

---

# **Evaluation de la désinfection par traitements UV et UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à l'échelle**

---

## III.1 Introduction

---

Cette étude a pour objectif de comparer l'efficacité de désinfection des traitements UV et UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sur le pilote de laboratoire à des doses UV inférieures ou égales à celles communément utilisées en désinfection (40 mJ/cm<sup>2</sup>). Dans un premier temps, l'étude est réalisée sur des modèles bactériens indicateurs normalisés (*Escherichia coli*, Coliformes totaux et Streptocoques), dans l'eau de station d'épuration (STEU). L'effet de désinfection du peroxyde d'hydrogène seul est tout d'abord évalué sur une souche d'*E. coli* dite sauvage car isolée depuis l'eau de STEU de la Feyssine. Par la suite, l'objectif est de déterminer l'effet de la dose UV et de la concentration en peroxyde d'hydrogène sur l'abattement des modèles bactériens. Dans un second temps, ces mêmes traitements sont évalués sur la biomasse bactérienne totale d'une eau de STEU (Feyssine) par l'intermédiaire d'un test de dosage ATP (ATPmétrie) et d'un test de viabilité des bactéries par marquage (test LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability). Ces deux méthodes permettent notamment de déterminer si les bactéries sont détruites ou seulement inactivées. Les résultats sont comparés à la réglementation française actuelle du recyclage de l'eau (REUT).

## III.2 Effet d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sur *Escherichia coli*

---

Le peroxyde d'hydrogène est un oxydant actuellement utilisé pour la désinfection, notamment en industries alimentaires. L'évaluation de la plus-value du couplage UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nécessite de déterminer, au préalable, l'effet du peroxyde d'hydrogène utilisé seul. L'objectif est de distinguer l'efficacité de désinfection du couplage UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (formation de radicaux hydroxyles) de celle d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> seul.

### III.2.1 Résultats et discussion

La souche d'*E. coli* sauvage de l'eau de STEU de la Feyssine présente une forte sensibilité à H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans l'eau du réseau. Le taux d'abattement est supérieur à 4,5 log après 30 minutes de contact avec 100 mg/L d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Figure III.1). L'effet de la concentration en oxydant est prononcé : pour une même durée d'exposition et une concentration deux fois moindre (50 mg/L), le taux d'abattement est de seulement 1,5 log. L'expérimentation n'est pas poursuivie au-delà de 30 minutes car plus aucune bactérie n'est détectée (sensibilité 0,1 UFC/mL). Ces résultats rejoignent ceux de Watts *et al.* (2003) qui observent que l'inactivation d'une souche commerciale d'*E. coli* (ATCC No. 35218) dépend de la concentration en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. A des concentrations identiques à la présente étude, soit 51 et 102 mg/L d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, mais avec un temps de contact deux fois plus important (60 minutes), ils obtiennent un abattement d'environ 1 et 3 log, respectivement. A l'inverse, Ng *et al.* (2015) ont remarqué qu'il n'y avait aucune inactivation d'*E. coli* K-12, une souche sauvage d'*E. coli*, pour des concentrations d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inférieures à 2 mM (68 mg/l) même au bout de 8h. De même, en exposant *E. coli* K-12 à 10 mg/L d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans de l'eau milliQ, Rincón et

Pulgarin (2004) n'ont pas observé d'abattement après plus de 150 minutes d'exposition, confortant les observations de Ng *et al.* (2015) pour cette souche bactérienne. Dans l'étude de Labas *et al.* (2007), une concentration minimum en oxydant (100 mg/L) et un temps de contact conséquent (4 heures) est nécessaire pour obtenir un abattement d'au moins 4 log (99,99%) d'une autre souche d'*E. coli* (ATCC 8739), soit 200 fois moins rapide qu'une désinfection par UV ( $2,76 \pm 0,07 \text{mW.cm}^{-2}$  à 253,7 nm).



**Figure III.1: influence de la concentration en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (50 et 100 mg/L) sur l'abattement d'une souche d'*E. coli* sauvage dans l'eau du réseau.**

La variation de la sensibilité d'*E. coli* au contact d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> peut aller de la résistance complète à une forte sensibilité selon les souches bactériennes et les doses appliquées (10-100 mg/L). Ces résultats peuvent s'expliquer par l'existence de mécanismes de défense au stress oxydant chez les bactéries. En effet, certaines enzymes telles que les catalases, superoxyde dismutases ou exonucléases ont la capacité d'inhiber l'action oxydante du peroxyde d'hydrogène (Demple *et al.*, 1983), notamment chez *E. coli* (Borisov *et al.*, 2013; Linn et Imlay, 1987). En fonction de la capacité des bactéries à mobiliser ces mécanismes, la résistance au peroxyde peut varier d'une espèce à l'autre mais aussi d'une souche à l'autre.

S'il a été possible d'obtenir un abattement significatif d'*E. coli* dans l'eau du réseau, en revanche, dans l'eau de STEU, l'effet d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100 mg/L) seul est négligeable : le *Tableau III-1* montre que le taux d'abattement maximal atteint est de 0,46 log au bout de 120 minutes d'exposition, durée largement supérieure à celle des essais menés par la suite avec le pilote de laboratoire (< 5 min).

**Tableau III.1: cinétique d'abattement d'*E. coli* dans l'eau de STEU (ET A) au contact de 100mg/L d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**

Temps de contact	0	5	20	30	60
Abattement en log	-0,46	-0,47±0,01	0,16±0,15	0,43±0,01	0,46

Ces résultats sont en accord avec de précédents travaux reportés dans la littérature. Par exemple, Manane *et al.* (2007) n'ont observé aucune inactivation des micro-organismes étudiés (*E. coli*, et phages T4, T7 et MS2) à 25 mg/L d' $H_2O_2$  et 60 minutes de temps de contact dans une eau de surface. De façon similaire, Koivunen et Heinonen-Tanski (2005) ont obtenu moins de 0,2 log d'inactivation pour *E. coli*, *Enterococcus faecalis*, *Salmonella enteritidis* et le virus MS2 dans une eau usée artificielle, même à des doses de 150 mg/L d' $H_2O_2$ . La différence observée entre l'eau du réseau et l'eau de STEU peut provenir de l'interaction de la matière organique présente avec  $H_2O_2$  et ainsi diminuer l'impact de l'oxydant sur les souches bactériennes étudiées. D'autre part, les bactéries peuvent former des agrégats avec cette matière organique ce qui permet de les protéger des stress oxydants chimiques ( $H_2O_2$ ) ou physiques (UV) (Caron *et al.*, 2007).

---

### III.2.2 Conclusion

Dans cette étude, le peroxyde d'hydrogène peut engendrer un abattement important de certaines souches d'*E. coli* dans une matrice peu chargée en matière organique mais à des temps de contact et une concentration en oxydant relativement élevés (plus de 30 minutes pour obtenir 4,5 log d'abattement à 100 mg/L d' $H_2O_2$ ). En revanche, en considérant une matrice plus complexe (eau de STEU, eau saline), l'abattement bactérien est très faible (< 1 log en 120 minutes). Au regard des résultats obtenus, l'effet du peroxyde d'hydrogène sur l'abattement bactérien dans l'eau de STEU sera considéré comme négligeable dans le reste de l'étude. En effet, le temps de contact dans le pilote ne dépasse pas 5 minutes entre l'ajout du peroxyde d'hydrogène et le prélèvement de l'échantillon au sein duquel l' $H_2O_2$  résiduel est neutralisé par ajout de thiosulfate de sodium.

### III.3 Efficacité de désinfection du procédé UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Les résultats précédents ont mis en avant l'incidence négligeable, vis-à-vis de la désinfection, du peroxyde d'hydrogène utilisé seul à des concentrations <100 mg/L lorsque le temps de contact est de 60 minutes. L'objectif est désormais de comparer l'effet des traitements UV et UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans le pilote mis en place à l'échelle du laboratoire.

La comparaison des traitements UV et UV/ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> s'appuie sur le suivi de l'impact de l'irradiation à deux doses UV (10 et 40 mJ/cm<sup>2</sup>) et trois concentrations en oxydant (0, 50 et 100 mg/L) sur la population microbienne endogène d'une eau usée traitée prélevée à la STEU de la Feyssine (ET A). La dose UV maximale sélectionnée est celle imposée par la réglementation française, soit 40 mJ/cm<sup>2</sup> (ANSES, 2010). Une dose UV plus faible égale à environ 10 mJ/cm<sup>2</sup> a été choisie par rapport à la sensibilité connue d'*E. coli* aux UV : généralement, près de 6 log d'inactivation sont obtenus avec une dose UV située entre 1 et 15 mJ/cm<sup>2</sup> (Hijnen *et al.*, 2006).

L'objectif de cette étude est d'évaluer l'efficacité de ces deux traitements en conditions réelles (eau usée traitée, débit réaliste et bactéries endogènes).

