

Reprinted from

WATER RESEARCH

Vol. 28, No. 1, pp. 207-217

CINETIQUES DE L'ACTION BACTERICIDE DES
CHLOROISOCYANURATES SUR TROIS
BACTERIES: *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*,
STREPTOCOCCUS FAECALIS ET
STAPHYLOCOCCUS AUREUS
THE KINETICS OF THE ACTION OF
CHLOROISOCYANURATES ON THREE
BACTERIA: *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*,
STREPTOCOCCUS FAECALIS AND
STAPHYLOCOCCUS AUREUS

G. GOLASZEWSKI et R. SEUX

Laboratoire d'Etude et de Recherche en Environnement et Santé, ENSP, 35043 Rennes Cedex,
France

PERGAMON PRESS LTD
OXFORD · NEW YORK · SEOUL · TOKYO
1993

CINETIQUES DE L'ACTION BACTERICIDE DES
CHLOROISOCYANURATES SUR TROIS BACTERIES:
PSEUDOMONAS AERUGINOSA, *STREPTOCOCCUS*
FAECALIS ET *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

THE KINETICS OF
THE ACTION OF CHLOROISOCYANURATES
ON THREE BACTERIA: *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*,
STREPTOCOCCUS FAECALIS AND *STAPHYLOCOCCUS*
AUREUS

G. GOLASZEWSKI et R. SEUX[✉]

Laboratoire d'Etude et de Recherche en Environnement et Santé, ENSP, 35043 Rennes Cedex, France

(Reçu août 1991; accepté en forme révisée avril 1993)

Résumé—L'action bactéricide des chloroisocyanurates (à plus de 95% sous la forme monochloroisocyanurique, HClCy^-) a été examinée sur trois espèces bactériennes (*Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*). L'étude a été effectuée en laboratoire, dans des conditions (pH, température, concentration en chlore) similaires à celles trouvées dans les eaux de piscines. Trois concentrations d'acide isocyanurique ont été utilisées (25, 150 et 360 mg l^{-1}) pour des concentrations initiales en chlore total allant de 1 à 2,5 mg l^{-1} . On a ainsi pu étudier l'action bactéricide du monochloroisocyanurate, HClCy^- . Les cinétiques de désinfection sont plus lentes que celles obtenues avec du chlore libre ($\text{HOCl} + \text{ClO}^-$). Une décroissance de la population bactérienne supérieure à 99,99% après un temps de contact compris entre 2 et 10 min, a été observée pour des concentrations en chlore disponible supérieures à 1 mg l^{-1} . Lorsque la concentration en acide isocyanurique atteint 150 mg l^{-1} , on a remarqué que la décroissance bactérienne n'est perceptible qu'après 1-2 min.

Mots clés—chloroisocyanurates, acide hypochloreux, désinfection, cinétique, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*

Abstract—The efficiency of chloroisocyanurates in swimming pool disinfection has been demonstrated by a number of authors (Andersen, 1965; Kolwalski and Hilton, 1966; Robinton and Mood, 1967; Fitzgerald and der Vartanian, 1969). The disinfection rate was seen to slow down during studies on different bacteria; this was attributed to the existence of a weak concentration of free chlorine ($\text{HOCl} + \text{ClO}^-$). However, since these studies were carried out when the aqueous chemistry of chloroisocyanurates was not completely elucidated, the specific action of chloroisocyanurates was difficult to determine. This, in part, was due to the large number and variety of experimental procedures and analytical methods for chlorine measurements, and to the lack of specificity of the methods employed.

We studied the action of chloroisocyanurates on three environmental strains: *S. faecalis*, *S. aureus*, *Ps. aeruginosa* and on one collection strain: *Ps. aeruginosa*—CIP. Disinfection tests were carried out in the laboratory, in pH and temperature conditions typically found in swimming pools (pH 7.5, 25°C). The initial concentration of total chlorine varies from 0.5 to 2.5 mg l^{-1} , for concentrations of isocyanuric acid, H_3Cy , from 25 to 360 mg l^{-1} . With these concentrations, free chlorine ($\text{HOCl} + \text{ClO}^-$) does not exceed 3% of total chlorine (that is, less than 0.08 mg l^{-1}). We used an easy and rapid method of dosage which distinguishes between "available chlorine" ($(\text{HOCl} + \text{ClO}^-) + (\text{chlorine from isocyanurates, H}_3\text{Cl}_m\text{Cy}^p)$) and "total chlorine": absorption spectrophotometry after reaction with the *N*-diethylparaphenylenediamine (DPD). We adopted a common method for monitoring simultaneously, chlorine concentration and bacterial count. In this way, we studied the kinetics of selected bacteria inactivation, relative to H_3Cy concentration and for different levels of available chlorine.

Effect of isocyanuric acid (H_3Cy) on disinfection

In the absence of chlorine and within 1 h, isocyanuric acid does not significantly modify the initial bacteria population (Table 1). Thus, we may consider that non-chlorinated dissociated molecules, from H_3Cy excess, have no bactericidal effect on *S. faecalis*, *S. aureus* and *Ps. aeruginosa*, in our experimental conditions with chlorine.

Evolution of the chlorine during a test

For pH 7.5, a calculation taking into account all the equilibrium constants concerning the chloroisocyanurates, shows that the fraction of free chlorine ($\text{HOCl} + \text{ClO}^-$) does not exceed 3% of the total initial chlorine concentration:

3%	with 25 mg l ⁻¹ of H ₃ Cy
0.5%	with 150 mg l ⁻¹ of H ₃ Cy
<0.1%	with 360 mg l ⁻¹ of H ₃ Cy

The colorimetric DPD method (Seux *et al.*, 1984) distinguishes between free and potential chlorine ($\text{HOCl} + \text{ClO}^-$; $\text{H}_n\text{Cl}_m\text{Cy}^{p-}$), and chlorine which is engaged in organic molecules.

The introduction of bacterial concentrate solution (10⁸-10⁹ cfu/ml) in the disinfection reactor, leads in a few seconds to a reduction of chlorine concentration which can reach up to 5% of the initial concentration. Available chlorine and total chlorine concentration decreases are not so marked during each assay (Table 2). The variations which are noted during 15 min are, on average, greater with 25 mg l⁻¹ of H₃Cy.

Disinfectant action of chloroisocyanurates

In our test conditions, more than 97% of initially introduced chlorine is present as monochloroisocyanurate, HCiCy^- . When the available chlorine concentration increases, an optimum inactivation rate is obtained for one fixed time, and this is confirmed whatever the excess amount of isocyanuric acid used. (Tables 3, 4 and 5).

The rate of bacterial decrease observed with HCiCy^- is slower than that obtained with similar concentrations of free chlorine.

For 1.1 mg l⁻¹ of available chlorine with *Ps. aeruginosa*, we obtained:

199.9%	< 0.25 min	with H ₃ Cy = 0
	= 1.1 min	with H ₃ Cy = 25 mg l ⁻¹
	= 3.6 min	with H ₃ Cy = 360 mg l ⁻¹

A model linking bacterial decrease, chlorine concentration and time

We have adjusted our experimental results (see Fig. 3) with a sequential linear regression (Haas, 1988), based on Chick and Watson's model:

$$\log(N/N_0) = -kC^n t$$

where

C = available chlorine concentration (mg l⁻¹) at the time t (min)

k = empirical rate constant

n = dilution coefficient.

The values of the n and k parameters, calculated for bacterial inactivation with 360 mg l⁻¹ of H₃Cy, are always lower than those obtained with 25 mg l⁻¹. This shows that the rate of disinfection is slower with an excess of H₃Cy.

