynamiques

Les résultats des essais avec le système dynamique peuvent être résumés comme suit :

- Dans le système dynamique, la formation de biofilm était plus faible sur le C-PVC (80 pg ATP/cm²) ; la concentration de biofilm la plus élevée a été observée sur le cuivre (240 pg ATP/cm²).

- La formation de biofilm sur les matériaux dans le système dynamique était plus faible que dans le test statique BFR (pouvoir de formation de biofilm), à l'exception de l'acier inoxydable.

- La formation de biofilm sur les matériaux dans le système dynamique était plus faible que sur le verre de l'appareil "biofilm". Le taux de formation de biofilm mesuré avec l'appareil "biofilm" était de $4,5 \pm 0,6$ pg ATP/cm² jour. Le taux moyen de formation de biofilm sur les matériaux dans le système dynamique allait de $0,8$ à $1,5$ pg ATP/cm² jour.

- En général, les numérations bactériennes (à 22 °C et 37 °C) sur les matériaux étaient faibles.

- Aucune bactérie coliforme, *Legionella*, *Pseudomonas* ou mycobactérie n'ont été observées avec aucun des matériaux.

- Les numérations bactériennes les plus élevées dans l'eau ont été observées après 28 jours, après stagnation de l'eau. En général, la stagnation entraîne une augmentation du nombre de colonies.

- L'accumulation de fer sur les matériaux était faible (< 1 mg/cm²) et équivalente pour les différents matériaux.

Comparaison du PVC et du polyéthylène

Le polychlorure de vinyle non plastifié PVC-U est le matériau de canalisation le plus fréquemment utilisé (plus de 40 %) pour les réseaux de transport et de distribution d'eau ($D > 63$ mm) aux Pays-Bas. Le polyéthylène (PE), qui est communément utilisé dans d'autres pays européens, constitue approximativement 1,5 % de ces canalisations et il est souvent utilisé dans les branchements dans les immeubles d'habitation.

Cinq matériaux de PVC et dix matériaux de polyéthylène (5 types de PE-40 et 5 types de PE-80) ont été étudiés en utilisant le test BPP.

Le développement de la biomasse sur le matériau (biofilm) a été étudié durant une période de plus d'un an. Les résultats montrent qu'une croissance relativement forte de micro-organismes apparaît après quelques semaines pour le PVC-U et le PE, suivie d'une diminution du contenu en ATP. Ce développement indique que des substances biodégradables sont présentes sur la surface du matériau entraînant une rapide croissance des bactéries. Lorsque ces substances ont (pour la plus grande part) été utilisées, l'activité diminue et un équilibre s'instaure entre l'apport de substances biodégradables et l'activité des micro-organismes sur les matériaux. Sur le verre (témoin négatif), la croissance des micro-organismes est très limitée.

Les valeurs BPP sont calculées sur la base des mesures des concentrations de biomasse sur les matériaux et dans l'eau après des périodes de 8, 12 et 16 semaines. La figure 4.5. montre les résultats pour les matériaux étudiés PVC-U et PE ainsi que pour un matériau de polypropylène (PP). Cette figure montre que :

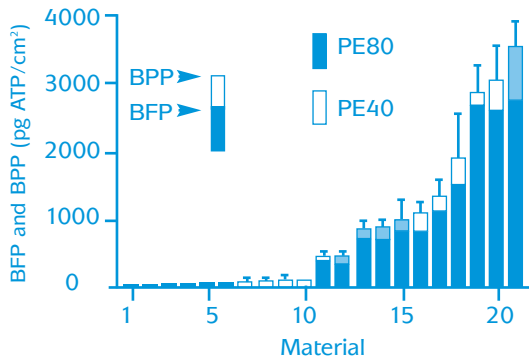
- les valeurs BPP du PVC-U sont faibles ($50 - 100$ pg ATP/cm²) mais plus élevées que pour le verre (environ 25 pg ATP/cm²) ;

- les valeurs BPP des matériaux en polyéthylène sont nettement (10 à 30 fois) plus élevées que celles du PVC-U ;

- les valeurs BPP des matériaux en polyéthylène sont très différentes les unes des autres et les valeurs BPP du PE-40 sont habituellement plus élevées que celles du PE-80 ;

- la majeure partie de la valeur BPP des matériaux en polyéthylène est présente en tant que biofilm sur le matériau.

Figure 4.5. Pouvoir de production de biomasse (BPP = BFP + SBP) des matériaux en PVC et en polyéthylène.



N° 1 et 2 : verre ; N° 3 et 4 : acier inoxydable ; N° 5 - 10 : PVC-U ; N° 11 : polypropylène ; N° 12 - 15 : PE-80 ; N° 16 - 20 : PE-40 ; N° 21 : PE-80

La partie inférieure des barres montre la biomasse présente sur le matériau (pouvoir de formation de biofilm, BFP). La partie supérieure montre la fraction présente dans l'eau (SBP). L'écart type des valeurs BPP est aussi présenté.

Comparaison des matériaux de canalisations habituellement utilisés

Un nombre croissant de matériaux synthétiques est disponible pour l'utilisation dans les réseaux intérieurs de distribution d'eau. Toutefois, on ne sait pas bien dans quelle mesure l'utilisation de ces matériaux peut entraîner un accroissement indésirable de bactéries, y compris *Legionella*, dans l'eau.

Dix matériaux utilisés dans les systèmes de distribution d'eau ont été choisis sur la base de leur part de marché et leur composition (type de polymère). Ils concernent les types de matériaux suivants :

- polyéthylène (PE-X)
- polypropylène (PP)
- polybutylène (PB)
- PVC-surchloré (C-PVC)

A titre de comparaison, des échantillons de cuivre et d'acier inoxydable ont été aussi étudiés. Des témoins, verre (témoin négatif) et silicone (témoin positif) ont été utilisés.

La promotion de la croissance des matériaux a été testée à l'aide de la méthode BPP (test statique) et dans un système dynamique dans lequel l'utilisation d'eau dans un réseau domestique a été imitée, c'est à dire des périodes brèves d'écoulement d'eau en alternance avec des périodes de stagnation. En outre, les caractéristiques de formation de biofilm de l'eau potable utilisée dans le système dynamique ont été déterminées à l'aide de l'appareil "biofilm" (cf annexe 1).

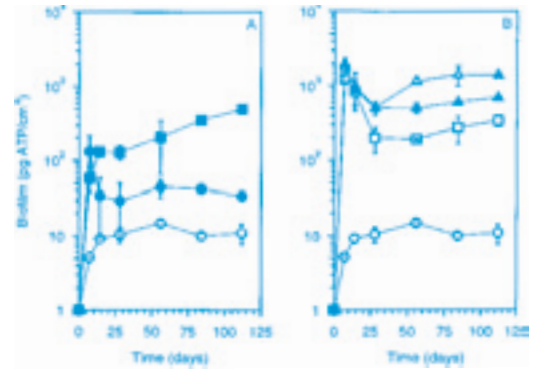
Cette étude avait les objectifs suivants :

- comparaison des caractéristiques de la promotion de la croissance des divers types de matériaux synthétiques et comparaison avec le cuivre et l'acier inoxydable dans des conditions d'essais statiques et dynamiques ;
- détermination de l'effet de ces matériaux sur la croissance des *Legionella* ;

- évaluation des matériaux en fonction de leur degré de promotion de croissance dans les deux tests.

La concentration de la biomasse sur les matériaux augmente rapidement et atteint sa valeur maximale en 1 à 2 semaines (figure 4.6.).

Figure 4.6. Formation de biofilm sur les matériaux durant l'incubation dans une eau biologiquement stable (filtration lente sur sable) à 25 °C.

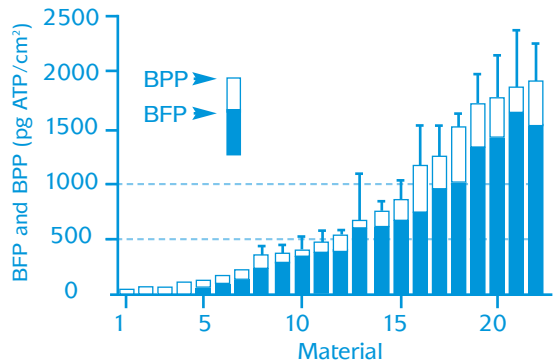


Symboles : ○ verre ; ● acier inoxydable ; ■ cuivre ; □ C-PVC ; △ PE-X ; ▲ PP

Les valeurs du pouvoir de production de biomasse (BPP) des divers matériaux vont d'environ 60 pg ATP/cm² pour le verre et 100 pg ATP/cm² pour l'acier inoxydable jusqu'à environ 1800 pg ATP/cm² pour les matériaux PE-Xa et PE-Xb (figure 4.7.).

Pour la plupart des matériaux, la grande majorité (> 80 %) de la biomasse est présente sur le matériau. Les valeurs BPP de plusieurs matériaux synthétiques (N° 7,8, 9, 11 et 12) sont plus faibles que celles du cuivre. En outre, les résultats montrent que des types de matériaux similaires peuvent avoir des valeurs BPP différentes, par exemple les numéros 7 et 9 (C-PVC), 8 et 15 (PB) et aussi les 12 et 16 (PE-Xc). Pour ces matériaux des possibilités d'amélioration peuvent exister.

Figure 4.7. Pouvoir de Production de Biomasse (BPP = BFP + SBP) des matériaux choisis et des matériaux de référence.



N° 1, 2 et 3 : verre ; N° 4, 5 et 6 : acier inoxydable ; N° 7 : C-PVC ; N° 8 : PB ; N° 9 : C-PVC ; N° 10 : cuivre ; N° 11 : PP-R ; N° 12 : PE-Xc ; N° 13 : cuivre ; N° 14 : PP-R ; N° 15 : PB ; N° 16 : PE-Xc ; N° 17 : Sil. ; N° 18 : PE-Xa ; N° 19 : PE-Xa ; N° 20 : Sil. ; N° 21 : Al/PE-Xb ; N° : Sil.

Les concentrations moyennes de biofilm dans le système dynamique sont relativement faibles (< 250 pg ATP/cm²) pour tous les matériaux testés. La concentration de biofilm sur les anneaux de verre dans l'appareil "biofilm" (alimenté par un flux d'eau à 0,2 m/s) est nettement plus élevée, 600 pg ATP/cm², à la même période.

■ DISCUSSION

Impact des conditions d'essai sur la formation de biofilm

Les résultats des études menées dans le cadre du Kiwa par Veenendaal et Van der Kooij (juin 1999) et présentés ci-dessus (4.1 à 4.3.) montrent clairement que le pouvoir de formation du biofilm des matériaux, mesuré par le test (statique) BFP, diffère significativement d'un matériau à l'autre. La valeur la plus faible des matériaux testés est de 41 pg ATP/cm² pour l'acier inoxydable ; la valeur la plus forte est de 1400 pg ATP/cm² pour le PE-Xa. Dans le système dynamique, avec moins de matériaux testés, la concentration de biofilm la plus faible est de 80 pg ATP/cm² pour le C-PVC et la concentration la plus forte est de 240 pg ATP/cm² pour le cuivre. Pour l'acier inoxydable et le PE-Xa, la concentration moyenne est respectivement de 100 et 200 pg ATP/cm². Cette concentration de biofilm est significativement plus basse que les valeurs de BFP (à l'exception de l'acier inoxydable).

