

Mesure de la biomasse et de l'activité bactérienne dans l'eau de distribution

Measurement of bacterial biomass and activity in tap water

P. Servais, P. Laurent and G. Randonl

Volume 5, Number 4, 1992

URI: <https://id.erudit.org/iderudit/705142ar>

DOI: <https://doi.org/10.7202/705142ar>

[See table of contents](#)

Publisher(s)

Université du Québec - INRS-Eau, Terre et Environnement (INRS-ETE)

ISSN

0992-7158 (print)

1718-8598 (digital)

[Explore this journal](#)

Cite this article

Servais, P., Laurent, P. & Randonl, G. (1992). Mesure de la biomasse et de l'activité bactérienne dans l'eau de distribution. *Revue des sciences de l'eau / Journal of Water Science*, 5(4), 473–488. <https://doi.org/10.7202/705142ar>

Article abstract

Bacterial regrowth in distribution systems is an important problem for drinking water producers. It is linked to the more and more frequent utilization of low quality surface waters, containing high concentration of organic matter, as raw water, and also to the increase in size and complexity of the distribution networks with high residence time of the water between its production and utilization. At the present time chlorination of treated water, with sometimes rechlorination in the network, is the usual way to limit growth in distribution systems. This solution however presents disadvantages, the major one is the formation of unpleasant organochlorine compounds which are responsible for tastes and odours of water. An alternative strategy consists of developing treatment lines in which biodegradable dissolved organic carbon is removed. It allows through a reduction of the chlorine demand of the water to increase the stability of the chlorine residual of the water. In this context, it is important to get a good knowledge of the factors controlling bacterial development in distribution networks. Up to now, studies on this subject have met some methodological problems linked to the fact that classical bacteriological methods are inadequate to study this kind of systems.

In this paper, various methods have been investigated to estimate bacterial biomass and activity in tap water. For this study, the analyzed water samples have been collected in the distribution system of the Parisian suburbs.

Three methods have been tested for the determination of bacterial biomass : plate count, measurement of DNA associated with particles with a size higher than 0.2 µm and direct microscopic enumeration. Heterotrophic plate counts have been performed following the French standard and results are expressed in CFU (Colony Forming Units) per ml; the DNA collected after filtration of 500 ml to 1500 ml of water on a 0.2 µm pore size membrane was estimated using a fluorimetric method, as proposed by Mc COY and OLSON (1985); direct enumerations were performed by epifluorescence microscopy after acridine orange staining (AODC) following the procedure proposed by HOBBIÉ et al. (1977), the comparison between plate counts and AODC (fig. 1) shows the important underestimation of the bacterial numbers when estimated by the CFU (up to 3 orders of magnitude). Such discrepancy has already been observed in natural aquatic ecosystems and is usually explained by the presence of numerous dead cells enumerated by microscopy. Now, it seems that the difference between plate counts and direct counts may rather be explained by the presence in water of « viable but non culturable » bacteria.

A comparison between DNA estimation and direct counts have also been performed. Figure 2 shows the results of this comparison. In spite of the dispersion, the correlation between both methods is significant and the correlation straight line indicates an average DNA content per bacteria of 4.1 x 10⁻¹⁵g DNA in good accordance with the values quoted in the literature. The dispersion of the data around this average can be explained by various ways : the variability of DNA per cell content for the different bacterial strains present in the water samples, the precision of the DNA method which is not higher than 20 % and possible contamination by other organisms than bacteria, as flagellates or ciliates, which are retained on the 0.2 µm pore size membrane.

On the basis of these tests, it seems that the direct count by epifluorescence microscopy is the most adapted method for studying the bacterial regrowth in distribution system.

The understanding of bacterial dynamics in a distribution system requires measurements of bacterial activity. Various methods have been developed in order to estimate bacterial activity in natural aquatic ecosystems. They are primarily based on the use of radioactive tracers. At the present time, the tritiated thymidine incorporation method, which measures the replication of bacterial DNA, is the most usually used one, but the incorporation of tritiated leucine into proteins, which measures increase in bacterial biomass, seems to be also an interesting method. These methods have been selected, on one hand, because of their specificity towards bacteria and, on the other hand, because of their high sensibility which is required for measurements of bacterial activity in the conditions of drinking water. Up to now, these methods have never been applied to drinking water. We have modified the experimental procedure of both methods : incubation time, radioactive tracers concentrations and volume of the sample have been tested and adapted in order to allow measurement in the conditions of drinking water samples. For thymidine incorporation, the volume of sample, incubated during 20 hours in the presence of 20 nM concentration of ³H-thymidine, was 100 ml. The incorporation was measured in the DNA, using the biochemical procedure proposed by WICKS and ROBARTS (1977), rather than in the total macromolecules. For leucine incorporation, we measured the incorporation rate at four leucine concentrations (2, 27, 52, 77 nM : 2 nM of ³H-leucine + non radioactive leucine) in 25 ml samples and the incubation lasted 3 to 4 hours. The incorporation rate was calculated as the reciprocal of the angular coefficient of the correlation straight line obtained when the reciprocal of the fraction of leucine incorporated per hour was plotted against leucine concentration (fig. 3). Comparison of both methods on samples of drinking is presented at figure 4, a good linear correlation was found. The equation of the correlation straight line is :

$$\log [\text{Inc.leu (pmol/Lh)}] = 0.97 \log [\text{Inc.thy (pmol/Lh)}] + 1.35 (n = 69, r = 0.84)$$

The molar ratio between leucine and thymidine incorporation found in these samples (20 to 25) seems to be in good agreement with the usual conversion factors found for both methods in natural aquatic ecosystems. Both methods seem to be available to bacterial activity estimations in drinking water, the tritiated thymidine incorporation method which requires working with only one concentration of radioactive tracer seems easier to use.

Mesure de la biomasse et de l'activité bactérienne dans l'eau de distribution

Measurement of bacterial biomass
and activity in tap water

P. SERVAIS¹, P. LAURENT¹, G. RANDON²

Reçu le 19 août 1991, accepté pour publication le 23 mars 1992*.

SUMMARY

Bacterial regrowth in distribution systems is an important problem for drinking water producers. It is linked to the more and more frequent utilization of low quality surface waters, containing high concentration of organic matter, as raw water, and also to the increase in size and complexity of the distribution networks with high residence time of the water between its production and utilization. At the present time chlorination of treated water, with sometimes rechlorination in the network, is the usual way to limit growth in distribution systems. This solution however presents disadvantages, the major one is the formation of unpleasant organochlorine compounds which are responsible for tastes and odours of water. An alternative strategy consists of developing treatment lines in which biodegradable dissolved organic carbon is removed. It allows through a reduction of the chlorine demand of the water to increase the stability of the chlorine residual of the water. In this context, it is important to get a good knowledge of the factors controlling bacterial development in distribution networks. Up to now, studies on this subject have met some methodological problems linked to the fact that classical bacteriological methods are inadequate to study this kind of systems.

In this paper, various methods have been investigated to estimate bacterial biomass and activity in tap water. For this study, the analyzed water samples have been collected in the distribution system of the Parisian suburbs.

