



HAL
open science

Qualité biologique des eaux usées traitées en vue de la réutilisation

Erwan Carré

► **To cite this version:**

Erwan Carré. Qualité biologique des eaux usées traitées en vue de la réutilisation. Autre. Université de Lyon, 2017. Français. NNT : 2017LYSEM018 . tel-01848744

HAL Id: tel-01848744

<https://theses.hal.science/tel-01848744v1>

Submitted on 25 Jul 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



N°d'ordre NNT : 2017LYSEM018

THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON
opérée au sein de
l'Ecole des Mines de Saint-Etienne

Ecole Doctorale N° 488
Sciences, Ingénierie, Santé

Spécialité de doctorat : Sciences et Génie de l'Environnement

Soutenue publiquement le 06/07/2017, par :
Erwan Carré

**Qualité biologique des eaux usées
traitées en vue de la réutilisation**

Devant le jury composé de :

Chiron, Serge	Directeur de recherche	IRD Montpellier	Président, Rapporteur
Wéry, Nathalie	Chargée de recherche	INRA Narbonne	Rapportrice
Grillot, Didier	Directeur de recherche	IMT Mines Saint-Etienne	Examinateur
Thomas, Marie- Florence	Enseignante-chercheure	EHESP Rennes	Examinatrice
Lopez-Ferber, Miguel	Directeur de recherche	IMT Mines Alès	Directeur de thèse
Lin, Liming	Enseignant-chercheur	IMT Mines Alès	Encadrant
Jauzein, Vincent	Ingénieur de recherche	SAUR	Invité

Spécialités doctorales
 SCIENCES ET GENIE DES MATERIAUX
 MECANIQUE ET INGENIERIE
 GENIE DES PROCEDES
 SCIENCES DE LA TERRE
 SCIENCES ET GENIE DE L'ENVIRONNEMENT

Responsables :
 K. Wolski Directeur de recherche
 S. Drapier, professeur
 F. Gruy, Maître de recherche
 B. Guy, Directeur de recherche
 D. Graillot, Directeur de recherche

Spécialités doctorales
 MATHEMATIQUES APPLIQUEES
 INFORMATIQUE
 SCIENCES DES IMAGES ET DES FORMES
 GENIE INDUSTRIEL
 MICROELECTRONIQUE

Responsables
 O. Roustant, Maître-assistant
 O. Boissier, Professeur
 JC. Pinoli, Professeur
 X. Delorme, Maître assistant
 Ph. Lalevée, Professeur

EMSE : Enseignants-chercheurs et chercheurs autorisés à diriger des thèses de doctorat (titulaires d'un doctorat d'Etat ou d'une HDR)

Nom	Responsable	Spécialité	Responsable	
ABSI	Nabil	CR	Génie industriel	CMP
AUGUSTO	Vincent	CR	Image, Vision, Signal	CIS
AVRIL	Stéphane	PR2	Mécanique et ingénierie	CIS
BADEL	Pierre	MA(MDC)	Mécanique et ingénierie	CIS
BALBO	Flavien	PR2	Informatique	FAYOL
BASSEREAU	Jean-François	PR	Sciences et génie des matériaux	SMS
BATTON-HUBERT	Mireille	PR2	Sciences et génie de l'environnement	FAYOL
BEIGBEDER	Michel	MA(MDC)	Informatique	FAYOL
BLAYAC	Sylvain	MA(MDC)	Microélectronique	CMP
BOISSIER	Olivier	PR1	Informatique	FAYOL
BONNEFOY	Olivier	MA(MDC)	Génie des Procédés	SPIN
BORBELY	Andras	MR(DR2)	Sciences et génie des matériaux	SMS
BOUCHER	Xavier	PR2	Génie Industriel	FAYOL
BRODHAG	Christian	DR	Sciences et génie de l'environnement	FAYOL
BRUCHON	Julien	MA(MDC)	Mécanique et ingénierie	SMS
CAMEIRAO	Ana	MA(MDC)	Génie des Procédés	SPIN
CHRISTIEN	Frédéric	PR	Science et génie des matériaux	SMS
DAUZERE-PERES	Stéphane	PR1	Génie Industriel	CMP
DEBAYLE	Johan	CR	Sciences des Images et des Formes	SPIN
DEGEORGE	Jean-Michel	MA(MDC)	Génie industriel	Fayol
DELAFOSSÉ	David	PR0	Sciences et génie des matériaux	SMS
DELORME	Xavier	MA(MDC)	Génie industriel	FAYOL
DESRAYAUD	Christophe	PR1	Mécanique et ingénierie	SMS
DJENIZIAN	Thierry	PR	Science et génie des matériaux	CMP
DOUCE	Sandrine	PR2	Sciences de gestion	FAYOL
DRAPIER	Sylvain	PR1	Mécanique et ingénierie	SMS
FAUCHEU	Jenny	MA(MDC)	Sciences et génie des matériaux	SMS
FAVERGEON	Loïc	CR	Génie des Procédés	SPIN
FEILLET	Dominique	PR1	Génie Industriel	CMP
FOREST	Valérie	MA(MDC)	Génie des Procédés	CIS
FOURNIER	Jacques	Ingénieur chercheur CEA	Microélectronique	CMP
FRACZKIEWICZ	Anna	DR	Sciences et génie des matériaux	SMS
GARCIA	Daniel	MR(DR2)	Sciences de la Terre	SPIN
GAVET	Yann	MA(MDC)	Sciences des Images et des Formes	SPIN
GERINGER	Jean	MA(MDC)	Sciences et génie des matériaux	CIS
GOEURIOT	Dominique	DR	Sciences et génie des matériaux	SMS
GONDRAN	Natacha	MA(MDC)	Sciences et génie de l'environnement	FAYOL
GRAILLOT	Didier	DR	Sciences et génie de l'environnement	SPIN
GROSSEAU	Philippe	DR	Génie des Procédés	SPIN
GRUY	Frédéric	PR1	Génie des Procédés	SPIN
GUY	Bernard	DR	Sciences de la Terre	SPIN
HAN	Woo-Suck	MR	Mécanique et ingénierie	SMS
HERRI	Jean Michel	PR1	Génie des Procédés	SPIN
KERMOUCHE	Guillaume	PR2	Mécanique et Ingénierie	SMS
KLOCKER	Helmut	DR	Sciences et génie des matériaux	SMS
LAFORÉST	Valérie	MR(DR2)	Sciences et génie de l'environnement	FAYOL
LERICHE	Rodolphe	CR	Mécanique et ingénierie	FAYOL
MALLIARAS	Georges	PR1	Microélectronique	CMP
MOLIMARD	Jérôme	PR2	Mécanique et ingénierie	CIS
MOUTTE	Jacques	CR	Génie des Procédés	SPIN
NIKOLOVSKI	Jean-Pierre	Ingénieur de recherche	Mécanique et ingénierie	CMP
NORTIER	Patrice	PR1	Génie des Procédés	SPIN
O CONNOR	Rodney Philip	MA(MDC)	Microélectronique	CMP
OWENS	Rosin	MA(MDC)	Microélectronique	CMP
PERES	Véronique	MR	Génie des Procédés	SPIN
PICARD	Gauthier	MA(MDC)	Informatique	FAYOL
PIJOLAT	Christophe	PR0	Génie des Procédés	SPIN
PINOLI	Jean Charles	PR0	Sciences des Images et des Formes	SPIN
POURCHEZ	Jérémy	MR	Génie des Procédés	CIS
ROBISSON	Bruno	Ingénieur de recherche	Microélectronique	CMP
ROUSSY	Agnès	MA(MDC)	Microélectronique	CMP
ROUSTANT	Olivier	MA(MDC)	Mathématiques appliquées	FAYOL
SANAUR	Sébastien	MA(MDC)	Microélectronique	CMP
STOLARZ	Jacques	CR	Sciences et génie des matériaux	SMS
TRIA	Assia	Ingénieur de recherche	Microélectronique	CMP
VALDIVIESO	François	PR2	Sciences et génie des matériaux	SMS
VIRICELLE	Jean Paul	DR	Génie des Procédés	SPIN
WOLSKI	Krzysztof	DR	Sciences et génie des matériaux	SMS
XIE	Xiaolan	PR1	Génie industriel	CIS
YUGMA	Gallian	CR	Génie industriel	CMP

Remerciements

Mes premiers remerciements vont à Serge Chiron, directeur de recherche à l'IRD de Montpellier, Nathalie Wéry, chargée de recherche à l'INRA de Narbonne et Didier Graillot, directeur de recherche à l'IMT Mines Saint-Etienne pour avoir consacré du temps à juger ce travail de thèse. Un merci tout particulier à Marie-Florence Thomas, enseignante-chercheuse à l'EHESP, pour ses encouragements pendant mon cursus à l'EME et pendant cette thèse.

Durant ces trois années, j'ai eu la chance d'intégrer deux équipes, chez SAUR et au LGEI. Je souhaite tout d'abord remercier Fabrice Nauleau, directeur R&D SAUR pour m'avoir fait confiance pour cette mission. Un grand merci également à Vincent Jauzein, ingénieur R&D pour ses conseils et pour m'avoir fait découvrir les nombreux aspects de ce métier. J'ai beaucoup appris professionnellement grâce à toi. Ce fût un réel plaisir de côtoyer l'ensemble de l'équipe R&D pendant ces trois années : Jean, Yves, Frédérique, Sabine, Stéphanie, Gilbert, Mathieu, Michel, Philippe, Rémi, Guillaume, Joanna, Laure, Sylvain... Je ne les cite pas tous, mais je les remercie pour leur bonne humeur et leur disponibilité ! J'ai bien sûr une pensée particulière pour mes collègues de Mauguio, stagiaires ou techniciens, pour tous ces moments partagés qu'ils soient bons (café du midi en terrasse) ou moins bons (UF en panne à 17h) : Julie, Geoffrey, Sylvain et Christopher.

J'ai également été très bien accueilli au LGEI. Un grand merci à Miguel Lopez-Ferber, directeur de recherche, pour ses conseils avisés, pour m'avoir épaulé quand il le fallait et pour sa grande capacité à replacer les résultats dans un contexte plus général ! Merci également à toute l'équipe ESAH, brillamment animée par Anne Johannet pour leur indéfectible joie de vivre et pour leur disponibilité ! Plus globalement, merci à Oualid et à la team « Caminov » pour la bonne humeur au labo et à Roro pour la bonne humeur dans la salle de pause. Et bien sûr, merci à l'indispensable Cathy, toujours disponible pour aider à régler les problèmes administratifs. Je remercie également Sandrine Bayle pour m'avoir initié à la PCR. Enfin un grand merci à la team « doctorants et stagiaires » pour la bonne ambiance des pauses du midi ! Pascale (« le train est encore supprimé ! »), Perrine et Takoua (team micropolluants !), Rémi (pour les discussions animées), Michael et Adrien (team spéléo !), les géologues, et tous les autres pour les bons moments partagés ! Merci enfin à Liming Lin.

Enfin, je souhaite remercier mes amis toujours présents pour partager des week-ends de folie qui redonnent la pêche pour attaquer la semaine. Axel et Marion pour les fameuses soirées de Montpellier après les fameuses soirées Rennaises ! Et la « famille EME », notamment Clarisse et Arthur (les témoins !) pour les retrouvailles en Bretagne, en Mayenne, à Lyon ou dans le Sud !

À mes parents, pour leur soutien et les valeurs qu'ils m'ont transmises. Merci également à Flo (et Klaudia) et Coco !

À Mathilde, qui a accepté de devenir ma femme il y a bientôt un an, et qui est mon bonheur au quotidien.