#### III.3.1 Effet de la concentration en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sur les traitements

##### III.3.1.1 Résultats sur les modèles bactériens : culture sur milieux

Les concentrations des modèles bactériens endogènes dans l'eau usée traitée A (ET A) ont été déterminées, elles sont présentées dans le *Tableau III.2*. La charge bactérienne mesurée en sortie de STEU de la Feyssine est similaire à celle d'autres eaux usées traitées qui est de l'ordre de 10<sup>4</sup>-10<sup>6</sup> UFC/L pour *E. coli* (Kruithof *et al.*, 2007; Souza *et al.*, 2013).

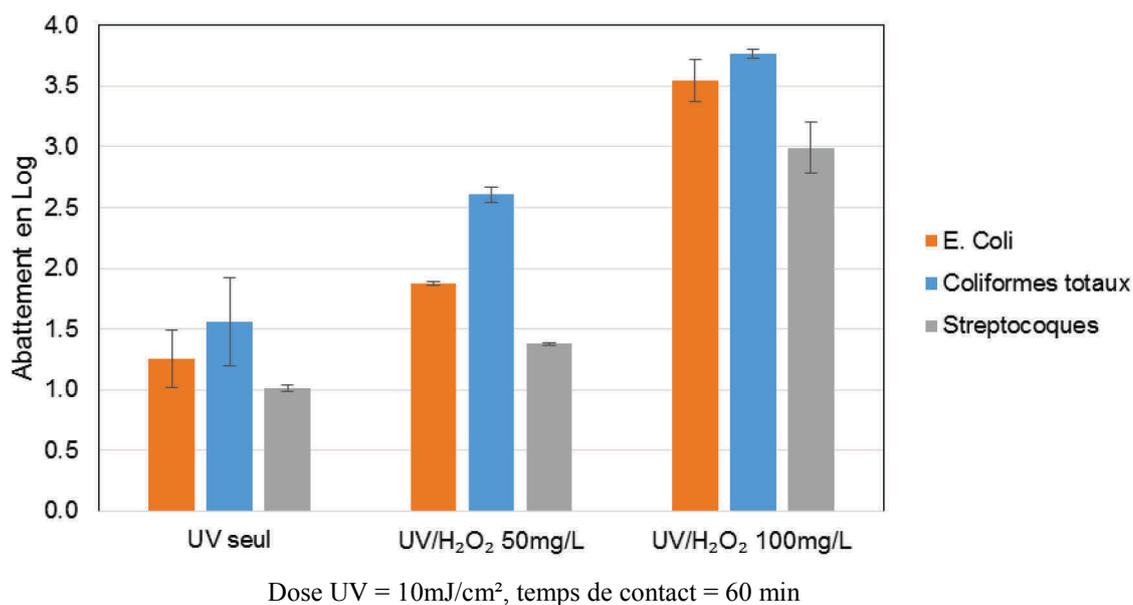
**Tableau III.2: paramètres de qualité de ET A utilisée pour l'étude de l'efficacité des traitements UV et UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans le pilote.**

Eau utilisée	DCO	UVT	pH	[ <i>E. coli</i> ] UFC/L	[Coliformes totaux] UFC/L	[Streptocoques] UFC/L
ET A	21,7	70	8,1	1.10 <sup>5</sup> ± 5.10 <sup>4</sup>	4.2.10 <sup>5</sup> ± 1.4.10 <sup>5</sup>	1.40.10 <sup>4</sup> ± 1.4.10 <sup>3</sup>

DCO : Demande Chimique en Oxygène ; UVT : Transmittance de l'eau à 254 nm ; UFC : Unité Formant Colonie

Ensuite, des échantillons d'eau usée traitée ont subi différents traitements : photolyse (« UV seul »), traitement UV en présence d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à des concentrations de 50 ou 100 mg.L<sup>-1</sup>. Les résultats obtenus pour une dose UV de 10 mJ/cm<sup>2</sup> sont présentés *Figure III.2*. L'abattement des 3 modèles bactériens atteint 1,25 log pour *E. coli*, 1,5 log pour les coliformes totaux et 1 log pour les streptocoques lors du traitement par UV seul. Dès que le peroxyde d'hydrogène est ajouté, l'efficacité du traitement augmente pour tous les modèles bactériens : l'ajout de 50 mg/L de

peroxyde d'hydrogène permet d'atteindre des abattements de 1,9 log pour *E. coli*, 2,6 log pour les coliformes totaux et 1,4 log pour les streptocoques soit des gains de 52 %, 67 % et 36 %, respectivement. A une concentration de 100 mg/L d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, plus de 3 log d'abattement sont obtenus pour tous les modèles bactériens soit une efficacité plus que doublée par rapport à une exposition à l'UV seul. Plus la concentration en peroxyde d'hydrogène est importante, plus le gain d'abattement obtenu est important pour les 3 modèles bactériens étudiés par rapport au traitement UV seul. En doublant la dose d'oxydant, le gain d'abattement atteint 90 %, 44 % et 117 % pour *E. coli*, les coliformes totaux et les streptocoques, respectivement. L'ensemble des abattements obtenus sur les modèles bactériens en fonctions des traitements sont résumés dans le *Tableau III.3*.



**Figure III.2: comparaison de l'effet des traitements UV et UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sur l'abattement des modèles bactériens dans ET A à différentes concentrations d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.**

### III.3.1.1.1 Discussion sur les résultats de la photolyse

La sensibilité aux UV des 3 modèles bactériens étudiés dans l'eau de STEU est en concordance avec celle obtenue par d'autres auteurs. Hassen *et al.* (2000) se sont intéressés à la capacité de désinfection UV de l'eau de STEU sur différents modèles bactériens dont les coliformes fécaux et les streptocoques. Pour cela, ils utilisent un réacteur UV pilote en flux continu, similaire à celui utilisé dans cette étude. A une dose UV de 54 mJ/cm<sup>2</sup>, ils obtiennent des abattements de 2,25 et 1,5 log pour les coliformes fécaux et les streptocoques fécaux, respectivement. Considérant les qualités d'eau, les concentrations initiales en micro-organismes et les doses UV différentes, ces valeurs sont du même ordre de grandeur que les résultats exposés ici. Dans une étude similaire, Guo *et al.* (2009) ont exposé à différentes doses UV basse pression une eau de STEU dans laquelle ils ont ajouté une souche cultivée d'*E. coli* à une concentration de 10<sup>5</sup> UFC/mL. Le rayonnement est émis par un appareil UV à faisceau collimaté. A une dose de 10 mJ/cm<sup>2</sup>, ils obtiennent un abattement de 3 log pour *E. coli* et près de 5 log d'abattement à 15 mJ/cm<sup>2</sup>. A dose équivalente (10 mJ/cm<sup>2</sup>), le traitement est 2,4 fois plus performant que dans le pilote de la présente étude. Or, lorsqu'ils s'intéressent aux coliformes totaux présents initialement

dans l'eau de STEU étudiée, ils n'obtiennent au maximum que 2 logs d'abattement à 10 mJ/cm<sup>2</sup>, valeur proche de celle obtenue sur le pilote de cette étude (1,5 log). Les résultats de Guo *et al.* (2009) obtenus pour *E. coli* ainsi que les valeurs avancées par Hijnen *et al.* (2006) sur la sensibilité de cet organisme en culture pure (6 log d'abattement pour une dose comprise entre 1 et 15 mJ/cm<sup>2</sup>) semblent largement surestimés par rapport à ce qui est communément observé dans l'eau de STEU en conditions réelles. Pour expliquer la différence d'abattement entre les micro-organismes endogènes de l'eau et ceux provenant de cultures pures, il convient de garder en mémoire que les streptocoques fécaux ou les coliformes totaux endogènes à l'eau de STEU contiennent différents types de bactéries. Certaines d'entre elles peuvent être plus résistantes aux UV que les organismes issus de culture pure. En effet, la désinfection UV repose sur la sensibilité des micro-organismes aux radiations UV. Cette sensibilité est unique pour chaque type de bactérie et dépend de leurs capacités à absorber les longueurs d'onde germicides (200-280 nm) (Silva *et al.*, 2013). Elle dépend aussi de l'état physiologique des bactéries (phase de croissance ou préculture), de la souche bactérienne ou des mécanismes de réparation cellulaire propres à chaque souche. L'ensemble de ces paramètres fait qu'une population bactérienne diversifiée est plus résistante au rayonnement UV que des modèles issus de cultures pures. Enfin, la qualité de l'eau influence l'efficacité du traitement UV. Une faible transmittance ou une turbidité élevée de l'eau, mais aussi la présence de matière organique, agissent comme un filtre UV et protègent les bactéries du stress oxydant engendré par le rayonnement UV.