Three methods have been tested for the determination of bacterial biomass : plate count, measurement of DNA associated with particles with a size higher than 0.2 μm and direct microscopic enumeration. Heterotrophic plate counts have been performed following the French standard and results are expressed

1. Université Libre de Bruxelles, Groupe de Microbiologie des Milieux Aquatiques, Campus de la Plaine, CP 221, Boulevard du Triomphe, B-1050 Bruxelles, Belgique.

2. Compagnie Générale des Eaux, 63, rue d'Anjou, 75008 Paris, France.

* Les commentaires seront reçus jusqu'au 15 juin 1993.

in CFU (Colony Forming Units) per ml ; the DNA collected after filtration of 500 ml to 1500 ml of water on a 0.2 μm pore size membrane was estimated using a fluorimetric method, as proposed by Mc COY and OLSON (1985) ; direct enumerations were performed by epifluorescence microscopy after acridine orange staining (AODC) following the procedure proposed by HOBBS *et al.* (1977), the comparison between plate counts and AODC (*fig. 1*) shows the important underestimation of the bacterial numbers when estimated by the CFU (up to 3 orders of magnitude). Such discrepancy has already been observed in natural aquatic ecosystems and is usually explained by the presence of numerous dead cells enumerated by microscopy. Now, it seems that the difference between plate counts and direct counts may rather be explained by the presence in water of « viable but non culturable » bacteria.

A comparison between DNA estimation and direct counts have also been performed. Figure 2 shows the results of this comparison. In spite of the dispersion, the correlation between both methods is significant and the correlation straight line indicates an average DNA content per bacteria of 4.1×10^{-15} g DNA in good accordance with the values quoted in the literature. The dispersion of the data around this average can be explained by various ways : the variability of DNA per cell content for the different bacterial strains present in the water samples, the precision of the DNA method which is not higher than 20 % and possible contamination by other organisms than bacteria, as flagellates or ciliates, which are retained on the 0.2 μm pore size membrane.

On the basis of these tests, it seems that the direct count by epifluorescence microscopy is the most adapted method for studying the bacterial regrowth in distribution system.

The understanding of bacterial dynamics in a distribution system requires measurements of bacterial activity. Various methods have been developed in order to estimate bacterial activity in natural aquatic ecosystems. They are primarily based on the use of radioactive tracers. At the present time, the tritiated thymidine incorporation method, which measures the replication of bacterial DNA, is the most usually used one, but the incorporation of tritiated leucine into proteins, which measures increase in bacterial biomass, seems to be also an interesting method. These methods have been selected, on one hand, because of their specificity towards bacteria and, on the other hand, because of their high sensibility which is required for measurements of bacterial activity in the conditions of drinking water. Up to now, these methods have never been applied to drinking water. We have modified the experimental procedure of both methods : incubation time, radioactive tracers concentrations and volume of the sample have been tested and adapted in order to allow measurement in the conditions of drinking water samples. For thymidine incorporation, the volume of sample, incubated during 20 hours in the presence of 20 nM concentration of ^3H -thymidine, was 100 ml. The incorporation was measured in the DNA, using the biochemical procedure proposed by WICKS and ROBARTS (1977), rather than in the total macromolecules. For leucine incorporation, we measured the incorporation rate at four leucine concentrations (2, 27, 52, 77 nM : 2 nM of ^3H -leucine + non radioactive leucine) in 25 ml samples and the incubation lasted 3 to 4 hours. The incorporation rate was calculated as the reciprocal of the angular coefficient of the correlation straight line obtained when the reciprocal of the fraction of leucine incorporated per hour was plotted against leucine concentration (*fig. 3*). Comparison of both methods on samples of drinking is presented at figure 4, a good linear correlation was found. The equation of the correlation straight line is :

$$\log [\text{Inc.leu (pmol/l.h)}] = 0,97 \log [\text{Inc.thy (pmol/l.h)}] + 1,35$$
$$(n = 69, r = 0,84)$$

The molar ratio between leucine and thymidine incorporation found in these samples (20 to 25) seems to be in good agreement with the usual conversion factors found for both methods in natural aquatic ecosystems. Both methods seem to be available for bacterial activity estimations in drinking water, the tritiated thymidine incorporation method which requires working with only one concentration of radioactive tracer seems easier to use.

Key-words : *bacterial biomass, plate count, microscopic enumeration, bacterial activity, ^3H -thymidine incorporation, ^3H -leucine incorporation, drinking water.*

RÉSUMÉ

Afin d'étudier la reviviscence bactérienne dans les réseaux de distribution, des méthodes de mesures de la biomasse et de l'activité bactérienne ont été investiguées sur des eaux provenant d'un réseau de distribution. Trois méthodes d'estimation de la biomasse bactérienne ont été comparées : le comptage sur gélose, selon la norme française d'examen bactériologique des eaux de consommation, le dosage de l'ADN contenu dans les particules retenues sur une membrane de porosité de $0.2 \mu\text{m}$ et le comptage direct au microscope à épifluorescence après coloration des bactéries à l'acridine orange. Les comptages sur gélose, tout comme en milieu aquatique naturel, sous-estiment très largement le nombre de bactéries ; ceci semble principalement lié à la présence de bactéries viables mais non cultivables. Le dosage de l'ADN et les comptages directs corrélient assez bien avec en moyenne un contenu en ADN par bactérie de $4,1 \times 10^{-15}$ g d'ADN, mais la première méthode semble moins précise. Le comptage direct semble donc la méthode la plus adaptée à l'estimation du nombre total de bactéries dans ce type de milieu.

Afin d'estimer l'activité bactérienne, les protocoles expérimentaux de deux méthodes utilisées en écologie bactérienne ont été adaptés aux conditions particulières de l'eau de distribution : l'incorporation de thymidine tritiée dans l'ADN bactérien et l'incorporation de leucine tritiée dans les protéines. La comparaison des deux méthodes sur une série d'échantillons montre une bonne corrélation, avec un rapport molaire entre incorporation de leucine et de thymidine compatible avec les facteurs de conversion des deux méthodes cités dans la littérature et établis pour les milieux aquatiques naturels. Les deux méthodes sont utilisables pour mesurer l'activité bactérienne dans l'eau potable, néanmoins l'incorporation de thymidine est plus aisée à mettre en œuvre, car elle ne nécessite de travailler qu'à une seule concentration en traceur radioactif.

Mots clés : *biomasse bactérienne, comptage sur gélose, énumération microscopique, activité bactérienne, ^3H -thymidine, ^3H -leucine, eau de distribution.*

1 - INTRODUCTION

La reviviscence bactérienne dans les réseaux de distribution est un problème important auquel doivent faire face les producteurs d'eau potable. L'importance de ce problème est liée à l'utilisation, de plus en plus fréquente d'eau de surface de mauvaise qualité, contenant des concentrations élevées en matière organique, ainsi qu'à l'accroissement de la taille et de la complexité des réseaux de distribution, entraînant des temps de séjour élevés de l'eau dans le réseau avant son utilisation.