Table des matières

Remerciements

Table des matières

Liste des figures et tableaux

Publications et communications

Liste des abréviations

Première partie : Introduction générale

I. Introduction.....	3
II. Les moteurs de la REUT	4
1. Le stress hydrique, moteur principal de la REUT	4
2. Autres moteurs	6
III. Les différents usages des eaux usées traitées	9
1. Usages agricoles.....	9
a. Enjeux.....	9
b. Exemples d'application	12
2. Usages urbains	14
a. Enjeux.....	14
b. Exemples d'application	16
3. Usages industriels	18
a. Enjeux.....	18
b. Exemples d'application	19
4. Usages environnementaux et récréatifs	21
a. Enjeux.....	21
b. Exemple d'application.....	24
5. Usage potable direct.....	25
6. Conclusion.....	28
IV. Les risques sanitaires liés à la REUT	30
1. Les risques chimiques	30
2. Les risques biologiques.....	31
a. Bactéries.....	32
b. Protozoaires	33
c. Helminthes	34
d. Virus	35

e. Autres pathogènes et toxines	36
3. Estimation des risques biologiques	36
a. Effets des traitements sur les microorganismes pathogènes	36
b. Effet du stockage et de l'environnement sur les microorganismes pathogènes.....	38
c. Estimation quantitative du risque microbien (EQRМ)	39
4. Les indicateurs de qualité des eaux usées traitées	40
a. Qu'est-ce qu'un bon indicateur ?	40
b. Les indicateurs de qualité physico-chimique	41
c. Les indicateurs de qualité microbiologique.....	43
V. Principaux pays pratiquant la REUT et réglementations associées	48
1. Le cadre de l'OMS	49
2. Les normes ISO 16075	50
3. Les réglementations nationales et locales	52
4. Conclusion.....	56
VI. État des lieux de la recherche sur la réutilisation des eaux usées traitées	57
1. Filières de traitement abordées dans les publications.....	57
2. Principaux projets européens et français.....	60
a. Le projet DEMOWARE (DEMOWARE, 2015; IWA, 2014)	60
b. Le projet R3WATER (R3WATER, 2015)	61
c. Exemples de projets en France	61
3. Le projet NOWMMA	62
VII. Objectifs de la thèse	67

Deuxième partie : Fiabilité des méthodes de caractérisation de la contamination biologique

I. Introduction.....	71
II. Principes et limites des méthodes par culture.....	73
1. Méthodes par détermination du Nombre le Plus Probable (NPP)	73
a. Principe.....	73
b. Quantification	74
c. Aspects pratiques et économiques.....	76
2. Méthodes par comptage direct.....	77
a. Principe.....	77
b. Quantification	78
c. Aspects pratiques et économiques.....	80
3. Limites des méthodes par culture	81
a. Temps d'incubation nécessaire	81

b. Bactéries viables mais non cultivables (VBNC)	81
c. Association des microorganismes avec les particules en suspension	83
4. Mise en évidence de l'agrégation des microorganismes	85
a. Séparation de la fraction des microorganismes « libres »	86
b. Dispersion des microorganismes agrégés	87
c. Méthodes alternatives de dénombrement	89
5. Conclusion : définition de la stratégie expérimentale	95
III. Matériel et méthodes.....	97
1. Effluents étudiés et protocole expérimental	97
2. Analyses physico-chimiques	98
a. Matières en suspension (MES)	98
b. Turbidité	99
c. Transmittance UV à 254 nm.....	100
d. Distribution granulométrique des particules	100
3. Analyses microbiologiques : méthodes par culture	103
4. Analyses microbiologiques : PCR quantitative	105
a. Extraction et purification de l'ADN	105
b. Mesure de la quantité d'ADN extraite.....	105
c. Choix des séquences amplifiées et cycles d'amplification	106
d. Préparation des gammes d'étalonnage	109
5. Traitement des données.....	110
IV. Résultats	112
1. Caractérisation physico-chimique des effluents	112
a. Paramètres globaux	112
b. Distribution granulométrique des particules	112
2. Extraction de l'ADN et étalonnage pour la PCR	116
a. Extraction de l'ADN : aspects quantitatifs et qualitatifs	116
b. Gammes d'étalonnage pour la qPCR	118
3. Impact des matières en suspension sur la fiabilité des méthodes de quantification	119
a. Impact sur la quantification.....	119
b. Impact sur le rapport entre qPCR et méthodes par culture	123
c. Impact sur le rapport entre les échantillons non filtrés et filtrés à 5 µm	126
V. Discussion.....	128
VI. Conclusion.....	135

Troisième partie : Conditions limites de l'utilisation de la désinfection UV

I. Introduction.....	141
II. État de l'art.....	143
1. Principe de la désinfection UV	143
a. Spectre d'émission et classification du rayonnement UV	143
b. Action germicide	143
c. Types de lampes UV.....	145
d. Configurations pour la mise en œuvre sur une filière de traitement	147
2. Détermination de la dose appliquée à l'effluent.....	148
a. Aspects théoriques	148
b. Détermination de la dose UV appliquée par biodosimétrie	150
3. Impact des particules en suspension sur l'efficacité de la désinfection UV	153
a. Interaction des particules avec le rayonnement UV et avec les microorganismes	153
b. Modélisation de l'impact sur la désinfection	155
4. Réactivation après exposition aux UV.....	158
a. Photoréactivation	158
b. Réparation à l'obscurité (« dark repair »)	159
c. Modélisation de la réactivation	160
5. Autres facteurs affectant l'efficacité de la désinfection UV	161
a. Composition chimique de l'effluent.....	161
b. Caractéristiques des microorganismes.....	162
6. Conclusion.....	163
III. Matériel et méthodes.....	165
1. Caractérisation du réacteur pilote	165
a. Établissement d'une courbe dose-réponse.....	165
b. Caractérisation du réacteur pilote : hydraulique.....	167
c. Caractérisation du réacteur : doses de réduction équivalente (DRE).....	169
2. Étude de l'impact des particules en suspension sur l'efficacité de la désinfection UV	170
a. Effluents étudiés	170
b. Essais sur le réacteur à lumière collimatée.....	170
c. Essais sur le réacteur pilote	171
3. Stockage et réactivation : essais à l'échelle du laboratoire	172
4. Stockage et réactivation : essais à l'échelle du pilote industriel	173
a. Effluent étudié.....	173
b. Cuve de stockage et dispositif de lampes UV	173
c. Protocole de remplissage et d'échantillonnage.....	174
5. Analyse statistique des données	175

IV. Résultats et discussion	177
1. Caractérisation du réacteur pilote	177
a. Établissement d'une courbe dose – réponse	177
b. Validation des conditions de mélange dans le réacteur	179
c. Estimation des doses de réduction équivalente dans le réacteur.....	179
2. Impact des particules en suspension sur l'efficacité de la désinfection UV	181
a. Caractérisation physico-chimique des effluents	181
b. Représentativité des observations en réacteur batch	184
c. Modélisation de l'impact des particules sur la désinfection	185
d. Impact des particules sur la désinfection des microorganismes exposés aux UV	190
e. Impact des particules sur la désinfection des microorganismes protégés des UV	193
3. Évolution de la qualité biologique après la désinfection UV	200
a. Essais à l'échelle du laboratoire	200
b. Essais à l'échelle du pilote industriel.....	203
V. Conclusion.....	209

Quatrième partie : Filière de traitement tertiaire pour garantir la fiabilité de la qualité biologique des eaux usées traitées

I. Introduction.....	215
II. Optimisation du prétraitement par filtration en profondeur	217
1. État de l'art.....	217
a. Mécanismes de la filtration en profondeur.....	217
b. Aspects théoriques	218
c. Caractéristiques du média filtrant	220
d. Technologies de filtration existantes.....	222
e. Dimensionnement et paramètres opératoires	224
f. Cationisation du filtre par des coagulants inorganiques ou des polymères organiques.....	224
2. Matériel et méthodes	227
a. Présentation du site d'étude	227
b. Description du pilote de filtration sur sable	228
c. Configurations testées.....	230
d. Indicateurs de suivi de la performance.....	232
e. Traitement des données	233
3. Résultats	234
a. Performances épuratoires de la station d'épuration.....	234
b. Indicateurs physicochimiques	235
c. Indicateurs microbiologiques.....	238
d. Performance opérationnelle	240
e. Performances avec un effluent secondaire de qualité dégradée	245

4. Discussion.....	249
III. Estimation of water quality by UV/Vis spectrometry in the framework of treated wastewater reuse.....	253
1. Introduction.....	253
2. Methods.....	255
a. Experimental platform and data acquisition	255
b. Spectra exploitation with Partial Least Squares Regression (PLSR)	257
c. Spectra exploitation with Correlated Component Regression (PLS CCR).....	258
d. Evaluation of the quality of the models (PLSR and PLS CCR).....	258
3. Results and discussion	259
a. Definition of wavelength ranges for each indicator.....	259
b. COD estimation	259
c. TSS estimation	260
d. Turbidity estimation	261
e. Nitrate estimation	261
4. Conclusions	265
IV. Identification et définition des points de contrôle sur la filière	267
1. Introduction	267
2. Méthodologie	268
3. Résultats et discussion.....	269

Conclusion générale273

Références bibliographiques

Annexes

Annexe A : Protocole d'extraction de l'ADN pour la qPCR

Annexe B : Gammes d'étalonnage pour la qPCR

Annexe C : Constantes avec erreurs-type des modèles pour l'inactivation des microorganismes exposés aux UV et des microorganismes protégés des UV

Annexe D : Fiches techniques des medias filtrants et des coagulants utilisés pour l'optimisation de la filtration

Annexes E : Articles scientifiques

Abstract / Résumé

Liste des figures

Première partie

Figure 1 : Ressources d'eau douce nécessaires pour assurer le maintien de la vie humaine, en mètre cube par personne et par an (PNUE, 2010)	5
Figure 2 : Probabilité d'apparition de pénuries d'eau (moins de 1700 m ³ par personne et par an) dans le monde en 2030 (GWI, 2013).....	5
Figure 3 : a) Acceptabilité de la consommation de fruits et de légumes qui ont été arrosés avec des eaux usées traitées dans le but de participer aux efforts en faveur de la préservation des ressources en eau en France (Commissariat général au développement durable, 2014) ; et b) synthèse des résultats d'une enquête sur la réutilisation des eaux usées traitées pour différents usages en France (Lazarova & Brissaud, 2007; SOFRES, 2006)	7
Figure 4 : Synoptique de la station d'épuration de San Rocco, Milan, Italie (Lazarova, 2013b)	14
Figure 5 : Exemple de marquage pour les réseaux d'eaux usées traitées : a) canalisations et b) au point d'usage (NWQMS, 2006; US EPA, 2012)	16
Figure 6 : Schéma de la filière de réutilisation des eaux usées dans le quartier de Shinjuku (Tokyo, Japon) pour l'alimentation des chasses d'eau d'immeubles (Lazarova et al., 2013)	18
Figure 7 : Principales méthodes pour la recharge artificielle d'aquifères : a) bassin d'infiltration en surface ; b) puits d'injection dans la zone non saturée (ou zone vadose) ; c) puits d'injection directe (Asano et al., 2007)	23
Figure 8 : Cycle de l'eau de la ville de Wulpen (Belgique) (Dewettinck et al., 2001).....	25
Figure 9 : Différence entre l'usage potable indirect (a) et l'usage potable direct (b) des EUT (Asano et al., 2007)	26
Figure 10 : Schéma de la filière de réutilisation des EUT pour un usage potable direct de Cloudcroft, Nouveau-Mexique, USA (Livingston, 2008; Tchobanoglous et al., 2011) ..	27
Figure 11 : Origine et impacts possibles des micropolluants (source SAUR)	31
Figure 12 : Différence entre les bactéries Gram-positives (a) et les bactéries Gram-négatives (b) (Madigan et al., 2012).....	32
Figure 13 : Méthodologie générale de l'EQRM (n : fréquence d'exposition ; d : dose reçue à chaque exposition ; N50 : dose infectieuse médiane ; α et r : constantes « d'infectiosité » du pathogène) (d'après Drechsel et al., 2011; Haas et al., 1999; Salgot & Huertas, 2006)	40
Figure 14 : Définition de la notion d'indicateur de qualité des EUT	41
Figure 15 : Signification des indicateurs globaux de la pollution organique (Thomas & Theraulaz, 2007).....	42

Figure 16 : Les différentes formes de l'azote et les indicateurs liés (d'après Asano et al., 2007)	43
Figure 17 : Représentation d'une cellule de <i>Escherichia coli</i> (souche O157:H7). La longueur est d'environ 3 µm pour un diamètre d'environ 1 µm (Madigan et al., 2012).	45
Figure 18 : Photos d'entérocoques au microscope électronique à balayage. Le diamètre des cellules varie entre 0,5 et 1 µm (Madigan et al., 2012)	46
Figure 19 : Principaux pathogènes rencontrés dans les eaux usées et principaux indicateurs microbiologiques de contamination	47
Figure 20 : Principe de l'osmose directe (Achilli et al., 2009).....	58
Figure 21 : Les sites d'études du projet DEMOWARE, mis en perspective avec la disponibilité de la ressource en eau à l'échelle européenne (IWA, 2014).....	61
Figure 22 : Positionnement de la thèse autour des tâches du projet NOWMMA.....	63
Figure 23 : Implantation de la plateforme expérimentale du projet NOWMMA au sein de la STEP étudiée dans le cadre du projet. P désigne les installations de traitement (photo de droite) et I la parcelle d'irrigation. Le trait bleu représente la canalisation d'amenée de l'effluent secondaire du canal venturi de la STEP vers la plateforme.	64
Figure 24 : Description des filières de traitement tertiaire pour la réutilisation des eaux usées traitées développées dans le cadre du projet NOWMMA.	65
Figure 25 : Répartition du degré de traitement des eaux usées des stations d'épuration des villes côtières du bassin méditerranéen entre 2000 et 10 000 EH (PNUE, 2008)..	66