### III.3.1.1.2 Discussion sur l'effet du peroxyde d'hydrogène

Les effets constatés de la concentration du peroxyde d'hydrogène sur l'efficacité de traitement rejoignent ceux observés sur différents microorganismes lors de travaux antérieurs. Bounty *et al.* (2012) ont montré par exemple que le traitement UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> était plus efficace que le traitement UV seul sur les adénovirus. En effet, l'ajout de 10 mg/L d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a permis de réduire la dose UV de 200 à 120 mJ/cm<sup>2</sup> pour atteindre un abattement de 4 log dans une solution saline (irradiation par appareil UV à faisceau collimaté). Par rapport à l'UV seul, Sun *et al.* (2016) ont observé 1 log d'abattement additionnel pour *E. coli* en présence de 0,3 mM d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (~ 10 mg/L) sous rayonnement UV BP, et un abattement 15 fois plus important pour le phage MS2. Toutefois, d'autres études rapportées dans la littérature aboutissent à des conclusions contradictoires. Koivunen et Heinonen-Tanski (2005) n'observent aucune synergie entre UV (BP) et H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sur les entérocoques fécaux. Travaillant sur une matrice composée d'eau distillée et de peptone simulant une eau usée, ils obtiennent, pour une dose UV de 10 mJ/cm<sup>2</sup>, 1,2 log d'abattement en UV seul et 1,12 log d'abattement en présence de 30 mg/L d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Pablos *et al.* (2013) observent une faible amélioration de l'abattement d'*E. coli* K-12 après traitement UV + 10 mg/L d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, concluant à une faible production de radicaux hydroxyles. Les résultats obtenus dans la présente étude à 10 mJ/cm<sup>2</sup> ne permettent pas de conclure sur le mécanisme principal d'inactivation mais ce dernier sera discuté dans III.3.2, qui compare 2 doses d'UV différentes.

ET Ant donné la diversité des modèles de micro-organismes cibles utilisés ainsi que les différentes conditions expérimentales appliquées (matrices, dose UV, concentration en oxydant...), il est difficile de comparer les résultats de ces travaux. Le *Tableau III* regroupe les résultats de la présente étude et ceux des principales études évoquées. La limite principale de nombreuses études réside dans l'utilisation de micro-organismes issus de cultures pures et soumis à des traitements dans des matrices à forte transmittance (solutions salines). Comme souligné dans

le cas du traitement UV, les conditions expérimentales appliquées ne rendent pas compte des différences de sensibilité des micro-organismes endogènes ni de l'effet de la matière organique présente dans les eaux de STEU. Dès lors, l'abattement issu du traitement UV est déjà très conséquent dans ces études, masquant l'effet de l'apport du peroxyde d'hydrogène qui paraît alors minime. Teksoy *et al.* (2011) ont étudié l'impact du traitement UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sur différents indicateurs de désinfection (dont *E. coli* et *B. subtilis*) dans l'eau de surface et en présence de différentes concentrations en matières humiques (3 concentrations différentes d'acide fulvique). Ils simulent ainsi la présence de matière organique susceptible d'arrêter les rayons UV et donc de diminuer l'efficacité du traitement. Ils concluent que la présence d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> permet de compenser l'absorption des UV par la matière organique pour *E. coli* mais pas pour *B. subtilis*. Il est donc important de prendre en compte l'effet de la matrice sur le traitement UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et la variation de sensibilité des micro-organismes.

Dans la présente étude, le procédé UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est évalué dans des conditions proches de la réalité (réacteur en flux continu, temps de contact réel, eau de STEU chargée en matière organique) et sur des micro-organismes endogènes. Or, peu d'études ont évalué l'effet du traitement UV ou UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans de telles conditions. C'est le cas des travaux de Souza *et al.* (2013) qui appliquent un traitement UV + 5 mg/L d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pendant 5 minutes (réacteur avec 3 lampes BP de 8 W). Dans ces conditions, ils ont obtenu 100% d'abattement des bactéries endogènes suivies (*E. coli*, spores de bactéries sulfite-réductrices) en moins de 5 minutes. Lorsqu'ils appliquent uniquement un traitement UV, ils obtiennent aussi le même niveau de désinfection (100%) et concluent alors qu'il n'y a pas d'effet synergique de l'UV et du peroxyde d'hydrogène. Cependant, la dose UV correspondant à 5 min d'exposition est de l'ordre de 2412 mJ/cm<sup>2</sup>. Cette dose est 60 à 240 fois supérieure à celles appliquées dans la présente étude, et peu réaliste, notamment pour la consommation électrique qu'elle engendrerait à grande échelle. La désinfection UV est donc déjà très importante, masquant probablement l'effet des radicaux hydroxyles dans le cas du traitement UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Lors du traitement UV seul, il est aussi probable qu'une telle dose UV appliquée à une matrice complexe engendre un phénomène de photolyse indirecte. Des radicaux hydroxyles peuvent être formés à partir de précurseurs comme le chlore ou les nitrates et participer à la désinfection alors qu'aucun oxydant n'a été ajouté (Yuan *et al.*, 2009).

Les résultats obtenus dans le cadre de cette étude (résumé dans le tableau III.3) montrent que l'emploi simultané de l'UV et du peroxyde d'hydrogène renforce leurs pouvoirs désinfectants individuels. Cette synergie dépend de la concentration initiale en oxydant. Ces observations sont valables lorsqu'une faible dose UV est appliquée sur des micro-organismes indicateurs de contaminations fécales, largement utilisés et facilement cultivables (*E. coli*, streptocoques, coliformes totaux...). Reste à déterminer si les autres micro-organismes présents dans les échantillons sont aussi inactivés par les différents traitements. Pour cela, une méthode basée sur le dosage de l'ATP a été utilisée pour évaluer le niveau de désinfection sur la biomasse bactérienne totale, et notamment déterminer s'il y a uniquement inactivation ou lyse des bactéries

**Tableau III.3: bilan des abattements des modèles bactériens obtenus dans la présente étude à différentes doses d’UV ou concentrations en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et comparaison avec ceux issus de la bibliographie.**

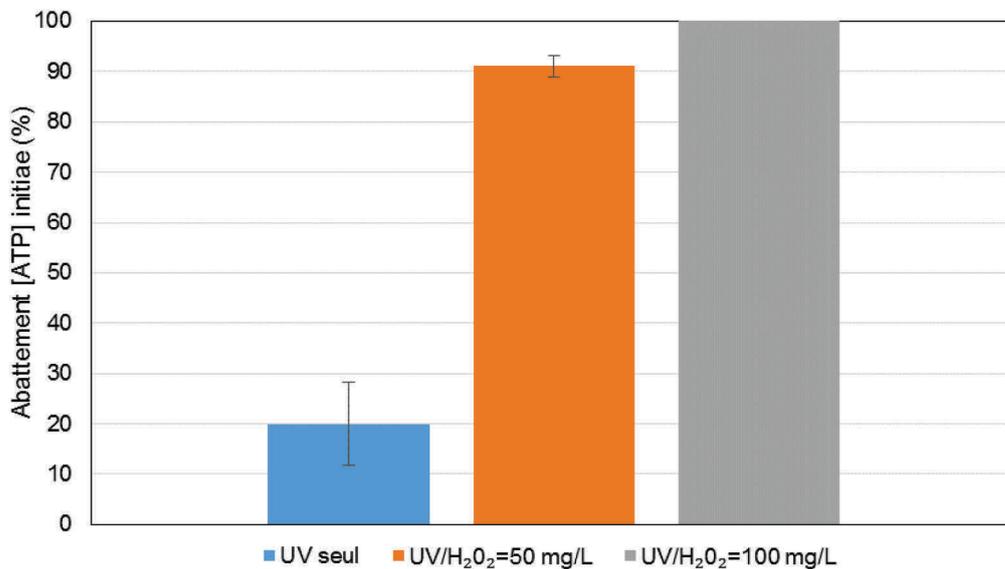
Organismes	Origines	Réacteur	Matric es	Dose UV mJ/cm <sup>2</sup>	[H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ] mg/L	Abattement (log)	Référence
<i>E. coli</i>	Endogènes	BP 55W	ET	10	0	1,25	Cette étude
				40	0	3,13	
				10	50	1,9	
				10	100	3,55	
Coliformes totaux	Endogènes	BP 55W	ET	10	0	1,59	Cette étude
				40	0	3,10	
				10	50	2,6	
				10	100	3,9	
Streptocoques	Endogènes	BP 55W	ET	10	0	1,01	Cette étude
				40	0	4	
				10	50	1,37	
				10	100	2,99	
Coliformes fécaux	Cultivés	BP 65 W	ET	54	0	2,25	Hassen <i>et al.</i> (2000)
<i>E. coli</i>	Cultivés	FC 125 W	ET	10	0	3	Guo <i>et al.</i> (2009)
Coliformes totaux	Endogènes	FC 125 W	ET		0	2	
<i>E. coli</i> ATCC 15197	Cultivés	FC 30 W	ET	10	0	0,55	Koivunen et Heinonen-Tanski (2005)
<i>E. coli</i> K-12	Cultivés	BP 6 W	ED	11,7	0	3	Pablos <i>et al.</i> (2013)
				7	10	3	
				14	10	4	
<i>E. coli</i> WG5	Cultivés	BP 8 W	ET	2412	0	>5	(Souza <i>et al.</i> , 2013)
<i>E. coli</i> WG5	Cultivés	BP 8 W	ET	2412	5	>5	(Souza <i>et al.</i> , 2013)

ET : eaux usées traitées, ED : eau déminéralisée FC : faisceau collimaté à 254 nm, BP : lampe basse pression

### III.3.1.2 Résultats sur la biomasse bactérienne : ATPmétrie

Le suivi de la biomasse bactérienne est essentiel pour déterminer l’effet des traitements UV ou UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sur les différentes populations bactériennes présentes dans les eaux usées traitées. Ces populations sont complexes et une large majorité (au moins 85%) n’est pas cultivable sur milieu (Wagner *et al.*, 1994). La méthode d’analyse par ATPmétrie a donc été appliquée pour évaluer la proportion de micro-organismes encore vivants après traitements puisqu’ils sont les seuls à produire de l’ATP. Les analyses ont été réalisées sur les mêmes échantillons que ceux ayant servi à déterminer l’abattement des 3 modèles bactériens. La *Figure* III.3 présente les taux

d'abattement de l'ATP intracellulaire après traitements UV et UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de ET A, à une dose UV unique de 10 mJ/cm<sup>2</sup> et des concentrations en peroxyde d'hydrogène de 50 et 100 mg/L. Le traitement UV seul n'abat qu'environ 20% de l'ATP initiale alors qu'en ajoutant 50 mg/L d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, l'abattement atteint 91 %. L'ATP n'est pratiquement plus détectée à une concentration de 100 mg/L d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, indiquant que la désinfection est quasi-totale. En doublant la concentration en peroxyde d'hydrogène, le gain d'abattement de l'ATP n'est alors que de 10%.



