

19 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
COURBEVOIE

11 N° de publication :
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

3 078 076

21 N° d'enregistrement national : 18 51495

51 Int Cl⁸ : C 12 Q 1/02 (2018.01), G 01 N 33/18

12 DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

22 Date de dépôt : 21.02.18.

30 Priorité :

43 Date de mise à la disposition du public de la demande : 23.08.19 Bulletin 19/34.

56 Liste des documents cités dans le rapport de recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du présent fascicule*

60 Références à d'autres documents nationaux apparentés :

○ Demande(s) d'extension :

71 Demandeur(s) : CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS) — FR et UNIVERSITE DE NANTES — FR.

72 Inventeur(s) : THOUAND GERALD, DURAND-THOUAND MARIE-JOSE et JOUANNEAU SULIVAN.

73 Titulaire(s) : CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS), UNIVERSITE DE NANTES.

74 Mandataire(s) : IPSILON.

54 METHODE D'EVALUATION DE LA TENEUR EN MATIERE ORGANIQUE BIODEGRADABLE D'UN ECHANTILLON AQUEUX ET KIT POUR SA REALISATION.

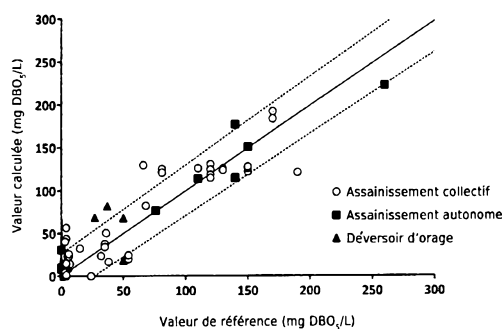
57 Méthode d'évaluation de la teneur en matière organique biodégradable d'un échantillon aqueux comprenant les étapes successives suivantes :

- répartition de différentes fractions de l'échantillon dans des cellules de mesure renfermant chacune une souche bactérienne unique, non pathogène, isolée du milieu naturel, lesdites souches appartenant au panel suivant : Firmicutes, Actinobacteria et Proteobacteria ;

- ajout dans chaque cellule d'un marqueur fluorescent ou coloré de l'activité respiratoire des dites bactéries dans une enceinte thermostatée ;

- suivi par spectrophotométrie de l'activité bactérienne de chaque fraction d'échantillon pendant au moins une heure, le résultat final et/ou les résultats cinétiques des enregistrements relatifs à chaque fraction fournissant des informations sur l'activité métabolique des bactéries, et donc une évaluation de la teneur globale en matière organique biodégradable de l'échantillon aqueux. Une corrélation avec la méthode DBO₅ standard est présentée.

Utilisation pour des effluents de station d'épuration, industriels ou d'élevage ou d'eaux naturelles.



FR 3 078 076 - A1



DOMAINE DE L'INVENTION

La présente invention concerne une méthode d'évaluation de la teneur en matière organique biodégradable d'un échantillon aqueux, un kit pour réaliser
5 cette évaluation et son application à des effluents tels que des effluents de stations d'épuration, effluents industriels ou effluents d'élevage.

ART ANTERIEUR

Les eaux usées urbaines, industrielles ou issues de l'agriculture sont
10 généralement fortement chargées en matières organiques. Afin de déterminer les paramètres d'une épuration adaptée par voie biologique, ou pour vérifier la qualité des rejets en sortie d'une station d'épuration, il est nécessaire d'avoir une estimation de la charge en pollution organique biodégradable de ces effluents.

15

La mesure de la DBO₅ (Demande Biochimique en Oxygène à 5 jours) est un test largement utilisé aujourd'hui. Cette méthode, qui fait l'objet d'une norme (ISO 5815) repose sur la mesure de la consommation en oxygène d'un échantillon aqueux par les microorganismes aérobies dudit échantillon
20 dégradant les matières organiques présentes pendant une durée d'incubation de 5 jours à 20 °C à l'obscurité. La mesure de l'oxygène est réalisée par une méthode iodométrique ou au moyen d'une sonde électrochimique, la valeur de la DBO₅ étant exprimée en mg d'O₂/L. Cette méthode n'est adaptée qu'à des valeurs comprises entre 0 et 6 mg d'O₂/L, ce qui nécessite des dilutions
25 préalables, et présente une importante variabilité (de l'ordre de 20 %). De plus, sa durée (5 jours) rend impossible un suivi en ligne : par exemple le suivi de la qualité de rejets de stations d'épuration.

Certaines améliorations ont été apportées à cette méthode de mesure :
30 automatisation avec une mesure d'oxygène par sonde optique, méthode photométrique (suivi d'un colorant), ou méthode manométrique (modification de pression). Cependant, ces améliorations ne permettent pas d'avoir une

estimation inférieure à 5 jours de la charge en pollution organique biodégradable des échantillons.

Pour obtenir des informations plus rapides et permettre une mesure en ligne de la matière carbonée biodégradable, des biocapteurs ont été développés. Cependant ces dispositifs nécessitent une phase préalable lourde de calibration et de paramétrage sur site.

Par ailleurs, des mesures alternatives à la mesure traditionnelle de la DBO₅ ont été proposées : par exemple les mesures réalisées par spectroscopie reposent sur une extrapolation de la teneur en matière organique biodégradable faite à partir de l'interprétation de spectres UV. De telles mesures sont peu précises.

Si les méthodes présentées ci-dessus améliorent partiellement la mise en œuvre de la DBO₅ ou permettent une estimation plus rapide de la charge en matière organique biodégradable d'un échantillon, elles sont soit incomplètes, soit imprécises et/ou peu adaptées à des mesures continues permettant de répondre aux besoins de gestion des effluents.

20

BUTS DE L'INVENTION

Un premier but de l'invention est donc de proposer une méthode d'évaluation de la teneur en matière organique biodégradable d'un échantillon aqueux qui soit rapide (de préférence quelques heures), permettant par exemple de répercuter l'information sur des conditions d'épuration, précise et reproductible.

Un autre but de l'invention est de proposer une méthode permettant d'estimer la teneur en matière organique biodégradable sur une large concentration, sans nécessiter de dilution de l'échantillon et tout en réduisant la variabilité entre les mesures.