Actuellement, la chloration de l'eau traitée, avec parfois rechloration dans le réseau, est souvent utilisée pour limiter la croissance bactérienne. Cette solution présente divers inconvénients tels que la formation, par réaction de la matière organique avec le chlore, de dérivés organochlorés indésirables, qui diminuent la qualité organoleptique de l'eau.

Une stratégie alternative consiste à réduire dans les filières de production d'eau potable la matière organique biodégradable qui sert de substrat à la croissance bactérienne dans le réseau. Ceci permet aussi, via la réduction de la demande en chlore de l'eau, d'augmenter la stabilité du résiduel de chlore dans l'eau distribuée.

Néanmoins, quelle que soit la stratégie adoptée, il apparaît aujourd'hui impossible d'éviter la présence d'un biofilm à l'intérieur des canalisations, et difficile de concilier des taux de chloration acceptables avec absence de reviviscence bactérienne.

Dans ces conditions, une bonne connaissance des facteurs de contrôle du développement bactérien dans le réseau semble une priorité. Les études entreprises sur ce sujet (MARTIN *et al.*, 1982 ; LE CHEVALLIER *et al.*, 1987) ont rencontré pas mal de difficultés méthodologiques. Ceci est lié au fait que les méthodes bactériologiques classiques se révèlent inadéquates à l'étude de ce type de systèmes.

Un gros effort se devait donc d'être fait pour développer des méthodes performantes et adaptées à l'étude de la dynamique des bactéries présentes dans les eaux circulant dans les réseaux de distribution. Cet article présente une investigation de diverses méthodes utilisables pour l'estimation de la biomasse bactérienne dans l'eau de distribution ainsi qu'un développement méthodologique de mesures de l'activité bactérienne dans ce type de milieu.

La plupart des études menées sur les réseaux de distribution utilisent la méthode de comptage sur milieu gélosé afin de dénombrer les bactéries. Cette méthode ne dénombre en fait qu'une partie très limitée et variable de la population bactérienne, comme l'ont montré récemment HAUDIDIER *et al.* (1988), dans un réseau de distribution expérimental. Des méthodes, telles que le dénombrement des bactéries après coloration à l'acridine orange (méthode AODC) ou le dosage de composés spécifiques, tels que l'acide désoxyribonucléique (ADN) (Mc COY et OLSON, 1985), doivent absolument être utilisées. Nous avons comparé ces diverses méthodes.

A côté de ces mesures de dénombrement bactérien, qui permettent une étude statique du niveau de contamination bactérienne des réseaux de distribution, l'application de mesures d'activité bactérienne offre la possibilité d'une étude dynamique du processus de reviviscence bactérienne dans les réseaux. Des méthodes permettant des mesures d'activité bactérienne ont été développées pour l'étude des milieux aquatiques naturels, elles sont principalement basées sur l'emploi de traceurs radioactifs. Parmi celles-ci, l'incorporation de thymidine tritiée dans le matériel génétique bactérien (FUHRMAN et AZAM, 1980, 1982 ; SERVAIS, 1988) est actuellement la plus couramment utilisée, mais l'incorporation de leucine tritiée dans les protéines (KIRCHMAN *et al.*, 1985) semble une voie tout à fait intéressante et complémentaire (SIMON et AZAM,

1989 ; SERVAIS, 1990 ; SERVAIS et GARNIER, 1990). Ces deux méthodes ont été sélectionnées, d'une part, pour leur spécificité vis-à-vis des bactéries, d'autre part, pour leur sensibilité nécessaire à la mesure d'activité dans les conditions d'un réseau de distribution. Nous avons modifié les procédures expérimentales et les avons appliquées en parallèle à des échantillons d'eau provenant d'un réseau de distribution potable.

2 - MATÉRIEL ET MÉTHODES

Les dénombrements et mesures d'activité bactérienne présentés dans cet article ont été effectués sur des échantillons prélevés dans le réseau de distribution de la banlieue nord de Paris appartenant au Syndicat des Eaux de l'île de France. Les échantillons ont été prélevés après rinçage du branchement, soit sur des poteaux à incendie, soit sur des bouches de lavage, situés sur divers types de canalisations (diamètres de 800 mm à 80 mm). Quatre séries d'environ 25 prélèvements ont été effectuées respectivement en février, mai, septembre et novembre 1989.

2.1 Estimation de l'abondance bactérienne

Trois méthodes d'estimation de l'abondance bactérienne ont été comparées au cours de cette étude : l'énumération des micro-organismes revivifiables sur milieu gélosé à 20 °C, l'énumération au microscope à épifluorescence et le dosage de l'ADN associé à des particules de taille supérieure à 0,2 µm.

2.1.1 Micro-organismes revivifiables

Le dénombrement des micro-organismes revivifiables en aérobiose à 20 °C sur milieu gélosé non spécifique a été effectué selon la Norme Française (NF T90-420) d'examens bactériologiques des eaux destinées à la consommation humaine. Les résultats sont exprimés en unités formant colonies (UFC) après 72 h d'incubation sur le milieu gélosé.

2.1.2 Enumération en microscopie à épifluorescence

Cette méthode, actuellement couramment employée dans les milieux aquatiques, permet une estimation du nombre total de bactéries au contraire des méthodes de dénombrement sur milieu gélosé. Le dénombrement des bactéries au microscope à épifluorescence après leur coloration à l'acridine a été effectué selon la procédure décrite par HOBBIÉ *et al.* (1977). Un volume d'échantillon fixé au formaldéhyde (concentration finale 2 %) lors de sa collecte est filtré sur une membrane de porosité 0,2 µm (filtre Nucléopore noir) en présence d'acridine orange (concentration finale 0,01 %), colorant fluorescent des acides nucléiques. Les bactéries sont comptées sur une quinzaine de

champs microscopiques sélectionnés au hasard sur le filtre. Le microscope à épifluorescence (Leitz) est équipé d'une lampe à vapeur de Hg 100 W et le grossissement utilisé est de 1000 x. La précision de la méthode a été estimée à environ 10 %.

2.1.3 Dosage de l'ADN

Dans l'eau du réseau de distribution, la biomasse bactérienne forme l'essentiel du matériel vivant, c'est pourquoi le dosage de l'ADN associé à des particules de taille supérieure à 0,2 μm peut être considéré comme une bonne estimation de la biomasse bactérienne. Le protocole suivant, adapté de celui proposé par MCCOY et OLSON (1985) a été utilisé.

Un volume d'eau, compris entre 500 et 1500 ml, est filtré sur une membrane de porosité 0,2 μm (filtre Satorius en acétate de cellulose). Le filtre est alors placé dans un tube contenant 5 ml de tampon phosphate (0,2 M Na_2HPO_4 ; 2 M NaCl ; 0,01 M EDTA ajusté à PH 7,4). L'échantillon est passé pendant 30 secondes aux ultra-sons (puissance 90 W), puis homogénéisé. Il est ensuite filtré sur une membrane de porosité 5 μm , afin d'éliminer les débris de filtres résultant de la sonication. Un volume de 3 ml en est prélevé et est additionné de 30 μl de fluochrome Hoechst 33258 (solution 10 $\mu\text{g/ml}$). La fluorescence est mesurée avec une longueur d'onde d'excitation de 356 nm et à une longueur d'onde d'émission de 465 nm. La quantité d'ADN est estimée par comparaison avec un standard d'ADN (Boehringer Mannheim) de concentration connue. La précision de la méthode a été estimée à environ 20 %.