Dose UV = 10 mJ/cm<sup>2</sup>

**Figure III.3: mesure des taux d'abattement de l'ATP (représentative de la population microbienne endogène) après traitement UV ou UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de ET A**

Ces résultats montrent que le traitement UV seul (10 mJ/cm<sup>2</sup>) n'entraîne qu'une faible mort cellulaire des micro-organismes présents dans les échantillons testés. Il ne s'agit pas uniquement de bactéries mais de tous les organismes vivants produisant de l'ATP tels que les protozoaires ou les micro-algues. Le traitement UV à une dose relativement faible ne semble conduire qu'à une inactivation des micro-organismes. C'est le cas dans l'étude de Süß *et al.* (2009) où les auteurs ont utilisé des outils de biologie moléculaire (Polymerase Chain Reaction (PCR) et Denaturation Gradient Gel Electroforesis (DGGE)) pour évaluer les dommages causés par une exposition UV (40 à 60 mJ/cm<sup>2</sup>) sur une population complexe de micro-organismes présents dans de l'eau de STEU. Une forte inactivation bactérienne est mesurée après exposition UV mais une régénération très importante est constatée au bout de quelques heures. Certaines bactéries sont donc capables de réparer les dommages causés par les UV. D'autres populations bactériennes sont résistantes au traitement, même à des doses UV supérieures à celles préconisées par les différents organismes de certification internationaux (40 mJ/cm<sup>2</sup>). Or, les résultats de la présente étude montrent que l'ajout de peroxyde d'hydrogène permet de vaincre cette résistance même à faible dose UV.

Le faible effet du traitement UV constaté dans la présente étude et dans l'étude de Süß *et al.* (2009) s'explique notamment par la diversité et la complexité des populations bactériennes présentes dans l'eau de STEU. Certaines sont résistantes aux UV, d'autres sont capables de mettre en place des mécanismes de réparation qui conduisent à une réactivation de la réplication de la cellule par des mécanismes de photoréactivation (Guo *et al.*, 2009; Lindenauer and Darby, 1994)

ou de « dark repair » (Jungfer *et al.*, 2007). Or, au regard de la *Figure III.3*, la combinaison de l'UV et du peroxyde d'hydrogène (50 mg/L) conduit à une mort cellulaire très importante. Cette capacité de désinfection du procédé UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> vient de la production de radicaux hydroxyles qui vont détruire la membrane cellulaire des bactéries de façon irréversible (Ng *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2014). L'augmentation de la concentration en peroxyde d'hydrogène conduit à une augmentation de la production de radicaux hydroxyles. Ainsi, la désinfection est nettement améliorée.

Ces observations montrent également les limites des méthodes de culture bactérienne sur milieux qui tendent à surestimer les capacités de désinfection. D'une part, seulement 1 à 15 % des bactéries peuvent être suivies par ces méthodes. D'autre part, elles ne prennent en compte que la perte de la faculté de croître sur un milieu nutritif. Or, les bactéries peuvent rester potentiellement pathogènes même inactives (Oliver, 2005). Dans le cas d'un traitement UV, les cellules inactivées ont potentiellement la capacité de se réactiver par divers mécanismes de réparation cellulaire mêmes à des doses UV réglementaires (40 mJ/cm<sup>2</sup>). Lors de la combinaison de l'UV et de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, la cellule subit des dommages irréversibles au contact des radicaux hydroxyles, entraînant la mort cellulaire. Cette distinction d'état des cellules, à savoir inactives ou mortes, ne peut se faire qu'avec des méthodes complémentaires ou de substitution, non basées sur la culture sur milieux. Elle permet d'évaluer la mort cellulaire des micro-organismes de façon plus réaliste et d'évaluer l'impact des traitements sur les bactéries viables mais non cultivables. L'ATPmétrie, la cytométrie de flux et les méthodes de biologie moléculaire sont adaptées pour le suivi de désinfection des eaux de STEU mais nécessitent des équipements coûteux. Néanmoins, l'évolution des techniques analytiques laisse présager l'utilisation en routine de l'ATPmétrie et de la cytométrie de flux (Van Nevel *et al.*, 2013; Vital *et al.*, 2012).

La désinfection est une procédure qui permet de réduire le niveau de contamination microbienne. Cependant, il y a différents niveaux d'efficacité qui s'étendent de la stérilisation totale (éradication totale des micro-organismes) à une réduction minimale du nombre de contaminants microbiens. Dès lors, on peut considérer que les traitements UV et UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sont des méthodes de désinfection mais que la combinaison UV et H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est beaucoup plus efficace car elle conduit à une mort cellulaire et se rapproche donc de la stérilisation.

### III.3.1.3 Conclusion

Une dose UV de 10 mJ/cm<sup>2</sup> peut inactiver les modèles bactériens utilisés mais n'entraîne pas la mort cellulaire de la majorité de la biomasse bactérienne. Une réparation cellulaire et donc une réactivation bactérienne peuvent alors se produire. L'ajout de peroxyde d'hydrogène augmente significativement le taux de mort cellulaire jusqu'à atteindre une désinfection quasi-totale à forte concentration. Cette désinfection est dépendante de la concentration en peroxyde d'hydrogène. Néanmoins, le gain d'abattement obtenu entre 50 et 100 mg/L est modeste. Il est possible d'optimiser la concentration en peroxyde d'hydrogène en fonction des objectifs de traitement. Il faut alors prendre en compte le coût du peroxyde d'hydrogène et de la consommation énergétique pour trouver le meilleur compromis. Certaines études montrent que la désinfection totale (mesurée par ATPmétrie) peut aussi être atteinte avec l'UV seul, notamment dans l'eau de mer (Penru *et al.*, 2012). Pour vérifier l'effet de la dose UV sur les traitements, des expérimentations à 40 mJ/cm<sup>2</sup> ont été mises en œuvre. Les résultats acquis par culture sur milieux et par ATPmétrie ont été comparés à ceux obtenus à 10 mJ/cm<sup>2</sup>.