Deuxième partie

Figure 1 : Représentation des intervalles de confiance à 95 % négatifs et positifs pour les valeurs de NPP données par la table IDEXX pour chaque combinaison grands puits / petits puits de la plaque Quanti-Tray 2000 (d'après ISO, 2014).....	76
Figure 2 : Coefficient de variation du nombre de colonies comptées dans une suspension parfaitement homogénéisée suivant la loi de distribution de Poisson (d'après ISO, 2001)	79
Figure 3 : Exemple de résultats pour Compact Dry EC. Dans le cas (a), le nombre de colonies est considéré comme proche de 300 et seule une partie de la surface est comptabilisée. Dans le cas (b), le nombre de colonies est considéré comme trop important et la dilution supérieure doit être prise en compte	80
Figure 4 : Paramètres définissant la viabilité d'une cellule bactérienne (Hammes et al., 2011)	82
Figure 5 : Structure typique d'un floc bactérien (Farnood, 2014)	85
Figure 6 : Protocole expérimental pour la mesure du niveau d'agrégation chez <i>E. coli</i> (MUGlu : substrat spécifique ; MUF : produit de dégradation fluorescent) (Garcia-Armisen & Servais, 2009)	90

Figure 7 : Évolution de la quantité d'ADN mesurée par fluorescence durant un cycle de qPCR : C_q (également noté CT) représente le nombre de cycles nécessaires pour atteindre le seuil de fluorescence (d'après Bustin, 2004)	93
Figure 8 : Stratégie expérimentale retenue	96
Figure 9 : Banc de mélange des effluents	98
Figure 10 : Tailles de particules et méthodes optiques de comptage (Harrison & Latime, 2008)	101
Figure 11 : Différence entre les méthodes par diffraction (a) et par blocage (b) de la lumière (Zhang et al., 2009)	101
Figure 12 : Différentes interprétations de la taille d'une particule non sphérique (Particle Measuring Systems, 2011)	103
Figure 13 : Montage expérimental pour la mesure de la distribution granulométrique des particules d'un échantillon. Les flèches rouges indiquent l'écoulement de l'échantillon d'eau à analyser	103
Figure 14 : Exemple de protocole de dilution des échantillons avant mise en culture pour la condition C	104
Figure 15 : Principe de la PCR avec hydrolyse des sondes (VIC et FAM sont des fluorophores) (DNA Vision, 2016)	107
Figure 16 : Représentation de la distribution des données d'un échantillon sous forme de boîte à moustaches ou box plot	111
Figure 17 : Corrélations linéaires entre la concentration en particules de taille supérieure ou égale à 25 μm et les paramètres MES, turbidité et transmittance UV à 254 nm. Les données sont regroupées pour les trois effluents étudiés	114
Figure 18 : Représentation graphique de la distribution granulométrique des particules pour les trois effluents étudiés (moyennes sur six réplicats) : a) distribution absolue ; b) distribution relative en nombre de particules ; c) distribution relative en volume occupé	115
Figure 19 : Electrophorèse de l'ADN extrait issu des deux souches étudiées. Migration sur gel d'agarose 1 % et coloration de l'ADN au BET. La flèche blanche indique le sens de migration.	116
Figure 20 : Exemples de a) profil d'amplification et b) gamme d'étalonnage (points bleus) pour l'ADN extrait de la souche <i>E. coli</i>	119
Figure 21 : Résultats de dénombrement pour les échantillons non filtrés. Les échantillons marqués par un exposant différent (a-c) pour un indicateur donné sont significativement différents les uns des autres (test de Mann-Whitney, $p < 0,05$)	120
Figure 22 : Résultats de dénombrement pour les échantillons filtrés à 5 μm . Les échantillons marqués par un exposant différent (a-c) pour un indicateur donné sont significativement différents les uns des autres (test de Mann-Whitney, $p < 0,05$)	121

Figure 23 : Droite de régression entre les mesures avec la méthode IDEXX et la méthode Compact Dry. Le trait noir épais correspond à la régression sur l'ensemble des mesures (n = 46)	124
Figure 24 : Ratios entre les valeurs mesurées par qPCR et par les méthodes par culture pour les trois conditions et les indicateurs <i>E. coli</i> (A – échantillons non filtrés et B – échantillons filtrés à 5 µm) et entérocoques (C – échantillons non filtrés et D – échantillons filtrés à 5 µm). Les échantillons marqués par un exposant différent (a-c) pour un indicateur donné sont significativement différents les uns des autres (test de Mann-Whitney, p < 0,05).....	125
Figure 25 : Rapports entre les teneurs mesurées sur les échantillons non filtrés et les échantillons filtrés à 5 µm pour les trois indicateurs étudiés. Le trait vert en pointillés représente un ratio égal à 1. Les échantillons marqués par un exposant différent (a-c) pour un indicateur donné sont significativement différents les uns des autres (test de Kruskal-Wallis, suivi par la procédure de comparaison par paire de Conover-Iman avec correction de Bonferroni, p < 0,05).....	127
Figure 26 : Variabilité de la teneur en MES (TSS) des effluents issus de procédés de type « boues activées » (Asano et al., 2007). Une concentration en MES de 65 mg/L correspond approximativement au neuvième décile des valeurs rencontrées pour des clarificateurs de faible profondeur	130

Troisième partie

Figure 1 : Positionnement et classification des longueurs d'onde UV au sein du spectre électromagnétique (US EPA, 2006)	143
Figure 2 : Spectres d'absorption dans l'UV de l'ADN et de ses bases azotées (a), et mécanisme principal d'action des radiations UV (b) (International Water-Guard Industries, 2005; Moles, 2007)	144
Figure 3 : Exemple de lampe UV basse pression et basse intensité	145
Figure 4 : Spectre d'émission UV pour une lampe basse pression basse intensité et pour une lampe moyenne pression. L'intensité relative de la lampe moyenne pression par rapport à la lampe basse pression est représentée sous forme d'histogramme pour chaque longueur d'onde (axe de gauche). Le spectre d'absorption de l'ADN dans les UV est également représenté (en proportion de l'absorbance totale dans la gamme 220 – 240 nm, axe de droite) (Linden & Rosenfeldt, 2011)	146
Figure 5 : Exemples de systèmes de désinfection UV : a) configuration en canal ouvert (© SAUR) et b) configuration en réacteur fermé (© BIO-UV). Dans ces deux exemples, les lampes sont placées de façon parallèle à l'écoulement	147
Figure 6 : Profondeur de pénétration du rayonnement UV (d en cm à partir de la surface de la gaine de quartz de la lampe) en fonction de la transmittance de l'eau à traiter (cuve de 10 mm). La courbe rouge correspond à une chute de 99% (x = 0,01) de l'intensité I_s et la courbe bleue correspond à une chute de 95% (x = 0,05) de l'intensité I_s (d'après Bolton et al., 2001). La zone grisée correspond aux transmittances typiquement rencontrées pour les EUT.....	149

Figure 7 : Procédure de validation de la dose UV appliquée par biodosimétrie (Trojan technologies).....	151
Figure 8 : Exemple de montage expérimental de type « réacteur UV à lumière collimatée » (Sarathy & Mohseni, 2010).....	152
Figure 9 : Taille des différents types de particules présentes dans les eaux usées (Chahal et al., 2016).....	154
Figure 10 : Interactions entre les particules et le rayonnement UV qui affectent l'efficacité de la désinfection (Asano et al., 2007).....	155
Figure 11 : Modélisation de la désinfection UV : a) premier ordre ; b) microorganismes résistants aux UV ; c) prise en compte de l'effet de traîne (en ordonnée, quantité résiduelle de microorganismes à partir d'une quantité initiale N0) (d'après Emerick et al., 2000).....	156
Figure 12 : Action de la photolyase pour réparer les atteintes à l'ADN causées par les UV (photoréactivation) (Friedberg, 2003).....	159
Figure 13 : Mécanisme de réparation « à l'obscurité » de l'ADN par excision. Les gènes impliqués dans ce mécanisme sont indiqués entre parenthèses (Sancar, 2016).....	160
Figure 14 : Doses UV requises pour une inactivation de 4 log de plusieurs microorganismes pathogènes avec une lampe UV basse pression (Linden & Rosenfeldt, 2011 d'après Hijnen et al., 2006; US EPA, 2006). L'information génétique est sous forme d'ARN pour les virus et sous forme d'ADN pour les autres microorganismes (et le virus de l'hépatite B).....	163
Figure 15 : Mesure de l'intensité reçue sur l'ensemble de la surface traitée : « Petri factor » = 0,9026.....	167
Figure 16 : Réacteur pilote de désinfection UV : a) vue de dessus et b) représentation schématique en coupe.....	168
Figure 17 : Configuration expérimentale pour l'étude du stockage à l'obscurité ou à la lumière à l'échelle du laboratoire.....	172
Figure 18 : Cuve de stockage étudiée : a) vue d'ensemble, b) point de prélèvement en sortie du stockage, c) dispositif de lampes UV immergées (vue de dessus).....	174
Figure 19 : Analyses réalisées lors de chaque essai.....	175
Figure 20 : Courbe dose – réponse obtenue avec le réacteur à lumière collimatée (3 essais) et <i>E. coli</i> ATCC 15597 : a) entre 0 et 50 mJ/cm ² et b) zoom pour des doses appliquées inférieures à 20 mJ/cm ² . Les traits en pointillés représentent l'intervalle de confiance à 95% de la régression linéaire (n = 18).....	178
Figure 21 : Évolution des teneurs en coliformes, <i>E. coli</i> et entérocoques (effluent secondaire – dénombrement en Nombre le Plus Probable (NPP), méthode IDEXX) en fonction de la durée d'agitation dans le réacteur pilote (lampe UV éteinte). L'incertitude sur la mesure est égale à environ 0,3 log NPP/100 mL pour les concentrations mesurées.....	179

- Figure 22 : a) Inactivation d'*E. coli* ATCC 15597 en fonction du temps de contact dans le réacteur pilote et de la transmittance UV à 254 nm du milieu et b) doses de réduction équivalentes. Les points mis en évidence sont ceux pris en compte pour la détermination du facteur de conversion par régression linéaire 180
- Figure 23 : Distribution des coefficients de variation des mesures de MES, turbidité et quantité de particules de taille supérieur ou égale à 25 µm réalisées sur les effluents étudiés (voir 2ème partie – paragraphe III.5 pour l'interprétation des graphiques en boîtes à moustaches) 183
- Figure 24 : Courbes d'inactivation pour *E. coli* avec l'effluent secondaire seul (ES) et l'effluent secondaire + 1,4 % de boue obtenues avec le réacteur pilote (RP) et avec le réacteur à lumière collimatée (LC). Les traits pointillés représentent la limite de quantification pour les essais avec le réacteur à lumière collimatée (2 log UFC/100 mL)..... 185
- Figure 25 : Modélisation de l'inactivation par deux droites de régression correspondant respectivement aux microorganismes exposés aux UV et aux microorganismes protégés des UV..... 187
- Figure 26 : Courbes d'inactivation (a) et courbes d'inactivation normalisées des coliformes, *E. coli* et entérocoques pour les essais de désinfection UV dans le réacteur pilote avec les différents effluents étudiés (ES : effluent secondaire)..... 188
- Figure 27 : Droites de régression (intervalle de confiance à 95% en traits pointillés) de la constante d'inactivation k_1 en fonction de a) la turbidité et b) la transmittance UV à 254 nm (effluent secondaire plus ou moins chargé en boue). Les points carrés orange correspondent aux essais avec la fécule de maïs et ne sont pas inclus dans la régression. Les barres représentent les erreurs-types sur les paramètres (négligeables pour la transmittance UV) 193
- Figure 28 : Représentation schématique de modèles de floccs dans les eaux usées : type 1 (a,b) ou floccs exposés aux UV ; type 2 (c) ou floccs résistants aux UV ; (d) noyaux compacts. Le cercle blanc indique l'emplacement du microorganisme viable le plus abrité (Azimi, 2013)..... 194
- Figure 29 : Droites de régression (intervalle de confiance à 95% en traits pointillés) de Res₄₀, teneur résiduelle après 40 minutes d'exposition aux UV (soit environ 50 mJ/cm²) en fonction de a) la turbidité ; b) la transmittance UV à 254 nm ; c) la quantité de particules de taille supérieure ou égale à 25 µm et d) les MES. Les barres représentent les erreurs-types sur les paramètres (négligeable pour la transmittance UV)..... 195
- Figure 30 : Comparaison entre la quantité de microorganismes liée à l'apport en boue dans l'effluent secondaire et Res₄₀, teneur résiduelle après 40 minutes d'exposition aux UV (soit environ 50 mJ/cm²) 198
- Figure 31 : Evolution des teneurs en coliformes, *E. coli* et entérocoques pendant le stockage à la lumière et à l'obscurité pour les effluents étudiés (ES : effluent secondaire). Les barres représentent les écarts-types (3 essais) et les astérisques (*)

mettent en évidence les différences significatives (comparaisons par paires, échantillons appariés : test de Wilcoxon signé, $p < 0,05$)	201
Figure 32 : Evolution de la qualité biologique d'un effluent secondaire filtré (FAS : filtre à sable) pendant le stockage en cuve fermée avec ou sans dispositif de lampes UV. Les moyennes sont calculés à partir de trois essais constitués chacun de trois réplicats. Les échantillons marqués par un exposant différent (a-c) pour un indicateur donné sont significativement différents les uns des autres (échantillons appariés, test de Wilcoxon signé, $p < 0,05$).....	205
Figure 33 : Résultats de l'ACP issue des données du Erreur ! Source du renvoi introuvable. : cercle des corrélations selon les axes F1 et F2 (les pourcentages représentent la part de variance expliquée).	206
Figure 34 : Résultat de la CAH à partir des données du Erreur ! Source du renvoi introuvable. : dendrogramme des corrélations entre les variables (distance euclidienne, méthode de coupure de Ward). Un signe négatif a été attribué aux variables représentées en italique (DCO, turbidité, MES, température)	207
Figure 35 : Propriétés physico-chimiques d'un effluent secondaire pour garantir l'efficacité maximale de la désinfection UV	211