2.2 Estimation de l'activité bactérienne

Au cours de cette étude, deux méthodes ont été utilisées en parallèle. Il s'agit de la mesure de l'incorporation de thymidine tritiée dans l'ADN bactérien et de leucine tritiée dans la fraction protéique des bactéries.

2.2.1 Mesure de la production bactérienne par incorporation de thymidine tritiée

Suite aux essais préliminaires, le protocole expérimental suivant a été défini : 100 ml d'échantillon sont incubés pendant vingt heures à l'obscurité et à température *in situ* en présence de (méthyl- ^3H) thymidine de radioactivité spécifique 50 Curies mmole^{-1} (Amersham) à une concentration finale de 20 nM. L'incubation est stoppée par l'ajout de 5 ml de NaOH 5 N. Il agit pendant 10 minutes, puis est neutralisé par 28 ml d'acide trichloroacétique (TCA) 100 %. Après 15 minutes à 0°C, l'échantillon est filtré sur une membrane de porosité 0,2 μm (filtre Sartorius en nitrate de cellulose). Celle-ci est ensuite rincée quatre fois au TCA 5 %, puis deux fois avec 5 ml d'un mélange phénol-chloroforme (50 g/100 ml) et enfin deux fois avec 5 ml d'éthanol 80 % froid, selon le protocole défini par WICKS et ROBERTS (1987). La radioactivité associée au filtre est mesurée par scintillation liquide (scintillateur Packard Tri-Carb), après dissolution du filtre dans 1,5 ml de Lumasolve (Lumac) et addition de 9 ml de Lipoluma (Lumac) comme mélange scintillant. Un blanc d'incorporation est soustrait, il est déterminé par une manipulation identique à celle décrite ci-dessus, mais dans laquelle le NaOH est ajouté immédiatement après l'addition de thymidine.

2.2.2 Mesure de la production bactérienne par incorporation de leucine tritiée

La procédure expérimentale résultant des essais effectués dans le cadre de ce travail est la suivante. On ajoute 0,15 nmole de ^3H -leucine [activité spécifique 134 Curies.m mole $^{-1}$ (Amersham)] à trois sous-échantillons de 25 ml ainsi que respectivement 0, 0,63 et 1,25 nmole de L-leucine froide. Après 3 à 4 heures d'incubation, 1,5 ml de TCA 100 % est ajouté à chacun des sous-échantillons. Ceux-ci sont ensuite chauffés durant 30 minutes à 85 °C ; après refroidissement, les sous-échantillons sont filtrés sur une membrane de porosité 0,2 μm (filtre Sartorius en nitrate de cellulose), le filtre est rincé au TCA 5 %, puis à l'éthanol 80 %, afin de conserver sur le filtre uniquement la fraction protéique. La radioactivité associée au filtre est comptée comme dans le protocole d'incorporation de thymidine ; un blanc d'incorporation est également déduit, il est déterminé par une procédure équivalente à celle décrite ci-dessus pour l'incorporation de la thymidine.

3 - RÉSULTATS ET DISCUSSION

3.1 Estimation de l'abondance bactérienne

3.1.1 Comptage sur gélose - comptage direct

La comparaison des dénombrements bactériens en microscopie à épifluorescence avec les dénombrements sur milieu gélosé, effectuée sur une soixantaine d'échantillons d'eau de distribution prélevés dans le réseau, est présentée à la figure 1. Cette figure met en évidence la sous-estimation très importante du nombre de bactéries déterminé par le dénombrement des colonies après mise en culture sur milieu gélosé (UFC). La relation linéaire suivante a été calculée entre les logarithmes des deux estimations :

$$\log (\text{bact epi/ml}) = 0,495 \log (\text{UFC/ml}) + 3,69$$

$$n = 62 \quad r = 0,67$$

Bien que la dispersion soit importante autour de cette relation, elle est peu éloignée de celle obtenue pour la comparaison entre les mêmes méthodes en milieu marin par BILLEN *et al.* (1990). Pendant longtemps, les microbiologistes ont expliqué la différence observée entre les comptages directs et les comptages sur gélose par la présence dans les populations naturelles de bactéries d'une énorme proportion de bactéries mortes (c'est-à-dire non cultivables). Au cours de la dernière quinzaine d'années, des méthodes ont été développées pour tester l'activité métabolique des cellules bactériennes : microautoradiographie (TABOR et NEIHOFF, 1984), test d'activité du système de transport d'électron (ZIMMERMAN *et al.*, 1978), ou encore un protocole basé sur l'inhibition de l'accroissement de taille des bactéries après inhibition de la synthèse de l'ADN par l'acide nalidixique (KOGURE *et al.*, 1979, 1987). Ces

méthodes ont permis de montrer que la part des bactéries, dénombrées au microscope et dont on peut détecter l'activité métabolique, est toujours largement supérieure à celle des bactéries dénombrées par mise en culture sur milieu riche. Ce type d'observations a conduit à l'introduction du concept de bactéries « viables mais non cultivables » : les bactéries incapables de croître sur milieu riche, et qui échappent donc au dénombrement par les méthodes d'ensemencement sur boîte de Pétri, ne sont pas pour autant des bactéries mortes, puisqu'elles manifestent une activité métabolique. La démonstration de la présence de bactéries « viables mais non cultivables » dans les milieux aquatiques naturels a fait l'objet de travaux récents de l'équipe de recherche de COLWELL et ses collaborateurs (GRIMES et COLWELL, 1986 ; ROSZAK *et al.*, 1984 ; COLWELL, 1985). Cette équipe a, d'autre part, tout dernièrement démontré la présence de bactéries « viables mais non cultivables » dans l'eau potable (BYRD *et al.*, 1991). Ceci exclut l'utilisation de la méthode d'énumération sur gélose pour l'étude de la dynamique de l'ensemble de la population bactérienne dans le réseau de distribution, même si les comptages sur gélose continuent à être employés pour le contrôle sanitaire des eaux de distribution.