30

Un autre but de l'invention est de proposer une méthode aisée à mettre en

œuvre et pouvant être automatisée.

Enfin, un autre but de l'invention est de proposer une méthode dont les résultats puissent être convertis en valeur équivalente à la valeur de DBO₅ définie par la norme actuelle.

DESCRIPTION DE L'INVENTION

A cet effet la présente invention concerne une méthode d'évaluation de la teneur en matière organique biodégradable d'un échantillon aqueux comprenant les étapes successives suivantes :

- répartition de différentes fractions de l'échantillon aqueux dans au moins quatre cellules de mesure renfermant chacune une souche bactérienne unique, non pathogène, isolée du milieu naturel, lesdites souches bactériennes appartenant au panel suivant : *Firmicutes*, *Actinobacteria*, et *Proteobacteria*, notamment *Betaproteobacteria* et *Gammaproteobacteria* ;
- ajout dans chaque cellule d'un marqueur de l'activité métabolique des bactéries, tel qu'un marqueur fluorescent et/ou coloré de l'activité respiratoire des dites bactéries ;
- placement des cellules de mesure dans une enceinte thermostatée ;
- suivi par spectrophotométrie de l'activité bactérienne de chaque fraction d'échantillon pendant au moins une, de préférence trois heures, le résultat final et/ou les résultats cinétiques (paramètres cinétiques de la biodégradation) relatifs à chaque fraction fournissant des informations sur l'activité métabolique des bactéries, et donc une évaluation de la teneur globale en matière organique biodégradable de l'échantillon aqueux.

Il s'avère que cette méthode permet d'obtenir une estimation très rapide, en quelques heures (une à trois heures généralement) de la teneur en matière organique biodégradable d'un échantillon, ce qui permet par exemple un suivi quasi en temps réel de la qualité d'épuration d'un traitement biologique d'une station. L'estimation de la réponse de chaque souche bactérienne est prise individuellement.

Par "suivi", on entend par exemple une mesure à intervalles réguliers de la fluorescence de l'échantillon. Le résultat final donnant une information sur la concentration de la matière organique biodégradable de l'échantillon et la
5 pente de la courbe une information sur la vitesse de biodégradation par la souche bactérienne en présence.

Le marqueur de l'activité métabolique des bactéries est avantageusement la résazurine.

10

En effet, la molécule de résazurine est réduite en résorufine de couleur rose en présence d'une activité métabolique cellulaire, cette réaction étant quantitativement corrélée à la respiration bactérienne et donc à la concentration en oxygène induite par la dégradation biologique de la matière
15 organique dans l'échantillon considéré. Avec ce marqueur, le suivi de l'activité métabolique peut être réalisé par colorimétrie (pic d'absorbance de la résazurine : 601 nm / pic d'absorbance de la résorufine : 571 nm) et/ou par spectrophotométrie de fluorescence à une longueur d'onde d'excitation de 540 nanomètres et une longueur d'onde d'émission de 610 nanomètres environ.

20

La méthode selon l'invention permet ainsi d'estimer la teneur en matière organique biodégradable sur une large concentration, allant de 0 à au moins 300 mg O₂/L, sans nécessiter de dilution de l'échantillon, ce qui présente un avantage très important par rapport aux méthodes mettant en œuvre des
25 sondes à oxygène par exemple qui sont limitées à 6 mg O₂/L environ.

La présente méthode peut aisément être automatisée.

De manière préférée, chaque cellule de mesure est préparée selon les étapes successives suivantes :

30

- isolement et culture de la souche bactérienne sélectionnée,
- lavage pour éliminer toute impureté carbonée,
- puis conditionnement dans ladite cellule avec ajout d'un agent protecteur de

la souche bactérienne vis-à-vis de la lyophilisation,

- lyophilisation de la souche bactérienne pour sa conservation,

- puis, avant son utilisation pour l'évaluation de la teneur en matière organique dégradable d'un échantillon aqueux, réhydratation et régénération au moyen

5 d'une solution aqueuse de régénération de type tampon NPK, et maintien de la souche bactérienne dans un incubateur pendant environ vingt heures permettant aux bactéries de consommer le carbone résultant des résidus cellulaires de bactéries mortes pendant les étapes précédentes (dénommée étape d'épuisement de la partie carbonée).

10

L'étape de culture de la souche bactérienne permet notamment d'avoir des bactéries en phase exponentielle de croissance avec une population homogène.

15 L'agent de protection est avantageusement une substance non biodégradée par la souche bactérienne considérée. On peut utiliser par exemple un diholoside tel que le saccharose ou un triholoside tel que le raffinose.

L'étape de lyophilisation est de préférence précédée d'une phase de
20 congélation dans une plage de -20°C à -80°C , la lyophilisation ayant lieu à une température inférieure à -40°C sous une pression inférieure à 0,10 mbar (par exemple environ 0,05 mbar).

La lyophilisation dans ces conditions permet une conservation des bactéries,
25 sans affecter leur activité.

Les souches bactériennes utilisées dans la présente méthode ont été isolées du milieu naturel. Ce sont, en particulier, des microorganismes fréquemment rencontrés dans les eaux usées urbaines.

30

Selon un mode de réalisation avantageux de l'invention les souches bactériennes sont choisies parmi : *Acinetobacter towneri*, *Paracoccus*

pantotrophus, *Arthrobacter aurescens*, *Proteus mirabilis*, *Bacillus funiculus*,
Pseudomonas aeruginosa, *Bacillus mycoides*, *Bacillus subtilis* subsp. *Subtilis*,
Pseudomonas putida, *Bosea vestrisii*, *Budvicia aquatica*, *Rhizobium*
radiobacter, *Comamonas denitrificans*, *Rhodococcus rhodochrous*,
5 *Comamonas testosteroni*, *Sphingobium yanoikuyae*, *Corynebacterium*
pseudodiphtheriticum, *Staphylococcus auricularis*, *Cupriavidus necator*,
Staphylococcus sp., *Enterobacter helveticus*, *Thauera linaloolentis*, *Escherichia*
coli, *Variovorax paradoxus*, *Paracoccus denitrificans*, *Zoogloea resiniphila*.