With 25 mg l⁻¹ of H₃Cy:

Ps. aeruginosa: for $C = 1.8$ and $t = 2 \log(N/N_0)_{\text{exp}} = -4.7 \log(N/N_0)_{\text{mod}} = -4.8$

S. aureus: for $C = 2.1$ and $t = 2 \log(N/N_0)_{\text{exp}} = -4.1 \log(N/N_0)_{\text{mod}} = -4.0$

S. faecalis: for $C = 1.9$ and $t = 1 \log(N/N_0)_{\text{exp}} = -3.7 \log(N/N_0)_{\text{mod}} = -3.8$

With 360 mg l⁻¹ of H₃Cy:

Ps. aeruginosa: for $C = 0.7$ and $t = 5 \log(N/N_0)_{\text{exp}} = -2.5 \log(N/N_0)_{\text{mod}} = -2.7$

S. aureus: for $C = 2.2$ and $t = 3 \log(N/N_0)_{\text{exp}} = -2.9 \log(N/N_0)_{\text{mod}} = -2.2$

S. faecalis: for $C = 1.2$ and $t = 5 \log(N/N_0)_{\text{exp}} = -1.1 \log(N/N_0)_{\text{mod}} = -1.3$

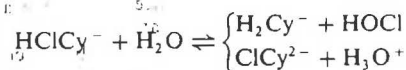
Key words—chloroisocyanurates, hypochlorous acid, disinfection, kinetic. *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*

INTRODUCTION

L'acide hypochloreux issu du chlore gazeux ou de l'hypochlorite de sodium, est le bactéricide le plus fréquemment utilisé pour le traitement des eaux de piscine, mais il a l'inconvénient de se décomposer sous l'action de la lumière. Les chloroisocyanurates (principalement les sels de sodium ou de potassium du dichloro-s-triazinetrione, NaCl_2Cy ou KCl_2Cy) sont utilisés en tant que désinfectants dans le traitement des eaux de piscine depuis une quarantaine

d'années aux Etats Unis et une quinzaine d'années en France. Leur structure chimique limite la photolyse du chlore, ce qui les rend particulièrement attrayants en piscine de plein air.

En solution aqueuse, les chloroisocyanurates subissent des réactions de dissociation et des réactions d'hydrolyse avec formation d'acide hypochloreux.



L'ensemble de ces réactions est régi par un système d'équilibres entre les molécules dissociées ou non de l'acide isocyanurique, H_3Cy . Seux *et al.* (1984) ont conçu un programme de calcul établi à partir du modèle proposé par Brady *et al.* (1963), qui fait référence aux valeurs des constantes d'équilibre établies par O'Brien *et al.* (1974) et par Pinsky *et al.* (1981). Ils ont ainsi calculé la répartition des différentes molécules chlorées. Pour des conditions usuelles en eaux de piscine (2 mg l^{-1} de chlore; 50 mg l^{-1} de H_3Cy ; $\text{pH} = 7,4$; 25°C) les calculs effectués par Scotte *et al.* (1987) indiquent que les molécules chlorées sont majoritairement, HClCy^- (96%), et en moindre proportion Cl_2Cy^- (1,5%). Le chlore libre, $\text{HOCl} + \text{ClO}^-$, n'excède pas 1,4%. La part des molécules chloroisocyanurées, H_2ClCy , HCl_2Cy ou Cl_3Cy , est inférieure à 1%.

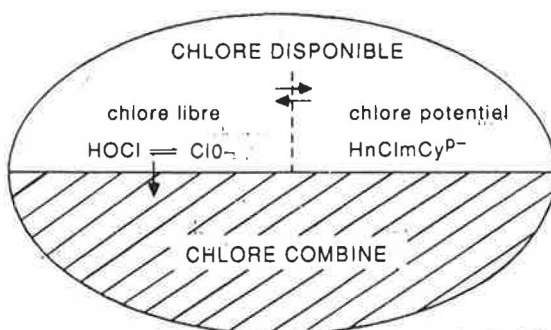
Une dénomination est adoptée pour désigner les diverses molécules chlorées présentes dans l'eau (Seux *et al.*, 1984):

- chlore libre = acide hypochloreux + ion hypochlorite.
- chlore potentiel = chlore issu du motif isocyanurique: $\text{H}_n\text{Cl}_m\text{Cy}^{p-}$ ($n + m + p = 3$)
- chlore disponible = chlore libre + chlore potentiel
- chlore combiné = chlore engagé dans des structures organiques (chloramines ...) et capable d'oxyder l'iodure à pH fixé.
- chlore total = chlore disponible + chlore combiné

(voir Schéma 1).

Actuellement, une seule méthode de dosage, simple et rapide, permet de différencier le chlore disponible du chlore total. Il s'agit de la spectrophotométrie d'absorption moléculaire après réaction avec le *N*-diethylparaphénylènediamine (DPD).

Les premières études relatives à l'efficacité des chloroisocyanurates utilisés en désinfection des eaux



Cy: noyau isocyanurique
 $n + m + p = 3$

Schéma 1. Dénomination des diverses molécules chlorées présentes dans l'eau (Seux *et al.*, 1984).

Scheme 1. Names of chlorinated molecules which are present in water (Seux *et al.*, 1984).

de piscine, donnent des résultats difficilement comparables car les auteurs n'avaient pas la possibilité de différencier le chlore issu du motif isocyanurique du chlore libre. Ainsi, Kowalski et Hilton (1966) n'observent pas de différences significatives entre le traitement aux chloroisocyanurates et la désinfection au chlore dans des bassins de plein air, alors que d'autres auteurs (cités par Canelli, 1974) font état d'une moindre efficacité lorsque la désinfection est réalisée en présence d'acide isocyanurique.

La compilation des résultats obtenus lors d'études en laboratoire sur *E. coli*, *S. aureus*, *S. faecalis* ou *Ps. aeruginosa* par Andersen (1965), Robinton et Mood (1967), Fitzgerald et der Vartanian (1969), montre qu'à pH neutre et pour une concentration moyenne de chlore "résiduel" de $0,5 \text{ mg l}^{-1}$ en présence de 50 mg l^{-1} de H_3Cy , on obtient une diminution de 99,9% de la population bactérienne initiale après 1 minute pour *S. faecalis*, et 9,2 min pour *Ps. aeruginosa*. Le délai s'élève à 15 min pour *S. aureus*.

Tous ces auteurs constatent que les vitesses de désinfection sont plus lentes en présence de chloroisocyanurates. Ainsi, 3 min suffisent pour obtenir 99,9% d'inactivation d'une population de *S. aureus* avec $0,55 \text{ mg l}^{-1}$ de chlore, alors qu'une durée 5 fois plus longue est nécessaire lorsqu'il y a une adjonction de 50 mg l^{-1} de H_3Cy (Robinton et Mood, 1967). Ils attribuent ce ralentissement à la faible concentration en acide hypochloreux présent, mais ces travaux ne permettent pas d'élucider le mode d'action des chloroisocyanurates.