Quatrième partie

Figure 1 : Mécanismes impliqués dans l'élimination des particules par filtration en profondeur : a) capture ; b) sédimentation ; c) interception ; d) adhésion (Tchobanoglous & Schroeder, 1985).....	218
Figure 2 : Profils des pertes de charge en fonction du temps dans un filtre fonctionnant à vitesse constante. L'évolution du front de filtration est indiqué par la lettre B (Leclerc, 1998)	220
Figure 3 : Répartition des grains en fonction de leur taille dans le matériau filtrant (Asano et al., 2007).....	221
Figure 4 : Stabilité d'une suspension colloïdale (Degrémont, 2005)	225
Figure 5 : Structure chimique des monomères de polyamine (a) et de polyDADMAC (b) (d'après Baudin et al., 2004)	226
Figure 6 : Pilote de filtration sur sable sous pression (photo et schéma en coupe)	229
Figure 7 : Positionnement des configurations étudiées par rapport à l'évolution de la qualité de l'effluent secondaire (mesurée par les MES). Les configurations exploitées lors d'un fonctionnement en mode dégradé de la STEP sont indiquées en orange	235
Figure 8 : Comparaison des valeurs moyennes mesurées en entrée (grisé) et en sortie (blanc) de filtration pour chaque configuration étudiée et pour les paramètres : turbidité (a), MES (b) et transmittance UV à 254 nm des effluents non filtrés (c) ou filtrés à 0,45 μm (d). Les barres représentent les écarts-types. Les valeurs et les traits correspondent aux abattements (ou gains) moyens. Les astérisques indiquent une différence significative entre l'entrée et la sortie du filtre pour chaque configuration (test de Wilcoxon signé, $p < 0,05$) (SG : sable grossier ; SF : sable fin).....	237

Figure 9 : Comparaison des quantités de particules de taille supérieure ou égale à 10 μm mesurées en entrée (grisé) et en sortie (blanc) de filtration pour chaque configuration étudiée. Les valeurs et les traits correspondent aux abattements moyens (SG : sable grossier ; SF : sable fin)	238
Figure 10 : Comparaison des concentrations moyennes mesurées en entrée (grisé) et en sortie (blanc) de filtration pour chaque configuration étudiée et pour les indicateurs <i>E. coli</i> (a), coliformes (b) et entérocoques (c). Les barres représentent les écarts-types. Les valeurs et les traits correspondent aux abattements moyens (SG : sable grossier ; SF : sable fin)	239
Figure 11 : Exemple de suivi de turbidité réalisé lors du lavage (pour la configuration « sable fin - 24h – 0,4 ppm FeCl_3 »).....	240
Figure 12 : Exemple d'exploitation des courbes de ΔP (perte de charge entre l'entrée et la sortie du filtre à sable)	242
Figure 13 : Vitesses moyennes de colmatage (mesurées par l'augmentation des pertes de charge ΔP) pour les différentes configurations étudiées. Les barres représentent les écarts-types.....	242
Figure 14 : Corrélacion entre l'augmentation moyenne de ΔP et la turbidité moyenne de l'effluent secondaire pour les effluents étudiés	244
Figure 15 : Comparaison entre la durée du cycle de filtration et l'augmentation de ΔP pour la configuration « sable fin 2 ppm Floquat 31 24 h ». Le trait noir correspond à la durée de cycle calculée en fonction de l'augmentation de ΔP pour $\Delta P_0 = 0,2$ bar et $\Delta P_c = 0,3$ bar $\pm 20\%$	244
Figure 16 : Évolution de la qualité de l'effluent secondaire et de l'effluent filtré pendant le dysfonctionnement lié à une panne d'aération sur le bassin de boues activées (la durée de la panne est indiquée en orange). La configuration mise en œuvre sur le filtre est : « sable fin 0,4 ppm FeCl_3 42 h ».....	247
Figure 17 : Évolution de la qualité de l'effluent secondaire et de l'effluent filtré pendant le dysfonctionnement lié à une interruption de l'extraction des boues au niveau du clarificateur. Les configurations mises en œuvre sur le filtre sont indiquées sous chaque graphe	248
Figure 18 : Schematic description of the effluents used in this study. Dotted arrows indicate sampling points	256
Figure 19 : Pearson's correlation coefficient between N-NO_3 (n = 41), COD (n = 180), turbidity (n = 180), TSS (n = 179) and absorbance at each wavelength studied	259
Figure 20 : Relationship between predicted and observed values for the calibration and prediction datasets. The results presented are related to PLSR models for COD, TSS and turbidity. The grey lines represent the 95% confidence interval of the calibration. Triangle dots represent artificial data added to the original dataset (secondary and filtered effluents)	264
Figure 21 : Comparison between estimated values (PLSR and PLS-CCR models are equivalent) by UV/Vis spectrometry (samples two-fold diluted) and measured values	

for secondary and filtered effluents during a monitoring period of four weeks. Nitrate concentration did not vary in the period considered265

Conclusion générale

Figure 1 : Exemple de filière tertiaire pour la réutilisation des eaux usées traitées compatible avec l'irrigation de tout type de cultures : identification des points de contrôle réglementaires (France : JORF, 2014) (PR), des points de contrôle critiques (CCP) et des points d'attention (PA). Les modes de surveillance et la fréquence sont indiqués en italique.279

Liste des tableaux

Première partie

Tableau 1 : Potentiel de colmatage des systèmes d'irrigation par goutteur en fonction de la qualité des eaux utilisées (d'après Asano et al., 2007; ISO, 2015c; Pescod, 1992) (UFC : Unité Formant une Colonie)	11
Tableau 2 : Paramètres importants pour l'utilisation des EUT pour l'amélioration des masses d'eau de surface (Asano et al., 2007)	22
Tableau 3 : Résumé des enjeux liés à chaque usage et exemples de filières de traitement tertiaire associées	29
Tableau 4 : Principales bactéries pathogènes rencontrées dans les eaux usées (d'après ANSES, 2012; Asano et al., 2007; Straub & Chandler, 2003)	33
Tableau 5 : Principales espèces d'helminthes pathogènes rencontrées dans les eaux usées (d'après ANSES, 2012; Asano et al., 2007; Boutin & Helmer, 2009; Straub & Chandler, 2003)	35
Tableau 6 : Principaux virus rencontrés dans les eaux usées (d'après ANSES, 2012; Asano et al., 2007; Straub & Chandler, 2003)	35
Tableau 7 : Ordres de grandeur des abattements (en unités \log_{10}) observés en station d'épuration selon le type de traitement et le type de microorganisme (d'après ANSES, 2012)	37
Tableau 8 : Survie de quelques pathogènes entériques dans des eaux douces superficielles (Asano et al., 2007; Feachem et al., 1983; Korhonen & Martikainen, 1991; Kutz & Gerba, 1988; McFeters & Terzieva, 1991)	38
Tableau 9 : Classement des pays pratiquant la réutilisation des eaux usées traitées, selon deux critères (Jiménez-Cisneros & Asano, 2008)	48
Tableau 10 : Volume d'eaux usées traitées ingéré entraînant un risque d'infection de 104 (Salgot & Huertas, 2006)	50
Tableau 11 : Qualité suggérée des EUT par la norme ISO 16075-2 en fonction des paramètres physico-chimiques et biologiques (ISO, 2015b)	51

Tableau 12 : Exemples de normes de qualité pour des EUT destinées à au moins un des usages suivants : irrigation de cultures non transformées, usage urbain non restreint, usage environnemental non restreint ou usage potable indirect (* : lignes directrices ; Abb. : abattement entre l'entrée et la sortie de l'ensemble du traitement des eaux usées)	54
Tableau 13 : Niveaux de rejet de la STEP étudiée dans le cadre du projet.....	63

Deuxième partie

Tableau 1 : Réactions enzymatiques impliquées dans les tests Idexx Colilert-18 (coliformes et <i>E. coli</i>) et Enterolert-E (entérocoques) (ISO, 2014)	73
Tableau 2 : Exemple de calcul du NPP par la plaque Quanti-Tray 2000 (d'après Dichter, 2015; ISO, 2014)	75
Tableau 3 : Aspects pratiques et économiques des méthodes IDEXX Colilert-18 et Enterolert-E.....	77
Tableau 4 : Réactions enzymatiques impliquées dans les tests Compact Dry EC (coliformes et <i>E. coli</i>) et ETC (entérocoques) (Nissui, 2009).....	78
Tableau 5 : Aspects pratiques et économiques des méthodes Compact Dry EC et ETC ..	80
Tableau 6 : Résumé des facteurs affectant l'association des bactéries avec les particules (d'après Chahal et al., 2016)	84
Tableau 7 : Liste non exhaustive de méthodes utilisées pour la dispersion des microorganismes liés aux particules. Le ratio observé correspond à la quantité de microorganismes dénombrés dans l'échantillon traité par rapport à la quantité de microorganismes dénombrés dans l'échantillon non traité. Les microorganismes sont dénombrés par des méthodes standards par culture.....	88
Tableau 8 : Principaux gènes utilisés pour la détection et/ou la quantification d' <i>E. coli</i> , des entérocoques et des coliformes par PCR.....	92
Tableau 9 : Avantages et inconvénients des méthodes alternatives de dénombrement. Les méthodes sans mise en culture permettent la détection des bactéries VBNC. * Pour les méthodes avec mise en culture, la durée d'incubation dépend de la limite de détection souhaitée. Pour les méthodes sans culture, la rapidité dépend de la durée des manipulations nécessaires. Le coût par analyse est estimé seulement pour les réactifs et consommables (+ : de 1 à 10 € ; ++ : de 10 à 30 €)	94
Tableau 10 : Composition moyenne et médiane de l'effluent secondaire étudié (TUV : transmittance UV). Données issues de l'autocontrôle de l'exploitant pour l'année 2016. ...	97
Tableau 11 : Composition des mélanges pour les trois conditions testées. Les volumes sont donnés par bécher.....	98
Tableau 12 : Facteurs de dilution appliqués pour les méthodes par culture et pour les trois conditions réalisées	104

Tableau 13 : Amorces et sondes utilisées dans le cadre des qPCR pour la quantification d' <i>E. coli</i> et des entérocoques. Pour les sondes, les fluorophores sont en couleur et les quenchers en gris (T_m : température de fusion).....	108
Tableau 14 : Composition des mélanges pour les amplifications.....	108
Tableau 15 : Caractérisation des effluents étudiés pour les paramètres MES, turbidité et transmittance UV (TUV) à 254 nm. Valeurs médianes sur six réplicats (les écarts-types sont indiqués entre parenthèses).	112
Tableau 16 : constantes A et β issues des distributions granulométriques observées pour les trois conditions (valeurs moyennes sur six réplicats).....	113
Tableau 17 : Résultats quantitatifs et qualitatifs de l'extraction d'ADN mesurés par spectrophotométrie pour les cultures de souches (pas de réplicat) et pour les effluents étudiés (six réplicats, Moy. : moyenne ; EC : écart-type). La concentration en ADN est exprimée par rapport au volume de l'échantillon avant extraction).....	117
Tableau 18 : Indices d'évaluation des gammes d'étalonnage de qPCR pour les indicateurs <i>E. coli</i> et entérocoques.....	118
Tableau 19 : Rapport entre la quantité de cellules retenues sur un filtre de porosité 5 μm et la quantité de particules de taille supérieure à 5 μm (mesurée par compteur optique) pour les deux indicateurs et les trois effluents étudiés. Les ratios sont calculés à partir des moyennes des valeurs mesurées.	123
Tableau 20 : Risque de sous-estimation par les méthodes par culture pour les indicateurs coliformes, <i>E. coli</i> et entérocoques en fonction de la teneur en MES pour un effluent issu d'un traitement secondaire des eaux usées.....	136