Les différences d'effets de promotion de la croissance entre les divers matériaux apparaissent de manière beaucoup moins claire dans le système dynamique que dans le test BFP. Lorsque la comparaison est faite en utilisant le pouvoir de production de biomasse (BPP), qui comprend aussi la biomasse formée sous l'influence du matériau (dans le test BFP), la capacité de distinction des tests est même plus grande. Il faut noter que la concentration de biofilm sur les matériaux dans le système dynamique est plus faible que la concentration de biofilm sur le verre dans l'appareil "biofilm" après 100 jours. L'explication de ces différences demande une analyse plus fine des processus de formation du biofilm dans les deux tests et dans l'appareil "biofilm".

La quantité de biomasse formée sur la surface du matériau au contact avec l'eau dépend de plusieurs processus/ facteurs. Ils sont présentés dans le tableau 5.1. qui précise également si ces processus ont un rôle dans les tests précités.

Tableau 5.1. Processus et facteurs ayant un impact sur la formation de biomasse à la surface des matériaux dans diverses conditions de test.

Processus	Test BFP	Système dynamique	Appareil "biofilm"
Relargage de composés biodégradables par le matériau	+	+	-
Apport de composés biodégradables par l'eau	-	+	+
Mort microbienne (y compris la phagocytose par des protozoaires prédateurs)	+	+	+
Libération de la biomasse par le flux d'eau	-	+	+

Le taux de relargage de composés biodégradables par le matériau dépend probablement de la diffusion du matériau lui-même et en principe, ce taux est équivalent dans les deux tests, statique et dynamique, à condition que ces composés qui deviennent disponibles sur la surface du matériau soient directement utilisés ou libérés. Toutefois, il est aussi possible que la croissance apparaisse du fait de la détérioration du matériau.

Dans les conditions des tests utilisés, le relargage des composés biodégradables par les matériaux dans le système dynamique est probablement plus faible que dans le test BFP, parce que la température de l'eau dans le système dynamique est significativement plus basse (18,6 ± 0,7 °C) que dans le test BFP qui est effectué à 25 ± 1 °C.

L'apport de composés facilement biodégradables par l'eau est très faible dans le test BFP, qui est effectué dans un filtrat biologiquement stable obtenu par filtration lente sur sable (faible contenu en carbone organique assimilable et faible taux de formation de biofilm). Sous l'influence possible de la corrosion des métaux (alors que les substances organiques sont fixées par des formations complexes), certains composés organiques présents dans l'eau deviennent disponibles pour la croissance des micro-organismes sur le matériau. Dans le système dynamique, des composés facilement biodégradables sont apportés par l'eau. Toutefois, cet apport est très faible en comparaison de celui de l'appareil "biofilm". Une consommation de 130 l/jour et un écoulement de 260 l/heure aboutit à un flux continu de 0,5 heure par 24 heures, soit seulement 2 % du temps. En revanche, il y a un flux continu dans l'appareil "biofilm". Un apport de substances biodégradables par l'eau qui correspond à 2 % de l'apport dans l'appareil "biofilm" apporte après 100 jours une contribution à la densité de biomasse de 100 x 4,5 (BFS) x 0,02 = 9 pg ATP/cm². Cette contribution, inférieure à 10%, est négligeable vis-à-vis des concentrations de biofilm observées sur les matériaux dans le système dynamique.

Le degré de létalité de la biomasse (liée à la respiration endogène et à la phagocytose par des protozoaires prédateurs) dépend de la concentration de la biomasse et de la température. La létalité augmente lorsque la température s'élève.

Il n'y a pas de libération de biomasse dans le test BFP. Toutefois, dans ce test, l'impact du matériau est déterminé par la mesure de la concentration de biomasse dans l'eau. Dans le système dynamique et dans l'appareil "biofilm", une forte libération peut survenir. Dans l'appareil "biofilm", il y a un flux constant (0,2 m/s), grâce auquel un biofilm peut se développer et s'attacher relativement solidement. La libération de biomasse dans le système dynamique est probablement élevée parce que le biofilm est entièrement formé dans les périodes sans écoulement d'eau. Dans les canalisations du système dynamique, un flux d'eau entre 0,35 m/s (acier inoxydable) et 0,85 m/s (PP-R) prédomine durant les tirages. A cette vitesse, le flux d'eau dans les canalisations est turbulent. Ceci signifie que, durant le temps court où l'eau s'écoule dans les canalisations, il puisse survenir une érosion relativement importante du biofilm qui s'est développé au cours de la période de stagnation. Les différences de

Biofilm et matériaux des canalisations des réseaux de distribution d'eau

Présentation des études scientifiques

la vitesse du flux dans les diverses canalisations peuvent affecter le degré de formation du biofilm sur la surface des divers matériaux dans le système dynamique.

Sur la base des facteurs mentionnés ci-dessus, on peut expliquer pourquoi dans le système dynamique une formation plus faible de biofilm est observée que dans le test BFP, et aussi pourquoi le degré de formation de biofilm est plus faible que dans l'appareil "biofilm". Dans le système dynamique, toutefois, des différences peuvent être observées dans la concentration de biofilm sur les divers matériaux.

Les concentrations de biofilm les plus importantes sont observées sur les matériaux PE (polyéthylène) et sur le cuivre et les concentrations les plus faibles sur le C-PVC, l'acier inoxydable et le PP-R (polypropylène). Après 28 jours d'essai, une concentration relativement élevée de biofilm est déjà observée sur plusieurs matériaux. Ceci est le cas du cuivre et des deux matériaux en polyéthylène. Dans le même temps, il est clair que, après une période d'essai de 140 jours, aucun équilibre n'a été atteint pour la plupart des matériaux. Il n'est toutefois pas évident qu'un accroissement des concentrations de biofilm pourra être obtenu sur ces matériaux.

Une formation de biofilm, plus importante qu'attendue, est apparue sur l'acier inoxydable sur la base du taux de formation de biofilm observé dans l'appareil "biofilm" et du faible pourcentage de temps durant lequel le système dynamique était en flux continu. Les facteurs qui pourraient avoir un rôle ici sont :

- la présence d'une couche d'huile à l'intérieur de la canalisation (l'acier inoxydable utilisé dans le test BFP a été chauffé à 550 °C avant utilisation),
 - le degré de fixation de la biomasse au matériau de la canalisation (possibilité d'une meilleure fixation sur l'acier inoxydable que sur le verre).
- Toutefois, l'étude ne fournit pas de réponse sur le rôle possible de ces facteurs.

Une autre différence entre les résultats du test BFP et ceux du système dynamique est que dans le système dynamique aucune croissance de *Legionella* n'a été observée. Les possibilités de croissance pour les *Legionella* sont limitées dans le système dynamique du fait de la faible température de l'eau (< 20 °C) et de la libération de biomasse résultant des tirages réguliers de l'eau.

Choix de la méthode d'essai

Avec la détermination du degré de formation de biofilm sur divers matériaux dans des conditions d'essai différentes, un des objectifs de l'étude était de discuter la possibilité d'une évaluation des matériaux de canalisations sur la base de leurs caractéristiques de promotion de la croissance. Une telle évaluation demande d'apprécier les résultats des mesures obtenus avec les tests réalisés. Un point de la discussion est le degré de représentativité des conditions d'essai pour les situations pratiques.

Les conditions pratiques (c'est à dire les installations domestiques de distribution d'eau potable) sont très

proches, sous plusieurs aspects, des conditions du système dynamique que de celles du test BFP, c'est à dire que l'eau est renouvelée dans les canalisations plusieurs fois par jour (22 fois par jour dans le système dynamique). Les observations indiquent que les matériaux testés dans les conditions correspondant aux conditions du système dynamique n'ont pratiquement aucun impact sur la qualité microbiologique de l'eau. La multiplication de micro-organismes indésirables n'a pas été observée et les numérations bactériennes à 22 °C et 37 °C restent basses dans l'eau avant et directement après la circulation d'eau. Dans l'eau de canalisations en Al/PE-MD, la valeur médiane des numérations bactériennes à 37 °C a été légèrement au-dessus du niveau cible (10 UFC/ml) (tableau 4.12). Sur la base de résultats, on peut conclure que l'application en pratique des matériaux testés dans ces circonstances, qui correspondent aux conditions du système dynamique (circulation fréquente, température de l'eau < 20 °C), auront peu d'impact sur la qualité microbiologique de l'eau.

En pratique, toutefois, les facteurs qui peuvent avoir un impact sur la croissance des micro-organismes dans les installations de distribution d'eau potable peuvent largement varier. Ceci est particulièrement vrai pour la durée de séjour de l'eau (stagnation de longue durée), la température de l'eau (comprenant l'influence saisonnière et la température intérieure) et le temps de contact lors de la circulation de l'eau (longueur des canalisations). Même dans des circonstances pratiques défavorables (situations "au pire des cas"), la promotion de la croissance par les matériaux des canalisations ne devrait pas entraîner de problèmes de qualité microbiologique de l'eau. La qualité microbiologique de l'eau dans les installations intérieures de distribution n'est (pratiquement) pas examinée et la protection de la qualité microbiologique repose ainsi entièrement sur la prévention. A l'inverse, il est recommandé d'utiliser le comportement des matériaux dans le test BFP (dans lequel une durée de séjour extrêmement longue est associée à une température de l'eau relativement élevée) comme la base d'évaluation des matériaux pour leur application dans les installations de distribution d'eau potable. La question est de savoir quels critères d'évaluation doivent être utilisés.

Paramètres et critères d'évaluation

Paramètres et base de l'évaluation

L'évaluation des matériaux sur la base de la promotion de la croissance dans le test BFP dépend du choix des paramètres (BFP, BMC, BPP, croissance des *Legionella*, croissance d'autres types de bactéries) et les critères par lesquels les résultats des mesures peuvent être testés. Les tableaux 3.2., 3.3., 3.4. et 3.5. montrent que les résultats obtenus par l'étude du Kiwa concernent seulement les paramètres de biomasse et du nombre de *Legionella* sur le matériau et dans l'eau qui doivent être évalués. Une telle évaluation peut alors être menée sur la base de :

- Une comparaison avec les données pratiques, par laquelle le degré de formation de biofilm dans le test

BFP est comparé avec les observations sur la formation de biofilm dans les installations de distribution d'eau potable.

– Une approche scientifique comprenant des aspects soulevés tels que le risque sanitaire (risque infectieux) et des désagréments esthétiques et techniques associés à une promotion de la croissance.

Les possibilités d'évaluation sont examinées en détail ci-dessous.

Evaluation sur la base de la formation de biofilm

• Désagréments esthétiques et techniques

Les désagréments esthétiques résultant d'un accroissement excessif de micro-organismes comprennent en particulier la formation par des champignons et des actinomycètes de substances donnant un mauvais goût, ou le développement d'anoxie et la présence d'organismes ou de particules de biomasse dans l'eau. Un exemple est celui de la prolifération d'actinomycètes sur des membranes en caoutchouc dans des compresseurs qui augmente les problèmes de goût.