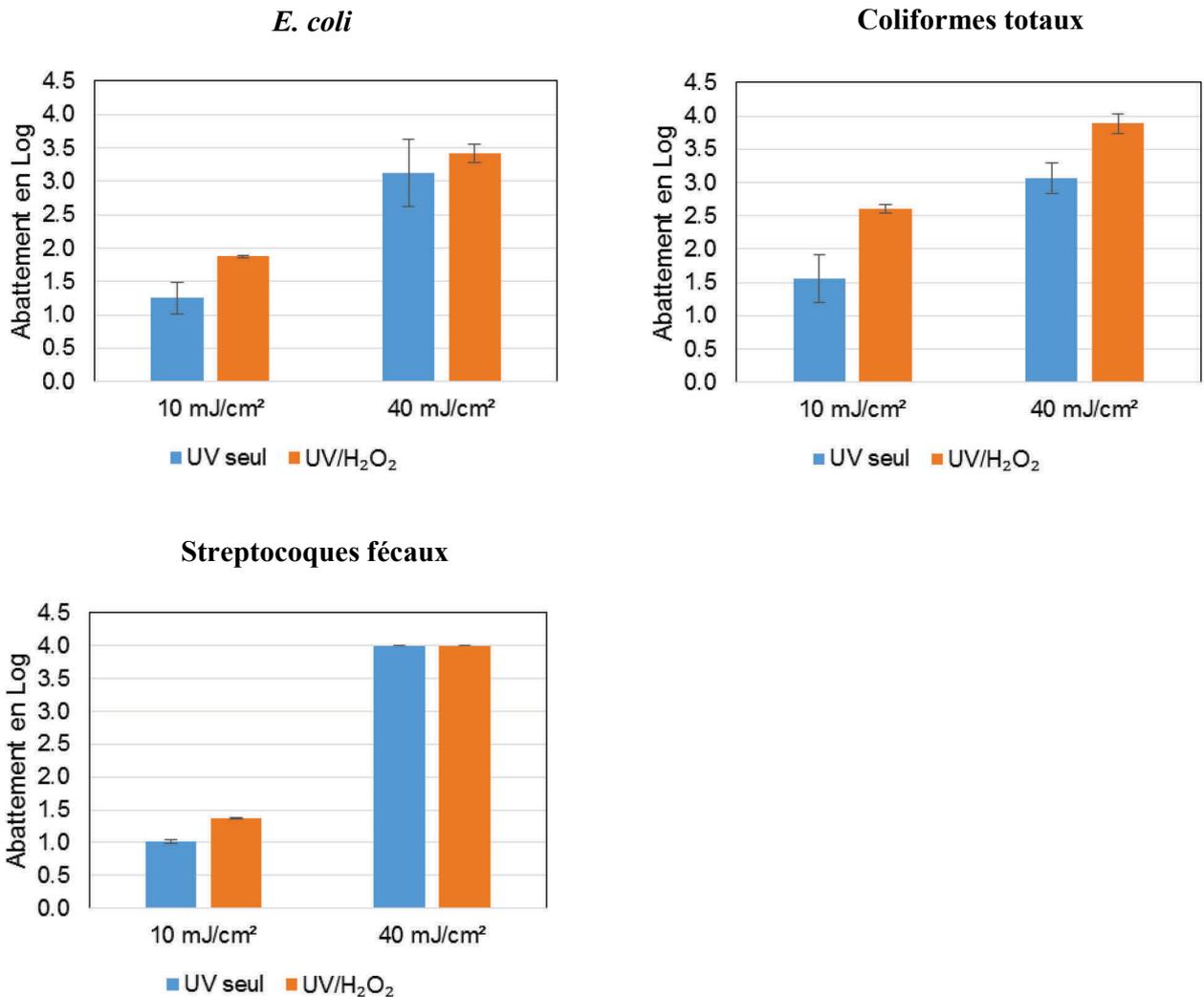
---

### III.3.2 Effet de la dose UV sur les traitements:

La dose UV imposée par la réglementation pour assainir les eaux s'élève à 40 mJ/cm<sup>2</sup> (ANSES, 2010) mais un grand nombre de micro-organismes ont une sensibilité inférieure à 10 mJ/cm<sup>2</sup> (Hijnen *et al.*, 2006). Il apparaît donc nécessaire d'approfondir l'influence de la dose UV sur la désinfection. Deux doses UV (10 et 40 mJ/cm<sup>2</sup>) ont été étudiées. Le choix de travailler à une concentration de 50 mg/L d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est justifié par les forts taux d'abattement obtenus à cette concentration dans l'étude précédente (1,5 à 2,5 log selon les modèles et 90 % d'abattement en ATP). De plus, dans une perspective d'utilisation à échelle réelle, le coût de l'oxydant doit être minimisé. Les traitements UV et UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ont été appliqués sur l'eau de STEU (ET A) dans le pilote. Les échantillons sont analysés d'une part sur milieux chromogènes pour suivre les modèles bactériens *E. coli*, coliformes et streptocoques et par ATPmétrie pour évaluer l'effet des traitements sur la biomasse bactérienne totale.

#### III.3.2.1 Résultats sur les modèles bactériens : culture sur milieu

La *Figure* III.4 présente les abattements obtenus pour les 3 modèles bactériens à deux doses UV : 10 et 40 mJ/cm<sup>2</sup> avec 50 mg/L d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ou sans peroxyde d'hydrogène. Les résultats obtenus pour le traitement par UV seul montrent que l'augmentation de la dose UV conduit à un meilleur abattement de l'ensemble des micro-organismes étudiés. L'efficacité de désinfection vis-à-vis des trois modèles est plus importante à 40 mJ/cm<sup>2</sup> qu'à 10 mJ/cm<sup>2</sup> (environ 2,5 fois pour *E. coli*, 2 fois pour les coliformes totaux et plus de 4 fois pour les streptocoques). Il est à noter que, concernant les streptocoques, aucune bactérie n'a été détectée après le traitement à 40 mJ/cm<sup>2</sup>. Au regard de la concentration initiale de ce modèle dans l'eau de STEU (1.10<sup>4</sup> UFC/L), il est considéré que l'abattement observé est au moins égal à 4 log. Le traitement UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 40 mJ/cm<sup>2</sup> est respectivement 1,8, 1,5 et 3 fois plus efficace qu'à 10 mJ/cm<sup>2</sup> pour *E. coli*, les coliformes totaux et les streptocoques.



La dose d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est de 50 mg/L dans le cas du traitement UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

**Figure III.4: abattements des modèles bactériens endogènes dans ET A à 10 et 40 mJ/cm².**

Dans la littérature, il est aussi constaté que l'abattement des micro-organismes dépend de la dose UV. Pour les adenovirus, 1 log de gain supplémentaire est obtenu entre 10 et 90 mJ/cm² dans un tampon sulfate par Bounty *et al.* (2012). Koivunen *et al.* (2005) observent une meilleure efficacité du traitement UV sur l'ensemble des modèles qu'ils ont étudiés (*E. coli*, *E. faecalis* ou *S. enteritidis*). Pour *E. coli*, l'abattement obtenu à 14 mJ/cm² est 2,6 fois plus efficace qu'à 10 mJ/cm² dans une eau usée artificielle (peptone). Ces observations peuvent s'expliquer par le fait qu'une dose élevée d'UV permet d'atteindre un plus grand nombre de bactéries qui étaient jusqu'alors protégées par d'autres cellules. D'autre part, à partir d'une certaine dose, d'autres populations bactériennes plus résistantes sont affectées. Leurs mécanismes de réparation sont altérés (enzymes) entraînant une inactivation ou une mort cellulaire. Cependant, il convient de se rapprocher des conditions réelles (eau de STEU, micro-organismes endogènes) pour vérifier ces observations.

Différentes courbes d'inactivation de micro-organismes en fonction de la dose UV ont déjà été établies auparavant dans l'eau de STEU. Gehr *et al.*, (2003) ont notamment suivi l'abattement des coliformes fécaux, de *Clostridium perfringens* et du phage MS2 par traitement UV. Pour les coliformes fécaux, ils observent que l'abattement atteint sa valeur maximale (3 log)

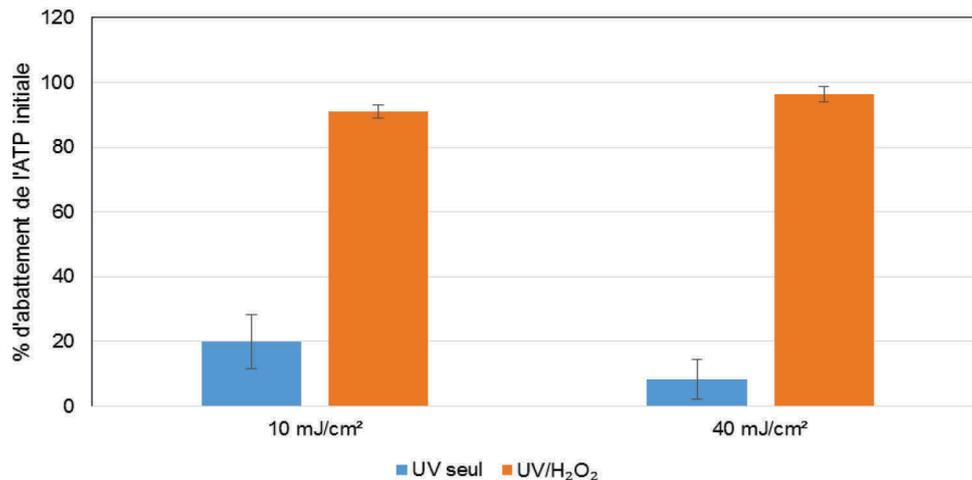
pour une dose de 20 mJ/cm<sup>2</sup>. Au-delà de cette limite, l'augmentation de la dose UV n'entraîne pas de gain d'abattement. Des profils d'inactivation similaires sont obtenus par Kruithof *et al.* (2007) pour les protozoaires *Giardia muris* et *Cryptosporidium parvum* (lampe BP et MP) et *B. subtilis* dans une eau de STEU. Le profil de réponse des micro-organismes au rayonnement UV est bien décrit dans la littérature et n'est généralement pas linéaire (Silva *et al.*, 2013). Ces auteurs expliquent qu'à faible dose UV, les mécanismes de réparation cellulaire des micro-organismes fonctionnent encore et ralentissent l'effet de désinfection. Dans un deuxième temps, l'abattement augmente proportionnellement à la dose UV. Enfin, il y a une phase de saturation où l'augmentation de la dose UV n'engendre plus de gain d'abattement. Ce plateau est probablement dû à la résistance UV de certaines sous-populations de micro-organismes mais aussi à la présence de bactéries agglomérées ou sous formes de particules, induisant une protection au rayonnement UV. Dans le cadre de cette thèse, seules deux doses sont étudiées ce qui ne permet pas d'établir de telle courbe d'abattement.