Troisième partie

Tableau 1 : Facteurs de correction de l'intensité mesurée au centre de la boîte de Pétri pour déterminer l'intensité réelle appliquée à l'effluent dans le cadre d'un montage de type « réacteur UV à lumière collimatée » pour des lampes UV basse pression (Bolton et al., 2003)	153
Tableau 2 : Absorbance UV à 254 nm de composés chimiques fréquemment rencontrés dans les eaux usées (d'après Asano et al., 2007; Bolton et al., 2001; US EPA, 2006)	162
Tableau 3 : Détermination des doses UV appliquées à l'effluent à l'aide d'un réacteur UV à lumière collimatée (Bolton et al., 2003)	166
Tableau 4 : Dimensions caractéristiques du réacteur et comparaison avec les valeurs « standards ». Les dénominations des longueurs et hauteurs renvoient à la Figure 16	169
Tableau 5 : Composition des mélanges pour les différentes conditions testées (essais en triplicats pour chaque condition)	170
Tableau 6 : Facteurs de conversion (a) calculés pour les 4 essais par régression linéaire (Figure 22b) avec $k = 0,308 \text{ cm}^2/\text{mJ}$ pour <i>E. coli</i> ATCC 15597 et estimation des doses de réduction équivalente pour différents temps de contact (en minutes) dans le réacteur pilote (N : nombre de points pris en compte)	181

Tableau 7 : Résultats de caractérisation physico-chimique des effluents étudiés dans le réacteur pilote (trois essais en réplicats)	182
Tableau 8 : Constantes des modèles pour l'inactivation des microorganismes exposés aux UV (Inactivation = $-k_1.t$) et des microorganismes protégés des UV (Inactivation = $-k_2.t + IL$). Res_{40} correspond à la teneur attendue selon ce dernier modèle après 40 minutes d'exposition. Les valeurs aberrantes sont supprimées. Les erreurs-types et coefficients de détermination des droites de régression sont présentés en Annexe C (col : coliformes ; ecol : <i>E. coli</i> ; ent : entérocoques)	189
Tableau 9 : Coefficients de détermination des droites de régression entre la constante k_1 et les indicateurs de pollution particulière. Le code couleur (vert --> rouge) correspond à un classement des R^2 par ordre décroissant pour chaque indicateur	191
Tableau 10 : Principaux facteurs positifs ou négatifs pour la croissance des populations de microorganismes pathogènes pendant le stockage après désinfection UV (☀ : facteurs spécifiques au stockage à la lumière) (d'après Eme & Molle, 2013; Madigan et al., 2012; Xu et al., 2002).....	202
Tableau 11 : Ratios maximum de survie (%) modélisés (dose comprise entre 15 et 25 mJ/cm ²) et calculés pour les effluents étudiés (après 20 h de stockage) (voir équations (9) et (10) (écarts-types entre parenthèses)	203
Tableau 12 : Abattements (moyennes sur 3 réplicats) obtenus pour les trois indicateurs étudiés (COL : coliformes ; ECOL : <i>E. coli</i> ; ENT : entérocoques) entre 0 et 29 h de stockage avec ou sans allumage des lampes UV. Les températures (minimales, maximales et médianes) sont mesurées dans la cuve et les autres paramètres sont mesurés en sortie du filtre à sable pendant le remplissage	205

Quatrième partie

Tableau 1 : Principales technologies de filtration existantes (d'après Asano et al., 2007; Degrémont, 2005)	223
Tableau 2 : Principaux avantages et inconvénients des coagulants organiques (d'après Baudin et al., 2004)	227
Tableau 3 : Méthodes utilisées sur par le laboratoire agréé pour les indicateurs microbiologiques étudiés	228
Tableau 4 : Déroulement du lavage du filtre à sable et volumes d'eau consommés.....	230
Tableau 5 : Taux de traitement choisis pour les coagulants étudiés	231
Tableau 6 : Description et durée des configurations testées (les taux d'injection en coagulant sont données en ppm de composé actif)	232
Tableau 7 : Composition moyenne des eaux brutes et des eaux traitées de la station d'épuration étudiée.....	234
Tableau 8 : Comparaison des matières retenues pendant la filtration et évacuées lors du lavage pour les différentes configurations étudiées (SG : sable grossier ; SF : sable fin).....	241

Tableau 9 : Rendements hydrauliques observés et attendus pour les configurations étudiées (SG : sable grossier ; SF : sable fin).....	245
Tableau 10 : Description of the models used for COD, TSS, turbidity and nitrate estimation (N: number of observations, cal: calibration, pred: prediction, w/o AS: without artificial samples)	263
Tableau 11 : Performances minimales des stations d'épuration des agglomérations devant traiter une charge de pollution organique supérieure ou égale à 120 kg/ j de DBO5 (JORF, 2015).....	268
Tableau 12 : Danger, stratégie de surveillance et actions correctives pour les points de contrôle critiques (CCP) et les points d'attention (PA) identifiés	272

Publications et communications

Articles scientifiques

- Carré, E., Pérot, J., Jauzein, V., Lin, L., Lopez-Ferber, M. (2017). Estimation of water quality by UV/Vis spectrometry in the framework of treated wastewater reuse. *Water Science and Technology*, 76 (3), 633-641. DOI:10.2166/wst.2017.096.
- Carré, E., Beigbeder, J., Jauzein, V., Junqua, G., Lopez-Ferber, M. (2017). LCA case study: Tertiary treatment process options for wastewater reuse. *Integrated Environmental Assessment and Management*, In Press. DOI:10.1002/ieam.1956
- Carré, E., Pérot, J., Jauzein, V., Lin, L., Lopez-Ferber, M. (2017). Évaluation technique de filières tertiaires pour la réutilisation des eaux usées traitées. *Techniques Sciences Méthodes*, 5, 67-85, DOI:10.1051/tsm/201705067.

Communications à des conférences internationales et nationales

Présentations

- Carré, E., Pérot, J., Jauzein, V., Lin, L., Lopez-Ferber, M. (2016). Reclaimed water: Use of UV/Vis spectrophotometry for quality monitoring. In: Aydin I., Yuzer, B., Yigit Huncce S., Sonmez, Z. 3rd International Conference on Recycling and Reuse, 28-30 September 2016, Istanbul (Turquie). Istanbul University Environmental Engineering Department & Namik Kemal University Environmental Engineering Department, 321 pp., ISBN 978-605-07-0604-8
- Carré, E., Pérot, J., Jauzein, V., Nauleau F. (2015). Filières de traitement tertiaire des eaux usées en vue de la réutilisation. In: Polytech Montpellier. 14^{ème} Séminaire Eau, 23-26 Février 2015, Montpellier (France).

Posters

- Carré, E., Beigbeder, J., Jauzein, V., Junqua, G., Lopez-Ferber, M. (2016). LCA case study: Tertiary treatment process options for wastewater reuse. In: SETAC Europe. LCA Case Study Symposium, 20-22 September 2016, Montpellier (FR). Bruxelles: SETAC Europe, 168 pp., ISSN 2310-3191.

Autres

- Carré, E., Pérot, J., Jauzein, V., Lin, L., Lopez-Ferber, M. (2016). Reclaimed water: Use of UV/Vis spectrophotometry for quality monitoring. Poster présenté à la journée des doctorants de l'ED SIS, 16 Juin 2016, Saint-Etienne.
- Carré, E., Pérot, J., Jauzein, V., Lin, L., Lopez-Ferber, M. (2015). La réutilisation des eaux usées traitées : comment garantir une qualité biologique satisfaisante ?. Poster présenté à la journée des doctorants de l'IM2E, 20 Mars 2015, Montpellier.
- Carré, E., Pérot, J., Jauzein, V., Lin, L., Lopez-Ferber, M. (2016). La réutilisation des eaux usées traitées : comment garantir une qualité biologique satisfaisante ?. Présentation « ma thèse en 180 s », journée de la recherche de l'EMA, 17 Mars 2016, Alès.

Liste des abréviations

ADN	Acide DésosxyriboNucléique
ANSES	Agence Nationale de sécurité sanitaire, environnement, travail
ARN	Acide RiboNucléique
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adénosine Triphosphate
AVCI	Années de Vie Corrigées de l'Incapacité
BASR	Bactéries Anaérobies Sulfito-Réductrices
BET	Bromure d'éthidium
BRM	Bioréacteur à membrane
CCP	Critical Control Point (point critique pour la maîtrise)
CCR	Correlated Component Regression (régression par les composantes corrélées)
CFD	Computational Fluid Dynamics
COT	Carbone Organique Total
CV	Coefficient de Variation
DBO ₅	Demande Biologique en Oxygène (BOD en anglais) sur 5 jours
DCO	Demande Chimique en Oxygène (COD en anglais)
DRE	Dose de Réduction Équivalente (RED en anglais)
DREAL	Direction Régionale Environnement Aménagement Logement
EDCH	Eaux Destinées à la Consommation Humaine
EH	Equivalent-habitant - correspond à une charge journalière de 60 g de DBO ₅ et 200 L d'eau
EPS	Extracellular Polymeric Substance
EQRM	Estimation Quantitative du Risque Microbien (QMRA en anglais)
EUT	Eaux Usées Traitées
FAU	Formazine Attenuation Unit
FISH	Fluorescent In Situ Hybridization
HACCP	Hasard Analysis Critical Control Point
Kb	Kilobase (1000 paires de bases d'ADN)
LED	Light Emitting Diode
MES	Matières en suspension
MFI	Modified Fouling Index
MON	Matière Organique Naturelle
MS	Matière Sèche
MVS	Matières Volatiles Sèches
NFU	Nephelometric Formazine Unit
NGL	Azote global
N-NH ₄	Azote de l'ion ammonium
NOWWMA	New process for Optimizing Wastewater Reuse from Mauguio to the Mediterranean Area in support of the French Reuse Directive
NPP	Nombre le Plus Probable (MPN en anglais)
NTK	Azote Kjeldahl
NTU	Nephelometric Turbidity Unit
OI	Osmose inverse

OMS	Organisation Mondiale de la Santé (WHO en anglais)
PCR	Polymerase Chain Reaction
PLSR	Partial Least Square Regression (régression par les moindres carrés partiels)
PNUE	Programme des Nations Unies pour l'Environnement
ppm	partie par million
PRESS	Prediction Error Sum of Squares
PSS	Point Source Summation
Pt	Phosphore total
q-PCR	PCR quantitative
R ²	Coefficient de détermination
REUT	Réutilisation des Eaux Usées Traitées
RMSE	Root Mean Square Error
RPD	Ratio of Prediction to Deviation
RSS	Residual Sum of Squares
SAC	Spectral Absorption Coefficient (coefficient d'absorption spectrale)
SAR	Sodium Adsorption Ratio
SAT	Soil Aquifer Treatment
SDI	Silt Density Index
STEP	Station d'épuration
TAC	Titre Alcalimétrique Complet
TH	Titre Hydrotimétrique
TUV	Transmittance UV (UVT en anglais)
UF	Ultrafiltration
UFC	Unité Formant une Colonie (CFU en anglais)
UV	Ultraviolets
UV/Vis	gamme Ultraviolet / Visible (longueurs d'onde entre 200 et 400 nm)
VBNC	Viable But Nonculturable (bactéries viables mais non cultivables)
WWTP	WasteWater Treatment Plant (voir STEP)

Première partie

Introduction générale

I. Introduction

L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) définit les eaux usées comme les déchets liquides évacués vers les réseaux d'élimination individuels ou les canalisations d'égouts municipales et contenant principalement des excréta humains et de l'eau ayant servi (WHO, 2006). Les directives de l'OMS ne parlent pas de réutilisation des eaux usées mais seulement de « l'utilisation sans risque des eaux usées ». Le terme « réutilisation » a commencé à être utilisé par les institutions européennes, et est apparu dans ses réglementations dès 1991 (JOCE, 1991). Il est actuellement défini comme « l'usage bénéfique d'une qualité appropriée d'eau usée traitée » (MEDWWRWG, 2007a). Dès 2001, les australiens et les californiens ont commencé à utiliser le terme de « water recycling » (eau « recyclée ») (NRMMC et al., 2009; State of California, 2001). L'agence américaine de protection de l'environnement utilise pour sa part le terme de « reclaimed water » (eau « récupérée ») qui désigne des eaux usées municipales qui sont suffisamment traitées pour atteindre le niveau de qualité requis pour l'usage identifié (US EPA, 2012). Plus récemment, Jiménez-Cisneros (2014) propose une distinction entre le terme « réutilisation » qui implique un changement d'utilisateur (eaux usées municipales pour l'irrigation agricole par exemple) et le terme « recyclage » qui implique une utilisation de l'effluent pour le même usage que celui qui l'a généré (dans les industries notamment). Dans la suite de ce mémoire, le terme de réutilisation des eaux usées traitées ou REUT désignera la réutilisation d'eau usée d'origine principalement domestique, et ayant subi un traitement approprié à l'usage envisagé.