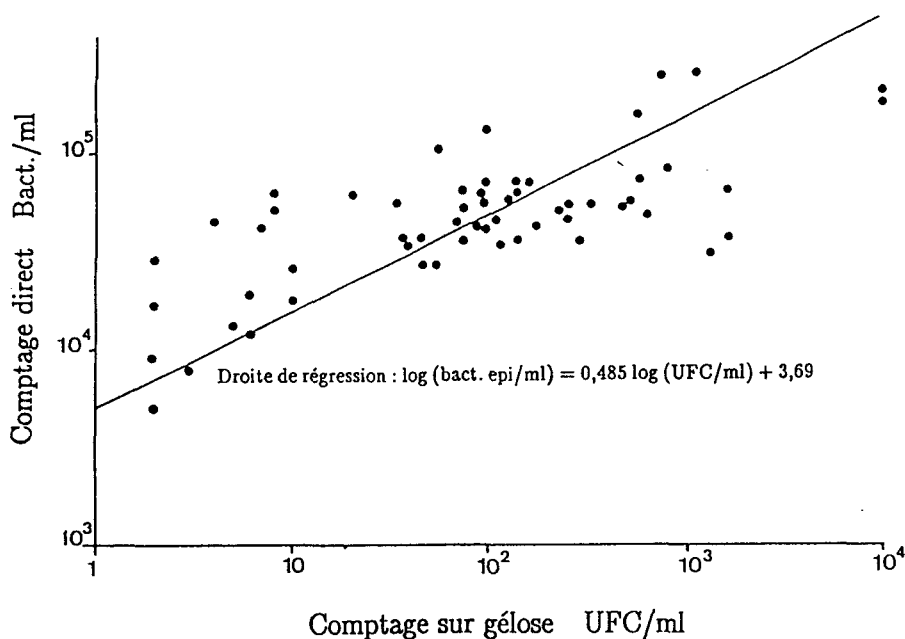


Figure 1 Nombre de bactéries déterminé par comptage direct au microscope à épifluorescence en fonction du nombre de colonies formées après mise en culture sur milieu gélosé à 20 °C (UFC).

Bacterial numbers estimated by epifluorescence microscopy plotted against the colony forming units at 20 °C.

3.1.2 Comptage direct – dosage de l'ADN

Sur une centaine d'échantillons, nous avons comparé l'énumération directe au microscope à épifluorescence avec le dosage de l'ADN. La figure 2 présente les résultats de cette comparaison. Malgré la dispersion, le coefficient de

corrélation ($r = 0,7$) est significatif et la droite de régression indique un contenu moyen en ADN de $4,1 \times 10^{-15}$ g par bactérie. Cette valeur se trouve dans la gamme des valeurs de contenu en ADN par bactérie mesurées sur des cultures pures (1×10^{-15} à 25×10^{-15} g ADN/bactérie) citées dans la littérature (WALLACE et MOROWITZ, 1973 ; STANIER *et al.*, 1985 ; MC COY et OLSON, 1985). Elle est légèrement inférieure à celle trouvée par Mc COY et OLSON (1985) pour des bactéries de réseaux de distribution ($7,1 \times 10^{-15}$ g ADN/bactérie).

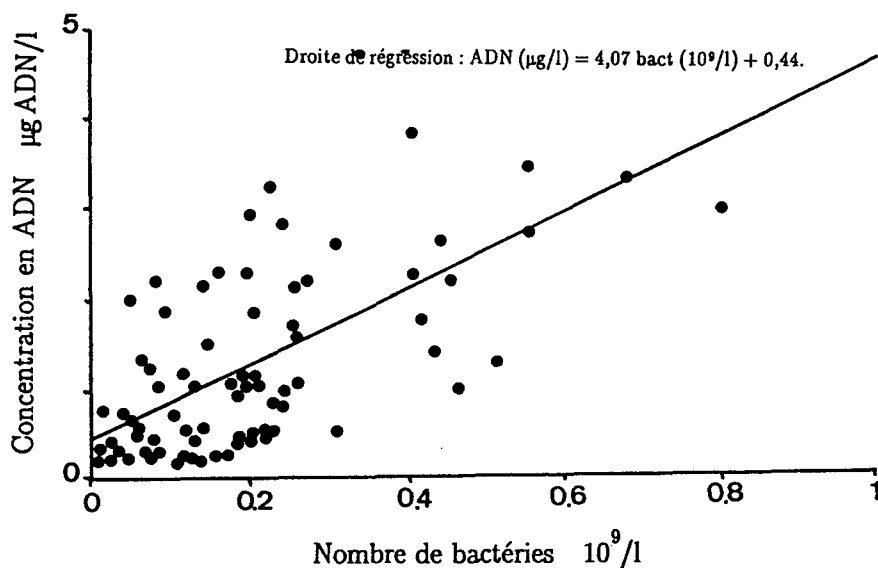


Figure 2 Comparaison entre l'estimation du nombre de bactéries en microscopie à épifluorescence et le dosage de l'ADN sur des échantillons d'eau du réseau de distribution.

Comparison between the bacterial numbers estimated by epifluorescence microscopy and the estimation of DNA content of particles higher than 0,2 μm .

La dispersion des valeurs autour de la moyenne peut s'expliquer de diverses manières :

- Elle est d'abord liée à la précision des méthodes. Celle-ci a été estimée à 10 % pour l'énumération microscopique et à environ 20 % pour le dosage de l'ADN dans les conditions expérimentales décrites ci-dessus. La mauvaise précision du dosage de l'ADN résulte de la faible quantité d'ADN à doser, de l'ordre de quelques μg . L'augmentation du volume filtré permettrait d'augmenter la précision de la méthode, mais le colmatage du filtre 0,2 μm empêche, dans la plupart des cas, de filtrer un volume supérieur à un litre.

- La variabilité du contenu bactérien en ADN, selon les souches bactériennes. Les variations spatiales et temporelles des souches bactériennes dominantes modifient ainsi le rapport ADN par bactérie.

- Une possible contamination par d'autres organismes que des bactéries, tels que flagellés et ciliés, qui seraient retenus sur le filtre 0,2 μm et dont l'ADN serait dosé avec celui des bactéries.

Sur la base de ces essais, il semble que la microscopie à épifluorescence soit la méthode la plus judicieuse pour l'étude de l'abondance bactérienne dans les réseaux de distribution.

3.2 Estimation de l'activité bactérienne

Parmi l'ensemble des méthodes développées pour la mesure de l'activité bactérienne en milieux aquatiques naturels (AZAM et FUHRMAN, 1984), nous avons testé dans ce travail l'application à l'eau de distribution des deux méthodes les plus sensibles : l'incorporation de thymidine tritiée et l'incorporation de leucine tritiée.

3.2.1 Mesure d'incorporation de thymidine

Le principe de la méthode d'incorporation de thymidine tritiée consiste à évaluer la production de biomasse bactérienne à partir du taux de synthèse de l'ADN bactérien. La synthèse de l'ADN est directement proportionnelle aux taux de division cellulaire et donc à la production de biomasse. Le taux de synthèse de l'ADN est estimé par la mesure du taux d'incorporation de (méthyl-³H) thymidine dans l'ADN (FUHRMAN et AZAM, 1980, 1982). Le protocole utilisé pour la mesure dans les milieux naturels a été modifié, afin de permettre la mesure dans des milieux beaucoup moins riches en bactéries, tels que l'eau de distribution. Les volumes filtrés, afin de mesurer la radioactivité incorporée par les bactéries, ont été portés à 100 ml, alors qu'ils sont habituellement de 5 à 20 ml (SERVAIS, 1988). Le temps d'incubation à température *in situ* en présence de thymidine tritiée à concentration saturante (20 nM) a été porté à 20 heures après vérification de la constance du taux d'incorporation de radioactivité sur une telle période dans les conditions expérimentales utilisées. Dans les milieux oligotrophes, une fraction parfois importante de la (méthyl-³H) thymidine est incorporée dans d'autres macromolécules que l'ADN, les protéines notamment (SERVAIS, 1988). Il est donc important de mesurer spécifiquement l'incorporation dans l'ADN et non dans la fraction macromoléculaire précipitable à l'acide trichloroacétique (TCA), comme habituellement effectué. A cet effet, la procédure proposée par WICKS et ROBARTS (1987) a été utilisée. Elle permet d'éliminer, par rinçages successifs, les autres macromolécules que l'ADN retenues sur la membrane de 0,2 µm. En comparant, sur une dizaine d'échantillons du réseau, cette procédure avec l'incorporation dans l'ensemble des macromolécules précipitables au TCA, nous avons montré que la radioactivité incorporée dans l'ADN ne représentait qu'en moyenne 40 % de celle incorporée dans les macromolécules.