Une synergie entre le peroxyde d'hydrogène et l'UV est bien observée pour 10 mJ/cm<sup>2</sup> mais semble être moins important pour une dose de 40 mJ/cm<sup>2</sup>. Cette tendance ne peut pas être fermement affirmée au regard de la variabilité des mesures. Pour vérifier que la différence d'efficacité entre les traitements UV et UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> s'atténue à plus forte dose, il conviendrait de tester des doses UV supplémentaires dans l'eau de STEU. Cependant, à un certain taux d'abattement, la limite de détection de la méthode de suivi (1 UFC/100 mL) sera atteinte. Cela a déjà été observé dans le cas des streptocoques où la différence entre le traitement UV et UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 40 mJ/cm<sup>2</sup> est masquée par la limite de détection (pas de colonies détectées dans 100 mL d'échantillon). Il convient désormais de vérifier l'effet de la dose UV sur la population bactérienne générale. La méthode de dosage de l'ATP ne renseigne pas sur la cause de la mort cellulaire (UV ou radicaux hydroxyles) mais permet de déterminer l'efficacité globale du traitement. Dès lors, les mêmes échantillons utilisés pour déterminer l'effet de la dose UV sur l'abattement des modèles bactériens ont été analysés par ATPmétrie.

### III.3.2.2 Résultats sur la biomasse bactérienne : ATPmétrie.

Les expérimentations précédentes ont mis en évidence l'effet de la concentration en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (à dose UV fixe de 10 mJ/cm<sup>2</sup>) sur l'efficacité d'abattement de l'ATP intracellulaire (III.3.1.2 page 90). Il se traduit par des taux de mort cellulaire de la biomasse bactérienne supérieurs à 90% à des concentrations en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> supérieures ou égales à 50 mg/L. L'étude se poursuit par l'évaluation du rôle de la dose UV, seule ou en présence d'une concentration d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> égale à 50 mg/l, sur la biomasse bactérienne totale.

La *Figure III.5* met en évidence un faible abattement de la concentration en ATP intracellulaire donc un faible taux de mort cellulaire aux deux doses UV testées sans H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. L'abattement de la concentration initiale en ATP semble même inférieur à la dose la plus élevée (40 mJ/cm<sup>2</sup>) mais la variabilité constatée sur les 6 réplicats laisse penser que la différence observée n'est pas significative. Ces résultats vont à l'encontre de ceux obtenus précédemment par culture cellulaire, qui traduisaient un gain d'abattement à plus forte dose UV.



**Figure III.5: effet de la dose UV en absence (UV seul) ou en présence (UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) de peroxyde d'hydrogène (50 mg/L) dans ET A**

L'ATPmétrie montre ici que l'augmentation de la dose UV ne conduit pas à une augmentation de la mort cellulaire. Les résultats obtenus par dénombrement sur milieux de culture résultent donc d'une plus forte inactivation bactérienne mais les micro-organismes restent vivants (pas de lyse de la cellule bactérienne) et donc potentiellement capables de mettre en œuvre un mécanisme de réparation cellulaire. Kong *et al.*, (2015) ont comparé les abattements d'*E. coli* obtenus par méthode de culture sur milieux et ATPmétrie à différentes doses UV (0-80 mJ/cm<sup>2</sup>) dans une solution saline. Comme dans la présente étude, le traitement UV seul n'induit qu'une faible diminution de la concentration en ATP alors qu'il provoque un abattement plus important du nombre de bactéries capables de croître sur milieux de culture. Kong *et al.* ont ensuite déterminé l'état des cellules bactériennes par cytométrie de flux. Cette technique permet de mesurer à haut débit une suspension de bactéries marquées selon leur viabilité. Les cellules vivantes sont vertes, les mortes sont rouges. Ils ont mesuré un fort signal vert caractéristique d'une membrane cellulaire intacte. Ces auteurs ont montré que le traitement UV seul (jusqu'à 80 mJ/cm<sup>2</sup> dans ce cas) n'engendre pas de lyse membranaire mais bloque la réplication cellulaire. L'irradiation UV seule ne conduit à une mort cellulaire massive qu'à très fortes doses UV. Penru *et al.* (2012) parviennent à une désinfection complète de l'eau de mer (mesurée par ATPmétrie) en utilisant une dose de 4000 mJ/cm<sup>2</sup>. Néanmoins, il ne serait pas économiquement pertinent d'appliquer une telle dose en sortie de petites STEU. La dose UV réglementaire est généralement de 40 mJ/cm<sup>2</sup>. Or, si un grand nombre de bactéries est effectivement inactivé à cette dose, les virus sont plus résistants. Des doses supérieures à 200 mJ/cm<sup>2</sup> sont généralement nécessaires pour obtenir 4 log d'abattement (Boczek *et al.*, 2016; Bounty *et al.*, 2012). C'est également le cas des protozoaires qui nécessitent des doses UV supérieures à 120 mJ/cm<sup>2</sup> pour obtenir un abattement de 4 log dans l'eau de STEU (Kruithof *et al.*, 2007).

Les conclusions de la présente étude, renforcées par les résultats d'autres travaux traduisent le fait que la majorité des bactéries sont uniquement inactivées à une dose UV réglementaire de 40 mJ/cm<sup>2</sup> et que certains virus ou protozoaires ne seront pas affectés. Le rejet dans le milieu aquatique de ces micro-organismes ne constitue pas un problème majeur car le facteur de dilution limite la contamination. Par contre, dans la perspective de réutilisation de l'eau, notamment en irrigation ou pour recharger les nappes phréatiques, la possibilité de

réactivation des bactéries potentiellement pathogènes et la présence de virus ou protozoaires devient préoccupante. Pour répondre à une demande de qualité d'eau compatible avec le recyclage de l'eau, l'association de l'UV avec le peroxyde d'hydrogène est proposée pour renforcer l'efficacité de désinfection en altérant la membrane cellulaire. L'ajout de peroxyde d'hydrogène à 50 mg/L permet d'obtenir une diminution de la concentration initiale en ATP supérieure à 90 % pour les deux doses UV mises en œuvre.

### III.3.3 Perspectives de traitement pour le recyclage de l'eau

La mise en place d'un traitement complémentaire pour la désinfection s'inscrit dans une perspective de réutiliser les eaux usées traitées pour divers usages tels que l'irrigation, le lavage de voiries ou la recharge de nappes phréatiques. Les possibilités de valorisation des eaux traitées dépendent de la qualité microbienne requise pour l'usage visé. En France, l'Arrêté du 25 juin 2014 classe les eaux traitées en quatre catégories après traitement (I.1.4.2 page 24). Parmi les directives concernant les bactéries, seul le suivi hebdomadaire d'*E. coli* par les méthodes conventionnelles de culture sur milieux est imposé. Pour évaluer la pertinence des traitements UV et UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, l'objectif fixé pour cette étude est d'atteindre la qualité de catégorie A. Cette qualité d'eau permet notamment l'irrigation des cultures maraîchères et des espaces verts mais aussi des golfs, gros consommateurs d'eau (ANNEXE 4). Le *Tableau III.4* permet de comparer les concentrations résiduelles d'*E. coli*, après les différents traitements appliqués dans cette étude à la valeur réglementaire de l'arrêté pour la catégorie A. L'eau usée traitée A utilisée lors des expérimentations atteint déjà les normes fixées pour les MES (< 15 mg/L) et la DCO (<60 mg/L).

**Tableau III.4: concentrations en *E. coli* obtenues après traitements UV ou UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans ET A et comparées à la valeur réglementaire minimale à atteindre pour un classement en catégorie d'eaux usées traitées A.**

	Réglementation catégorie A	Traitements UV		Traitements UV/ H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>		
Dose UV (mJ/cm <sup>2</sup> )	-	10	40	10	10	40
[H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ] (mg/L)	-	0	0	50	100	50
DCO (mg/L)	60	21				
MES (mg/L)	15	4,7				
[ <i>E. coli</i> ] (UFC/L)	2500	5630 ± 360	98 ± 77	1190 ± 42	26 ± 11	35 ± 11

Seul le traitement UV à une dose de 10 mJ/cm<sup>2</sup> ne permet pas d'atteindre les objectifs fixés par la réglementation concernant la catégorie A. Le traitement UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> atteint les objectifs pour toutes les conditions étudiées. La réglementation s'appuie sur les techniques conventionnelles de culture sur membrane (ISO 9308-1:2014). Or, les expérimentations réalisées

précédemment montrent que les abattements issus du traitement UV traduisent une inactivation bactérienne mais pas une mort cellulaire. Une réactivation est donc possible. De plus, la sensibilité aux UV varie selon les micro-organismes. Le suivi d'un seul modèle bactérien ne permet pas de connaître véritablement la qualité microbiologique de l'eau traitée. Au contraire, la synergie entre l'UV et le peroxyde d'hydrogène peut permettre d'obtenir des qualités d'eau supérieures à celles requises par la réglementation en assurant la destruction cellulaire et en touchant un plus grand nombre de micro-organismes. Les meilleurs niveaux de désinfection sont obtenus pour les combinaisons UV ( $10 \text{ mJ/cm}^2$ ) +  $100 \text{ mg/L d'H}_2\text{O}_2$  et UV ( $40 \text{ mJ/cm}^2$  +  $50 \text{ mg/L d'H}_2\text{O}_2$ ). Néanmoins, au regard du coût de l'oxydant, la seconde combinaison serait la plus économiquement adaptée à une mise en place à plus grande échelle.