La disponibilité du programme de calcul de la répartition des différentes formes de chlore en présence d'acide isocyanurique, nous a conduits à reprendre l'étude de désinfection sur quelques bactéries rencontrées dans les eaux de piscine, afin de déterminer l'activité germicide des chlorisocyanurates en utilisant des conditions où l'acide hypochloreux est en concentration négligeable. Dans ce but, nous avons choisi trois souches bactériennes issues de l'environnement *Staphylococcus aureus* (SA), *Streptococcus faecalis* (SF), *Pseudomonas aeruginosa* (PA), et une souche de collection *Pseudomonas aeruginosa*-CIP-A22 (PA-CIP), pour lesquelles nous avons utilisé un protocole expérimental unique. Nous avons étudié les cinétiques d'inactivation des bactéries choisies en fonction de la concentration en acide isocyanurique (de 25 à 360 mg l^{-1}) pour différents niveaux de chlore disponible (de $0,5$ à $2,5 \text{ mg l}^{-1}$). Ainsi, dans les conditions les plus favorables, la concentration en acide hypochloreux n'a pas excédé 3% du chlore total, soit $0,08 \text{ mg l}^{-1}$.

PARTIE EXPERIMENTALE

Deux réacteurs sont utilisés: l'un comme "témoin bactériologique", l'autre comme "réacteur de désinfection". Deux échantillons sont prélevés après chaque temps de contact. L'un est neutralisé par du thiosulfate de sodium en vue du dénombrement bactérien; l'autre permet la mesure du pH, le dosage du chlore disponible et du chlore total. Les

cultures et les dénombrements bactériens sont faits à partir d'un étalement sur gélose nutritive. Chaque essai a été réalisé avec un dénombrement bactérien effectué en utilisant deux ou trois boîtes de gélose par dilution. Les concentrations initiales en bactéries sont élevées, 10^6 - 10^7 ufc ml^{-1} , afin de faciliter le suivi expérimental de la désinfection.

Matériels et méthodes

Réactifs. Toute l'eau utilisée pour les manipulations de bactériologie est préalablement désionisée sur cartouche Millipore, puis bidistillée sur pyrex. Après ajout de 8,5 g l^{-1} de NaCl (Merck), elle est autoclavée 15 min à 121°C. On la désignera par la suite, "eau physiologique".

L'eau utilisée dans les essais de désinfection doit avoir une demande en chlore négligeable. Elle est préparée à partir d'eau fraîchement bidistillée sur quartz, à laquelle on ajoute 0,5 mg l^{-1} de chlore. Après un temps de contact de deux heures, elle est exposée pendant 24 h à la lumière u.v. pour détruire le chlore résiduel. Elle est ensuite autoclavée 15 min à 121°C. On la désignera par la suite, "eau à demande en chlore nulle".

Un tampon phosphate molaire (pH = 7,67) est préparé en dissolvant dans 100 ml d'eau à demande en chlore nulle, 0,116 g de KH_2PO_4 (Merck) et 1,035 g de $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ (Merck); puis il est autoclavé à 121°C pendant 15 min.

La solution d'hypochlorite de sodium est préparée par dilution d'un concentré. Son titre final, vérifié par iodométrie, est de 1 g l^{-1} en chlore total.

Une solution de thiosulfate de sodium 8×10^{-3} N est obtenue en diluant une solution à 0,1 N (Merck) dans de l'eau bidistillée; elle est stérilisée par filtration sur membrane de 0,2 μm (Millipore).

Origine des souches et préparation des cultures. *Ps. aeruginosa*, *S. aureus* et *S. faecalis* ont été isolés à partir d'eaux de piscine, puis identifiés au laboratoire. *Ps. aeruginosa*—CIP-A22 provient de la collection de l'Institut Pasteur de Paris. La croissance et le dénombrement bactérien sont effectués sur gélose nutritive Bio Merieux (5 139 1).

Les souches initiales sont isolées sur gélose nutritive (48 h à 37°C). À partir de l'isolement, 1 ou 2 colonies sont prélevées et mises en suspension dans de l'eau physiologique stérile. Quelques gouttes de cette suspension sont étalées sur des géloses nutritives, qui sont ensuite mises en incubation pendant 18 h à 37°C. Ces géloses de croissance sont ensuite lavées à l'aide de 3 ml d'eau physiologique stérile. On détermine le titre de cette suspension bactérienne. Il doit être compris entre 10^9 et 10^{10} ufc ml^{-1} .

Dénombrement bactérien.

Étalement sur gélose nutritive:

un volume de 0,1 ml d'échantillon additionné de thiosulfate de sodium (ou des dilutions dans de l'eau physiologique suivant les puissances de 10) est étalé sur gélose nutritive; chaque étalement est réalisé en double; l'incubation a lieu à 37°C pendant 48 h; une première lecture est effectuée au bout de 24 h.

Filtration sur membrane:

des volumes de 10 et 1 ml d'échantillon additionné de thiosulfate de sodium, sont filtrés sur membrane de 0,45 μm (Sartorius). La mise en culture est faite à 37°C pendant 48 h sur gélose nutritive; chaque filtration est répétée deux fois.

Identification des colonies douteuses:

les colonies qui présentent un aspect particulier lors du dénombrement sont identifiées par des tests biochimiques rapides: oxydase pour *Ps. aeruginosa*, catalase pour *S. faecalis* et "staphylase test" (Oxoid) pour *S. aureus*.

Les résultats sont obtenus à partir d'une moyenne pondérée des numérations réalisées sur l'ensemble des dilutions utilisables (Beytout, 1985); ils sont exprimés en unité formant colonies (ufc), par unité de volume.

On note le nombre de colonies N_i , comptées pour la dilution d_i , sur n_i boîtes de gélose. Le titre de l'échantillon

est donné par la formule suivante (l'inoculum étant de 0,1 ml, on multiplie par le coefficient 10):

$$m = 10 \frac{\sum N_i}{\sum n_i d_i}$$

La précision relative est calculée selon:

$$pr = \sigma m / \mu = 1 / \sqrt{\sum N_i}$$

et l'intervalle de confiance est estimé avec:

$$\mu = m / (1 \pm 2 \cdot pr)$$

Dosage des formes de chlore. Le chlore disponible et le chlore total sont dosés selon la méthode colorimétrique au diéthylparaphénylènediamine (DPD) décrite par Seux et Batto (1984) en utilisant un spectrophotomètre Jouan à la longueur d'onde de 553 nm.

Protocole expérimental

Toute la verrerie utilisée est lavée avec une solution concentrée de bichromate de potassium avant d'être rincée plusieurs fois par de l'eau à demande en chlore nulle. Elle est stérilisée par autoclavage à 121°C pendant 20 min.

On utilise comme réacteurs des flacons de 1,5 l. en pyrex. On introduit 50 ml de tampon phosphate (pH = 7,67) et la quantité nécessaire d'acide isocyanurique (25, 150 ou 360 mg) complétés, sous agitation magnétique, à 1 litre par de l'eau à demande en chlore nulle. Le col des réacteurs est recouvert par une capsule de papier d'aluminium. L'ensemble est autoclavé à 121°C pendant 20 min. Les réacteurs, soumis à une agitation magnétique constante (500 tours/min), sont alors placés dans un bain d'eau thermostaté à $25 \pm 1^\circ C$, pendant 30 min. On introduit ensuite 1 ml de suspension bactérienne concentrée (10^9 - 10^{10} ufc ml^{-1}) dans le réacteur. Après une homogénéisation de 15 min, on ajoute le volume adéquat de solution d'hypochlorite de sodium à 1 g l^{-1} . Le chronomètre est déclenché dès la fin de l'addition.

Le réacteur témoin est préparé de la même façon mais sans ajout de chlore.

Pour chaque essai, deux personnes effectuent des prélèvements au cours du temps dans le réacteur de désinfection, au moyen de "pipet-aid" (Drummond) munis de pipettes graduées jusqu'à 30 ml:

—30 ml sont utilisés immédiatement pour la mesure du pH et le dosage du chlore.