En Angleterre, le critère pour évaluer les propriétés de croissance des matériaux au contact de l'eau potable est fondé sur l'observation d'une croissance visible sur les matériaux. Une croissance visible survient lorsque la consommation d'oxygène du matériau, déterminé dans le test de la différence en oxygène dissous (MDOD), est supérieure à 2,3 mg/l. Du fait de l'absence de données sur la corrélation entre les valeurs MDOD et les valeurs BFP, ce critère ne peut être (encore) traduit en une valeur BFP.

Un autre aspect inesthétique est l'accumulation de fer et de manganèse dans le biofilm qui peut entraîner des périodes de plaintes sur la couleur de l'eau. Ici aussi, on manque de données quantitatives.

Un problème technique associé à la formation de biofilm est l'augmentation de la résistance dans la canalisation. Ce problème apparaît probablement dans les cas d'un degré extrême de formation de biofilm.

Au total, il n'existe pas suffisamment d'information pour définir un critère quantitatif pour la formation de biofilm basé sur les aspects esthétiques et techniques par lequel les matériaux pourraient être évalués.

• Comparaison avec des situations pratiques

Il n'existe pas de données disponibles sur la densité de biofilm dans les installations d'eau potable aux Pays-Bas. Aussi, une comparaison de la formation de biofilm observée dans le test BFP avec les concentrations de biofilm dans les installations d'eau potable est impossible. Avec la recherche sur les processus de croissance dans les systèmes de distribution, des informations ont été recueillies sur les caractéristiques de formation de biofilm de l'eau potable et sur les concentrations de biofilm dans les systèmes de distribution d'eau sans désinfectant résiduel.

A partir des recherches menées avec l'appareil "biofilm" il apparaît que le taux de formation de biofilm (BFR) de différents types d'eau potable aux Pays-Bas s'étend

de valeurs < 1 pg ATP/cm² jour (filtration lente sur filtres à sable, eau préparée à partir d'eau souterraine contenant de l'oxygène) jusqu'à des valeurs supérieures à 50 pg ATP/cm² . jour (eau potable préparée à partir d'eau souterraine anoxique). Dans le même temps, il apparaît que le degré de recroissance des *Aeromonas* dans le réseau de distribution est lié au taux de formation de biofilm de l'eau de l'usine de traitement (Van der Kooij et al. 1999).

Une étude sur les concentrations de biofilm dans les parois de canalisations en PVC, réalisée dans 22 systèmes de distribution, a montré que les valeurs variaient de 40 pg ATP/cm² (min.) à 5800 pg ATP/cm² (max.) avec une valeur médiane de 670 pg ATP/cm² (Van der Kooij et al. 1999). Des concentrations supérieures à 1000 pg ATP/cm² ont été observées dans des réseaux de distribution présentant une recroissance des *Aeromonas*. Ces concentrations de biofilm sont le résultat du décrochage de composés biodégradables provenant de l'eau potable circulante, parce que le pouvoir de formation du biofilm des matériaux en PVC non plastifié est inférieur à 100 pg ATP/cm².

Les données sur les concentrations de biofilm des parois des canalisations peuvent être utilisées pour évaluer les valeurs BFP et BPP des matériaux des canalisations. On peut considérer comme point de départ qu'un matériau peut seulement contribuer dans une faible part à la formation du biofilm. Dans les situations où l'eau potable entraîne une très faible formation de biofilm sur la paroi des canalisations, il est préférable d'utiliser des matériaux qui ne provoquent autant que possible qu'une très faible formation de biofilm.

Classes de qualité

Sur la base des considérations présentées ci-dessus, une classification en classes de qualité peut être proposée pour les matériaux au contact de l'eau potable. Ces classes de qualité des matériaux peuvent être déterminées à l'aide du test BFP. Une classification possible sur la base des valeurs de BFP est présentée dans le tableau 5.2. Il n'est pas encore évident s'il faut déterminer ces classes selon les valeurs BFP ou BPP. Pour la plupart des matériaux, la différence entre ces paramètres est faible, toutefois en présence de certains matériaux un degré relativement élevé de formation de biomasse a été observé dans l'eau (figure 5.1).

Tableau 5.2. Classes de qualité pour les matériaux au contact de l'eau potable, selon leur pouvoir de formation du biofilm.

Classe	BFP (pg ATP/ cm ²)	Matériau
A	≤ 100	Verre, acier inoxydable, PVC*, téflon*
B	100 < BFP ≤ 500	C-PVC (1), C-PVC (2), PB (1), cuivre (2), PP-R (1), PE-Xc (1)
C	500 < BFP ≤ 1000	Cuivre (1), PP-R (2), PE-Xc (2), Al / PE-MD, silicones (2)
D	1000 < BFP ≤ 3000	PE-Xa, silicones (1), silicones (3)
E	BFP > 3000	Types de caoutchouc*, PVC souple*

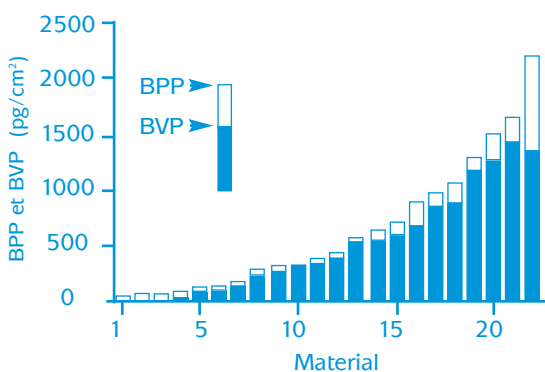
*résultats de recherches réalisées antérieurement

Biofilm et matériaux des canalisations des réseaux de distribution d'eau

Présentation des études scientifiques

Les exemples de matériaux relevant de classe de qualité la plus élevée (valeurs BFP ou BPP < 100 pg ATP/cm²) sont le verre (toutefois non utilisable pour les canalisations d'eau potable), acier inoxydable, PVC non plastifié et PFTE. Des exemples de matériaux présentant une relative plus forte promotion de la croissance (valeurs BFP ou BPP > 3000 pg ATP/cm²) sont le caoutchouc naturel et le PVC plastifié. De tels matériaux ne sont applicables au contact de l'eau potable, sauf dans des situations où de très petites surfaces sont exposées à l'eau (par exemple, des anneaux de caoutchouc dans des joints de canalisations).

Figure 5.1. Matériaux testés, y compris les matériaux témoins, distribués selon le degré de formation de biofilm dans le test BFP.



N° 1, 2 et 3 : verre ; N° 4, 5 et 6 : acier inoxydable ; N° 7 : PVC-1 ; N° 8 : PB (1) ; N° 9 : C-PVC (2) ; N° 10 : cuivre (2) ; N° 11 : PP-R (1) ; N° 12 : PE-Xc (2) ; N° 13 : cuivre (1) ; N° 14 : PP-R (2) ; N° 15 : PB (2) ; N° 16 : Al/PE-MD ; N° 17 : PE-Xc (2) ; N° 18 : silicoles ; N° 19 et 20 : PE-Xa ; N° 21 et 22 : silicones

En classant les matériaux selon les valeurs de BFP (figure 5.1.), il apparaît que certains d'entre eux ont des scores équivalents ou meilleurs que le cuivre dans le test BFP. Il a déjà été montré que les canalisations en cuivre présentaient une formation de biofilm relativement forte dans le test BFP et dans le système dynamique. Les concentrations de biofilm sur le cuivre augmentent de manière linéaire en fonction du temps dans le test BFP. Les taux de formation de biofilm sont d'environ 4 (cuivre 2) et 20 (cuivre 1) pg ATP/cm² jour. Cette formation de biofilm est probablement le résultat de la présence d'huile minérale sur les tuyaux de cuivre, car la formation de biofilm la plus élevée est observée sur le cuivre présentant le plus d'huile minérale. Toutefois, si la corrosion joue aussi un rôle, la composition de l'eau (pH, carbone organique et inorganique) pourrait aussi avoir un impact sur la promotion de la croissance par le cuivre. Aucune autre information n'est disponible sur ce point.

Ces observations indiquent que les scores du cuivre sont bien moindres que ce qui était attendu, eu égard à la stabilité biologique basée sur l'affirmation que le cuivre ne relargue aucun composé promouvant la croissance et qu'il devrait même être inhibiteur de croissance. Toutefois, cette inhibition de croissance ne s'applique pas à tous les micro-organismes. Des souches

de *Pseudomonas* et aussi des souches d'*Aeromonas* sont relativement sensibles au cuivre, mais de faibles concentrations de cuivre ont peu d'effet sur les *Legionella* et des souches de *Mycobacterium*. Les résultats de cette étude démontrent aussi que le cuivre a peu ou pas d'effet sur *Legionella*.

Sur la base de la formation de biofilm/production de biomasse, une distinction claire peut être faite entre les matériaux, ce qui rend possible une division en classes de qualité. Toutefois, il n'est pas encore possible d'indiquer les domaines d'application des matériaux de diverses classes de qualité. Dans la définition de domaines d'application, des facteurs tels que la longueur de la canalisation, le diamètre (rapport surface/volume) et la température de l'eau jouent un rôle important.

Evaluation sur la base du risque sanitaire associé à la promotion de la croissance de bactéries pathogènes

Les micro-organismes potentiellement pathogènes, qui peuvent se multiplier dans les installations d'eau (potable), comprennent *Legionella* spp., *Mycobacterium* spp. et *Pseudomonas* spp. On peut admettre que plus il y aura de nutriments, plus forte sera la croissance de ces micro-organismes. La température, la vitesse d'écoulement et la durée de séjour sont aussi importants. Dans les conditions des essais, pratiquement aucun accroissement de *Pseudomonas* et de *Mycobacterium* n'a été observé. La croissance des *Legionella* a été observée dans le test BFP. Ainsi, la possibilité d'évaluer les matériaux selon (les risques liés à) la promotion de la croissance des *Legionella* est discutée ci-dessous.

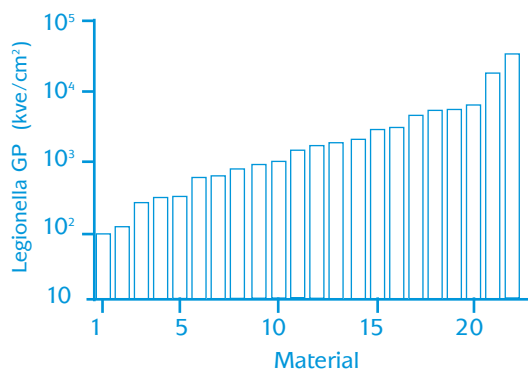
• Croissance des *Legionella* dans le système testé

En présence de matériaux promouvant la croissance, la croissance des *Legionella* peut être favorisée, conduisant ainsi à un danger sanitaire. Les *Legionella* sont largement dispersées dans l'eau et se multiplient en particulier dans les biofilms à une température suffisamment élevée. A partir des résultats obtenus avec le test BFP, il apparaît que certains matériaux sont des promoteurs relativement importants de la croissance de *Legionella*. Plus élevée était la multiplication des *Legionella*, généralement plus forte était la promotion de la croissance du matériau (figure 5.2.).