L'utilisation de l'ATPmétrie dans le suivi de la qualité biologique de l'eau recyclée est une solution pour évaluer plus sûrement la qualité microbiologique d'une eau destinée à la réutilisation.

---

### III.3.4 Conclusion

L'étude de l'effet de deux doses UV sur la désinfection d'une eau de STEU (ET A de la Feysine) avec ou sans peroxyde d'hydrogène en conditions réelles (réacteur UV commercial, débit  $40 \text{ L/min}$  et eaux usées traitées) conduit à quatre conclusions principales.

- En absence de peroxyde d'hydrogène, l'augmentation de la dose UV favorise l'inactivation bactérienne mais n'accroît pas la mortalité bactérienne.
- L'ajout de peroxyde d'hydrogène engendre une forte désinfection ( $>90\%$ ) des échantillons aux deux doses UV étudiées.
- L'ATPmétrie est plus adaptée que la culture sur milieux pour étudier l'efficacité d'une désinfection puisqu'elle donne accès au taux de mortalité bactérienne, tandis que la culture sur milieux ne discerne pas les cellules mortes des cellules inactivées temporairement et qui peuvent présenter un risque sanitaire après réparation.
- Le traitement UV/ $\text{H}_2\text{O}_2$  permet d'obtenir une eau traitée de haute qualité (catégorie A).

## III.4 Microscopie après marquage ‘Live Dead Backlight’

---

Une autre méthode permettant de distinguer les bactéries mortes des bactéries vivantes et de les dénombrer a été utilisée. Il s’agit du test de viabilité bactérienne « LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability » développé par Thermofisher. L’avantage de ce test par rapport à l’ATPmétrie est qu’il permet de vérifier si la lyse de la paroi cellulaire par les radicaux tels que les OH• est le mécanisme principal d’action du traitement. L’objectif principal de cette méthode est de vérifier l’état de la membrane cellulaire des microorganismes après les traitements UV ou UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

---

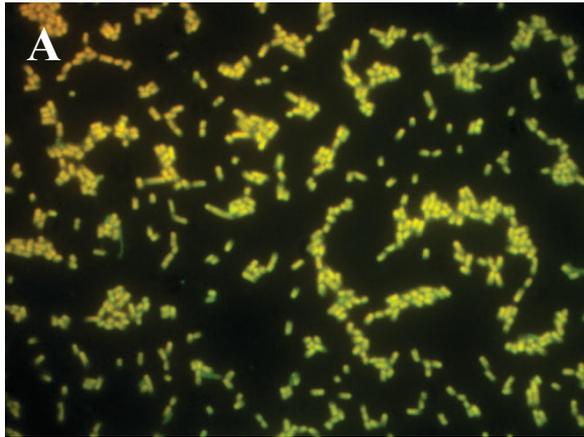
### III.4.1 Méthodologie

Le test « LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability » est basé sur un marquage différencié des cellules selon que leur paroi membranaire est intacte (cellules supposées vivantes) ou endommagée (cellules supposées mortes) grâce à deux sondes fluorescentes (iodure de propidium (IP) et le SYTO® 9) qui émettent des couleurs différentes (rouge ou verte) lorsqu’elles se fixent sur l’ADN. L’iodure de propidium (rouge) n’est pas capable de franchir la barrière de la membrane cellulaire, il ne pourra donc qu’interagir avec l’ADN des cellules mortes dont la membrane est altérée. Le dénombrement des bactéries vivantes (actives ou non) qui apparaissent vertes et des bactéries mortes colorées en rouge est effectué sous microscope à épifluorescence, après excitation des fluorochromes. Le protocole expérimental complet est décrit dans II.2.3.2 page 70

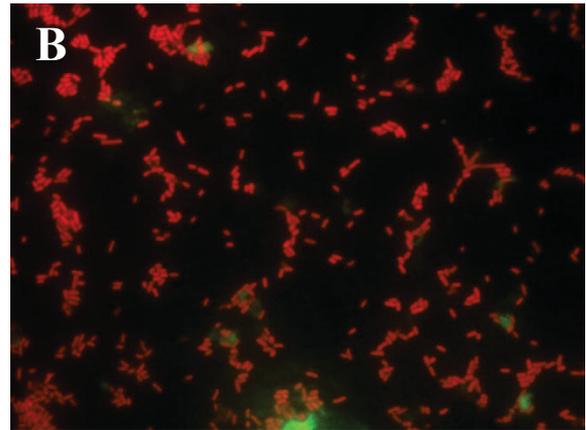
---

### III.4.2 Validation du protocole

La validation du protocole a été réalisée grâce à deux témoins. Le témoin positif, ne contenant a priori que des cellules vivantes, est constitué par une suspension dans l’eau usée traitée A (ET A) de bactéries *E. coli* (cultivées à partir d’une souche sauvage de l’eau de la Feyssine) qui n’a pas subi de traitement. Pour obtenir le témoin négatif, cette même suspension a été portée 10 minutes à 90°C pour détruire toutes les bactéries *E. coli*. Les clichés des observations microscopiques des témoins sont présentés *Figure III.6*. Les colorations exclusivement vertes du témoin positif et rouge du témoin négatif valident le protocole établi pour la réalisation du test « LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability ».



Témoin positif  $\times 100$



Témoin négatif ( $\times 100$ )

**Figure III.6 : *E. coli* sauvage marquée par le test LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability sans traitement (A) et après 10 minutes à 90 °C (B).**

---

### III.4.3 Suivi de l'action des traitements UV et UV/ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> par marquage de la biomasse endogène d'une eau traitée

#### III.4.3.1 Méthodologie

Les essais ont tout d'abord été réalisés sur la population microbienne endogène d'un échantillon d'eau traitée issue de la Feyssine (ET A) dont les caractéristiques sont rappelées dans II.1.3.2.2 page 65. Les échantillons ont été prélevés sur le pilote après traitement UV (40 mJ/cm<sup>2</sup>) ou UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (40 mJ/cm<sup>2</sup> + 50 mg/L d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Les échantillons (45 mL) contenus dans des tubes Falcons sont ensuite centrifugés à 10 000g pendant 5 minutes et suspendus dans 2 mL d'eau de STEU. 3 réplicats sont réalisés pour chaque échantillon. §

#### III.4.3.2 Résultats

Les essais de marquage de la biomasse endogène n'ont pas été concluants du fait d'une concentration en bactéries endogènes insuffisante même après centrifugation. Il en résulte que les micro-organismes marqués étaient trop peu nombreux dans les 5  $\mu$ L déposés sur la lame du microscope pour permettre une observation satisfaisante. Dès lors, l'étude a été poursuivie en utilisant une culture d'*E. coli* sauvage pour augmenter la concentration bactérienne de l'effluent de STEU.

---

### III.4.4 Suivi par marquage de l'action des traitements UV et UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sur une suspension d'*E. coli*

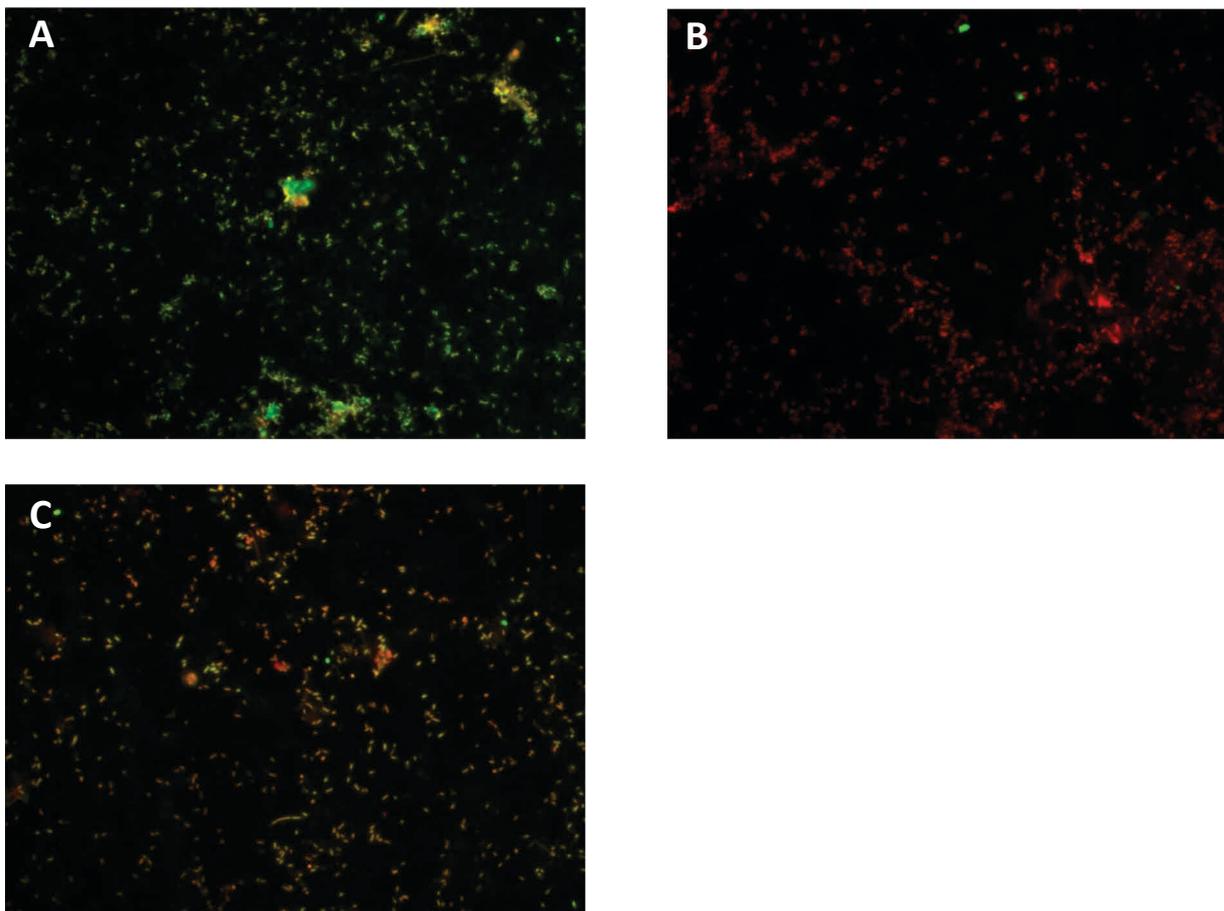
Le recours à une population bactérienne cultivée est beaucoup moins intéressant que l'observation des populations endogènes de l'eau de STEU. En effet, il n'est pas possible de prendre en compte des populations bactériennes susceptibles d'être plus résistantes aux UV ou aux radicaux hydroxyles. De plus, les résultats ne seront valables que pour la population d'*E. coli* étudiée. Cependant, cette expérimentation permet de vérifier l'effet des traitements appliqués dans cette étude sur la membrane bactérienne.