Cette première partie a pour objectif de replacer les travaux de cette thèse dans le contexte de la réutilisation des eaux usées traitées : moteurs, typologie des usages, réglementations en vigueur. L'état de l'art des recherches en cours dans ce domaine permet ensuite d'identifier les verrous actuels et de définir la problématique de ce travail.

II. Les moteurs de la REUT

1. Le stress hydrique, moteur principal de la REUT

Sur Terre, l'eau douce ne représente que 2,5 % de la quantité totale d'eau. Cette faible fraction est constituée aux deux tiers de glace, à un tiers d'eau souterraine et à seulement 0,3 % d'eau de surface (lacs, rivières...) facilement accessible. C'est cette eau qui assure une grande partie du maintien de la vie sur Terre (PNUE, 2010). De plus, cette ressource en eau est inégalement répartie géographiquement : les précipitations annuelles sont par exemple très importantes au nord de l'Amérique du Sud alors qu'elles sont très faibles au nord du continent africain (Oki & Kanae, 2006). Cette ressource est impactée par les activités humaines : l'agriculture représente environ 70 % de la demande mondiale en eau, suivie par l'industrie (20 % de la demande mondiale) et les usages urbains (10 %) (GWI, 2013).

On parle de pénurie d'eau ou de stress hydrique quand la demande en eau dépasse les ressources disponibles (PNUE, 2010). Ce phénomène dépend également de la demande en eau sur le territoire étudié. Le Programme des Nations Unies pour l'Environnement (PNUE) estime que les ressources en eau sont suffisantes si la quantité disponible par personne et par an est supérieure ou égale à 1700 m³. Une quantité inférieure à 1000 m³ par habitant et par an correspond à une situation de stress hydrique (Figure 1). Le stress hydrique peut avoir des conséquences importantes au niveau économique, de la santé publique, etc... et il entraîne des conflits d'usage importants (agriculture contre tourisme par exemple) comme cela a été observé pendant l'été 2015 en Californie (Nagourney et al., 2015). Certaines zones géographiques sont particulièrement touchées au niveau mondial, mais des problématiques locales existent également, du fait de spécificités géographiques (îles) et/ou démographiques (augmentation importante de la population pendant l'été dans les zones touristiques) (Figure 2). D'ici 2025, plus de la moitié de la population mondiale vivra dans des régions soumises au stress hydrique (OMS, 2016).

Les situations de stress hydrique sont souvent dues à des causes physiques, mais d'autres facteurs peuvent également être impliqués. Le manque de moyens pour accéder à la ressource (souterraine notamment) peut entraîner de telles situations. C'est le cas par exemple en Afrique centrale, qui dispose d'un important gisement d'eau souterraine, mais qui est très peu exploité (PNUE, 2005b). L'eau est également un enjeu géopolitique : c'est le cas du bassin de l'Euphrate. La Turquie en amont représente 28 % de la surface du bassin et 88 % du débit initial du fleuve. En aval,

l'Irak représente 40 % de la surface du bassin, mais le débit résiduel est quasi-nul du fait des prélèvements en amont (PNUE, 2004).

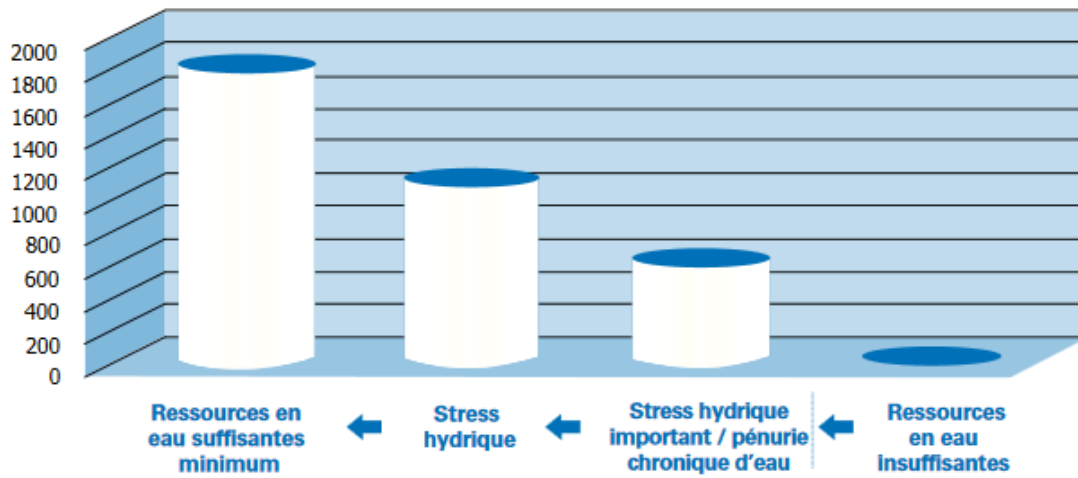


Figure 1 : Ressources d'eau douce nécessaires pour assurer le maintien de la vie humaine, en mètre cube par personne et par an (PNUE, 2010)

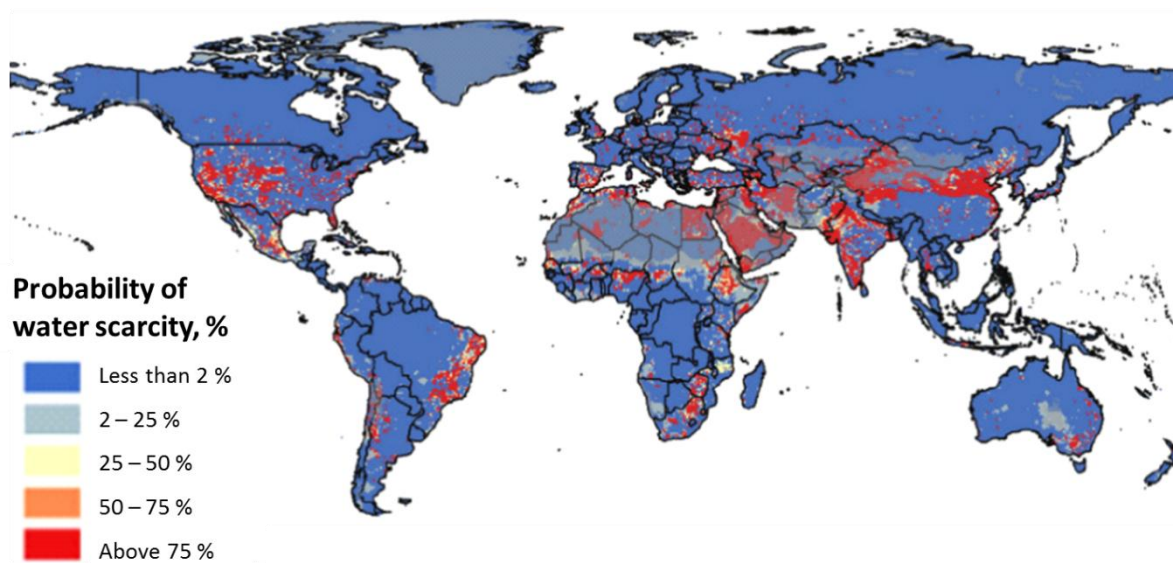


Figure 2 : Probabilité d'apparition de pénuries d'eau (moins de 1700 m³ par personne et par an) dans le monde en 2030 (GWI, 2013)

Plus globalement le bassin méditerranéen est un bon exemple de l'inégalité de la répartition des ressources en eau : sur l'ensemble de la pluviométrie de cette zone, 71 % concerne la rive nord de la Méditerranée, contre seulement 13 % pour la rive sud et 16 % pour la rive est (PNUE, 2004). Dans ce contexte, la réutilisation des eaux usées est un enjeu fort et de plus en plus pris en compte dans les scénarios d'approvisionnement

en eau. Ces scénarios prospectifs doivent également considérer l'impact du changement climatique. En prenant une hypothèse de stabilisation des émissions de CO₂ d'ici 2100, la pluviométrie annuelle pourrait significativement baisser dans des régions déjà caractérisées par une faible pluviométrie : 100 mm de pluie en moins (par rapport à la situation actuelle) à l'horizon 2050 pour la région de Montpellier par exemple (DRIAS, 2015). Même si les ressources superficielles et souterraines sont plutôt abondantes, des situations de tensions peuvent survenir notamment pendant les périodes estivales avec une augmentation significative de la population liée au tourisme.

2. Autres moteurs

D'un point de vue environnemental, la réutilisation des eaux usées traitées a de nombreux avantages. Dans le cas de zones naturelles sensibles (comme les écosystèmes côtiers et marins), l'intérêt principal est de diminuer les volumes rejetés dans le milieu récepteur (MEDWWRWG, 2007a; US EPA, 1998). L'intérêt est à la fois écologique (biodiversité) et économique (protection d'activités sensibles comme la conchyliculture ou la baignade) (BRL Ingénierie, 2011). De plus, l'exploitation de cette nouvelle ressource permet de diminuer la pression sur les masses d'eau douce superficielles, qui ont souvent une grande valeur environnementale (zones humides par exemple). Cette diminution de la pression se fait soit indirectement par l'utilisation des EUT à la place d'une autre ressource, soit directement par le transfert d'une eau de bonne qualité vers le milieu d'intérêt. Dans ce dernier cas, la recharge ou le maintien en qualité des réserves d'eau (de surface ou souterraines) pour la potabilisation est souvent aussi un enjeu (MEDWWRWG, 2007a; US EPA, 1998).

Les eaux usées traitées sont une ressource économiquement intéressante, car constante en qualité et en quantité. Cela permet donc de mieux gérer les périodes de pénurie d'eau, mais aussi de stabiliser les productions agricoles et industrielles, avec tous les bénéfices sociaux qui en résultent (MEDWWRWG, 2007a). Dans certains cas, la REUT peut être plus intéressante que la mobilisation d'une nouvelle ressource. Ainsi, les grands projets de transfert d'eau d'un bassin à l'autre sont souvent remis en cause par les opinions publiques qui s'interrogent sur la pertinence économique et environnementale de tels projets (Jiménez-Cisneros, 2014; Singh, 2010). De plus, les eaux usées véhiculent d'autres éléments qui peuvent être mobilisés, comme la chaleur ou les nutriments (Jiménez-Cisneros, 2014; MEDWWRWG, 2007a). Par exemple, la ville de Boise (Idaho, USA) combine la REUT avec la récupération de chaleur et la récupération ciblée du phosphore à l'aide de struvite (Pramanik et al., 2012). Ainsi, les

eaux usées sont maintenant perçues comme une ressource par les instances internationales (ONU, 2017), ce qui n'a pas toujours été le cas.

L'approche hygiéniste mise en œuvre depuis le début du 20^{ème} siècle suite aux épidémies d'origine hydrique comme le choléra à Paris entre 1830 et 1870 (Servais et al., 2009) a conduit à un sentiment de rejet des eaux usées par les populations dans les pays développés. L'enjeu pour ces populations est donc de passer d'une perception négative (danger) à une perception positive (ressource). Cette perception est en train d'évoluer avec la prise de conscience de l'ensemble des enjeux environnementaux et économiques. Les dernières enquêtes publiques sur le sujet tendent à montrer que ce changement est en bonne voie (Figure 3). Dans les pays en développement, la problématique est plutôt inverse : il s'agit de maîtriser la qualité des eaux usées pour éviter leur réutilisation non contrôlée, ce qui a des impacts négatifs sur la santé des travailleurs et des consommateurs (Jiménez-Cisneros & Asano, 2008).

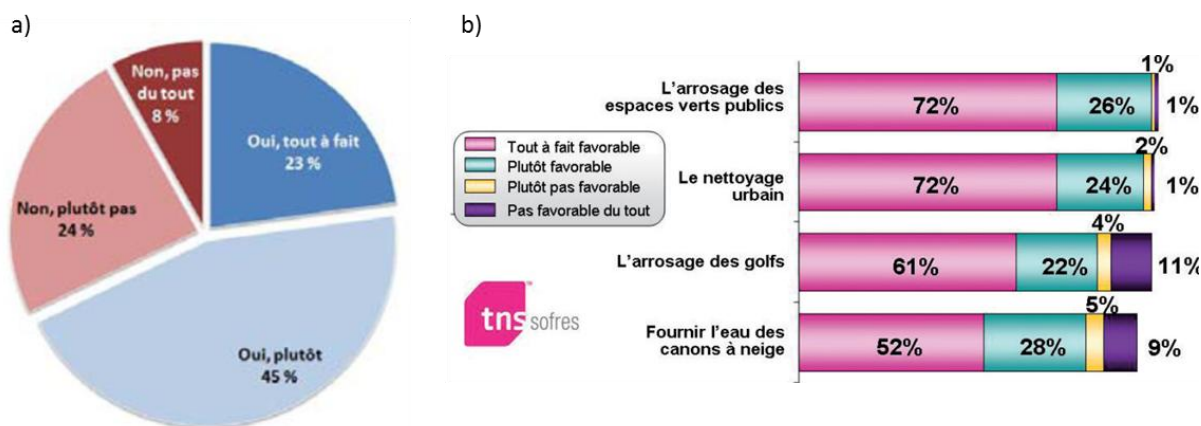


Figure 3 : a) Acceptabilité de la consommation de fruits et de légumes qui ont été arrosés avec des eaux usées traitées dans le but de participer aux efforts en faveur de la préservation des ressources en eau en France (Commissariat général au développement durable, 2014) ; et b) synthèse des résultats d'une enquête sur la réutilisation des eaux usées traitées pour différents usages en France (Lazarova & Brissaud, 2007; SOFRES, 2006)

Enfin, les avancées technologiques concernant le traitement des eaux usées sont également un facteur à prendre en compte (Lazarova & Brissaud, 2007). Le développement des bioréacteurs à membranes immergées permet par exemple d'atteindre des performances épuratoires élevées avec des consommations énergétiques faibles, même si une maintenance plus élevée est nécessaire par rapport aux traitements classiques par boues activées (Tare, 2011). De la même façon, l'optimisation des réacteurs de désinfection UV permet de réduire l'empreinte carbone

de ce procédé au niveau de la fabrication et du fonctionnement (Linden & Rosenfeldt, 2011). Ainsi la robustesse globale d'une filière de traitement peut être améliorée par la multiplication des barrières à un coût raisonnable.