L'association la plus nette entre le degré de promotion de la croissance et la croissance des *Legionella* provient de la relation entre les valeurs de BPP et la croissance des *Legionella* sur les matériaux et dans l'eau (figure 5.2.). Toutefois, la distribution est relativement large et le degré de promotion de croissance des *Legionella* ne peut être déduit avec précision pour un matériau spécifique simplement à partir d'une valeur BFP ou BPP. Une cause possible de cette large distribution peut être la température de l'eau (25 °C) utilisée dans le test BFP. Cette température est significativement plus basse que la température optimale (35 à 37 °C) pour la croissance des *Legionella*, ce qui rend la compétition pour les *Legionella* plus difficile avec les autres bactéries. Le pouvoir de

promotion de la croissance de ces bactéries s'exprime moins clairement à des températures plus proches de la température optimale de croissance de cette bactérie, c'est à dire 30-37 °C.

Figure 5.2. Pouvoir de croissance de *Legionella* sur différents matériaux.



N° 1, 2 et 3 : verre ; N° 4 : PVC (1) ; N° 5 : acier inoxydable ; N° 6 : PE-Xa ; N° 7 : silicones (1) ; N° 8 : témoin acier inoxydable ; N° 9 : cuivre (2) ; N° 10 : témoin acier inoxydable ; N° 11 : PE-Xc (1) ; N° 12 : silicones (2) ; N° 13 : cuivre (1) ; N° 14 : PP-R (1) ; N° 15 : PB (2) ; N° 16 : C-PVC (2) ; N° 17 : PE-Xc (2) ; N° 18 : PB (1) ; N° 19 : PP-R (2) ; N° 20 : silicones (3) ; N° 21 : Al/PE-MD ; N° 22 : PE-Xa (répété)

• Risque sanitaire

Est-ce qu'un critère d'évaluation de risque sanitaire peut être déduit de la promotion de la croissance de *Legionella* dans le test BFP ?

Dans les réseaux intérieurs de distribution d'eau chaude aux Pays-Bas, des *Legionella* sont observées à des numérations allant de 5×10^3 UFC/l à 2×10^5 (Van der Kooij et Hoestra, 1984). Meenhorst (1984) a trouvé des numérations jusqu'à plusieurs centaines d'UFC/l, et des cas de maladie du légionnaire ont été observés à des numérations supérieures à 40 UFC/ml (40 000/l). En Allemagne, une concentration de 10 UFC/ml (10 000 UFC/l) a été proposée comme niveau au dessus duquel des mesures correctives doivent être prises. En présence de *L. pneumophila* sérogroupe 1, des mesures seraient nécessaires à des valeurs plus basses (Exner et al. 1993). Toutefois, il n'existe aucune valeur seuil d'un nombre maximal de *Legionella* qui serait liée à un risque infectieux (par exemple de 10-4 par personne et par an).

Pour déterminer un tel niveau (dans l'eau), les facteurs à prendre en compte sont les suivants :

- l'infection survient par l'intermédiaire d'aérosols qui sont formés avec cette eau,
- les nombreuses souches et sérotypes de *Legionella* qui diffèrent les unes des autres dans leur degré de virulence,
- l'absence de données sur le risque sanitaire après exposition aux *Legionella* ("dose infectieuse").

Les concentrations de *Legionella* dans l'eau du test BFP sont comprises entre 10 et 1500 UFC/ml, et

sont ainsi plus élevées que les numérations des systèmes d'eau chaude pour lesquelles la maladie du légionnaire est observée ou des mesures correctives sont proposées. Les conditions du test BFP sont relativement favorables à la croissance des *Legionella*, malgré le fait que la température de l'eau n'est pas optimale pour leur croissance. Pour "traduire" les résultats du test BFP, on a besoin de données sur la relation entre les numérations de *Legionella* dans le biofilm et dans l'eau à une certaine fréquence de remplacement de l'eau (en pratique et dans le test). Ainsi, un critère quantitatif est nécessaire pour le nombre de *Legionella* dans l'eau afin d'évaluer le résultat du test. Avec les données disponibles, il n'est pas possible de déduire un critère d'évaluation quantitatif pour les matériaux sur la base de la promotion des *Legionella* dans le test BFP.

Evaluation des matériaux de canalisations pour les installations domestiques

Les considérations précédentes montrent clairement qu'il n'est pas encore possible de déduire un critère objectif d'évaluation pour les matériaux des installations intérieures sur la base de la promotion de la croissance. Les possibilités pour arriver à un système d'évaluation ont été discutées. La définition de classes de qualité, basée sur la promotion de la croissance et indiquant le domaine d'application pour chaque classe, offre des possibilités pour aboutir à une politique d'autorisation claire. Il reste à examiner si une évaluation sur la base d'une formation de biofilm ou une production de biomasse est suffisante ou si le degré de multiplication de micro-organismes pathogènes, en particulier *Legionella*, doit être compris dans la catégorisation en classes de qualité (et dans la performance du test).

La commission du Kiwa sur "les aspects sanitaires des substances chimiques et des matériaux au contact avec l'eau potable" a un rôle central dans l'évaluation de l'impact des matériaux sur la qualité de l'eau potable. Etant donné les risques sanitaires potentiels associés à la promotion de la croissance bactérienne des matériaux au contact de l'eau potable, il serait logique d'impliquer cette commission dans de futurs développements de cette approche.

Matériaux pour les canalisations des réseaux de distribution

L'étude menée dans le cadre du Kiwa par Van der Kooij (octobre 2001) et dont les résultats sont présentés ci-dessus (4.4. et 4.5) montre que les matériaux en polyéthylène stimulent la croissance des bactéries de manière beaucoup plus forte (10 à 30 fois) que les matériaux en PVC-U. Les valeurs BPP pour le verre, qui est chauffé à 500 °C, sont les plus faibles (environ 30 pg ATP/cm²) et sont principalement liées aux très faibles concentrations de substances biodégradables présentes dans l'eau du test (filtration lente sur sable). Les valeurs BPP du PVC-U (70 - 120 pg ATP/cm², sans correction de la contribution apportée par l'eau) ne sont pas beaucoup plus élevées que celles du verre.

Biofilm et matériaux des canalisations des réseaux de distribution d'eau

Présentation des études scientifiques

Dans le réseau de distribution, l'eau potable contribue à la formation de biofilm sur le matériau par l'apport continu de substances biodégradables. Les divers types d'eau potable aux Pays-Bas diffèrent dans leurs caractéristiques de formation de biofilm. Les valeurs du taux de formation de biofilm (BFR), déterminées par l'appareil "biofilm", vont de moins de 1 pg ATP/cm² jour pour des eaux traitées par filtration lente sur sable jusqu'à des valeurs supérieures à 50 pg ATP/cm² jour pour certaines eaux souterraines.

Cette différence dans les valeurs BFR explique les différences dans les concentrations de biofilm observées sur des segments de canalisations en MATÉRIAU SOUPLE (PVC-U) qui ont été utilisées durant de longues périodes (> 10 ans) dans des systèmes de distribution. Pour environ 50 % des canalisations en MATÉRIAU SOUPLE (PVC-U), la concentration de biofilm était comprise entre 250 et 750 pg ATP/cm². Pour moins de 10 % des segments, cette valeur était plus basse, et des concentrations de biofilm à plus de 1500 pg ATP/cm² ont été relativement peu fréquentes. Occasionnellement, une valeur à plus de 4000 pg ATP/cm² a été trouvée. Les concentrations supérieures à 1000 pg ATP/cm² ont été observées dans des réseaux de distribution présentant une recroissance d'Aeromonas. Au vu des valeurs BPP faibles sur les matériaux en MATÉRIAU SOUPLE (PVC-U), il peut être avancé que la formation de biofilm sur les canalisations des réseaux de distribution est presque complètement causée par l'eau.

Les concentrations "normales" de biofilm (250-750 pg ATP/cm²) et les concentrations "élevées" (à plus de 1000-1500 pg ATP/cm²) peuvent servir comme valeurs de référence afin de déduire des critères pour les valeurs BPP des matériaux des canalisations des réseaux de distribution.

Matériaux de canalisations pour les réseaux intérieurs de distribution

Les divers matériaux de canalisations pour les réseaux intérieurs de distribution diffèrent nettement dans leur degré de promotion de la croissance (valeurs BPP) (figure 4.7.). Dans les conditions d'essai (statique, sans renouvellement de l'eau), les matériaux avec les valeurs BPP les plus élevées sont des promoteurs relativement forts de la croissance des *Legionella*. Ces observations confirment les résultats d'autres études sur l'influence de matériaux synthétiques sur la croissance des *Legionella* (Colbourne et Pratt, 1984 ; Rogers et al. 1994). Toutefois, la réalisation du test BPP à une température de 25 °C ne donne probablement pas une image claire du pouvoir de croissance sur les matériaux pour *Legionella* car ces bactéries ne peuvent pas bien entrer en compétition avec les autres micro-organismes à cette température relativement basse. Ceci peut expliquer les valeurs différentes observées pour quelques matériaux dans la relation entre les valeurs BPP et LegGP (figure 4.8.).

Les concentrations de biofilm sur les matériaux dans le système dynamique étaient plus basses que celles du

verre dans l'appareil "biofilm". Le flux continu à travers l'appareil "biofilm" (0,2 m/s) a pour résultat un apport beaucoup plus grand de substances biodégradables par l'eau que dans le système dynamique avec un flux inférieur à 30 minutes (2 %) en 24 heures. En outre, la fréquente alternance (21 fois en 24 heures) d'un flux d'eau bref, relativement fort, après des périodes de stagnation, prévient probablement la formation de biofilm. Dans ces conditions, il apparaît que les divers matériaux n'ont pas d'effet démontrable sur la qualité bactériologique de l'eau dans un système relativement petit. Toutefois, au vu des résultats du test BPP, il ne peut être exclu que certains matériaux auront un effet sur la qualité de l'eau, y compris la présence de *Legionella*, dans certaines conditions comme la stagnation, l'augmentation de température et l'utilisation de longues canalisations. Aussi, la qualité de l'eau et les conditions hydrauliques pourraient avoir un effet sur la formation de biofilm. Toutefois, les données sur la formation de biofilm dans les réseaux de distribution dans des conditions pratiques différentes ne sont pas encore disponibles pour les comparer aux valeurs BPP.

Optimisation et harmonisation des méthodes d'essais

Dans le cadre d'un projet international subventionné par l'Union européenne, il a été élaboré un projet sur l'optimisation et l'harmonisation d'une méthode d'essai pour évaluer les caractéristiques des matériaux (produits) au contact de l'eau potable. La détermination de l'ATP est le paramètre de mesure de la biomasse. La fréquence de renouvellement de l'eau est un critère important dans le test.

■ CONCLUSIONS

Les études menées dans le cadre du Kiwa permettent de tirer les conclusions suivantes :

Pouvoir de formation de biofilm des matériaux (test BFP)

1. une trentaine de matériaux de canalisations, comprenant le cuivre et l'acier inoxydable, qui sont utilisés dans les installations de distribution d'eau potable ont été testés pour leur promotion de la croissance bactérienne. Cette étude a utilisé deux systèmes d'essai différents, c'est à dire le test statique du pouvoir de formation de biofilm (BFP) et le système dynamique (système à flux continu).

2. le test BFP montre que les matériaux diffèrent nettement entre eux quant à leur promotion de la croissance des micro-organismes. La promotion de croissance la plus faible a été observée avec l'acier inoxydable ; une promotion de croissance environ 30 fois plus forte a été observée pour plusieurs matériaux en polyéthylène (PE).