10 Plus particulièrement les différentes fractions de l'échantillon aqueux sont
réparties dans au moins 6, de préférence au moins 8, cellules de mesure
renfermant chacune une souche bactérienne appartenant à l'un des groupes
suivants :

- groupe A : *Bacillus funiculus*, *Bosea vestrisii*, *Zoogloea resiniphila*, *Paracoccus*
15 *pantotrophus*, *Budvicia aquatica*, ou *Acinetobacter towneri*,
- groupe B : *Thauera linaloolentis*, *Comamonas denitrificans*, *Comamonas*
testosteroni, *Bacillus mycoides*, ou *Rhodococcus rhodochrous*,
- groupe C : *Pseudomonas aeruginosa*, *Cupriavidus necator*, ou *Pseudomonas*
putida,
- 20 - groupe D : *Escherichia coli*, ou *Enterobacter helveticus*,
- groupe E : *Variovorax paradoxus*,
- groupe F : *Staphylococcus auricularis*, ou *Corynebacterium pseudo-*
diphtheriticum,
- groupe G : *Paracoccus denitrificans*, ou *Proteus mirabilis*,
- 25 - groupe H : *Rhizobium radiobacter*, *Bacillus subtilis* subsp. *Subtilis*,
Staphylococcus sp., *Sphingobium yanoikuyae*, ou *Arthrobacter aurescens*.

Il est en effet apparu que les souches considérées pouvaient être classées en
groupes de profils métaboliques de biodégradation similaires, les souches
30 bactériennes d'un même groupe étant capables de dégrader les mêmes
composés organiques.

Ainsi, à titre d'exemple, les différentes fractions de l'échantillon aqueux peuvent être réparties dans des cellules de mesure renfermant chacune une souche bactérienne unique comprenant au moins les huit souches bactériennes suivantes : *Bacillus subtilis subsp. Subtilis*, *Budvicia aquatica*,
5 *Comamonas testosteroni*, *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*, *Cupriavidus necator*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas putida*, *Rhodococcus rhodochrous*, *Variovorax paradoxus*.

La présente invention concerne également un kit pour réaliser l'évaluation de
10 la teneur en matière organique biodégradable d'un échantillon aqueux, ledit kit comprenant :

- au moins quatre cellules de mesure, de préférence six cellules, de préférence encore huit cellules de mesure, chacune renfermant une souche bactérienne unique, non pathogène, isolée du milieu naturel, et lyophilisée en présence
15 d'un agent de protection,
- un marqueur d'activité métabolique desdites bactéries, de préférence, un marque fluorescent et/ou coloré,
- une notice détaillée de mise en œuvre de la méthode telle que décrite ci-dessus.

20

Les cellules de mesure sont avantageusement des flacons transparents, par exemple en verre, fermés, de préférence sous la forme de tubes, individuels ou agencés par exemple en microplaques.

25 La présente invention concerne également l'utilisation de la méthode d'évaluation décrite ci-dessus, pour la quantification de la teneur en matière organique biodégradable d'un échantillon aqueux de stations d'épuration, d'effluents industriels ou d'effluents d'élevage, ou encore des eaux naturelles telles que des eaux de surface, des eaux souterraines ou des eaux marines.

30

Une utilisation avantageuse porte sur la détermination de la demande biologique en oxygène (DBO₅), par traitement statistique des données,

obtenues lors du suivi spectrophotométrique de l'activité bactérienne dans chaque fraction d'échantillon, mettant en œuvre une méthode multivariée, tel qu'un algorithme par apprentissage supervisé de type réseau de neurones, permettant de corréler les résultats de ladite méthode à la valeur
5 correspondante de DBO_5 de la norme ISO 5815.

BREVE DESCRIPTION DES DESSINS

L'invention sera bien comprise à la lecture de la description suivante d'exemples de réalisation, en référence aux dessins annexés dans lesquels :

10

La figure 1 est un schéma présentant la capacité de biodégradation de différentes sources de carbone par différentes souches bactériennes, ces souches pouvant être classées en huit groupes dénommés de A à H ;

15 La figure 2, en deux parties, présente à gauche la cinétique de biodégradation des souches bactériennes présentées la figure 1, et le schéma de droite l'indice de résistance toxicologique de ces souches bactériennes ;

La figure 3 présente la corrélation (régression linéaire) obtenue par une
20 approche individuelle de chacune des huit souches bactériennes présentées, les courbes individuelles montrent l'activité biologique (en unité arbitraire u.a.) en fonction de la méthode de référence DBO_5 ;

La figure 4 présente différents essais de corrélation entre la valeur calculée par
25 la méthode de la présente invention exprimée en $mg\ BDO_5/L$ en fonction de la méthode de référence, pour des échantillons d'origines différentes (assainissement collectif, assainissement autonome, déversoir d'orage).

EXEMPLES

30 Les différentes étapes de préparation des souches bactériennes avant leur introduction dans les cellules de mesure sont présentées ci-après :

Etape 1 : Culture des souches avant lyophilisation

La souche bactérienne sélectionnée est isolée sur boîte de pétri (milieu LB gélosé : 5g/L NaCl, 5g/L Tryptone, 0,5g/L Extrait de levure, 12g/L d'agar) à 30°C pendant 24 à 48 heures. Elle est ensuite inoculée et incubée en milieu LB
5 (5g/L NaCl, 5g/L Tryptone et 0,5g/L Extrait de levure) à 30°C, sous agitation à 250 tours/min pendant 16 à 20 heures. La culture est suivie par densité optique (indicateur de densité cellulaire) à 620 nm, jusqu'à obtenir une culture homogène de bactéries en phase exponentielle de croissance.

10 Etape 2 : Lavage des souches

Après centrifugation (6400 tours par min/ 4min/ 4°C), le culot est lavé plusieurs fois par une solution de $MgSO_4$ 10^{-2} M, puis conditionné dans une solution de lyophilisation comprenant : 50% d'une solution d'acides aminés IF-A (<http://www.biolog.com>) complémentée en azote et phosphore et 50% de
15 raffinose à 117,8 g/L.

Etape 3 : Lyophilisation des souches

La solution de lyophilisation renfermant lesdites bactéries en suspension sont réparties de manière égale dans différents tubes, qui sont ensuite soumis à
20 une congélation à -80°C pendant au moins 3 heures, puis à une étape de lyophilisation à -50°C sous 0,05mbar pendant 36 heures. L'ensemble peut alors être conservé pendant plusieurs mois à -20 °C.