III. Les différents usages des eaux usées traitées

En principe, les eaux usées traitées peuvent être utilisées pour l'ensemble des usages d'eau douce et d'eau potable. En pratique, cinq grands types d'usages sont identifiés (les pourcentages correspondent à la répartition mondiale, GWI, 2013) : les usages agricoles (30 %), les usages urbains (30 %), les usages industriels (20 %), les usages environnementaux (20 %), et les usages potables directs (anecdotiques). Cette répartition peut être très différente selon les pays. Par exemple, les volumes d'eau réutilisés par l'Espagne (370 millions de m³ en 2000) sont répartis principalement entre l'usage agricole (76 %) puis les usages urbains (9 %) et environnementaux (9 %). En Allemagne (20 millions de m³ réutilisés en 2000), l'usage agricole est également prépondérant (51 %), mais l'usage environnemental prend une place importante (39 %) (Wintgens & Hochstrat, 2006).

Pour chaque type d'usage, les enjeux sont détaillés, puis des exemples d'application sont présentés pour illustrer la diversité des filières et des modèles économiques existants.

1. Usages agricoles

a. Enjeux

L'utilisation des eaux usées en agriculture est une pratique très ancienne puisque des indications de cet usage remontent à environ 3000 av. J.C. par la civilisation minoenne en Crète, Grèce. Dans la deuxième moitié du 19^{ème} siècle, des fermes étaient même spécifiquement conçues pour l'épandage direct des eaux usées en Europe comme à Achères près de Paris (Asano et al., 2007). Si l'obligation de traiter les eaux usées s'est imposée pour la plupart des pays à partir du début du 20^{ème} siècle, l'épandage direct est encore très répandu dans le monde, pour l'apport d'eau aux cultures, mais surtout pour leur pouvoir fertilisant. En effet, elles possèdent une teneur importante en carbone, azote et phosphore. Il est très difficile d'estimer la quantité d'eaux usées non traitées réutilisées. Jiménez-Cisneros & Asano (2008) estiment qu'environ 6 millions d'hectares dans le monde sont irrigués avec des eaux usées non traitées, et environ 10 % de la population mondiale consommerait des aliments produits avec ces eaux (Smit & Nasr, 1992).

L'enjeu pour l'usage agricole est double : d'une part la protection des travailleurs et des consommateurs, notamment vis-à-vis du risque microbiologique, et d'autre part la

récupération de nutriments (notamment azote et phosphore) pour les cultures (Drechsel et al., 2011). Cependant, l'utilisation des eaux usées traitées pour l'agriculture doit prendre en compte d'autres paramètres, notamment la présence d'espèces ioniques en solution.

La présence de sels dissous dans l'eau peut avoir plusieurs conséquences agronomiques. Plus la salinité augmente, plus le gradient osmotique entre l'eau du sol et les cellules racinaires des plantes diminue. La plante doit donc dépenser plus d'énergie pour récupérer l'eau, ce qui affecte sa croissance (Asano et al., 2007; Jiménez-Cisneros, 2014; Lazarova, 2013a; Wintgens & Hochstrat, 2006). Selon le type de culture, la sensibilité à la salinité du sol diffère. Cette salinité est le plus souvent mesurée par la conductivité électrique de l'eau, exprimée en $\mu\text{S}/\text{cm}$. Le seuil de conductivité à partir duquel le rendement est significativement affecté est par exemple de $1000 \mu\text{S}/\text{cm}$ pour la carotte (sensible) et de $6100 \mu\text{S}/\text{cm}$ pour l'artichaut (tolérant) (Asano et al., 2007).

La sodicité définit une situation dans laquelle le sodium est le cation dominant dans l'eau d'irrigation. Dans le sol, les particules ont dans ce cas tendance à se disperser tandis que les argiles gonflent, ce qui a pour conséquence de réduire l'entrée de l'eau et de l'air dans le sol (Asano et al., 2007). La sodicité est exprimée par le paramètre SAR (Sodium Adsorption Ratio, Oster, 1994) :

$$SAR = \frac{[Na^+]}{\sqrt{([Ca^{2+}] + [Mg^{2+}])/2}} \quad (1)$$

La réduction de l'infiltration de l'eau dépend à la fois du SAR et de la présence d'autres ions (donc de la conductivité). D'autres paramètres peuvent influencer le bon développement des cultures. La plupart des éléments traces (comme l'arsenic ou le manganèse) sont toxiques pour les plantes même si certains sont nécessaires à leur croissance à de faibles concentrations. Le chlore résiduel peut également avoir un effet, même s'il est négligeable pour des concentrations inférieures à $1 \text{ mg}/\text{L}$. Concernant les nutriments, l'azote est utilisable par les plantes sous ses formes solubles NH_4^+ et NO_3^- , qui sont les formes majoritairement présentes dans les eaux usées traitées. En réalité, l'azote est bénéfique pour les végétaux pendant leur croissance, mais est beaucoup moins bénéfique à leur maturité (Drechsel et al., 2011). Une concentration d'azote total inférieure à $30 \text{ mg}/\text{L}$ est considérée comme sans effet pour la plupart des cultures

(Asano et al., 2007; ISO, 2015a). Le phosphore n'a quant à lui pas d'effet négatif connu, il a au contraire une valeur agronomique forte. Une étude mexicaine a estimé les économies découlant de l'utilisation d'eaux usées traitées au lieu d'engrais azotés et phosphorés à 135 US \$ par hectare et par an (Drechsel et al., 2011; Keraita et al., 2008). Néanmoins, la teneur maximale recommandée en phosphore total pour les eaux d'irrigation est de 7 mg/L (ISO, 2015a).

Récemment, plusieurs normes ont été publiées pour définir des bonnes pratiques concernant la réutilisation des eaux usées traitées en irrigation (ISO, 2015a, 2015b, 2015c, 2015d). Les principaux systèmes d'irrigation pris en compte sont :

- les systèmes d'irrigation par aspersion : fixes ou mobiles
- les systèmes d'irrigation par goutteurs : enterrés ou de surface
- les systèmes d'irrigation par canaux : inondation de tranchées

Le système d'irrigation mis en œuvre, les caractéristiques des eaux et le type de culture sont intimement liés. Par exemple les systèmes par inondation sont de loin les plus tolérants en ce qui concerne la composition physico-chimique des eaux, mais les pertes sont importantes. À l'inverse, les faibles vitesses d'écoulement rencontrées dans les systèmes d'irrigation par goutteurs favorisent le colmatage par formation de biofilms et/ou par précipitation chimique (Tableau 1). Les systèmes d'aspersion forment quant à eux des aérosols et maximisent le risque de dispersion dans l'air d'agents pathogènes éventuellement présents dans les eaux traitées.

Tableau 1 : Potentiel de colmatage des systèmes d'irrigation par goutteur en fonction de la qualité des eaux utilisées (d'après Asano et al., 2007; ISO, 2015c; Pescod, 1992) (UFC : Unité Formant une Colonie)

Indicateur de colmatage	Unité	Potentiel de colmatage		
		Aucun	Faible à moyen	Fort
Physique				
MES	mg/L	< 50	50 - 100	> 100
pH	/	< 7,2	7,2 - 8,0	> 8,0
Redox	mV	300 - 500	250 - 300 et 500 - 600	< 250 et > 600
Manganèse	mg/L	< 0,1	0,1 - 1,5	> 1,5
Fer	mg/L	< 0,1	0,1 - 1,5	> 1,5
Biologique				
Flore totale	UFC/mL	< 10 000	10 000 - 50 000	> 50 000

b. Exemples d'application

Maraîchage périurbain à Ouagadougou – Burkina Faso (BRL Ingénierie, 2011)

L'ONEA est la société d'Etat en charge de l'eau potable et de l'assainissement au Burkina Faso. Cet organisme pilote le projet d'assainissement collectif de la ville de Ouagadougou qui comporte la mise en place d'un réseau de collecte des eaux usées municipales et industrielles, ainsi que la construction d'une station d'épuration, mise en service en 2005. Parallèlement, un « plan de contrôle des rejets » a été mis en place qui comprend notamment la définition d'un périmètre de réutilisation des eaux usées traitées d'une superficie de 11 ha répartis entre des maraîchers locaux. L'objectif principal est donc de contribuer à améliorer les pratiques d'irrigations préexistantes en évitant la réutilisation à l'état brut d'environ 5300 m³/jour d'effluents.

La station d'épuration est un système de lagunage avec lagunes anaérobies en tête. Les objectifs de traitement sont les suivants : DBO₅ < 50 mg/L et coliformes fécaux < 1000/100 mL. Pour chaque industriel raccordé au réseau, des prétraitements sur site avant rejet sont proposés si nécessaire. La filière comprend cinq étapes en série :

- étage anaérobie : 3 bassins en parallèle, surface totale de 0,9 ha, temps de séjour de 6,8 j
- étage aérobie facultatif : 2 bassins en parallèle, surface totale de 5,7 ha, temps de séjour de 19,3 j
- étage maturation 1 : 1 bassin, surface de 1,3 ha, temps de séjour de 4,4 j
- étages de maturation 2 et 3 : 2 bassins en série, surface de 0,7 ha, temps de séjour de 2,5 j

La qualité bactériologique en sortie des lagunes respecte globalement l'objectif de traitement, même si des dépassements sont parfois observés.

Les investissements liés à la construction de la station, à la mise en place de prétraitements sur les sites industriels et à la mise en place du périmètre d'irrigation contrôlé s'élèvent à environ 10 millions d'euros, financés par une subvention de l'Agence Française pour le Développement (70 %), un prêt de la Banque Mondiale (20 %), et sur fonds propres par l'ONEA (10 %). En ramenant au volume annuel traité par la station cela revient à environ 0,12 €/m³ en amortissant l'investissement sur 40 ans. Les charges de fonctionnement sont assurées par l'ONEA sans équilibre avec le montant de la redevance d'assainissement perçue sur la facture d'eau. L'eau d'irrigation n'est pas facturée aux maraîchers. Il faut noter qu'il existe un conflit

d'usage entre : d'une part les maraîchers concernés par le périmètre d'irrigation qui sont contraints de respecter un cahier des charges interdisant notamment les cultures de produits consommés crus ; et d'autre part les maraîchers non concernés par ce périmètre qui utilisent soit directement l'eau brute soit l'eau usée traitée sans autorisation et en s'affranchissant du cahier des charges.

Station d'épuration de San Rocco – Milan, Italie (BRL Ingénierie, 2011; Lazarova, 2013b; Synteau, 2012a)

Historiquement, une partie du réseau d'égouts de la ville de Milan alimentait directement le réseau de canaux qui se déversent dans la plaine marécageuse adjacente dans laquelle l'agriculture est pratiquée, avec des cultures à fort besoin en eau (riz, maïs). En 2004-2005, la municipalité décide de lancer simultanément la construction ou réhabilitation de trois stations d'épuration dont la station de San Rocco (1 050 000 équivalents-habitants ou EH). L'objectif est double : préserver le milieu naturel et maintenir l'activité agricole sur une zone de 1900 ha. Les volumes réutilisés à cet effet (11,7 millions de m³ par an) correspondent à 11 % du volume produit par la STEP.