3. la formation de biofilm sur les matériaux de canalisations était plus faible dans le système dynamique que dans le test BFP (à l'exception de l'acier inoxydable). L'explication est que la biomasse formée dans le système dynamique est libérée dans l'eau, alors que ce n'est pas le cas dans le test BFP. Sur aucun des matériaux dans le système dynamique, aucune croissance de *Legionella*, *Pseudomonas* mycobactéries ou bactéries coliformes n'a été observée. Sur la base de ces observations, on peut conclure que, dans des circonstances normales, les matériaux testés ont peu d'impact sur la qualité microbiologique de l'eau.

4. sur le cuivre, il s'est produit une formation de biofilm relativement forte (en comparaison des plastiques testés et de l'acier inoxydable), dans les deux tests, BFP et système dynamique. Cette formation de biofilm est probablement liée à la présence d'huile minérale sur le cuivre. Des processus de corrosion ont aussi un rôle possible, processus par lesquels des composés organiques de l'eau deviennent disponibles pour les micro-organismes.

5. une relation significative a été observée entre le degré de promotion de la croissance, mesurée par la formation de biofilm ou par la production de biomasse, et la promotion de la croissance de *Legionella*. Toutefois, le degré de promotion de la croissance de *Legionella* ne peut être simplement déduit du degré de formation de biofilm ou de production de biomasse.

6. l'évaluation des matériaux sur la base de la formation de biofilm ou de production de biomasse en relation avec les aspects hygiéniques, esthétiques ou techniques est encore impossible. Aussi l'absence d'information sur les concentrations de biofilm dans les installations d'eau potable rend difficile l'évaluation des résultats du test BFP.

7. l'évaluation des matériaux sur la base de promotion de la croissance (dans le test BFP) des *Legionella* est impossible en raison de l'absence d'information sur la relation entre les numérations des *Legionella* dans l'eau et dans le biofilm dans différentes conditions hydrauliques, et de l'absence d'un critère pour le nombre de *Legionella* dans l'eau.

Pouvoir de production de biomasse des matériaux (test BPP)

1. dans le test BPP, les matériaux en polyéthylène (PE) sont des promoteurs de croissance beaucoup plus forts que les matériaux en PVC-U, qui sont de faibles promoteurs. Les divers matériaux en polyéthylène diffèrent nettement entre eux et les matériaux en PE-40 sont beaucoup plus fortement promoteurs que les PE-80.

2. les concentrations de biofilm sur les canalisations en PVC dans les systèmes de distribution varient énormément du fait des caractéristiques différentes de formation du biofilm de l'eau traitée. Des concentrations de biofilm entre 250 et 750 pg ATP/cm² sont considérées comme "normales" et des valeurs supérieures à 1000-1500 pg ATP/cm²

sont associées à des problèmes de recroissance. Ces valeurs peuvent servir de référence pour évaluer les valeurs BPP de matériaux de canalisations pour les systèmes de distribution.

3. les matériaux synthétiques utilisés dans les réseaux intérieurs de distribution sont des promoteurs de la croissance bactérienne dans le test (statique) BPP. Les valeurs les plus élevées sont observées pour les matériaux en PE-X et les plus faibles sont trouvées pour les matériaux en C-PVC. Toutefois, des différences sont aussi trouvées parmi les représentants de divers types de matériaux.

4. le cuivre est un promoteur de croissance dans le test BPP plus fort que l'acier inoxydable, probablement du fait de la présence d'une couche (résiduelle) d'huile.

5. les matériaux avec les valeurs BPP les plus élevées montrent la croissance la plus forte de *Legionella* dans le test BPP (test statique sans remplacement de l'eau).

6. dans le système dynamique, dans lequel un modèle de réseau domestique est imité (21 fois un bref écoulement d'eau en 24 heures) à 18 °C et avec une longueur de canalisation de 5 m, la formation de biofilm est plus faible que dans l'appareil "biofilm" (surfaces de verre exposées à un flux continu) et aucun accroissement de *Legionella* n'est observé.

7. le degré de formation de biofilm en pratique dépend des propriétés du matériau, de la qualité de l'eau et des conditions hydrauliques du système. Les données sur les concentrations de biofilm dans les réseaux intérieurs de distribution dans des conditions pratiques différentes ne sont pas encore disponibles pour les comparer aux valeurs BPP.

Promotion de la croissance microbienne des matériaux (méthode européenne harmonisée ou test BPP révisé)

1. une méthode harmonisée pour déterminer les propriétés de promotion de la croissance des matériaux au contact de l'eau potable a été développée sur la base de méthodes existantes.

2. le test détermine le pouvoir de production de biomasse (BPP) des matériaux en utilisant l'ATP comme paramètre de biomasse. Les échantillons de matériaux sont incubés dans de l'eau du robinet qui est remplacée une fois par semaine.

3. le coefficient de variation de la reproductibilité (CVR) du test s'étend de 34 à 107 % (à 25 °C) et de 20 à 34 % à 30 °C dans une première application du protocole d'essai avec des matériaux choisis. Les valeurs BPP de ces produits couvrent une large gamme : de moins de 50 à plus de 40 000 pg ATP/cm².

4. les principaux facteurs affectant la reproductibilité comprennent : des écarts dans l'analyse d'ATP, la qualité

Biofilm et matériaux des canalisations des réseaux de distribution d'eau

Présentation des études scientifiques

de l'eau du test et les procédures de détachement de la biomasse.

5. les valeurs BPP diminuent avec l'augmentation de la température, ce qui peut être expliqué par l'effet de la respiration endogène. Une température de 30 °C est proposée pour l'incubation.

6. le nombre d'échantillons étudiés dans le test MDOD, le test W270 et la méthode autrichienne est trop faible pour établir une relation quantitative entre les résultats de ces tests et le test BPP révisé.

7. quelques indications sur la signification pratique des valeurs BPP peuvent être déduits des résultats observés avec des matériaux similaires dans les tests MDOD dans cette expérimentation, des valeurs MDOD et W270 rapportées pour d'autres matériaux et les concentrations de biofilm observées dans les systèmes de distribution.

Recommandations pour de futures recherches

Des expérimentations complémentaires sont nécessaires pour améliorer la qualité de la procédure d'essai proposée et pour établir des critères discriminants. Les principaux aspects de ces études comprennent :

- l'optimisation et la standardisation de l'analyse d'ATP,
- l'optimisation de procédures pour récupérer la biomasse (ATP) à partir des matériaux, choix de l'eau du test (biostabilité, composés limitant la croissance),
- établissement de l'effet de la température (valeur Q10),
- propriétés de promotion de la croissance des matériaux qui sont utilisés durant une longue période (par exemple > 10 ans),
- relation entre les concentrations de biofilm et les problèmes de qualité d'eau (comprend une étude sur les concentrations de biofilm).

Ces études devraient comprendre des situations pratiques, des anneaux - tests et des conditions de laboratoire.

ANNEXES

■ ANNEXE 1

Méthodes développées aux Pays-Bas (Kiwa) pour déterminer le pouvoir de croissance microbienne des matériaux de canalisations d'eau

Essai statique (test BPP)

La méthode d'essai développée aux Pays-Bas diffère des autres méthodes selon les deux points suivants :

- la détermination de la biomasse dans le test BPP est basée sur l'analyse de l'adénosine triphosphate (ATP),
- l'essai est mené sous forme d'un test statique, c'est à dire que l'eau n'est pas renouvelée au cours de l'essai.

L'ATP est un composé riche en énergie qui est présent chez tous les organismes vivants (en activité). Le niveau d'ATP mesure ainsi la concentration de la biomasse active. L'utilisation d'un test statique permet de déterminer de manière quantitative le pouvoir du matériau de promouvoir une croissance bactérienne, qui a été définie comme le pouvoir de production d'une biomasse (BPP).

Le test BPP est réalisé en laboratoire en incubant dans l'obscurité à 25 ± 1 °C des échantillons de matériau (d'une surface totale d'environ 100 cm²) dans une eau de boisson biologiquement stable (600 ml), à laquelle sont ajoutés des sels de potassium et des micro-organismes d'eau de rivière. Dans ce test, les concentrations de biomasse active formée sur le matériau (biofilm) et dans l'eau (biomasse en suspension) sont mesurées sur une période de 16 semaines, après 56, 84 et 112 jours d'exposition. La biomasse est détachée du matériau par un appareil à ultra-sons (40 KHz).

En fonction de ce résultat, la valeur de BPP d'un matériau peut être calculée. La valeur de BPP comprend le pouvoir de formation de biofilm (BFP) et le pouvoir de former une biomasse en suspension (SBP). Ainsi, $BPP = BFP + SBP$. Ces paramètres sont tous exprimés comme la quantité de biomasse active par unité de surface du matériau testé (pg ATP/cm²).

Les matériaux peuvent être comparés les uns aux autres selon les valeurs de BPP (ainsi que de BFP et de SBP). Des bactéries comme *Legionella* ou d'autres bactéries (*Pseudomonas aeruginosa*, *Mycobacterium* spp. et coliformes) peuvent être ajoutées à l'eau au début du test, de telle manière que le nombre d'unités formant colonies soit d'environ 100 par ml. De cette manière, une information complémentaire est obtenue sur le degré de pouvoir d'un matériau à favoriser la croissance des *Legionella* ou d'autres bactéries dans les conditions du test.

Les nombres d'unités formant des colonies de *Legionella* sont déterminés dans l'eau et sur les matériaux avec le milieu de culture BCYE. Le pouvoir de croissance de *Legionella* (LegGP, UFC/cm²) sur les matériaux dans le test BPP est calculé comme la moyenne des concentrations en *Legionella* sur les matériaux et dans l'eau après 56, 84 et 112 jours d'incubation des matériaux.

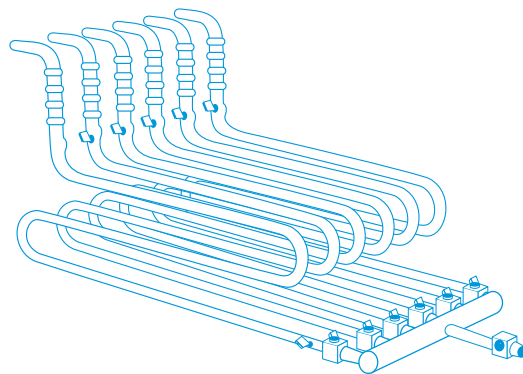
Essai dynamique

Les conditions hydrauliques des réseaux de distribution d'eau des habitats individuels sont imitées dans un système dynamique en faisant alterner des périodes de brefs écoulements et d'arrêts d'eau. Les canalisations d'un diamètre interne d'environ 13 mm et d'une longueur de 5 m, faites des matériaux testés, sont branchées à l'eau de ville. Les raccords utilisés dans l'installation sont en acier inoxydable (figure A1.1).

L'approvisionnement en eau, par une canalisation en PVC non plastifié, est mis en route et arrêté, de manière répétée (21 fois en 24 heures). Dans ces conditions, environ 130 litres d'eau par jour, soit un débit de 260 ± 50 l/heure, se sont écoulés dans chaque canalisation, à une température de $18,6 \pm 0,7$ °C, dans une température ambiante de $21,2 \pm 0,8$ °C.

Le système est inoculé par une culture de *Legionella* (cultivées dans de l'eau en présence de fragments de caoutchouc naturel), au début du test et après deux semaines. Les analyses microbiologiques des matériaux et de l'eau sont effectuées durant une période de 16 semaines.