3.2.2 Mesure d'incorporation de leucine tritiée

Le principe de la méthode consiste à additionner de la leucine tritiée à un échantillon d'eau contenant les bactéries et à mesurer le taux d'incorporation de radioactivité dans les protéines, afin d'estimer le taux de synthèse protéique. Pour ce faire, après incubation en présence de leucine tritiée, on mesure la radioactivité incorporée dans la fraction insoluble à l'acide trichloroacétique chaud qui comprend les protéines (KIRCHMAN *et al.*, 1985). Si la finalité de cette méthode et de celle d'incorporation de thymidine est donc d'estimer la

production bactérienne, les deux méthodes diffèrent néanmoins en ce que l'incorporation de leucine dans les protéines mesure directement un accroissement de la biomasse bactérienne, tandis que l'incorporation de thymidine est, pour sa part, une estimation du taux de replication. La spécificité de l'incorporation de leucine à des concentrations nanomolaires vis-à-vis des bactéries a été démontrée par HOPPE (1976) et KIRCHMAN *et al.* (1985). Pour déduire de la mesure d'incorporation de leucine tritiée le taux de synthèse protéique, il faudrait connaître le marquage effectif du pool intracellulaire de leucine, à partir duquel se fait la synthèse protéique. Or, le marquage de ce pool ne résulte pas seulement de l'incorporation dans ce pool de la leucine ajoutée, mais également de l'incorporation de leucine préalablement présente dans l'échantillon naturel, ainsi que de la production endogène de leucine par la biosynthèse à partir de précurseurs. Il en résulte que la radioactivité spécifique du pool interne de leucine est toujours inférieure à l'activité spécifique de la leucine additionnée. Le calcul de la synthèse protéique effectué à partir de cette dernière aboutirait donc à une sous-estimation. SERVAIS (1990) a montré que, en travaillant à différentes concentrations en leucine exogène, il est possible de calculer, par extrapolation, la vitesse d'incorporation de radioactivité dans les protéines correspondant à un marquage du pool interne de leucine égal à celui du pool externe. Pour ce faire, après calcul pour chaque concentration en leucine (L) de la fraction de leucine incorporée par heure dans les protéines (F), la relation suivante est utilisée :

$$\frac{1}{F} = \frac{1}{V_p} L + I$$

où V_p représente le taux de synthèse protéique exprimé en mole de leucine incorporée par litre et par heure, et

I le facteur de dilution isotopique dû à la fois à l'incorporation de leucine présente naturellement dans l'échantillon et de la biosynthèse endogène de leucine.

Pratiquement, on porte $1/F$ en fonction de L et V_p est déterminé comme l'inverse du coefficient angulaire de la droite de régression.

Dans les eaux de distribution, après des tests sur la sensibilité de la méthode, nous avons travaillé à une concentration en leucine marquée de 6 nM dans les différents sous-échantillons. Les concentrations en leucine froide ajoutée pour obtenir les différentes concentrations en leucine sont de 0, 25 et 50 nM. Le temps d'incubation a été fixé à trois heures ; au-delà de cette période, pour certains échantillons, on quitte la phase linéaire d'incorporation du tracteur. La figure 3 montre un exemple de détermination de la vitesse de synthèse protéique (V_p) à partir des résultats expérimentaux.

3.2.3 Comparaison des deux méthodes

Les deux méthodes ont été appliquées en parallèle sur 70 échantillons d'eau de réseau. Le taux d'incorporation de thymidine tritiée varie entre 0,047 et 17 pmole/l.h et celui d'incorporation de leucine entre 1,41 et 500 pmole/l.h. La figure 4 présente la relation entre les résultats obtenus par les deux méthodes.

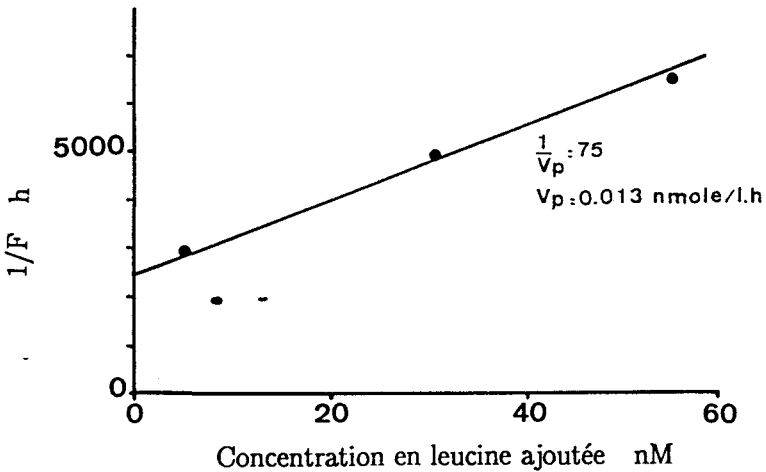


Figure 3 Détermination de la vitesse de synthèse protéique exprimée en nmole de leucine incorporée par litre et par heure au moyen de la relation entre l'inverse de la vitesse relative d'incorporation de radioactivité dans les protéines ($1/F$) et la concentration en leucine ajoutée (L).

Determination of the protein synthesis rate expressed in nmole of leucine incorporated per liter and per hour using the relationship between the inverse of the relative rate of radioactivity incorporation into proteins ($1/F$) and the added leucine concentration (L).

L'équation de la droite de corrélation :

$$\text{Log} [\text{Inc leu (pmole/l.h)}] = 0,97 \text{ Log} [\text{Inc thy (pmole/l.h)}] + 1,35$$

$$n = 69 \quad r = 0,84$$

montre que la relation entre les deux méthodes est quasi linéaire (coefficient angulaire proche de 1 en échelle logarithmique). La corrélation entre les deux méthodes est bonne ($r = 0,84$) et montre la cohérence de ces deux méthodes, qui peuvent être utilisées pour la mesure de l'activité bactérienne dans l'eau de distribution. Néanmoins, des écarts à la corrélation sont observés, diverses hypothèses peuvent être avancées pour les expliquer :

- la variabilité du rapport protéine/ADN dans les populations bactériennes du réseau qui induit une variation du rapport d'incorporation des deux traceurs ;
- l'éventuel découplage entre synthèse protéique et synthèse de matériel génétique pour des bactéries en croissance non balancée ;
- la précision des méthodes. Pour l'incorporation de thymidine, la précision de la méthode a été estimée à environ 5 % sur base de séries de répliquats ; elle est moins bonne pour l'incorporation de leucine. Dans cette dernière méthode, le taux de synthèse protéique est obtenu par calcul sur base des taux d'incorporation de leucine ajoutée à différentes concentrations. Pour des raisons pratiques et de coût d'expérimentation, nous avons travaillé à trois concentrations en leucine, ce qui s'avère un peu insuffisant pour obtenir une bonne précision sur la détermination du taux de synthèse protéique.