—25 ml sont vigoureusement mélangés à 1 ml de thiosulfate de sodium (8×10^{-3} N) dans des flacons stériles bouchés, pour le dénombrement bactérien

Au début et à la fin de chaque essai, on effectue dans le réacteur témoin des prélèvements pour la mesure du pH et les dénombrements bactériens.

Pour effectuer les numérations bactériennes, nous avons choisi la technique d'étalement sur gélose. Celle-ci présente une grande incertitude lorsque les colonies comptées sont inférieures à 10. Aussi, pour les temps de contact supérieurs à 2 min, nous avons utilisé en complément, la technique de dénombrement par filtration sur membrane. Nous avons vérifié que ces deux techniques n'entraînaient pas de différences significatives dans le dénombrement d'une suspension d'*E. coli*.

RESULTATS

Comportement de l'acide isocyanurique vis à vis des espèces bactériennes étudiées

Pour déterminer l'évolution de la population bactérienne en présence de H_3Cy , deux prélèvements ont été effectués, l'un dès l'ajout des bactéries (N_0), l'autre après un temps de contact fixé (N).

Dans la limite d'un temps de contact de 30 min, les variations entre les numérations initiales et

Tableau 1. Moyennes des dénombrements (N_0 et N) et intervalles de confiance (IC) calculés selon Beytout (1985), montrant l'évolution des populations bactériennes dans le réacteur témoin pour des concentrations de 25 et 360 mg l⁻¹ de H₃Cy

Table 1. Means of the bacterial counts (N_0 and N) and confidence limits (IC) (calculated from Beytout, 1985) showing decrease of bacterial populations in the control reactor, for two concentrations of H₃Cy (25 and 360 mg l⁻¹)

H ₃ Cy (mg l ⁻¹)	Bactérie	Temps de contact (min)	Population initiale (10 ⁶ ufc ml ⁻¹)		Population finale (10 ⁶ ufc ml ⁻¹)	
			N_0	IC	N	IC
25	PA	20	3,3	3,0-3,5	3,1	2,9-3,4
	PA-CIP	15	7,3	6,3-8,7	6,6	5,7-8,0
	SF	15	2,6	2,3-2,8	2,7	2,4-3,0
	SA	30	1,3	1,1-1,4	1,2	1,0-1,3
360	PA	30	22,8	20,9-25,0	22,7	20,8-24,9
	SF	30	3,3	3,1-3,6	3,2	3,0-3,5
	SA	30	12,4	11,0-14,0	11,8	10,0-13,0

finales restent inférieures à 10% quelle que soit la concentration en H₃Cy utilisée (25 ou 360 mg l⁻¹).

Pour les concentrations initiales introduites (10⁶-10⁷ ufc ml⁻¹) et avec la méthode de dénombrement utilisée, un test d'homogénéité montre que ces différences ne sont pas significatives (Tableau 1)

Evolution de la concentration de chlore au cours des essais

La matière organique introduite avec la suspension bactérienne concentrée (10⁸-10⁹ ufc ml⁻¹) dans le réacteur de désinfection réagit avec le désinfectant et conduit à une décroissance du chlore disponible et du chlore total qui peut aller de 0,1-0,5 mg l⁻¹ après 15 min de réaction. La diminution qui est de l'ordre de 5% de la concentration initiale en moins de 30 s, peut atteindre ou dépasser 20% en 15 min.

La variation de la concentration en chlore disponible ou en chlore total au cours d'un essai de 15 min est en général, supérieure avec 25 mg l⁻¹ de H₃Cy (Tableau 2).

Comportement des chloroisocyanurates vis à vis des espèces bactériennes étudiées

Nous donnons dans le Tableau 3, les résultats obtenus avec des concentrations initiales de chlore total allant de 0,5 à 2,5 mg l⁻¹ en présence de 25 ou 360 mg l⁻¹ de H₃Cy, sur la souche environnementale de *Ps. aeruginosa*. Lorsque la concentration en chlore disponible est supérieure à 1 mg l⁻¹, la décroissance est perceptible dès les premières 30 s en présence de 25 mg l⁻¹ de H₃Cy, alors que 2 min sont nécessaires lorsque cette concentration atteint 360 mg l⁻¹ (Tableau 3).

La décroissance bactérienne augmente avec la concentration en chlore disponible. On observe également, que le temps nécessaire pour obtenir 99,9% d'inactivation en présence de 1,1 mg l⁻¹ de chlore disponible, augmente avec la concentration en H₃Cy:

$$\begin{aligned}
 t_{99,9\%} &< 0,25 \text{ min lorsque } H_3Cy = 0 \\
 &= 1,1 \text{ min lorsque } H_3Cy = 25 \text{ mg l}^{-1} \\
 &= 3,6 \text{ min lorsque } H_3Cy = 360 \text{ mg l}^{-1}.
 \end{aligned}$$

Tableau 2. Evolution des concentrations en chlore disponible et en chlore total après 15 min de désinfection
Table 2. Evolution of available chlorine concentration and total chlorine concentration after 15 min of disinfection

Souche	H ₃ Cy (mg l ⁻¹)	Chlore disponible			Chlore total		
		Initial (mg l ⁻¹)	Final (mg l ⁻¹)	(C ₀ - C)/C ₀ (%)	Initial (mg l ⁻¹)	Final (mg l ⁻¹)	(C ₀ - C)/C ₀ (%)
PA	25	1,3	0,9	30	1,5	1,2	20
		1,6	1,4	13	1,9	1,8	5
		1,8	1,2	33	2,3	1,6	30
	360	1,1	0,8	27	1,4	1,1	21
		1,6	1,3	19	2,1	1,8	14
SF	25	0,9	0,7	22	1,5	1,3	13
		1,2	0,9	25	2,2	1,8	18
		1,9	1,3	32	2,5	2,2	12
	360	0,8	0,7	13	0,9	0,9	0
		1,0	0,9	10	1,4	1,4	0
		1,2	0,9	25	1,9	1,6	16
SA	25	0,9	0,7	22	1,2	1	17
		1,2	0,8	33	1,5	1,2	20
		1,3	0,9	31	1,7	1,4	18
	360	2,1	1,6	24	2,5	2,0	20
		1,3	1,0	23	1,5	1,3	13
		2,2	1,9	14	2,4	2,2	18

Moyenne des écarts de concentrations en chlore disponible: 0,38 avec 25 mg l⁻¹ de H₃Cy, et 0,24 avec 360 mg l⁻¹ de H₃Cy.

Moyenne des écarts de concentrations en chlore total initial: 0,34 avec 25 mg l⁻¹ de H₃Cy, et 0,19 avec 360 mg l⁻¹ de H₃Cy.

Tableau 3. Décroissance bactérienne obtenue avec la souche environnementale de *Ps. aeruginosa*, pour deux concentrations en chloroisocyanurates

H ₃ Cy (mg l ⁻¹)	Cl ₂ tot _{ini} (mg l ⁻¹)	Cl ₂ disp (mg l ⁻¹)	N ₀ (10 ⁶ ufc ml ⁻¹)	log(N/N ₀) après un temps de					
				15 s	1 min	2 min	3 min	5 min	10 min
25	0,7	0,5	2,2 ± 0,2	-0,2	-0,4	-2,3	-4,1	-5,4	-7,9
	1,5	1,3	5,7 ± 1,0	-0,2	-2,8	-4,6	-5,2	-5,9	*
	2,3	1,8	9,2 ± 0,9	-0,2	-3,9	-4,7	-5,4	-5,6	-7,3
360	0,8	0,7	3,3 ± 0,3	0	-0,1	-0,2	-0,3	-2,5	-6,7
	1,4	1,1	7,6 ± 1,3	0	0	-0,7	-2,2	-4,2	*
	2,1	1,6	6,2 ± 1,0	-0,1	-0,1	-0,8	-3,5	-5,2	-7,0

*N = 0.