Etape 4 : Préparation de l'analyse

25 Les bactéries lyophilisées sont « remises en activité » par ajout d'une solution dite de régénération composée de KH_2PO_4 : 0,085 g/L, K_2HPO_4 : 0,2175 g/L, Na_2HPO_4 : 0,2665 g/L et NH_4Cl : 0,02 g/L.

La souche bactérienne « régénérée » est ensuite placée dans un incubateur pendant 20 heures à 30°C pour une étape d'épuisement du carbone, c'est-à-
30 dire de manière à permettre aux bactéries de consommer le carbone résultant des résidus cellulaires de bactéries mortes dans le milieu pendant les étapes précédentes (notamment pendant l'étape de lyophilisation).

Chaque tube renfermant une souche bactérienne unique est alors prêt pour l'analyse proprement dite.

Etape 5 : Analyse

- 5 A la suspension bactérienne régénérée et exempte de carbone interférent est ajouté le réactif résazurine puis l'échantillon à tester dans les proportions suivantes : 10% de marqueur (résazurine), 23,3 % de suspension bactérienne régénérée et 66,7 % d'échantillon à tester.

10 Le suivi de la respiration bactérienne est alors suivi par fluorescence (longueur d'onde d'excitation de 540 nm et longueur d'onde d'émission de 610 nm).

Chaque souche sélectionnée donne une information partielle.

15 Cependant pour obtenir une estimation plus globale de la teneur en matière organique biodégradable d'un échantillon, il est nécessaire de combiner les informations provenant de plusieurs souches bactériennes.

A cet effet, les inventeurs ont sélectionné 28 souches bactériennes (voir tableau 1) issues du milieu naturel et les ont confrontées à différentes sources organiques carbonées : les résultats sont présentés en figure 1.

| Souches | Collection |
|---|-------------|
| <i>Acinetobacter towneri</i> | DSM 14962 |
| <i>Arthrobacter aureescens</i> | DSM 20116 |
| <i>Bacillus funiculus</i> | DSM 15141 |
| <i>Bacillus mycoides</i> | DSM 299 |
| <i>Bacillus subtilis subsp. subtilis</i> | DSM 10 |
| <i>Bosea vestrisii</i> | DSM 21229 |
| <i>Budvicia aquatica</i> | DSM 5075 |
| <i>Comamonas denitrificans</i> | DSM 17887 |
| <i>Comamonas testosteroni</i> | DSM 38 |
| <i>Corynebacterium pseudodiphtheriticum</i> | CIP A105 |
| <i>Cupriavidus necator</i> | DSM 428 |
| <i>Enterobacter helveticus</i> | DSM 18396 |
| <i>Escherichia coli</i> | ATCC 700926 |
| <i>Paracoccus denitrificans</i> | DSM 1404 |

| Souches | Collection |
|-----------------------------------|------------|
| <i>Paracoccus pantotrophus</i> | DSM 65 |
| <i>Proteus mirabilis</i> | CIP A235 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | DSM 11634 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | DSM 6279 |
| <i>Pseudomonas putida</i> | DSM 1868 |
| <i>Pseudomonas putida</i> | DSM 84 |
| <i>Rhizobium radiobacter</i> | DSM 7215 |
| <i>Rhodococcus rhodochrous</i> | DSM 6427 |
| <i>Sphingobium yanoikuyae</i> | DSM 6900 |
| <i>Staphylococcus auricularis</i> | DSM 20609 |
| <i>Staphylococcus sp.</i> | DSM 1057 |
| <i>Thauera linaloolentis</i> | DSM 12138 |
| <i>Variovorax paradoxus</i> | DSM 645 |
| <i>Zoogloea resiniphila</i> | DSM 14766 |

DSM: Collection Allemande de microorganismes

ATCC: American Type Culture Collection

5 CIP: Collection de l'Institut Pasteur

Tableau 1

Ceci a permis notamment de classer des différentes souches bactériennes en
 10 8 groupes principaux (notés de A à H sur la figure 1), dans lesquels les bactéries présentaient un profil de biodégradation comparable.

Dans chacun des groupes, a été retenue la souche bactérienne ayant
 notamment la meilleure cinétique de biodégradation (voir figure 2 schéma de
 15 gauche) et/ou la meilleure résistance à des tests toxicologiques (réalisés par la méthode selon la demande de brevet français du même déposant déposée le même jour) (voir figure 3 : index de résistance toxicologique).

Les informations partielles (rapportées en valeur de DBO_5) données par
 20 chaque souche individuelle sélectionnée sont regroupées à la figure 4.

Corrélation avec la DBO_5

Les analyses des données sont basées sur l'ensemble des données regroupant les valeurs de fluorescence de chacune des souches obtenues

après trois heures d'exposition avec l'échantillon à analyser et les valeurs correspondantes de DBO₅ mesurées selon la norme ISO 5815.

Cette base de données comprend 208 conditions. De manière individuelle, la
5 corrélation entre les réponses des souches et les valeurs de références de DBO₅ est faible avec un coefficient de corrélation moyen de 0,11 (voir figure 4). Aucune souche n'est un indicateur pertinent de la DBO₅. Cependant, chaque souche sélectionnée fournit une information partielle.

10 En conséquence, la stratégie des inventeurs est fondée sur une analyse multi-composants prenant en compte l'information fournie par les huit souches sélectionnées.

L'approche multi-variée proposée dans la présente demande de brevet est
15 basée sur l'algorithme neuronal (réseau de neurones) pour estimer la DBO₅ d'un panel bactérien après seulement trois heures de mesure.

Dans un premier temps, la base de données générale (n=208) a été introduite dans le logiciel Neuro One (version 6.13.0.5, Nétral, France) pour réaliser des
20 modèles (réseaux de neurone-perceptron) permettant de convertir l'information biologique fournie par le panel bactérien en valeur de DBO₅.

Plusieurs architectures neuronales ont été comparées (nombre de neurones cachés, mode d'activation, standardisation des données). Plus de 800 modèles
25 ont été générés afin de sélectionner les meilleures architectures.