Figure A1.1.



Détermination du biofilm

Les caractéristiques de formation du biofilm de l'eau utilisée dans le système dynamique sont déterminées en utilisant un appareil spécifique (figure A1.2) (Van der Kooij et al., 1997).

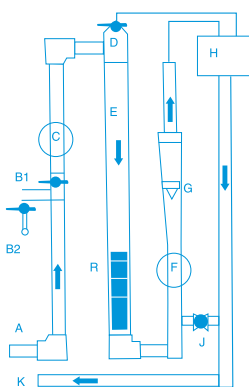
La concentration et le type de composés biodégradables présents dans l'eau traitée contribuent à la formation

Biofilm et matériaux des canalisations des réseaux de distribution d'eau

Annexes

du biofilm à la surface des matériaux des canalisations. Le taux de formation du biofilm (BFR) de l'eau traitée est déterminé par un appareil, une colonne de verre verticale remplie d'anneaux de verre placés l'un au-dessous de l'autre. L'eau s'écoule dans cette colonne du haut vers le bas à une vitesse de 0,2 m/s, correspondant au débit dans les réseaux de distribution. L'augmentation de la concentration en biofilm dans l'appareil est déterminée en retirant périodiquement deux anneaux de verre et en mesurant la quantité d'ATP. Le taux de formation du biofilm (BFR, pg ATP/cm². jour) est définie comme l'accroissement linéaire du contenu en ATP du biofilm comme une fonction du temps sur une période comprise entre 0 et 100 jours.

Figure : A1.2.

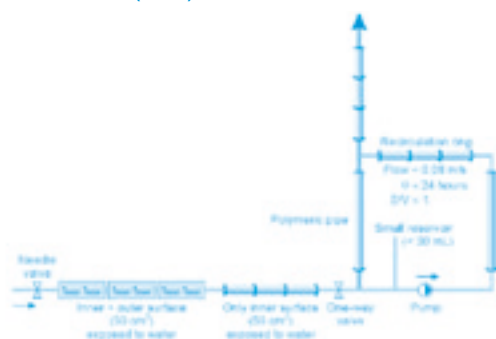


■ ANNEXE 2

Installation-test mise au point par l'Université technique du Danemark (DTU) pour des conditions d'écoulement d'eau en continu

Les systèmes de distribution d'eau potable ont été simulés par trois modèles parallèles construits avec soit le C-PVC, le MATÉRIAU SOUPLE (PVC-P) ou l'acier inoxydable (matériau de référence). Chaque système consiste en une ligne d'entrée, un anneau de recirculation, une ligne de sortie et deux types de points d'échantillonnage (figure A2.1).

Figure : A2.1. Installation testée à l'université technique du Danemark (DTU).



Les modèles ont été construits en acier inoxydable avec des segments de matériaux en polymère à tester. Dans l'anneau de recirculation, le matériau à tester est inséré dans la canalisation pour donner un rapport S/V d'environ 1 cm-1. Les trois systèmes ont une alimentation en eau en continu (contrôlée par une valve) à une vitesse approximative de 1 ml/mn. Ces conditions conduisent à une durée de séjour de l'eau d'environ un jour dans l'anneau de recirculation. Aucun composant n'a été ajouté à l'eau. La température de l'eau était de 10 °C durant la période du test.

Les lignes d'entrée et de sortie ont un écoulement relativement faible. L'écoulement de l'eau dans l'anneau de recirculation est d'environ 0,08 m/s. Ainsi, la ligne d'entrée simule une distance de transport courte avec un écoulement faible, l'anneau de recirculation, une distance de transport longue avec un écoulement élevé et la ligne de sortie, une distance de transport longue avec un écoulement faible.

Les segments de canalisations en polymère (pièces tests) sont insérés dans la ligne d'entrée, l'anneau de recirculation et dans la ligne de sortie, et ces segments peuvent être échantillonnés au cours du temps. Chaque pièce test retirée est remplacée par une nouvelle, ce qui rend possible la réalisation d'expérimentations durant des périodes prolongées. Les points d'échantillonnage correspondent à des segments de canalisations, qui sont immergés complètement dans l'eau, ou seulement leurs surfaces internes sont au contact de l'eau.

Point d'échantillonnage type 1

Dans la ligne d'entrée, 3 fois 2 pièces du matériau test, chacune avec une surface totale de 50 cm², sont incluses dans les canalisations en acier inoxydable, permettant à la fois aux surfaces internes et externes d'être en contact avec l'eau. Ce point d'échantillonnage permet une comparaison directe entre un faible taux constant d'échange d'eau et les expérimentations en récipients. Les trois segments en acier sont couplés à un montage, avec, aux deux ouvertures, un joint étanche à l'eau, mais permettant encore la récupération de segments de canalisations pour des échantillonnages.

Point d'échantillonnage type 2

Dans la ligne d'entrée, l'anneau de recirculation et dans la ligne de sortie, trois pièces du matériau à tester sont insérées comme faisant partie du circuit, permettant seulement aux surfaces internes de 50 cm² d'être en contact avec l'eau. Avec ces points d'échantillonnage, peuvent être comparés les effets d'une distance courte de transport avec un écoulement d'eau faible, un transport de 24 heures à un flux de 0,08 m/s et une longue distance de transport avec écoulement faible.

Tous les matériaux en acier sont rincés à l'acide avant leur installation et tous les matériaux en polymère sont rincés selon la procédure de nettoyage suivante : rinçage avec de l'eau du robinet durant 15 minutes, période de stagnation de 24 h, nouveau rinçage durant 15 minutes avant utilisation, trois rinçages avec l'eau du test.

Les joints des systèmes représentent une source potentielle de contamination, toutefois le contact entre l'eau et les joints est très limité et il a été estimé que le relargage de composés dans l'eau avait un faible impact. Si, malgré toutes les précautions prises, les joints affectaient l'eau, un tel effet doit être pris en compte lorsque chaque matériau testé est comparé au système modèle avec le matériau de référence – acier inoxydable.

La production de biomasse sur les pièces testées est mesurée par l'ATP. Dans le cas des pièces complètement immergées (point d'échantillonnage type 1), la biomasse est récupérée selon le procédé suivant. La pièce testée est transférée dans un tube contenant 50 ml d'eau et traitée 6 x 2 minutes par une sonication de faible énergie.

Ce traitement est suivie par 3 minutes de sonication à haute énergie. Pour les pièces seulement exposées à l'eau sur leurs surfaces internes (point d'échantillonnage type 2), la biomasse est récupérée par écouvillonnage. Chaque pièce est écouvillonnée par 5 écouvillons stériles qui sont transférés dans un tube renfermant 50 ml d'eau. Les écouvillons sont traités 6 x 2 minutes par une sonication à faible énergie suivie d'une sonication 1 x 3 minutes à haute énergie. On applique une sonication sur cinq écouvillons stériles représentant des témoins.

Lorsqu'on déconnecte les points d'échantillonnage type 2 dans l'anneau de recirculation, un échantillon d'eau est recueilli ; il représente l'eau de l'anneau de recirculation et de la ligne de sortie.

■ ANNEXE 3

Evaluation du pouvoir de production de biomasse des matériaux au contact de l'eau potable

Projet de méthode européenne harmonisée

La méthode évalue la capacité de matériaux au contact de l'eau destinée à la consommation humaine de promouvoir la croissance des micro-organismes.

Des échantillons de matériaux sont incubés, jusqu'à 16 semaines, dans des bocaux de verre (d'un volume de 1000 ml et d'une largeur de col de 57 mm, avec un bouchon en polyéthylène) contenant de l'eau du robinet et un mélange de micro-organismes naturels d'une eau de rivière (figure A3.1).

Le rapport surface/volume des échantillons est de 0,16 cm⁻¹. L'eau est remplacée toutes les semaines.

La formation de biomasse sur le matériau (biofilm) et dans l'eau est déterminée par des mesures d'ATP (adénosine triphosphate) après 8, 12 et 16 semaines d'incubation.

Figure A3.1. : Récipient utilisé pour réaliser le protocole révisé.



Volume : 1 litre ; hauteur : 18 cm ; diamètre externe : 10 cm ; diamètre du col : 5,7 cm ; bouchon en bakélite avec incrustations en PTFE.

Principaux paramètres du test

Critères de qualité de l'eau utilisée

Elle est constituée d'eau du robinet (900 ± 20 ml) dépourvue d'effets toxiques sur les bactéries, possédant un haut degré de stabilité biologique, des nutriments inorganiques suffisants (cf tableau A3.1) et une communauté microbienne additionnée de bactéries aquatiques présentes dans une eau de rivière.

Tableau A3.1 : Critères de qualité pour l'eau du test.

Paramètre	Concentration	Commentaires
pH	6,5 - 8,5	de préférence entre 7,0 et 8,5 la réduction en oxygène n'est pas acceptable
Oxygène (mg/l)	> 6,5	Ajout de 2 mg P/l
PO43-P (mg/l)	2,0 - 6,7	Ajout de 5 mg N/l
Nitrate - N	5 - 11,3	
Ammonium N (mg/l)	< 0,05	
Désinfectant résiduel	absent	à enlever si présent
Cuivre (mg/l)	< 0,05	
Argent (mg/l)	< 0,01	
Dureté	non définie	
Carbone organique dissous total (mg/l)	< 3	
Biostabilité (BP, ng ATP/l)	< 10	Ce degré de biostabilité correspond à une valeur de carbone organique assimilable < 10 µg C/l
Micro-organismes	bactéries indigènes + 1 % d'eau de rivière	eau de rivière après filtration sur membrane (1,2 µm)

Inoculum

L'inoculum est une eau de rivière fraîchement recueillie, d'un volume de 500 ml, sans substances flottantes telles que des algues.

Manipulation des matériaux

• *Nature des échantillons*

Les échantillons proviennent d'un lot de production normale qui n'a reçu aucun traitement spécial et qui représente les matériaux utilisés au contact de l'eau potable. Les produits larges par exemple des canalisations) sont découpés en échantillons avec la taille et la surface désirées.

• *Stockage des produits*

Les produits sont protégés de la contamination par la poussière, la graisse, l'huile, etc. durant leur stockage et leur transport. Ils sont également protégés de la chaleur, la lumière et les produits chimiques volatils. Les produits sont stockés à l'obscurité à 20 ± 3 °C, sauf prescription du fabricant.

Préparation des échantillons et des témoins

• *Taille et nombre d'échantillons*

Deux récipients sont préparés, chacun renfermant trois échantillons d'une surface externe de 50 cm². Pour chaque matériau testé, 8 pièces sont nécessaires. Si l'échantillon flotte (indice de gravité inférieur à 1), il est attaché par un fil d'acier inoxydable (diamètre : 0,8 mm) à un anneau de verre d'une surface externe de 8 cm² (diamètre externe : 18 mm, épaisseur : 2 mm, longueur : 7 mm). Les échantillons sous forme d'enduit sont préparés par le fabricant à l'aide de coupons d'acier inoxydable de surface appropriée. L'enduit doit recouvrir l'ensemble de l'échantillon. Les matériaux en ciment sont composés de cubes d'une surface externe d'au moins 50 cm².