Pour obtenir une réduction de 99,999% des dénombrements bactériens en présence d'une concentration initiale en chlore disponible supérieure à 0,5 et de 25 mg l⁻¹ de H₃Cy il suffit de 3 min, alors que 5 min sont nécessaires pour une concentration en chlore disponible de 1,5 mg l⁻¹ en présence de 360 mg l⁻¹ de H₃Cy.

Nous avons constaté que l'effet de l'acide isocyanurique pour une concentration donnée en chlore disponible, sur la décroissance bactérienne est très marqué dès 150 mg l⁻¹ de H₃Cy (Fig. 1).

Pour les essais réalisés avec 25 mg l⁻¹ de H₃Cy, nous remarquons que la souche de collection *Ps. aeruginosa*—CIP présente une moindre résistance vis à vis des chloroisocyanurates que la souche

environnementale qui a été isolée d'un échantillon d'eau de piscine (Fig. 2).

Nous avons reporté les résultats obtenus avec *S. aureus*, *S. faecalis* et *Ps. aeruginosa*—CIP dans le Tableau 4.

Pour toutes les souches, le rendement d'inactivation bactérienne augmente avec la concentration en chlore disponible (de 0,5 à 2,1 mg l⁻¹), mais la décroissance bactérienne est plus lente en présence de 360 mg l⁻¹ de H₃Cy.

Pour une concentration en chlore disponible donnée, on constate que les vitesses de décroissance bactérienne sont extrêmement différenciées entre 25 et 360 mg l⁻¹ de H₃Cy. Ceci est particulièrement marqué pour *S. faecalis*. En présence de 1,2 mg l⁻¹

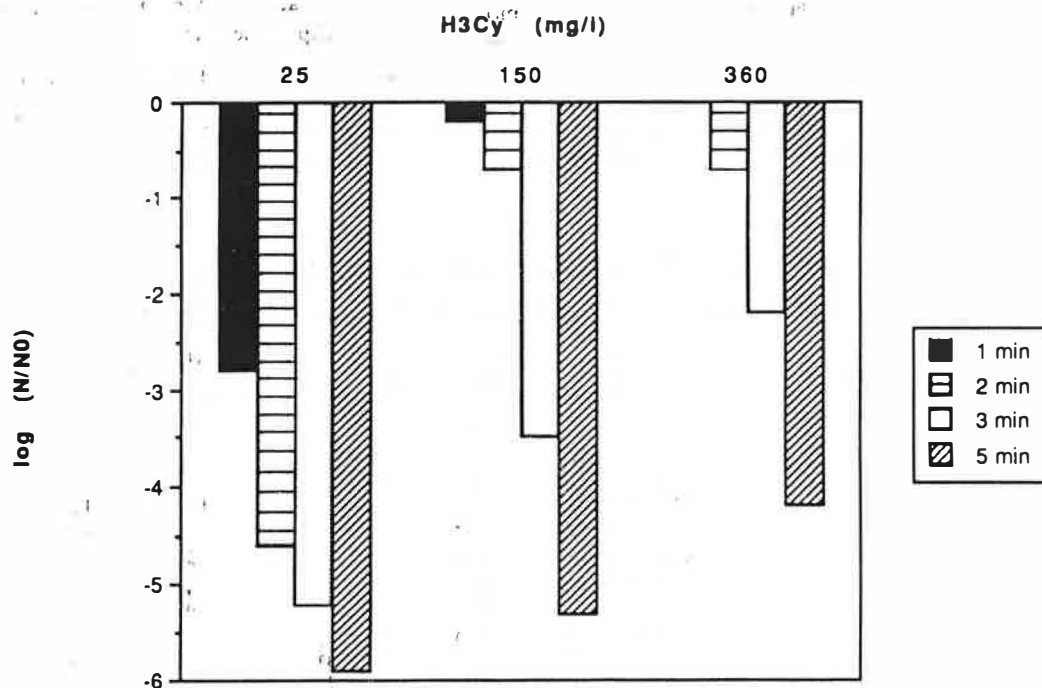


Fig. 1. Evolution de l'inactivation des *Ps. aeruginosa* (souche environnementale) en fonction de la concentration en acide isocyanurique, pour une concentration en chlore disponible initiale de 1,5 mg l⁻¹ (N₀ = 2,7 ± 10⁶ ufc ml⁻¹).

Fig. 1: *Ps. aeruginosa* (environmental strain) inactivation as a function of the isocyanuric acid concentration, for an initial available chlorine concentration of 1.5 mg l⁻¹ (N₀ = 2.7 ± 10⁶ cfu ml⁻¹).

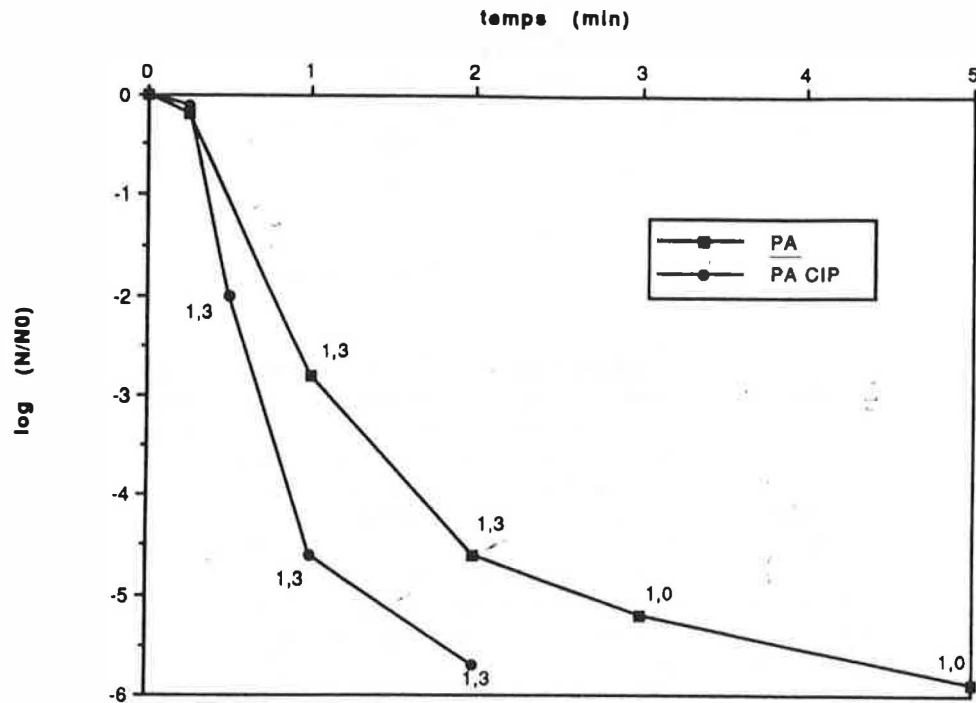


Fig. 2. Evolution de l'inactivation et de la concentration en chlore disponible (mg l^{-1}) obtenue pour $25 \text{ mg l}^{-1} \text{ H}_3\text{Cy}$ avec *Ps. aeruginosa*.