A partir des architectures sélectionnées, de nouveaux réseaux de neurones ont été générés avec le panel d'apprentissage. Le choix a été réalisé à partir du
taux de corrélation obtenu entre les valeurs estimées (panel bactérien) et la
30 référence de DBO₅ (voir figure 5) pour plusieurs types d'échantillon : assainissement collectif, assainissement non collectif ou eau de pluie.

Le modèle sélectionné consiste en une couche cachée de trois neurones activés par une fonction tangente hyperbolique. Ce modèle de réseaux de neurones a été capable de fournir une estimation de la DBO_5 ($R^2 = 0,851$ après seulement trois heures en comparaison des cinq jours requis par la méthode de référence).

En conséquence, la méthode d'évaluation selon la présente invention est une méthode robuste, fiable, apte à fournir des informations pouvant être corrélées avec la DBO_5 standard pour de larges gammes de concentrations de teneurs en matière organique biodégradable d'un échantillon aqueux.

REVENDICATIONS

1. Méthode d'évaluation de la teneur en matière organique biodégradable d'un échantillon aqueux comprenant les étapes successives suivantes :
- répartition de différentes fractions de l'échantillon aqueux dans au moins quatre cellules de mesure renfermant chacune une souche bactérienne unique, non pathogène, isolée du milieu naturel, lesdites souches bactériennes appartenant au panel suivant : *Firmicutes*, *Actinobacteria*, et *Proteobacteria*, notamment *Betaproteobacteria* et *Gammaproteobacteria* ;
 - ajout dans chaque cellule d'un marqueur de l'activité métabolique des bactéries, tel qu'un marqueur fluorescent et/ou coloré de l'activité respiratoire des dites bactéries ;
 - placement des cellules de mesure dans une enceinte thermostatée ;
 - suivi par spectrophotométrie de l'activité bactérienne de chaque fraction d'échantillon pendant au moins une, de préférence trois heures, le résultat final et/ou les résultats cinétiques relatifs à chaque fraction fournissant des informations sur l'activité métabolique des bactéries, et donc une évaluation de la teneur globale en matière organique biodégradable de l'échantillon aqueux.
2. Méthode selon la revendication 1, caractérisée en ce que chaque cellule de mesure est préparée selon les étapes successives suivantes :
- isolement et culture de la souche bactérienne sélectionnée,
 - lavage pour éliminer toute impureté carbonée,
 - puis conditionnement dans ladite cellule avec ajout d'un agent protecteur de la souche bactérienne vis-à-vis de la lyophilisation,
 - lyophilisation de la souche bactérienne pour sa conservation,
 - puis, avant son utilisation pour l'évaluation de la teneur en matière organique dégradable d'un échantillon aqueux, réhydratation et régénération au moyen d'une solution aqueuse de régénération de type tampon NPK, et maintien de la souche bactérienne dans un incubateur pendant environ vingt heures permettant aux bactéries de consommer le carbone résultant des résidus

cellulaires de bactéries mortes pendant les étapes précédentes (dénommée étape d'épuisement de la partie carbonée).

3. Méthode selon la revendication 2, caractérisée en ce que la phase de lyophilisation est précédée d'une phase de congélation dans une plage de -20°C à -80°C, la lyophilisation ayant lieu à une température inférieure à -40°C sous une pression inférieure à 0,10 mbar.

4. Méthode selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que le marqueur de l'activité métabolique des bactéries est la résazurine, le suivi de l'activité métabolique des bactéries étant réalisé par colorimétrie et/ou par spectrophotométrie de fluorescence.

5. Méthode selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que les souches bactériennes sont choisies parmi :

Acinetobacter towneri, *Paracoccus pantotrophus*, *Arthrobacter aurescens*, *Proteus mirabilis*, *Bacillus funiculus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus subtilis subsp. Subtilis*, *Pseudomonas putida*, *Bosea vestrisii*, *Budvicia aquatica*, *Rhizobium radiobacter*, *Comamonas denitrificans*, *Rhodococcus rhodochrous*, *Comamonas testosteroni*, *Sphingobium yanoikuyae*, *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*, *Staphylococcus auricularis*, *Cupriavidus necator*, *Staphylococcus sp.*, *Enterobacter helveticus*, *Thauera linaloolentis*, *Escherichia coli*, *Variovorax paradoxus*, *Paracoccus denitrificans*, *Zoogloea resiniphila*.

25

6. Méthode selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que les différentes fractions de l'échantillon aqueux sont réparties dans au moins 6, de préférence au moins 8, cellules de mesure renfermant chacune une souche bactérienne appartenant à l'un des groupes suivants :

30

- groupe A : *Bacillus funiculus*, *Bosea vestrisii*, *Zoogloea resiniphila*, *Paracoccus pantotrophus*, *Budvicia aquatica*, ou *Acinetobacter towneri*,

- groupe B : *Thauera linaloolentis*, *Comamonas denitrificans*, *Comamonas testosteroni*, *Bacillus mycoides*, ou *Rhodococcus rhodochrous*,
- groupe C : *Pseudomonas aeruginosa*, *Cupriavidus necator*, ou *Pseudomonas putida*,
- 5 - groupe D : *Escherichia coli*, ou *Enterobacter helveticus*,
- groupe E : *Variovorax paradoxus*,
- groupe F : *Staphylococcus auricularis*, ou *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*,
- groupe G : *Paracoccus denitrificans*, ou *Proteus mirabilis*,
- 10 - groupe H : *Rhizobium radiobacter*, *Bacillus subtilis subsp. Subtilis*, *Staphylococcus sp.*, *Sphingobium yanoikuyae*, ou *Arthrobacter aurescens*.

7. Méthode selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que les différentes fractions de l'échantillon aqueux sont

15 réparties dans des cellules de mesure renfermant chacune une souche bactérienne unique comprenant au moins les huit souches bactériennes suivantes : *Bacillus subtilis subsp. Subtilis*, *Budvicia aquatica*, *Comamonas testosteroni*, *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*, *Cupriavidus necator*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas putida*, *Rhodococcus*

20 *rhodochrous*, *Variovorax paradoxus*.

8. Kit pour réaliser l'évaluation de la teneur en matière organique biodégradable d'un échantillon aqueux, ledit kit comprenant :

- au moins quatre cellules de mesure, de préférence six cellules, de préférence
- 25 encore huit cellules de mesure, chacune renfermant une souche bactérienne unique, non pathogène, isolée du milieu naturel, et lyophilisée en présence d'un agent de protection,
- un marqueur d'activité métabolique desdites bactéries,
- une notice détaillée de mise en œuvre de la méthode conforme à l'une des
- 30 revendications précédentes.