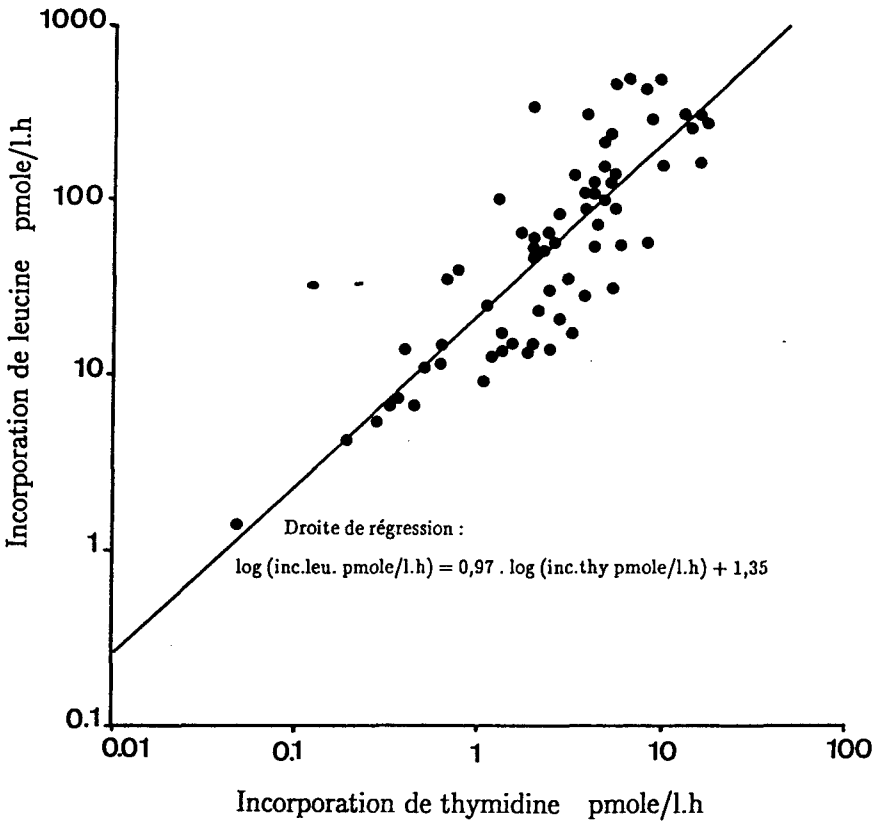


Figure 4 Relation entre le taux de synthèse protéique (exprimé en taux d'incorporation de leucine dans les protéines) et le taux d'incorporation de thymidine dans l'ADN.
Relationship between the protein synthesis rate expressed in leucine incorporation rate) and the thymidine incorporation rate into DNA.

Le rapport molaire moyen entre le taux d'incorporation de leucine et le taux d'incorporation de thymidine compris entre 20 et 25 est-il compatible avec les connaissances précédemment acquises sur l'incorporation de ces deux traceurs par les bactéries ? Les facteurs expérimentaux de conversion de l'incorporation de thymidine dans l'ADN en production cellulaire sont en général compris entre 1×10^{18} et 2×10^{18} bactéries produites par mole de thymidine incorporée (RIEMANN *et al.*, 1987 ; SERVAIS, 1988). Dans cette étude, le contenu cellulaire moyen en carbone des bactéries a été estimé à 30×10^{-15} gC/bactérie, sur la base des estimations microscopiques de biovolume cellulaire et d'une conversion en carbone grâce aux valeurs de contenu en carbone par unité de biovolume proposées par SIMON et AZAM (1989), qui tiennent compte de la variation de densité des cellules bactériennes en fonction de leur taille. Ceci signifie que l'incorporation d'un mole de thymidine correspond en

moyenne à une production de biomasse de 45000 gC (en utilisant un facteur de conversion moyen de $1,5 \times 10^{18}$ bactérie par mole de thymidine incorporée), et que cette production correspond aussi à l'incorporation de 20 à 25 moles de leucine. Dans ce cas, le facteur de conversion pour l'incorporation de leucine en production de biomasse serait comprise entre 1800 et 2250 gC par mole de leucine incorporée. Ces valeurs sont tout à fait dans la gamme des quelques valeurs citées dans la littérature pour des milieux aquatiques naturels et compris entre 1500 et 4000 gC par mole de leucine incorporée (SIMON et AZAM, 1989 ; SERVAIS, 1990). Ceci montre la cohérence des valeurs d'incorporation des deux traceurs obtenues dans cette étude sur les eaux de distribution avec les résultats obtenus par les mêmes méthodes dans les milieux aquatiques naturels. Ces deux méthodes semblent donc des voies intéressantes à suivre pour l'étude de l'activité des bactéries contenues dans l'eau de distribution. Grâce aux mesures d'activité effectuées en parallèle avec des dénombrements, l'activité spécifique des bactéries peut de plus être calculée. Par exemple, à partir des taux d'incorporation de thymidine, des activités spécifiques dans la gamme $0,3 \times 10^{-20}$ à 6×10^{-20} mole de thymidine/cellule ont été observées sur les échantillons du réseau de la banlieue parisienne. Les plus élevées de ces activités spécifiques sont dans la gamme de ce qui peut être observé en milieu aquatique naturel à des températures équivalentes (BILLEN *et al.*, 1990 ; TORRETON *et al.*, 1989).

CONCLUSION

Les comparaisons des méthodes pour le dénombrement bactérien dans les eaux de distribution ont abouti, d'une part, à confirmer la sous-estimation de l'abondance bactérienne évaluée par la méthode de dénombrement sur gélose et, d'autre part, à suggérer l'utilisation de la microscopie à épifluorescence plutôt que le dosage de l'ADN pour l'énumération des bactéries totales.

Après modifications des protocoles expérimentaux utilisés pour leur application aux milieux aquatiques naturels, l'incorporation de thymidine tritiée et l'incorporation de leucine tritiée sont tout à fait applicables à la mesure de l'activité bactérienne dans les eaux de distribution et elles donnent des résultats cohérents entre eux. La méthode d'incorporation de thymidine est plus simple à utiliser (un seul échantillon à traiter contre trois au minimum pour l'incorporation de leucine) et elle est aussi sensible, car bien que la vitesse d'incorporation soit moins rapide, elle autorise des incubations plus longues. L'application des mesures d'activité, telles que celles décrites ci-dessus, apparaît tout à fait nécessaire à la compréhension de la dynamique des populations bactériennes présentes dans un réseau de distribution. Ainsi récemment, en utilisant ce type de procédure, SERVAIS *et al.* (1992) ont mis en évidence la part relative des bactéries présentes dans l'eau et des bactéries fixées aux parois des canalisations dans la consommation de carbone organique durant le transit de l'eau dans un réseau de distribution.