Fig. 2. Evolution of the *Ps. aeruginosa* inactivation and of the available chlorine concentration (mg l^{-1}), obtained with 25 mg l^{-1} of H_3Cy .

de chlore disponible, on obtient une réduction de 4 unités logarithmiques après 2 min, lorsque la concentration en H_3Cy est de 25 mg l^{-1} , alors qu'il faut attendre 10 min pour avoir le même résultat en présence de 360 mg l^{-1} de H_3Cy (Fig. 3).

Bien que le titre de la suspension initiale soit plus élevé (d'un facteur 10), la souche de collection de *Ps. aeruginosa*—CIP, paraît plus sensible à l'action des chloroisocyanurates que *S. aureus* ou *S. faecalis* (cf. Tableau 4). L'interprétation des résultats obtenus

Tableau 4. Décroissance bactérienne obtenue sur 3 souches en présence de concentrations en chlore variables pour 25 et 360 mg l^{-1} de H_3Cy

Table 4. Bacterial decrease obtained with 3 bacterial strains for variable chlorine concentrations and 25 or 360 mg l^{-1} of H_3Cy

Souche	H_3Cy (mg l^{-1})	N_0 (ufc ml^{-1})	$\text{Cl}_2 \text{ tot}_{\text{in}}$ (mg l^{-1})	$\text{Cl}_2 \text{ disp}$ (mg l^{-1})	$\log(N/N_0)$ après un temps de:					
					15 s	1 min	2 min	3 min	5 min	10 min
SA	25	$6,6 \pm 1,1 \times 10^7$	1,0	0,6	-0,1	†	-1,4	†	-3,3	
		$2,2 \pm 0,2 \times 10^7$	1,5	1,2	-0,2	-0,4	-2,7	-4,9	*	
		$1,2 \pm 0,2 \times 10^7$	2,5	2,1	-0,1	-1,6	-4,1	-5,7	*	
	360	$3,4 \pm 0,2 \times 10^8$	1,0	0,6	0	0	†	-0,8	-2,1	-5,0
		$1,5 \pm 0,2 \times 10^7$	1,5	1,3	0	-0,1	†	-0,9	-4,9	-6,8
		$1,2 \pm 0,1 \times 10^7$	2,4	2,2	0	-0,2	†	-2,9	-5,8	-7,1
SF	25	$9,0 \pm 1,4 \times 10^5$	1,0	0,6	0	-0,6	-4,0	-5,2	-5,7	
		$1,2 \pm 0,2 \times 10^6$	2,2	1,2	-0,1	-3,6	†	-4,5	-5,5	
		$7,5 \pm 1,2 \times 10^5$	2,5	1,9	-0,1	-3,7	-4,7	-5,1	-5,6	
	360	$2,0 \pm 0,2 \times 10^5$	0,9	0,8	0	0	†	0	-0,2	-4,1
		$9,1 \pm 1,3 \times 10^5$	1,4	1,0	0	0	†	0	-0,4	-4,4
		$1,2 \pm 0,2 \times 10^6$	1,9	1,2	0	0	†	-0,1	-1,1	-4,3
PA-CIP	25	$1,0 \pm 0,1 \times 10^7$	1,0	0,9	-0,1	-0,8	-4,3	-5,4	*	
		$3,2 \pm 0,3 \times 10^6$	1,6	1,3	0	-4,6	-5,7	*	*	
		$6,5 \pm 1,1 \times 10^6$	1,8	1,6	0	-5,1	-6,1	*	*	
	360	$2,9 \pm 0,2 \times 10^6$	1,0	0,8	0	0	†	-0,3	-1,7	-5,4
		$4,0 \pm 0,3 \times 10^6$	1,6	1,3	0	0	†	-0,5	-5,0	*

* $N = 0$.

† Prélèvement non réalisé.

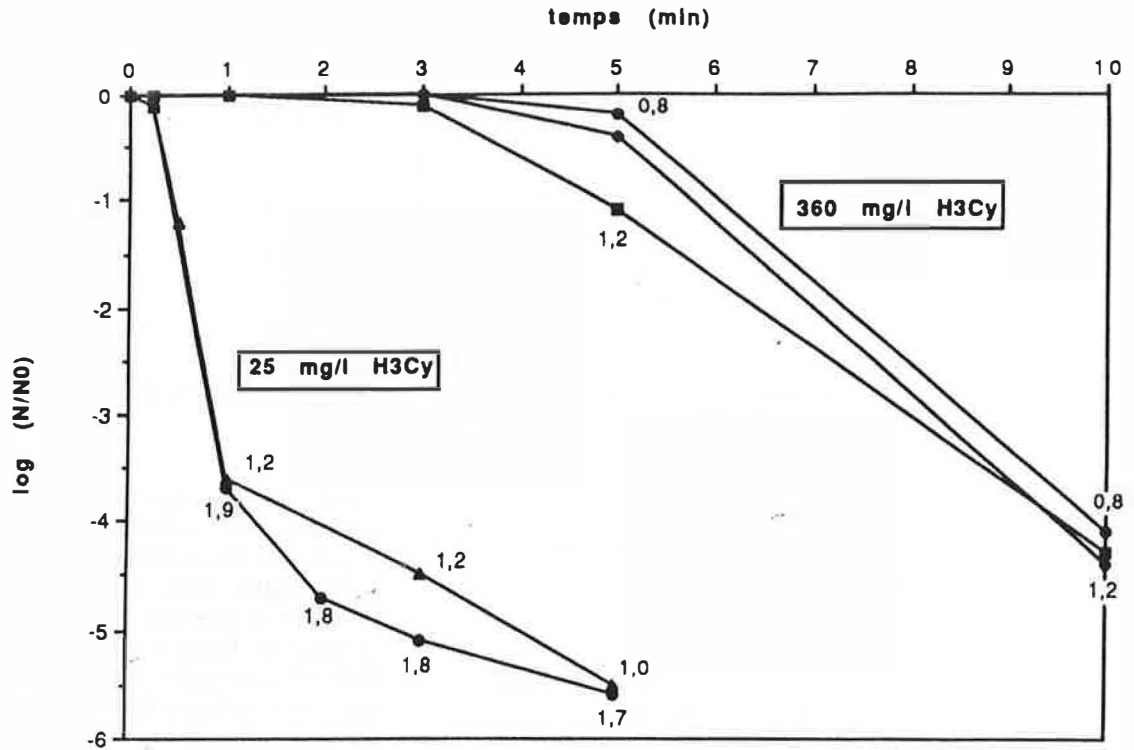


Fig. 3. Evolution de l'inactivation des *S. faecalis* en présence de 25 ou 360 mg l⁻¹ d'acide isocyanurique et pour des concentrations en chlore disponible résiduel allant de 0,8 à 1,7 mg l⁻¹.

Fig. 3. Evolution of *S. faecalis* inactivation with 25 or 360 mg l⁻¹ of isocyanuric acid, and with residual available chlorine concentrations from 0.8 to 1.7 mg l⁻¹.

lors des essais réalisés sur *S. faecalis* est rendue difficile par les écarts importants entre les concentrations en chlore total introduit et celles en chlore disponible mesuré 15 sec après la fin de l'ajout du réactif (Tableau 4).

Modélisation des cinétiques de désinfection

Avec des concentrations bactériennes initiales N_0 , de l'ordre de 10⁶ cfu ml⁻¹, on conserve un degré de signification suffisant en limitant le domaine d'observation des cinétiques d'inactivation à des rapports N/N_0 supérieurs à 10⁻⁵.