9. Kit selon la revendication 8, caractérisé en ce que les cellules de mesure sont des flacons transparents, fermés, de préférence sous la forme de tubes individuels ou agencés en microplaques.

5 10. Utilisation de la méthode d'évaluation selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, pour la quantification de la teneur en matière organique biodégradable d'un échantillon aqueux de stations d'épuration, d'effluents industriels ou d'effluents d'élevage ou d'eaux naturelles telles que les eaux de surface, les eaux souterraines ou les eaux marines.

10

11. Utilisation de la méthode d'évaluation selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, pour la détermination de la demande biologique en oxygène (DBO_5), par traitement statistique des données, obtenues lors du suivi spectrophotométrique de l'activité bactérienne dans chaque fraction
15 d'échantillon, mettant en œuvre une méthode multivariée, tel qu' un algorithme par apprentissage supervisé de type réseau de neurones, permettant de corrélérer les résultats de ladite méthode à la valeur correspondante de DBO_5 de la norme ISO 5815.

Souches bactériennes

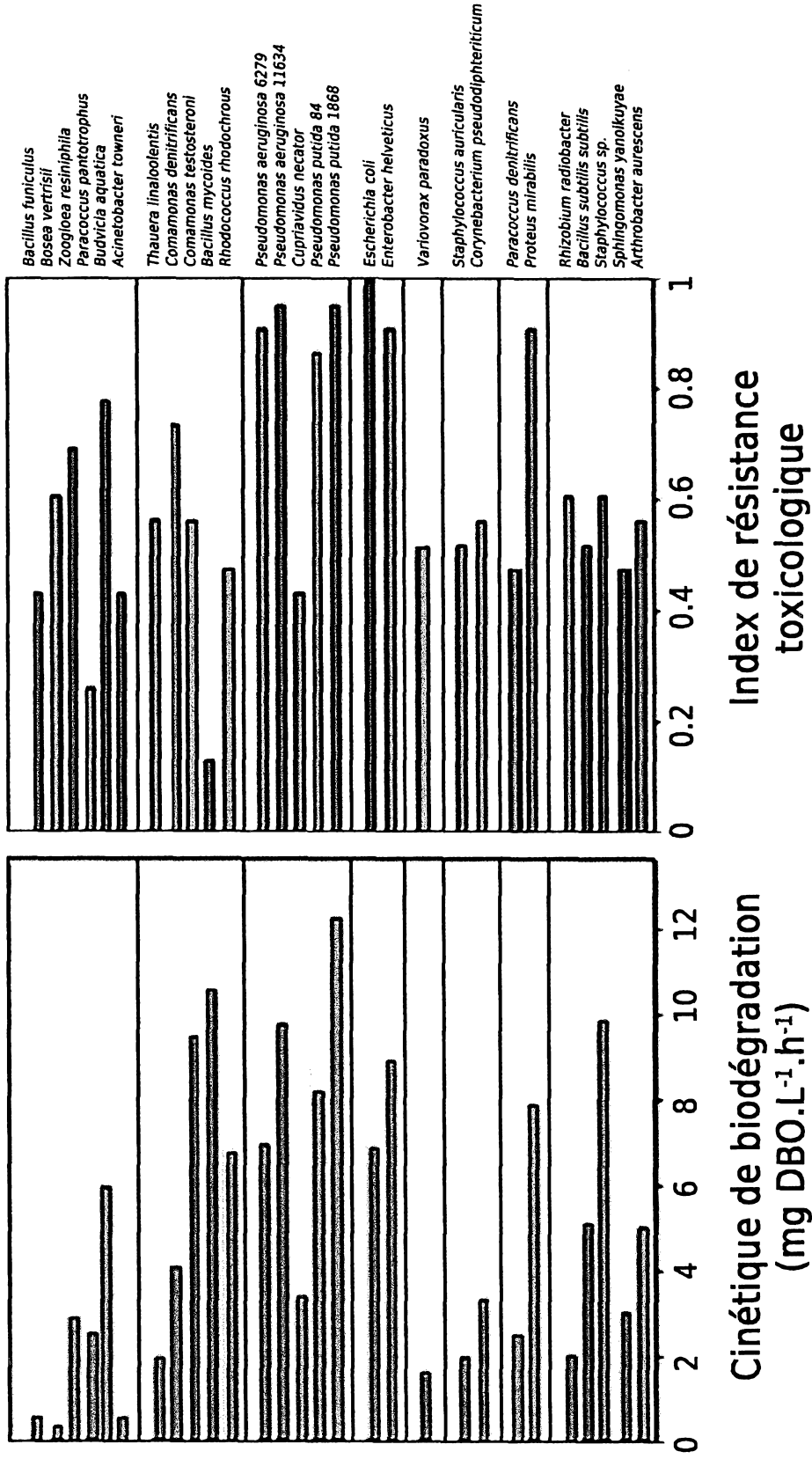


Fig. 2

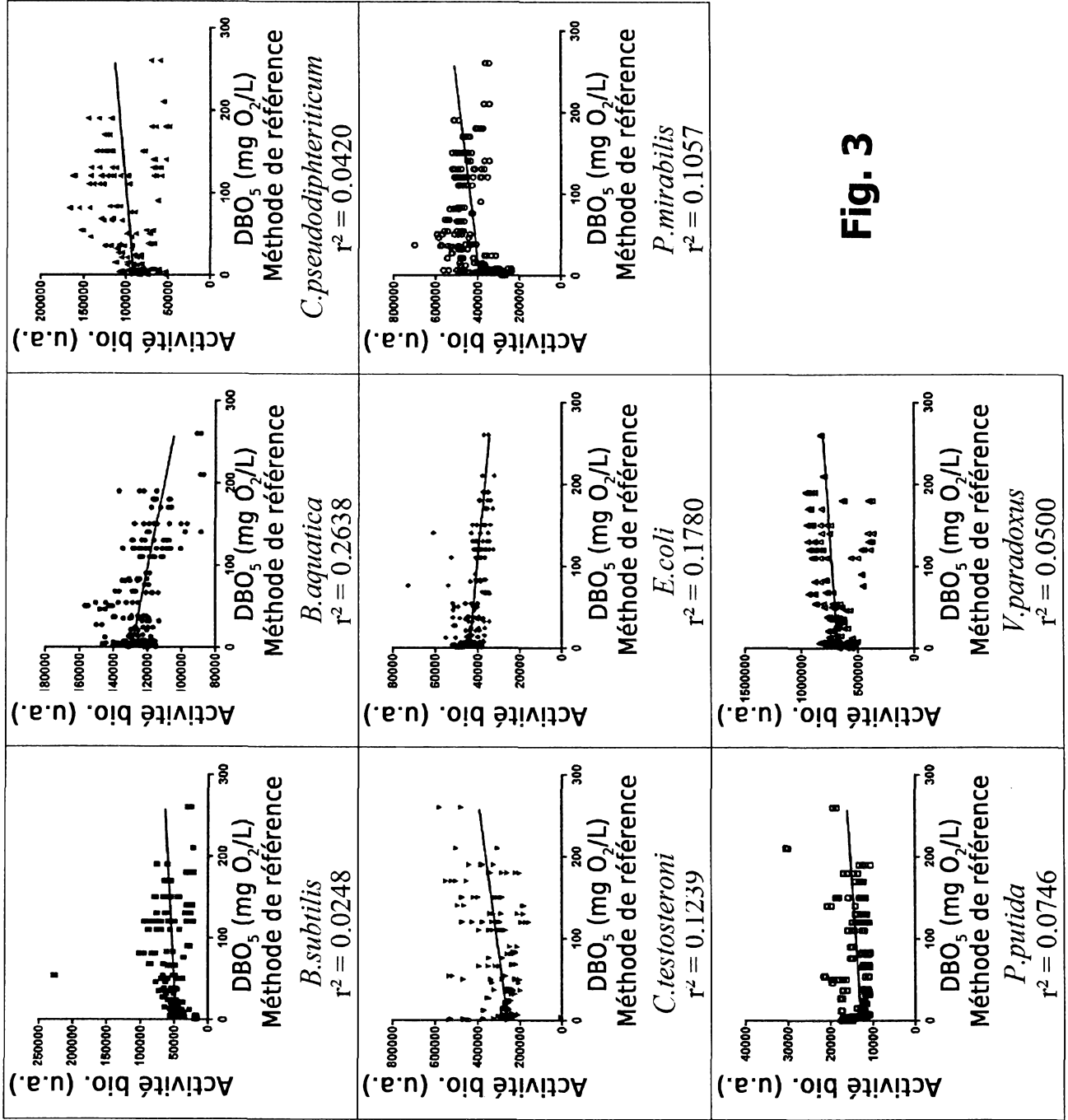


Fig. 3

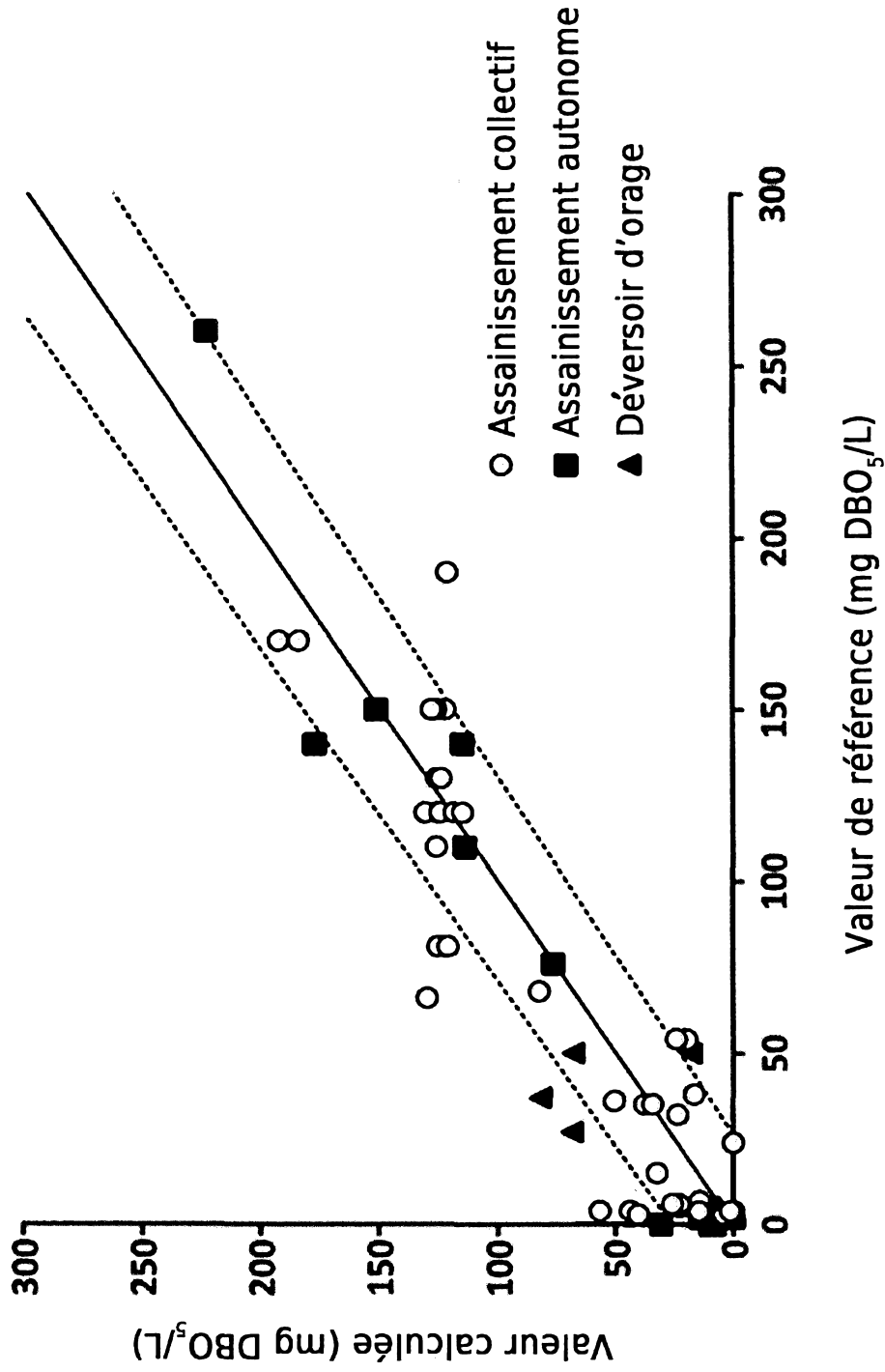


Fig. 4

**RAPPORT DE RECHERCHE
 PRÉLIMINAIRE**

 établi sur la base des dernières revendications
 déposées avant le commencement de la recherche
N° d'enregistrement
nationalFA 851207
FR 1851495

| DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS | | Revendication(s) concernée(s) | Classement attribué à l'invention par l'INPI |
|--|---|--|---|
| Catégorie | Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes | | |
| Y | EP 2 597 461 A2 (ENVOLURE [FR]) 29 mai 2013 (2013-05-29) * le document en entier * * alinéas [0015] - [0019], [0023] - [0032], [0038] - [0044], [0051] - [0054], [0057] - [0060], [0076], [0089] - [0092], [0143]; revendications 1-12; figures 1-9; exemples 1,2 * ----- | 1-11 | C12Q1/02 G01N33/18 |
| Y | WO 90/10083 A1 (FAXE KALKBRUD AS [DK]) 7 septembre 1990 (1990-09-07) * le document en entier * * pages 1-8 * * page 19, ligne 16 - page 30, ligne 10; revendications 1-21; figures 1-12; exemples 1-9 * ----- | 1-11 | |
| Y | XIONG JUKUN ET AL: "The microbial degradation of 2,4,6-tribromophenol (TBP) in water/sediments interface: Investigating bioaugmentation using Bacillus sp. GZT", SCIENCE OF THE TOTAL ENVIRONMENT, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 575, 6 septembre 2016 (2016-09-06), pages 573-580, XP029849776, ISSN: 0048-9697, DOI: 10.1016/J.SCITOTENV.2016.09.017 * le document en entier * * abrégé; figures 1-6 * ----- | 1-11 | DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (IPC) C12Q C02F G01N |
| | | -/-- | |
| Date d'achèvement de la recherche | | Examineur | |
| 26 septembre 2018 | | Boiangiu, Clara | |
| CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS | | T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant | |
| X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire | | | |

**RAPPORT DE RECHERCHE
 PRÉLIMINAIRE**

établi sur la base des dernières revendications
 déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement
 national

FA 851207
 FR 1851495

| DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS | | Revendication(s) concernée(s) | Classement attribué à l'invention par l'INPI |
|--|--|--|---|
| Catégorie | Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes | | |
| Y | DENG YUE ET AL: "Biodegradation of BTEX Aromatics by a Haloduric Microbial Consortium Enriched from a Sediment of Bohai Sea, China", APPLIED BIOCHEMISTRY AND BIOTECHNOLOGY ; PART A: ENZYME ENGINEERING AND BIOTECHNOLOGY, HUMANA PRESS INC, NEW YORK, vol. 183, no. 3, 8 avril 2017 (2017-04-08) , pages 893-905, XP036350900, ISSN: 0273-2289, DOI: 10.1007/S12010-017-2471-Y [extrait le 2017-04-08] * le document en entier * * abrégé * | 1-11 | DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (IPC) |
| Y | WO 99/24370 A1 (BIOBALANCE AS [DK]; NOERGAARD PETER [DK]; MIKKELSEN METTE RISUM [DK];) 20 mai 1999 (1999-05-20) * le document en entier * | 1-11 | |
| Y | WO 01/55717 A1 (SHW HOELTER WASSERTECHNIK GMBH [DE]; HELMO KIM [DK]; SKIBSTED ERIK TUE) 2 août 2001 (2001-08-02) * le document en entier * | 1-11 | |
| Date d'achèvement de la recherche | | Examineur | |
| 26 septembre 2018 | | Boiangiu, Clara | |
| CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire | | T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant | |

EPO FORM 1503 12.99 (P04C14) 2

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE
RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET FRANÇAIS NO. FR 1851495 FA 851207**

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche préliminaire visé ci-dessus.

Les dits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du **26-09-2018**

Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets, ni de l'Administration française

| Document brevet cité au rapport de recherche | | Date de publication | Membre(s) de la famille de brevet(s) | Date de publication |
|---|----|------------------------|---|------------------------|
| EP 2597461 | A2 | 29-05-2013 | CA 2797065 A1 | 23-05-2013 |
| | | | EP 2597461 A2 | 29-05-2013 |
| | | | FR 2982953 A1 | 24-05-2013 |
| | | | US 2013130308 A1 | 23-05-2013 |
| ----- | | | | |
| WO 9010083 | A1 | 07-09-1990 | AT 106452 T | 15-06-1994 |
| | | | AU 5199490 A | 26-09-1990 |
| | | | DE 69009463 D1 | 07-07-1994 |
| | | | DE 69009463 T2 | 15-09-1994 |
| | | | DK 0461166 T3 | 27-06-1994 |
| | | | EP 0461166 A1 | 18-12-1991 |
| | | | ES 2054344 T3 | 01-08-1994 |
| | | | NO 913363 A | 28-10-1991 |
| | | | US 5506096 A | 09-04-1996 |
| | | | US 5700370 A | 23-12-1997 |
| | | | WO 9010083 A1 | 07-09-1990 |
| ----- | | | | |
| WO 2006070389 | A1 | 06-07-2006 | AT 534032 T | 15-12-2011 |
| | | | AU 2004326113 A1 | 06-07-2006 |
| | | | DK 1831682 T3 | 05-03-2012 |
| | | | EP 1831682 A1 | 12-09-2007 |
| | | | WO 2006070389 A1 | 06-07-2006 |
| ----- | | | | |
| WO 9924370 | A1 | 20-05-1999 | AU 1144399 A | 31-05-1999 |
| | | | WO 9924370 A1 | 20-05-1999 |
| ----- | | | | |
| WO 0155717 | A1 | 02-08-2001 | AU 2831501 A | 07-08-2001 |
| | | | WO 0155717 A1 | 02-08-2001 |
| ----- | | | | |