• *Nettoyage des échantillons*

Le jour précédant le test, les échantillons de matériaux sont nettoyés durant une heure dans un vase de 500 ml par de l'eau froide du robinet. Les échantillons sont stockés dans l'eau durant une nuit et de nouveau nettoyés durant une heure avant le test.

• *Anneaux de verre, fil d'acier inoxydable et pinces*

Les anneaux de verre et le fil, utilisés pour augmenter le poids des fragments de matériaux testés, sont placés sur un plateau et chauffés à 550 °C durant 4 heures. Les pinces sont nettoyées par flambage.

Incubation

Les échantillons de matériaux sont placés dans les récipients, trois pièces dans chaque récipient. Pour chaque type de matériau, deux récipients (A et B) sont utilisés. Les pièces des produits de référence (verre et MATÉRIAU SOUPLE (PVC-P) exempt d'agent biocide) sont placées dans des récipients additionnels au contact de l'eau du test. On utilise neuf cylindres de verre, de 17 cm² chacun. Les récipients sont inoculés par 9 ml d'eau de rivière filtrée sur membrane. Les récipients sont incubés durant 16 semaines à l'obscurité dans un incubateur à 30 ± 2 °C sans les secouer. On remplace l'eau toutes les semaines en

utilisant une eau du robinet additionnée de nutriments inorganiques (phosphore, nitrates).

Il faut s'assurer que l'atmosphère de l'incubateur ou la chambre chaude ne renferme pas de composés organiques volatils. Ces composés peuvent être à l'origine d'une croissance microbienne dans l'eau du test et masquer la croissance due au matériau.

Analyse

La concentration de la biomasse sur les matériaux et dans l'eau est évaluée par des mesures d'ATP (adénosine triphosphate), en utilisant un luminomètre et des réactifs appropriés, selon les instructions du fabricant.

• *Echantillons de matériaux*

La concentration de biomasse (en picogrammes d'ATP/cm²) est déterminée sur la surface des échantillons de matériaux respectivement aux jours 56, 84 et 112. On retire un échantillon du récipient A et un du récipient B, à chacun des jours test. Les échantillons sont recueillis en utilisant des pinces nettoyées et traitées par la chaleur. Chaque échantillon est placé dans 50 ml d'eau stérile dans un récipient de verre de 100 ml. Ce récipient est ensuite placé dans une cuve à ultrasons renfermant de l'eau déminéralisée. L'eau de la cuve doit être au même niveau que celle des récipients. On applique une sonication de fréquence 40 Hertz durant 2 minutes. L'eau du récipient est transférée dans un récipient stérile qui est placé dans de la glace pilée. On ajoute 50 ml d'eau stérile au récipient contenant le matériau et on applique de nouveau une sonication. Cette procédure est répétée de telle manière que chaque échantillon de matériau ait subi six sonications (le verre n'a besoin que de trois traitements). La température de l'eau de la cuve à ultrasons doit être contrôlée et de la glace est ajoutée lorsque la température dépasse 25 °C.

La concentration en ATP est déterminée sur le volume total d'eau recueillie (soit 300 ml pour les matériaux traités par 6 sonications et 150 ml pour le verre). Cette concentration d'ATP est utilisée pour calculer la concentration de biomasse (pg ATP/cm²) de l'échantillon de matériau.

• *Eau*

Chaque récipient A et B est doucement secoué manuellement avant de recueillir un échantillon d'eau de 50 ml aux jours 56, 84 et 112. On verse les 50 ml d'eau de chacun des récipients dans des tubes stériles gradués. On détermine la concentration de biomasse en suspension dans l'eau (SB) dans les échantillons d'eau par des mesures d'ATP. Les échantillons d'eau doivent être recueillis avant de remplacer l'eau du récipient.

• *Taille des échantillons de matériaux*

Les échantillons de matériaux sont recueillis au cours du test. La surface externe de chacun des échantillons est mesurée avec précision après l'analyse puis on calcule la concentration de biofilm (pg ATP/cm²).

Calculs

• *Production de biomasse (BP)*

On calcule les valeurs de BP pour chacun des matériaux testés à partir des concentrations en ATP mesurées

sur les échantillons de matériaux et dans l'eau du test. La valeur moyenne de BP est la concentration de biomasse sur le matériau (pg ATP /cm²) et la concentration de biomasse de l'eau du test x V/S après 56, 84 et 112 jours d'incubation. On détermine aussi l'écart type (SD) de la moyenne des valeurs de BP.

• **Pouvoir de production de biomasse (BPP)**

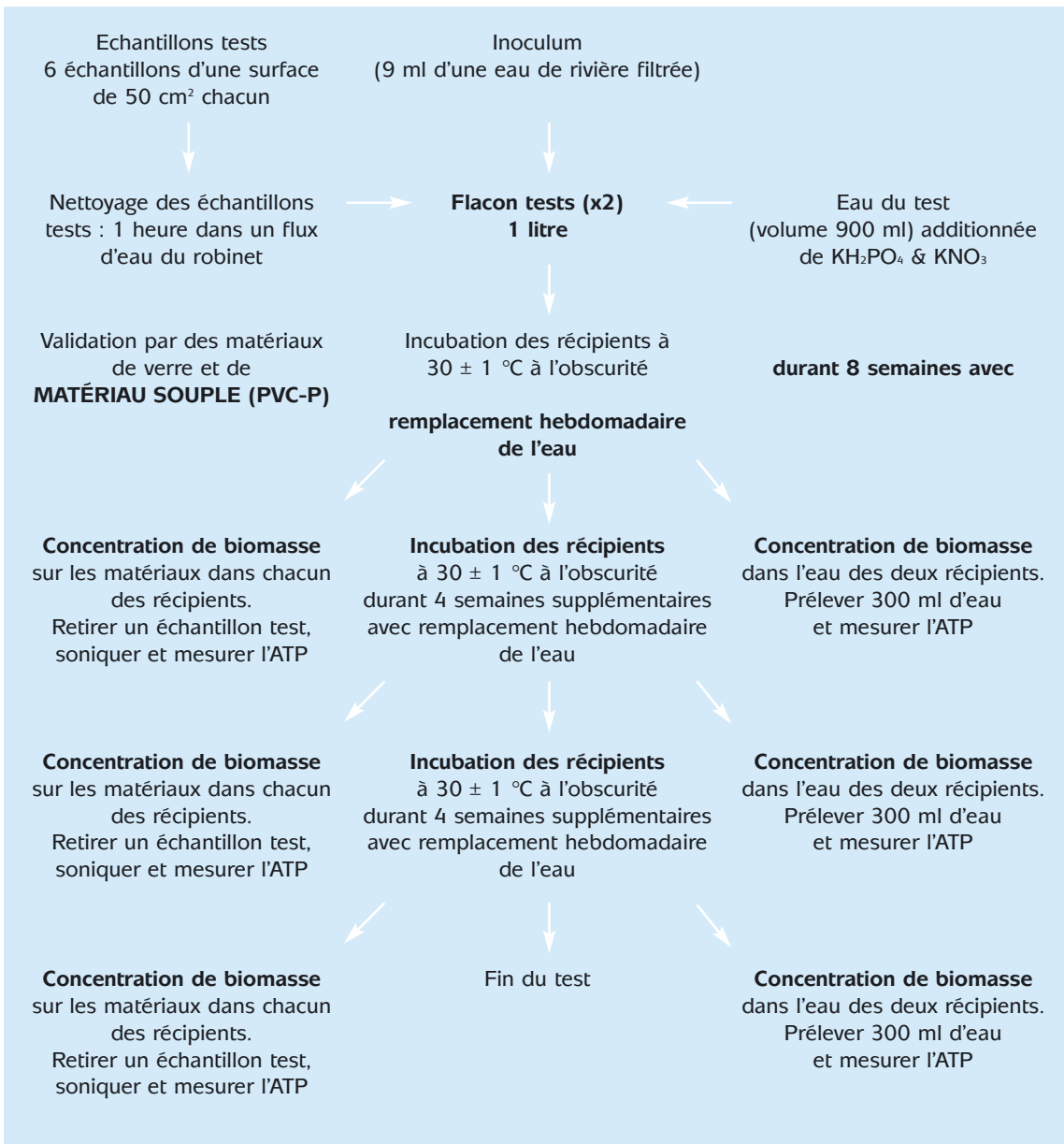
Le pouvoir de production de biomasse (BPP) est calculé comme la valeur moyenne des valeurs de BP observées respectivement aux jours 56, 84 et 112, en retranchant la valeur moyenne de BP observée avec le témoin verre. La valeur de BPP est aussi exprimée en pg ATP/cm².

Rapport d'essais

Les informations suivantes doivent être fournies dans le rapport d'essais :

- l'information nécessaire pour identifier le matériau,
- les valeurs de BP aux jours 56, 84 et 112 observées avec les échantillons de matériau, la valeur moyenne de BP et l'écart type,
- les valeurs de BP du témoin verre aux jours 56, 84 et 112 et la valeur moyenne de BP,
- les valeurs du témoin positif (MATÉRIAU SOUPLE (PVC-P)) aux jours 56, 84 et 112 et la valeur moyenne de BP,
- la valeur de BPP de(s) matériau(x) testé(s),
- des observations particulières durant la préparation des échantillons et/ou durant le test,
- tous les traitements et toutes les procédures utilisées et non décrites dans la norme et qui peuvent affecter les résultats.

TEST DU POUVOIR DE FORMATION DE BIOFILM (BPP)



■ RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

CHARACKLIS W.G.

Biofilms : a basis for an interdisciplinary approach. In "Biofilms"
(Characklis W.G., Marshall K.C. eds),
John Wiley and Sons,
New York, pp. 3-15

BURMAN N.P., COLBOURNE J.S.

Techniques for the assessment of growth of micro-organisms on plumbing materials used in contact with potable water supplies. J. Appl. Bacteriol 43 : 137-144, 1977

SCHOENEN D., SCHÖLER H.F.

Trinkwasser und Werkstoffe : Praxisbeobachtungen und Untersuchungsverfahren. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1983

FRENSCH K., HAHN J.U.,

LEVSEN K., NIESSEN J.,

SCHÖLER H.F., SCHOENEN D.

Koloniezählerhöhungen in einem Trinkwasserbehälter verursacht durch Lösemittel des Anstrichmaterials. Zbl. Bakt. B. 184 : 556-559, 1987

BERNHARDT H., LIESEN H.U.

Trinkwasserverkeimungen in Verteilungsnetzen durch Korrosionsschutz auf Bitumenbasis. GWFA Wasser-Abwasser 129 (1) : 28-32, 1988

WIERINGA J.T.

Recovery of coliforms in the presence of a free chlorine residual. J. Am. Water Works Assoc. 77, 83-88, 1985

SMITH D.B., HESS A., HUBBS S.A.

Survey of distribution system coliform occurrences in the United States. In Proceedings of AWWA Water Quality Technology Conference. Denver, Colo. American Water Works Association Denver. p. 1103-1116, 1990

BAYLIS J.R.

Bacterial aftergrowths in water distribution systems. Water Works Sewerage 77 (10), 335-338, 1930

CAMPER A.K., BURR M., ELLIS B., BUTTERFIELD P., ABERNATHY C.

Development and structure of drinking water biofilms and techniques for their studies. J. Appl. Microbiol. Symp. Supplement 85 : 1S-12S, 1999

SEIDLER R.J., MORROW J.E.,

BAGLEY S.T.