En prenant pour origine des temps le moment où la décroissance bactérienne est perceptible (15 s après l'ajout de chlore avec 25 mg l⁻¹ de H₃Cy, 1 à 3 min avec 360 mg l⁻¹ de H₃Cy), les pentes à l'origine des courbes $\log(N/N_0) = f(\text{temps})$ montrent que, pour une concentration donnée de H₃Cy, la vitesse d'inactivation augmente d'un facteur 1,5-3 selon la souche bactérienne, lorsque la concentration en chlore disponible double ou triple. Pour une concentration donnée en chlore disponible, on observe un ralentissement de la décroissance de *S. faecalis* d'un facteur 2-5 lorsque la concentration en H₃Cy passe de 25 à 360 mg l⁻¹.

Nous avons modélisé les résultats expérimentaux à partir d'une régression linéaire séquentielle, sur le modèle de Chick et Watson, de la forme:

$$\log(N/N_0) = -kC^n t$$

avec

- C = concentration en chlore disponible (mg l⁻¹) dosé à l'instant t (min)
- k = constante de vitesse empirique
- n = coefficient dit "de dilution"

Le temps-nécessaire pour obtenir un rendement d'inactivation de 99,9% est estimé pour chaque concentration en chlore disponible, à partir des courbes de décroissance expérimentales comme celles données Figs 2 et 3.

L'évolution de la concentration du chlore disponible en fonction du temps peut être représentée par une fonction linéaire établie entre les logarithmes de ces deux variables. La pente et l'ordonnée à l'origine de cette droite permettent d'estimer les valeurs du coefficient n et de la constante k . Au moyen de ce procédé de calcul décrit par Haas (1988), la concentration bactérienne est calculée pour une concentration donnée en chlore disponible à différents temps d'exposition.

Nous avons obtenu les équations suivantes:

— *Ps. aeruginosa* (souche environnementale):

$$\log(N/N_0) = -1,5 C^{0,9} t,$$

avec 25 mg l⁻¹ de H₃Cy

Tableau 5. Comparaison des résultats obtenus et l'estimation fournie par le modèle pour les 3 souches environnementales

Table 5. Comparison between experimental and estimate results for the 3 environmental strains						
H ₂ Cy (mg l ⁻¹)	Souche	Cl ₂ disp (mg l ⁻¹)	Temps (min)	log(N/N ₀) _{exp}	log(N/N ₀) _{mod}	Écart (%)
25	PA	1,3	3	-5,2	-5,7	-10
		1,8	2	-4,7	-4,8	-2
	SA	2,1	2	-4,1	-4,0	+2
		2,2	3	-2,9	-2,2	
	SF	0,6	2	-4,0	-3,0	+25
		1,9	1	-3,7	-3,8	-3
360	PA	0,7	5	-2,5	-2,7	-8
		2,2	3	-2,9	-2,2	+24
	SA	1	10	-4,4	-3,2	+27
		1,2	5	-1,1	-1,3	-18

$$\text{Écart} = \frac{\log(N/N_0)_{\text{exp}} - \log(N/N_0)_{\text{mod}}}{\log(N/N_0)_{\text{exp}}}$$

$$\log(N/N_0) = -0,9 C^{0,8}(t-1),$$

avec 360 mg l⁻¹ de H₂Cy

—*S. aureus*:

$$\log(N/N_0) = -1,2 C^{0,7}t,$$

avec 25 mg l⁻¹ de H₂Cy

$$\log(N/N_0) = -0,7 C^{0,6}(t-1),$$

avec 360 mg l⁻¹ de H₂Cy

—*S. faecalis*:

$$\log(N/N_0) = -2,3 C^{0,8}t,$$

avec 25 mg l⁻¹ de H₂Cy

$$\log(N/N_0) = -0,4 C^{0,3}(t-2),$$

avec 360 mg l⁻¹ de H₂Cy.

Les valeurs des paramètres *n* et *k* ainsi calculées permettent une comparaison aisée des performances des inactivations en fonction des concentrations en chlore disponible et en acide isocyanurique.

La décroissance bactérienne estimée à partir des équations précédentes peut être comparée aux résultats expérimentaux (Tableau 5).

DISCUSSION

Un certain nombre de facteurs d'incertitude n'ont pas pu être évités dans la mise en oeuvre du protocole expérimental. En effet, la préparation d'une suspension bactérienne à partir d'une gélose nutritive, introduit obligatoirement des matières organiques susceptibles de réagir avec le chlore, ce qui ne permet pas d'obtenir une concentration en chlore constante. La nécessité d'injecter le chlore sous une agitation modérée afin de ne pas "stresser" les bactéries, entraîne la formation d'un gradient de concentration et donc, un risque d'inhomogénéité dans le réacteur lors du premier prélèvement effectué après 15 s. Enfin, il est impossible d'avoir des concentrations bactériennes initiales, *N*₀, rigoureusement identiques dans tous les essais. Elles varient de 6 × 10⁶ à

2 × 10⁷ ufc ml⁻¹ selon les souches et les expérimentations, ce qui introduit une légère hétérogénéité dans la précision des dénombrements.

Nos résultats (Tableau 1) montrent qu'en l'absence de chlore et pour une durée inférieure à 30 min, la présence de H₂Cy à des concentrations de 25 et 360 mg l⁻¹, ne modifie pas significativement la population bactérienne initialement présente dans l'eau à des concentrations de l'ordre de 10⁶ ufc ml⁻¹.

Nous pouvons ainsi considérer que les molécules dissociées non chlorées provenant de l'excès de H₂Cy, n'ont aucune action bactéricide sur *Ps. aeruginosa*, *S. aureus* et *S. faecalis*, dans les conditions expérimentales de désinfection envisagées.

Il faut rappeler qu'il n'existe pas actuellement de méthode de dosage d'un usage simple et rapide permettant de différencier le chlore sous sa forme libre, du chlore potentiel engagé dans les molécules isocyanuriques. Le dosage colorimétrique au DPD utilisé par Seux *et al.* (1984) différencie seulement le chlore libre et le chlore potentiel du chlore combiné (chloramines et chlore engagé sur l'azote des substances organiques).

Pour un pH = 7,5 le résultat des calculs où interviennent toutes les constantes d'équilibre auxquelles sont soumis les chloroisocyanurates, montre que la fraction de chlore libre (HOCl + ClO⁻) n'excède pas 3% de la quantité du chlore total initial:

$$3\% \quad \text{avec } 25 \text{ mg l}^{-1} \text{ de H}_2\text{Cy}$$

$$0,5\% \quad \text{avec } 150 \text{ mg l}^{-1} \text{ de H}_2\text{Cy}$$

$$< 0,1\% \quad \text{avec } 360 \text{ mg l}^{-1} \text{ de H}_2\text{Cy}.$$

Pour des concentrations en chlore disponible comprises entre 0,5 et 2,2 mg l⁻¹, et en présence de 25 mg l⁻¹ de H₂Cy, on constate que 3 min suffisent pour obtenir un abattement supérieur à 99,9% de la population initiale, quelle que soit l'espèce bactérienne étudiée. Dans ces conditions, le chlore libre déterminé par calcul, n'excède pas 0,08 mg l⁻¹ de chlore. Or, d'après Fitzgerald *et al.* (1969), avec 0,1 mg l⁻¹ de chlore libre, 30 min à 1 heure sont nécessaires pour obtenir une décroissance de 99,9%

de la population initiale de *Ps. aeruginosa*. Les essais que nous avons réalisés en l'absence d'acide isocyanurique, nous ont permis d'obtenir à la concentration initiale de $0,8 \text{ mg l}^{-1}$ de chlore libre, un abattement de 99,9% d'une population de *S. faecalis* après 30 s. Avec *S. aureus* et *Ps. aeruginosa*, on obtient pour une concentration initiale de 1 mg l^{-1} de chlore libre une décroissance identique (99,95%) après 1 min. Ceci démontre que les décroissances que nous avons observées sous l'action des chloroisocyanurates ne peuvent être attribuées à la présence de chlore libre dont la concentration est négligeable.