#### III.4.4.1 Méthodologie

Le mode opératoire est inspiré de l'étude de Hoefel *et al.* (2003). Ainsi, trois expérimentations ont été mise en œuvre en triplicats pour évaluer l'efficacité des traitements sur la suspension d'*E. coli* dans l'eau traitée de la Feysine (ET A). Dans le premier essai, l'échantillon ne subit aucun traitement avant marquage. La seconde expérimentation consiste en un traitement UV à 40 mJ/cm<sup>2</sup> dans le pilote de laboratoire. Les conditions expérimentales de la troisième sont identiques mais en présence de peroxyde d'hydrogène à la concentration de 50 mg/L.

#### III.4.4.2 Résultats

La microphotographie de la *Figure* III.7A a été prise après traitement UV à 40 mJ/cm<sup>2</sup>. Les bactéries présentent majoritairement un marquage vert, indiquant qu'elles restent viables malgré la dose UV appliquée. Ces observations sont en accord avec les résultats obtenus par ATPmétrie. En effet, le traitement UV n'entraînait qu'une faible diminution de la concentration en ATP initiale, traduisant une faible mort cellulaire. Les microphotographies obtenues après traitement UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 40 mJ/cm<sup>2</sup> et 50 mg/L d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sont présentées *Figures* III.7B et 7C. Lorsque 50 mg/L d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sont ajoutés la fluorescence rouge domine mais varie selon la zone de la lame observée. Cette variation résulte peut-être d'une pénétration non homogène des marqueurs. Néanmoins, ce traitement semble induire une mort cellulaire importante, comme cela a été observé précédemment par ATPmétrie.



A : traitement UV 40 mJ/cm<sup>2</sup> ; B et C : traitement UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 40 mJ/cm<sup>2</sup> + 50 mg/L d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

**Figure III.7 : marquage des bactéries par Backlight après traitement UV ou UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**

### III.4.4.3 Conclusion sur le marquage par backlight

Dans l'ensemble, les résultats des tests backlight rejoignent ceux obtenus par dosage de l'ATP : le traitement UV permet d'inactiver les bactéries mais n'engendre pas la mort cellulaire, alors que l'association de l'UV au peroxyde d'hydrogène conduit à une mort cellulaire importante. Ces résultats confirment qu'une dose UV réglementaire de 40 mJ/cm<sup>2</sup> inactive les bactéries en bloquant la réplication cellulaire mais ne conduit pas à la mort de la cellule. Au contraire, la présence de radicaux hydroxyles générés par le traitement UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> va permettre de déstructurer la membrane bactérienne et engendrer la mort de la cellule. Néanmoins, la limite de cette étude sur le marquage du test backlight réside dans le fait qu'un seul type de bactéries (*E. coli*) a pu être observé. La diversité des populations endogènes n'est donc pas prise en compte. Les nombreux problèmes de marquage ou de densité bactérienne rencontrés montrent la difficulté d'utilisation de ce test en routine dans le domaine du traitement des eaux résiduaires urbaines. D'autre part, les images obtenues par le microscope nécessitent parfois un traitement qui rend le test compliqué à mettre en œuvre comparé au test ATP.

La méthode baclight peut présenter quelques inconvénients tels qu'une difficulté à discerner la couleur des bactéries ce qui subordonne plus ou moins leur dénombrement aux aptitudes de l'expérimentateur. Des chercheurs (Berney *et al.*, 2007) ont notamment signalé que la combinaison des 2 colorants peut générer des colorations ambiguës difficiles à interpréter. La difficulté de mise en place du test Baclight conduit à s'appuyer sur d'autres tests plus simples à exploiter. C'est le cas du test ATP qui donne une information rapide et fiable sur le taux de mort cellulaire. D'autres méthodes d'analyses plus poussées, basées sur le marquage, sont capables de donner des données plus fiables que le test baclight. C'est le cas de la cytométrie de flux (Hammes *et al.*, 2010; Kong *et al.*, 2015). Mais cette méthodologie nécessite des équipements coûteux (cymomètre de flux).

## III.5 Conclusion

---

La raréfaction des ressources en eau conduit à s'intéresser à la réutilisation des eaux usées traitées pour diverses utilisations (irrigations, recharges de nappe phréatique, utilisation en industrie). La qualité microbiologique de l'eau est donc essentielle pour éviter les contaminations. Le traitement UV est une solution de plus en plus employée à cet effet. Néanmoins, les résultats de cette étude montrent que cette technologie a des limites. Les doses réglementaires actuelles (40 mJ/cm<sup>2</sup>) permettent une inactivation des modèles bactériens indicateurs de contamination fécale mais ne conduisent pas à la mort cellulaire de ces derniers. Les mécanismes de réparation cellulaire existant peuvent alors potentiellement conduire à la réactivation des cellules. Le traitement UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> permet quant à lui une amélioration de la désinfection et conduit à la mort de la cellule, empêchant toute réactivation. Néanmoins, au regard de la réglementation actuelle sur le recyclage de l'eau, le traitement UV (40 mJ/cm<sup>2</sup>) et l'ensemble des conditions testées pour le traitement UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (doses UV de 10 et 40 mJ/cm<sup>2</sup> avec H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 50 ou 100 mg/L) permettent d'atteindre des qualités d'eau de catégorie A, le niveau de qualité le plus exigeant pour le recyclage des eaux traitées.

Ces observations ont été mises en évidence en utilisant différentes méthodologies de suivi. Tout d'abord, les méthodes conventionnelles de culture sur milieux qui sont la base de la réglementation actuelle. Elles permettent uniquement de montrer une inactivation bactérienne mais ne distinguent pas les bactéries inactivées des bactéries mortes. D'autre part, elles ne permettent pas de prendre en compte les bactéries viables mais non cultivables qui représentent la majeure partie de la biomasse bactérienne. Cela devient problématique dans le cas du recyclage de l'eau. En effet, une eau réglementairement conforme à la catégorie A de par ses concentrations en bactéries indicatrices de contamination fécales, peut malgré tout contenir d'autres bactéries potentiellement pathogènes. Cette étude s'est donc appuyé sur deux autres méthodes de suivi que sont l'ATPmétrie et le marquage cellulaire par Baclight. L'ATPmétrie est une méthode robuste (rapide et reproductible) et relativement simple à mettre en place. Elle a permis de montrer que les doses UV appliquées dans l'étude ne conduisaient qu'à une faible mort cellulaire alors que le traitement UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pouvait éliminer plus de 90% de la biomasse bactérienne. La méthode de marquage par Baclight aboutit aux mêmes conclusions mais la difficulté d'optimisation de cette méthode et le temps d'observation au microscope la rendent peu attractive pour une utilisation en routine.

En conclusion, le traitement UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est adapté à la désinfection de l'eau usée traitée et permet d'obtenir des qualités d'eau qui vont même au-delà de la réglementation actuelle. Il est aussi envisageable de produire une eau dont la qualité pourrait être modifiable à la demande en variant la concentration en oxydant. Les méthodes conventionnelles de suivi microbiologiques sont limitées pour vérifier l'innocuité d'une eau traitée. Il est nécessaire d'envisager la mise en place de méthodes capables de discerner les cellules vivantes des cellules mortes. L'ATPmétrie semble être une alternative prometteuse.