Klebsiella in drinking water emanating from redwood tanks. Appl. Environ. Microbiol. 33 : 893-900, 1997

ELLGAS W.M., LEE R.

Reservoir coatings can support bacterial growth. J. AWWA December 693-695, 1980

TOBIN J.O.H., BEARE J., DUNELL M.S.

Legionnaires' disease in a transplant unit : isolation of the causative organism from shower baths. Lancet 118-121, 1980

CORDES L.G., WIESENTHAL A.M.,

GORMAN G.W., PHAIR J.P.,

SOMMERS H.M., BROWN A., YU V.L.,

MAGNUSSEN M.H., MEYER R.D.,

WOLF S.S., SHANDS K.N., FRASER D.W.

Isolation of Legionella pneumophila from hospital shower heads. Ann. Intern. Med. 98 : 195-197, 1981

WHO - OMS

Weekly epidemiological record. 43, 75 : 345-352, 2000

ROWBOTHAM T.J.

Preliminary report on the pathogenicity of Legionella pneumophila for fresh water and soil amoebae. J. Clin. Path. 33 : 1179-1183, 1980

ABU KWAIK Y., GAO L.Y., STONE B.J.,

VENKATARAMAN C.V., HARB O.S.

Invasion of protozoa by Legionella pneumophila and its role in bacterial ecology and pathogenesis. Minireview. Appl. Environ. Microbiol. 64(9) : 3127-3133, 1998

COLBOURNE J.S., PRATT D.J.,

SMITH M.G., FISHER-HOCH S.P.,

HARPER D.

Water fittings as sources of Legionella pneumophila in a hospital plumbing system. Lancet, January 28 : 210-213, 1984

HENGESBACH B., SCHULZE-RÖBBECKE R., SCHOENEN D.

Legionella in membrane expansion vessels.
Zbl. Hyg. 193 :319-324, 1993

NIEDEVELD C.J., PET F.M., MEENHORST P.L.

Effect of rubbers and their constituents on proliferation of Legionella pneumophila in naturally contaminated hot water.
Lancet July 26 : 180-184, 1986

ROGERS J., DOWSETT A.B., DENNIS P.J., LEE J.V., KEEVIL C.W.

Influence of plumbing materials on biofilm formation and growth of Legionella pneumophila in potable water systems
Appl. Environ. Microbiol. 60, 1842-1851, 1994

ROGERS J., DOWSETT A.B., DENNIS P.J., LEE J.V., KEEVIL C.W.

Influence of temperature and plumbing material selection on biofilm formation and growth of Legionella pneumophila in a model potable water system containing complex microbial flora.
Appl. Environ. Microbiol. 60, 1585-1592, 1994

SCHOENEN D., SCHULZE-RÖBBECKE R., SCHIRDEWAHN N.

Mikrobielle Kontamination des Wassers durch Rohr- und Schlauchmaterialien.
2. Mitteilung : Wachstum von Legionella pneumophila.
Zb. Bakt. Hyg. B186 :326-332, 1988

SCHOFIELD G.M., LOCCI R.

Colonization of components of a model hot water system by Legionella pneumophila.
J. Appl. Bacteriol. 58 : 151-162, 1984

ANAISSIE E.J., PENZAK S.R., DIGNANI M.C.

The hospital water supply as a source of nosocomial infections : a plea for actions.
Arch. Intern. Med. 162(13) : 1483-1492, 2002

VON REYN C.F., MASLOW J.N., BARBER T.W., FALKINHAM J.O., ARBEIT R.D.

Persistent colonisation of potable water as a source of Mycobacterium avium infection in AIDS.
Lancet 343 : 1137-1141, 1994

FALKINHAM III J.O., NORTON C.D., LECHEVALLIER M.W.

Factors influencing numbers of Mycobacterium avium, Mycobacterium intracellulare, and other mycobacteria in drinking water distribution systems.
Appl. Environ. Microbiol. 67(3) : 1225-1231, 2001

SCHULTZE-RÖBBECKE R., FISCHEDER R.

Mycobacteria in biofilms.
Zbl. Bakt. Hyg. 188 : 385-390, 1989

VAN LIEVERLOO J.H.M., VAN DER KOOIJ D., VEENENDAAL G.

National survey of invertebrates in drinking water distribution systems in the Netherlands.
Pp. 2065-2081. *Proc. Am. Water. Works. Assoc. Wat. Qual. Technol. Conf.* November 6-10 1994, San Francisco California

ZACHEUS O.M., ILVANAINEN E.I., NISSINEN T.K., LETHOLA M.J., MARTIKAINEN P.J.

Bacterial biofilm formation on polyvinyl chloride, polyethylene and stainless steel exposed to ozonated water.
Wat. Res. 34, 63-70, 2000

PERCIVAL S.L., KNAPP J.S., EDYVEAN R.G.J., WALES D.S.

Biofilms, mains water and stainless steel.
Wat. Res. 24, 239-243, 1998

SERVAIS P.

Mesure de la production bactérienne par incorporation de thymidine tritiée.
Sciences de l'eau 1, 217-237, 1988

SERVAIS P., LAURENT P., RANDON G.

Mesure de la biomasse et de l'activité bactérienne dans l'eau de distribution.
Sciences de l'eau 5, 473-488, 1992

BLOCK J.C., HAUDIDIER K., PAQUIN J.L., MIAZGA J., LÉVI Y.

Biofilm accumulation in drinking water distribution systems.
Biofouling 6, 333-343, 1993

DONLAN R.M., PIPES W.O., YOHE T.L.

Biofilm formation on cast iron substrate in water distribution systems.
Wat. Res. 28, 1497-1503, 1994

**VAN DER KOOIJ D., VISSER A.,
HIJNEN W.A.M.**

Determining the concentration of easily assimilable organic carbon in drinking water.
J. Am. Water Works Assoc. 74 :540-545, 1982

JORET J.C., LEVY Y.

Méthode rapide d'évaluation du carbone éliminable des eaux par voie biologique.
Trib. Cebedeau 510, 39 :3-9, 1986

EUROPEAN UNION

Council directive 98/83/EC of 3 november 1998 on the quality of water intended for human consumption.
Off. J. European Communities L330 :32-53, 1998

COLBOURNE J.S., BROWN D.A.

Dissolved oxygen utilization as an indicator of total microbial activity on non-metallc materials in contact with potable water
J. Appl. Bacteriol. 47 :223-231, 1979

**VAN DER KOOIJ D.,
VEENENDAAL H.R.**

Assessment of the biofilm formation potential of synthetic materials in contact with drinking water during distribution, p.1395-1407.
In Proceedings of AWWA Water Quality Technology Conference, Nov.1993, Miami, Fla.

VAN DER KOOIJ D., VEENENDAAL H.R.

Biomass Production Potential of materials in contact with drinking water : method and practical importance.
Water Sci. Technol. Water Supply 1(3) :39-45, 2001

ÖNORM B 5018-1

Prüfung der Verkeimungsneigung von Trinkwasserrohren. Teil 1 : Prüfverfahren.
Österreichisches Normungsinstitut, 1020 Wien, 2002

ÖNORM B 5018-2

Prüfung der Verkeimungsneigung von Trinkwasserrohren. Teil 1 : Bewertung.
Österreichisches Normungsinstitut, 1020 Wien, 2002

COLBOURNE J.S.

Materials usage and their effects on the microbiological quality of water supplies
J. Appl. Bacteriol. Symp. Suppl. 47S-59S, 1985

SCHOENEN D., COLBOURNE J.S.

Microbiological evaluation of drinking water construction materials.
Zbl. Bakt. Hyg. B. 183. 505-510, 1987

**VAN DER KOOIJ D., VAN LIEVERLOO J.H.M.,
SCHELLART J., HIEMSTRA P.**

Maintaining quality without a disinfectant residual.
J. Am. Water Works Assoc. 91(1) :55-64, 1999

**VAN DER KOOIJ D., VROUWENVELDER J.S.,
VEENENDAAL H.R.**

Elucidation and control of biofilm formation processes in water treatment and distribution using the unified biofilm approach.
Water Science and Technol. 47 (5) : 83-90, 2003

**VAN DER KOOIJ D., ALBRECHTSEN H.J.,
CORFITZEN C.B., ASHWORTH J.,
PARRY I., ENKIRI F., HAMBSCH B.,
HAMETNER C., KLOIBER R.,
VEENENDAAL H.R., VERHAMME D.,
HOEKSTRA E.J.**

Assessment of the microbial growth support potential of construction products in contact with drinking water - CPDW project : development of the harmonised test to be used in the European Acceptance Scheme concerning CPDW.
European Commission, July 2003

VEENENDAAL H.R., VAN DER KOOIJ D.

Biofilm Formation Potential of Materials used in household plumbing systems.
Kiwa, June 1999

VAN DER KOOIJ D.

Biomasse Production Potential (BPP) of materials in contact with treated water : method and significance.
Kiwa, October 2001

HABITCH W., MÜLLER H.E.

Occurrence and parameters of frequency of Legionella in warm water systems of hospitals and hotels in Lower Saxony.
Zbl. Bakt. Hyg. B. 186 ; 79-88, 1988

**VAN DER KOOIJ D.,
VROUWENVELDER J.S.,
VEENENDAAL H.R.**

Bepaling on betekenis van de biofilmvormende eigenschappen van drinkwater
H2O, 25, p. 767-771, 1997

VAN DER KOOIJ D., HOEKSTRA A.C.

Legionella pneumophila in warmtapwaterinstallaties. Ziekehuishygiëne en infectiepreventie 84-5p 103-106, 1984

MEENHORST P.L.

Legionnaire's disease. Some clinical, diagnostic and epidemiological aspects. Dissertatie. Leiden, 1984

**EXNER M., TUSCHEWITZKI G.J.,
LANGER B., WERNICKE F.,
ST JÉRÔME PLEISCHL**

Vorkommen und Bewertung von Legionellen in Krankenhäusern und anderen Grossgebäuden. Schriftenreihe des vereins für Wasser, Boden und Lufthygiene 91 :105-130, 1993

COLBOURNE J.S., PRATT D.J.

Water fittings as sources of Legionella pneumophila in a hospital plumbing system. The Lancet 28 : 210-213, 1984

**ROGERS J., DOWSETT A.B., DENNIS P.J.,
KEEVIL C.W.**

Influence of plumbing materials on biofilm formation and growth of Legionella pneumophila in potable water systems. Appl. Environ. Microbiol. 60 : 1842-1851, 1994

BLOCK J.C., MATHIEU L, PAQUIN J.L.

Biofilm formation potential of plastic pipe materials and effect on bacteriological quality of water. Comparison of static and dynamic tests. Contract UHP-Nancy and APME, N°UNI 2001/048, October 2003

**APPENZELLER B.M.R., BATTÉ M.,
MATHIEU L ET AL.**

Effect of adding phosphate in drinking water on bacterial growth in slightly and highly corroded pipes. Wta. Res. 35 : 248-253, 2001

PERCIVAL S.L.

The effect of molybdenum on biofilm development. J. Industrial Microbiol. Technol. 23 : 112-117: 1999



BIOFILM ET MATÉRIAUX

des canalisations des réseaux de distribution d'eau

Docteur Fabien SQUINAZI - Directeur du Laboratoire d'hygiène de la ville de Paris -

- Mars 2004 -