Dans les conditions de nos essais (25, 150 et 360 mg l^{-1} de H_3Cy), plus de 97% du chlore initialement introduit est présent sous la forme de monochloroisocyanurate, HClCy^- . Le chlore disponible peut alors être assimilé au chlore potentiel et nos résultats permettent d'évaluer le pouvoir désinfectant de la molécule HClCy^- .

Nous constatons qu'une augmentation de la concentration en chlore disponible conduit à un meilleur taux d'inactivation pour un temps de contact donné, et cela quel que soit l'excès d'acide isocyanurique, ce qui est en accord avec les résultats obtenus par Andersen (1965), Robinton et Mood (1967) et Fitzgerald et der Vartanian (1969).

Les décroissances bactériennes observées avec HClCy^- sont plus lentes que celles obtenues avec des concentrations identiques de chlore libre. On peut cependant considérer que l'action désinfectante atteint des performances acceptables pour les doses de chlore disponible supérieures à $0,5 \text{ mg l}^{-1}$, puisque 2 min suffisent pour obtenir 99,99% d'inactivation avec 25 mg l^{-1} de H_3Cy et cela pour les trois modèles bactériens étudiés.

On note une très légère différence de comportement entre la souche de collection *Ps. aeruginosa*—CIP et la souche environnementale qui apparaît comme un peu plus résistante. Ceci tendrait à montrer qu'il convient d'utiliser les souches environnementales pour déterminer les conditions (dose, temps) de traitement des eaux de piscine.

En présence d'un excès de H_3Cy (au delà de 150 mg l^{-1}), on observe un net ralentissement des vitesses d'inactivation et 10 min sont nécessaires pour réduire de 99,99% une population de *S. faecalis* avec une concentration en chlore disponible de $0,8 \text{ mg l}^{-1}$.

A partir du modèle de Chick et Watson, il est possible de classer la sensibilité relative des trois espèces de bactériennes. En présence d'une faible concentration de H_3Cy (25 mg l^{-1}), *S. faecalis* est moins résistant que *S. aureus* et *Ps. aeruginosa* qui présentent une sensibilité équivalente. Cependant, ce classement n'est pas respecté en présence de fortes concentrations en H_3Cy (360 mg l^{-1}), pour lesquelles *S. faecalis* apparaît comme la plus résistante des souches étudiées.

CONCLUSION

L'acide isocyanurique H_3Cy , n'a pas d'effet bactéricide, en milieu neutre et à 25°C , sur une suspension concentrée (10^6 ufc ml^{-1}) de *Ps. aeruginosa*, de *S. aureus* ou de *S. faecalis*.

Le monochloroisocyanurate HClCy^- qui est l'espèce chlorée prépondérante dans nos essais, a un effet bactéricide sur chacun des modèles bactériens étudiés, *Ps. aeruginosa*, *S. aureus* et *S. faecalis*, mais à concentrations équivalentes son action est moins rapide que celle observée avec du chlore libre.

Pour ces espèces bactériennes, 99,99% d'inactivation sont obtenus en 2 min pour des concentrations en chlore disponible supérieures à 1 mg l^{-1} . Un excès d'acide isocyanurique (supérieur à 150 mg l^{-1}) entraîne un ralentissement des vitesses d'inactivation et 5–10 min sont alors nécessaires dans les mêmes conditions, pour obtenir un abattement de 4 unités logarithmiques.

L'application du modèle de Chick et Watson qui relie le rendement d'inactivation au produit de la concentration en chlore disponible et du temps, permet d'illustrer le ralentissement des cinétiques de désinfection en présence d'un fort excès d'acide isocyanurique. Les performances de la désinfection peuvent ainsi être estimée en fonction du temps de contact et de la concentration en chlore disponible sur les micro-organismes étudiés. Mais les extrapolations au delà d'un abattement de 4 unités logarithmiques n'ont plus de signification.

Remerciements—Cette étude a été réalisée grâce à une aide de la société Atochem (ex CDF-Chimie Toulouse). Nous remercions Mr J. L. Imbert, directeur des recherches, et Mr P. Scotte, ingénieur responsable des applications chloroisocyanurates, pour l'attention qu'ils ont accordée à nos travaux. Nous remercions également Mme S. Binard, technicienne au LERES, pour l'aide qu'elle nous a apportée au cours des expérimentations.

REFERENCES

- Andersen J. R. (1965) A study of the influence of cyanuric acid on the bactericidal effectiveness of chlorine. *Am. J. Publ. Hlth* **55**, 1629–1637.
- Bates R. C., Shaffer P. T. B. and Sutherland S. (1977) Development of Poliovirus having increased resistance to chlorine inactivation. *Appl. envir. Microbiol.* **34**, 849–853.
- Bates R. C., Sutherland S. M. and Shaffer P. T. B. (1978) Development of resistant Poliovirus by repetitive sublethal exposure to chlorine. In *Water Chlorination Environmental Impact and Health* (Edited by Jolley R. L., Gorchev H. et Hamilton D. H.), Vol. 2, pp. 471–482. Ann Arbor Science, Ann Arbor, Mich.
- Beytout D. (1985) *Virologie Médicale* (Edited by Maurin J.), pp. 294–309. Flammarion Médecine Sciences, Paris.
- Brady P., Sancier K. M. and Sirine F. (1963) Equilibria in solutions of cyanuric acid and its chlorinated derivatives. *J. Am. Chem. Soc.* **85**, 3101–3104.
- Canelli E. (1974) Chemical, bacteriological and toxicological properties of cyanuric acid and chlorinated isocyanurates as applied to swimming pool disinfection. *Am. J. Publ. Hlth* **64**, 155–162.

- Fitzgerald G. P. and der Vartanian M. E. (1969) *Pseudomonas aeruginosa* for the evaluation of swimming pool chlorination and algicides. *Appl. Microbiol.* 17, 415-421.
- Haas C. N. (1988) Maximum likelihood analysis of disinfection kinetics. *Wat. Res.* 22, 669-677.
- Kowalski X. and Hilton T. B. (1966) Comparison of chlorinated cyanurates with other chlorine disinfectants. *Publ. Hlth Rep.* 81, 282-288.
- O'Brien J. E., Morris J. C. and Butler J. N. (1974) Equilibria in aqueous solutions of chlorinated isocyanurate. In *Chemistry of Water Supply, Treatment and Distribution* (Edited by Rubin A. J.), pp. 333-358. Ann Arbor Science, Ann Arbor, Mich.
- Pinsky M. L. and Hua Ching Hu (1981) Evaluation of the chloroisocyanurate hydrolysis constants. *Environ. Sci. Technol.* 15, 423-430.
- Robinton E. D. and Mood E. W. (1967) An evaluation of the inhibitory influence of cyanuric acid upon swimming pool disinfection. *Am. J. Publ. Hlth* 57, 301-310.
- Scotte P. and Billaud G. (1987) Hydrolyse des chloroisocyanuriques—conséquences pratiques. *Sci. Eau* 6, 145-167.
- Seux R., Batto M., Clement M. and Beauducel B. (1984) Evolution des chloroisocyanurates en solution aqueuse et comportement des formes chlorées vis-à-vis de la diéthylparaphénylènediamine (DPD). *Technol. Sci. Municipales* 12, 1-9.