REMERCIEMENTS

Cette étude a été réalisée pour le compte du Syndicat des Eaux d'Ile de France. Les auteurs remercient les membres du Groupe Traitement de l'Eau et le personnel de l'agence d'Argenteuil à l'exploitation de la Banlieue de Paris de la Compagnie Générale des Eaux qui ont effectué le prélèvement des échantillons. L'assistance technique de A. Anzil s'est révélée précieuse au cours de l'ensemble de l'étude. Les mesures de dénombrement sur milieu gélosé ont été effectuées au laboratoire central de la Compagnie Générale des Eaux de Maisons-Laffitte.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- AZAM F., FUHRMAN J.A., 1984. Measurement of bacterioplankton growth in the sea and its regulation by environmental conditions. In : J.E. Hobbie and P.J. LeB Williams, ed., *Heterotrophic activity in the sea*, Plenum Press, New York.
- BILLEN G., JOIRIS C., MEYER-REIL L., LINDEBOOM H., 1990. Role of bacteria in the North Sea ecosystem. *Neth. J. Sea. Res.*, 26 : 265-293.
- BILLEN G., SERVAIS P., BECQUEVORT S., 1990. Dynamics of bacterioplankton in oligotrophic and eutrophic aquatic environments : bottom-up or top-down control ? *Hydrobiologia*, 207 : 37-42.
- BYRD J.J., XU H.S., COLWELL R.R., 1991. Viable but non culturable bacteria in drinking water. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57 : 875-878.
- COLWELL R.R., BRAYTON P.R., GRIMES D.J., ROSZAK D.B., HUQ S.A., PALMER L.M., 1985. Viable but non-culturable *Vibrio cholerae* and related pathogens in the environment : implications for release of genetically engineered micro-organisms. *Biotechnology*, 3 : 817-820.
- FUHRMAN J.A., AZAM F., 1980. Bacterioplankton secondary production estimates for coastal waters of British Columbia. Antarctica and California. *Appl. Environ. Microbiol.*, 39 : 1085-1095.
- FUHRMAN J.A., AZAM F., 1982. Thymidine incorporation as a measure of heterotrophic bacterioplankton production in marine surface waters : evaluation and field results. *Mar. Biol.*, 66 : 109-120.
- GRIMES D.J., COLWELL R.R., 1986. Viability and virulence of *Escherichia coli* suspended by membrane chamber in semi-tropical ocean water. *FEMS Microbiology Letters*, 34 : 161-165.
- HAUDIDIER K., PAQUIN J.L., FRANCAIS T., HARTEMANN P., GRAPIN G., COLLIN F., JOURDAIN M.J., BLOCK J.C., CHERON J., PASCAL O., LEVI Y., MIAZGA J., 1988. Bio-film growth in drinking water network : a preliminary industrial pilot plant experiment. *Wat. Sci. Techn.*, 20 : 109-115.
- HOBBIE J.E., DALEY R.J., JASPERS S., 1977. Use of nuclepore filters for counting bacteria by fluorescence microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.*, 33 : 1225-1228.
- HOPPE H.G., 1976. Determination and properties of actively metabolizing heterotrophic bacteria in the sea, investigated by means of microautoradiography, *Mar. Biol.*, 36 : 291-302.
- KIRCHMAN D.L., K'NEES E., HODSON R., 1985. Leucine incorporation and its potential as a measure of protein synthesis by bacteria in natural aquatic systems. *Appl. Environ. Microbiol.*, 49 : 599-607.

- KOGURE K., SIMIDU U., TAGA N., 1979. A tentative direct microscope method of counting living marine bacteria. *Can. J. Microbiol.*, 27 : 415-420.
- KOGURE K., SIMIDU U., TAGA N., COLWELL R.R., 1987. Correlation of direct viable counts with heterotrophic activity for marine bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 53 : 2332-2337.
- LE CHEVALLIER M.W., BABCOCK T.M., LEE R.G., 1987. Examinations and characterization of distribution system biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.*, 53 : 2714-2724.
- MARTIN R., GATES W., TOBIN R., GRANTHAM D., 1982. Factors affecting coliform bacteria growth in distribution systems. *Journal A. W. W. A.*, 74 : 34-37.
- MC COY W.F., OLSON B.H., 1985. Fluorimetric determination of the DNA concentration in municipal drinking water. *Appl. Environ. Microbiol.*, 49 : 811-817.
- RIEMANN B., BJORNSEN P., NEWELL S., FALLON R., 1987. Calculation of cell production of coastal marine bacteria based on measured incorporation of (³H)thymidine. *Limnol. Oceanogr.*, 32 : 471-476.
- ROSZAK D.B., GRIMES D.J., COLWELL R.R., 1984. Viable but non-recoverable stage of *Salmonella enteritidis* in aquatic systems. *Can. J. Microbiol.*, 30 : 334-338.
- SERVAIS P., 1988. Mesure de la production bactérienne par incorporation de thymidine tritiée. *Sciences de l'Eau*, 1 : 217-237.
- SERVAIS P., 1990. Estimation de la production bactérienne en milieu marin par mesure du taux de synthèse protéique. *Oceanologica Acta*, 13 : 229-235.
- SERVAIS P., GARNIER J., 1990. Activité bactérienne hétérotrophe dans la Seine : profils d'incorporation de thymidine et de leucine tritiées. *C.R. Acad. Sci. Paris*, 311 (III) : 353-360.
- SERVAIS P., LAURENT P., BILLEN G., LEVI Y., 1992. Etude de la colonisation bactérienne des réseaux de distribution. *T.S.M. - L'eau* (sous presse).
- SIMON M., AZAM F., 1989. Protein content and protein synthesis rates of planktonic marine bacteria. *Mar. Ecol. Progr. Ser.*, 51 : 201-213.
- STANIER, R.Y., ADELBERG E.A., INGRAHAM J.L., 1985. Ch. V : The Procarotes : An Introduction survey, pp. 118-152, *General Microbiology*. Fourth edition.
- TABOR P.S., NEIHOF R.A., 1984. Improved microautoradiographic method to determine individual micro-organisms active in substrate uptake in natural waters. *Appl. Environ. Microbiol.*, 44 : 945-953.
- TORRETON J.P., GUIRAL D., ARFI R., 1989. Bacterioplankton biomass and production during destratification in a monomictic eutrophic bay of a tropical lagoon. *Mar. Ecol. Progr. Ser.*, 57 : 53-67.
- WALLACE R.J., MOROWITZ H.J., 1973. Genome size and evolution. *Chromosoma*, 40 : 121-126.
- WICKS R.J., ROBERTS R.D., 1987. The extraction and purification of DNA labelled with methyl-³H thymidine in aquatic bacterial production studies. *J. Plankton Res.*, 9 : 1159-1166.
- ZIMMERMAN R., ITURRIAGA R., BECKER-BIRCK J., 1978. Simultaneous determination of the total number of aquatic bacteria and the number thereof involved in respiration. *Appl. Environ. Microbiol.*, 36 : 926-935.