Le synoptique de la station est présenté en Figure 4. L'affinage par filtration sur sable permet d'obtenir une eau de très bonne qualité sur le plan physico-chimique. Sur le plan microbiologique, la désinfection UV est utilisée pour produire deux niveaux de qualité d'eau :

- eau réutilisée en agriculture : très bonne qualité (10 UFC/100 mL) obtenue avec une dose UV importante
- eau rejetée dans le milieu naturel : qualité moyenne (5000 UFC/100 mL) obtenue avec une dose UV trois fois moins importante

Le financement des équipements est réalisé par l'intermédiaire d'un partenariat public-privé entre la ville de Milan et l'industriel Degrémont (groupe Suez). Le montant total de l'investissement s'élève à 89 millions d'euros, dont 66 % est réalisé par la ville de Milan et 34 % par l'industriel. En ramenant au volume annuel traité par la station cela revient à environ 0,8 €/m³. Le contrat prévoit également la délégation de l'exploitation de la STEP à Degrémont pour une durée de 9 ans et pour un montant de 87 millions d'euros. Les volumes prélevés n'étant pas facturés aux agriculteurs, ces coûts sont supportés intégralement par la collectivité qui les répercute sur la redevance prélevée chez les usagers d'eau potable. Il faut noter que l'ensemble des opérations d'investissement et de fonctionnement pour les trois stations d'épuration ont conduit à

multiplier le tarif de l'eau par trois à partir de 2005, même si celui-ci reste faible (proche de 1 €/m³).

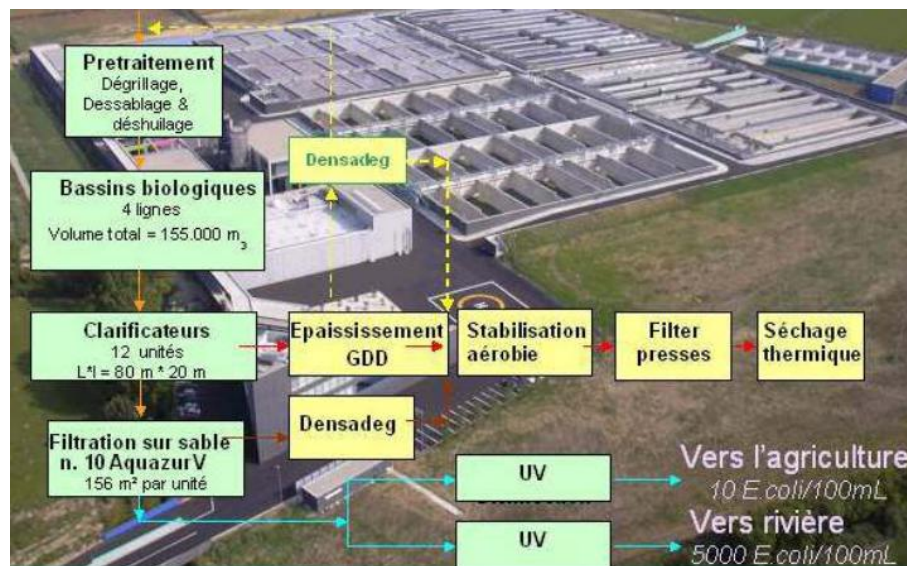


Figure 4 : Synoptique de la station d'épuration de San Rocco, Milan, Italie (Lazarova, 2013b)

2. Usages urbains

a. Enjeux

De nombreuses options sont disponibles pour la réutilisation des eaux usées traitées à l'échelle urbaine. Cette partie n'aborde pas le recyclage *in situ* des eaux grises à l'échelle d'un bâtiment (Humeau et al., 2011). Néanmoins, les usages possibles sont nombreux et comprennent l'arrosage des parcs publics ou des terrains de golf, l'eau pour les chasses d'eau dans des complexes sportifs ou commerciaux, le lavage des voiries, le lavage des voitures, la lutte contre les incendies et même la production de neige artificielle (Jiménez-Cisneros, 2014).

Les enjeux sont donc multiples et dépendent de chaque usage. Par exemple, pour l'irrigation des parcs et golfs, l'impact de la qualité de l'eau sur les performances agronomiques est à prendre en compte de la même façon que pour les usages agricoles. Le risque de contact avec l'Homme étant important quel que soit l'usage considéré, l'eau doit être de bonne qualité sur le plan microbiologique. Cet objectif est atteint avec des traitements avancés, comme la filtration membranaire, la désinfection UV et/ou la chloration. Ces traitements ont un coût élevé, mais ils sont très performants. Une

filière de ce type a été installée pour réutiliser les eaux usées sur le parc olympique pendant les jeux de Londres en 2012 et a permis une économie de plus de 40 % d'eau potable (Maybank et al., 2012). Pour les petites collectivités, de tels équipements sont difficilement envisageables, que ce soit au niveau des coûts d'investissement ou des coûts de fonctionnement. Néanmoins, les traitements extensifs de type lagunage avec bassin de maturation et lits filtrants permettent un abattement important au niveau microbiologique, même si ces filières ne peuvent pas fournir des effluents contenant moins de 100 UFC de coliformes fécaux dans 100 mL (Brissaud, 2008).

Le deuxième enjeu principal de la réutilisation des eaux usées traitées en milieu urbain est la mise en place d'un réseau de canalisations spécifique pour cette qualité d'eau. En effet, le coût le plus important dans ce type de projet est lié à la construction du réseau, qui est directement proportionnel à la distance entre la station d'épuration et le point d'usage. Concrètement, ce coût est souvent prohibitif pour des distances supérieures à 15-25 km (Asano et al., 2007; Lazarova, 2013a). Le coût est souvent moins élevé si les travaux sont réalisés au moment de la construction (en parallèle du réseau d'évacuation des eaux usées par exemple). La REUT doit donc être prise en compte en amont dans les projets de développement urbain (Lazarova, 2013a; PNUE, 2005b).

La mise en place d'un réseau supplémentaire pour les eaux usées traitées pose également le risque de connexion croisée avec le réseau d'eau potable (Asano et al., 2007; Jiménez-Cisneros, 2014; Lazarova, 2013a). Deux cas de figures peuvent être rencontrés :

- connexion volontaire avec le réseau d'eau potable pour pallier à un manque d'eaux usées traitées : dans ce cas, le risque est lié au reflux d'EUT dans le réseau d'eau potable. Pour prévenir ce risque, des dispositifs peuvent être installés, comme le montage de vannes anti-retour, ou la diminution de pression dans le réseau d'EUT (PNUE, 2005a).
- connexion involontaire ou illégale avec le réseau d'EUT pour un usage potable : pour prévenir ce risque, un marquage clair des canalisations d'eau usées traitées est indispensable. La couleur qui fait consensus au niveau international est le violet (pour rappel, c'est le bleu pour l'eau potable et le marron pour les eaux usées) (ISO, 2015c; US EPA, 2012). L'installation de panneaux d'affichage avec la mention « Ne pas boire » est également recommandée (Figure 5).

Le risque de colmatage ou de corrosion de ce type de réseaux est aussi à prendre en compte. Ce risque est plus important que sur les réseaux d'eau potable car les EUT contiennent plus de sels minéraux et de matière organique. Il faut donc faire attention aux matériaux choisis pour éviter la corrosion ou utiliser un enduit spécifique. Pour

prévenir le développement de biofilms, une injection de chlore résiduel à environ 0,1 mg/L est recommandée (Asano et al., 2007; PNUE, 2005a).

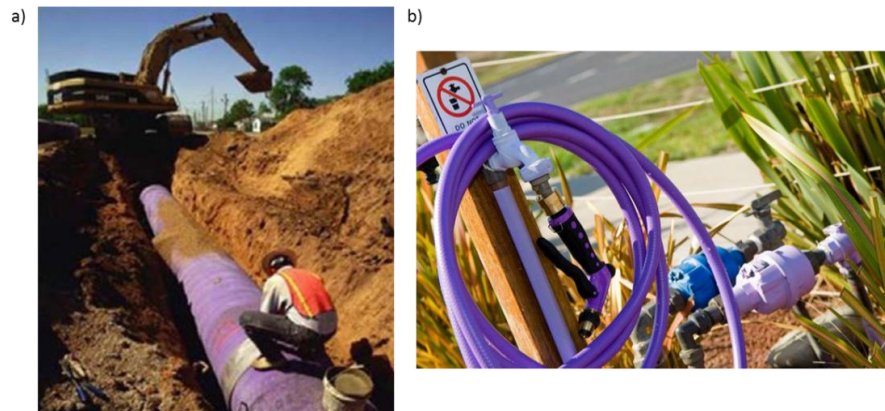


Figure 5 : Exemple de marquage pour les réseaux d'eaux usées traitées : a) canalisations et b) au point d'usage (NWQMS, 2006; US EPA, 2012)

b. Exemples d'application

Irrigation du golf du Rhuys-Kerver (Morbihan – France) (Loubier & Declercq, 2014; Nauleau et al., 2013; Synteau, 2012a)

Le golf de Rhuys-Kerver est situé dans une zone naturelle sensible, la presqu'île de Rhuys, qui est classée Natura 2000. La STEP de Saint-Gildas située à 2 km rejette les eaux traitées dans un cours d'eau très sensible, l'étier du Kerpont. Le volume d'eau rejetée est limité par un arrêté préfectoral à 820 m³/jour. En 2011, dans le cadre de l'extension de la STEP de 9000 à 14 500 EH, l'arrosage du golf a été considéré comme un exutoire alternatif intéressant par rapport à la solution initialement proposée qui avait provoqué une vive contestation parmi les riverains : la construction d'un émissaire de rejet en mer. Pour le golf cette nouvelle ressource a permis l'irrigation de l'ensemble du parcours (19 ha – environ 65 000 m³/an) alors qu'auparavant seul 1 ha était irrigué avec de l'eau potable (3500 m³/an).

La nouvelle station d'épuration est équipée d'un bioréacteur à membrane (BRM) et d'une désinfection par réacteur UV. Cette filière lui permet de produire une eau de très bonne qualité sur le plan microbiologique et physico-chimique. Le golf paie une redevance annuelle forfaitaire de 15 000 € pour 120 000 m³ au maximum qui permettent au maître d'ouvrage de la STEP de compenser les coûts (investissement et fonctionnement) liés à la désinfection UV et aux analyses supplémentaires nécessaires.

L'investissement total pour le traitement de désinfection, la canalisation d'amenée vers le golf et le bassin tampon des EUT est de l'ordre de 740 000 € financés à 40 % par le maître d'ouvrage, 6 % par le conseil régional de Bretagne, 24 % par l'agence de l'eau Loire-Bretagne et 30 % par le conseil général du Morbihan. Le golf a en charge l'entretien du bassin tampon et les analyses de sol pour environ 4000 €/an. Il faut noter que l'irrigation de l'ensemble du parcours a permis d'en améliorer la qualité, ce qui s'est traduit par une augmentation de 10 % de la fréquentation du golf. Pour la collectivité, la limitation des rejets en mer permet de protéger un site naturel et des activités économiques sensibles (baignade, conchyliculture).

Alimentation des chasses d'eau du quartier de Shinjuku à Tokyo (Japon) (Lazarova, 2013a; Lazarova et al., 2013a; PNUE, 2005b)

Le Japon a été un pionnier pour la réutilisation des eaux usées traitées en milieu urbain, notamment du fait de la forte densité de population de ses mégapoles comme Tokyo et suite aux sécheresses sévères auxquelles il a été confronté dans les années 1970. Le gouvernement de la région de Tokyo a démarré le projet de REUT du quartier de Shinjuku en 1984. Il s'agissait alors de fournir des EUT pour l'alimentation des chasses d'eau de neuf gratte-ciels, soit un volume de 1400 m³/jour. En 2009, trente immeubles sont raccordés au réseau d'EUT pour un volume journalier de 3000 m³. Dans chaque immeuble, un double réseau de plomberie (eau du robinet et EUT) est mis en place.

Les eaux usées traitées proviennent de la station d'épuration d'Ochiai. Le traitement est classique de type boues activées avec filtration tertiaire sur matériau granulaire (sable). La station traite actuellement 380 000 m³/jour (elle est dimensionnée pour traiter 450 000 m³/jour). Une partie du volume est ensuite dirigée vers l'unité de réutilisation, située au cœur du quartier de Shinjuku, via une canalisation de 9,1 km. Il s'agit en fait de deux réservoirs de stockage avec chloration (2007 et 902 m³) et d'unités de pompage (de 30 à 240 m³/h) qui transportent l'eau vers des petits réservoirs situés en haut de chaque immeuble (Figure 6). L'utilisation pour les chasses d'eau se fait ensuite de façon gravitaire jusqu'aux égouts qui amènent les eaux usées vers la STEP d'Ochiai. Les normes requises pour l'utilisation des EUT pour l'alimentation des chasses d'eau sont très strictes puisqu'aucune trace de la bactérie *Escherichia coli* ne doit être détectée.

La fourniture d'eaux usées traitées par la ville fonctionne de la même façon que pour l'eau du robinet : la ville prend en charge les coûts d'investissement et de fonctionnement des installations et cela est répercuté sur la facture des usagers. Les

investissements liés au double réseau de plomberie sont prévus par les promoteurs lors de la construction de l'immeuble. Les eaux usées traitées sont facturées à un prix 23 % moins élevé que celui de l'eau potable, ce qui représente une économie significative si l'on considère que les chasses d'eau représentent environ 30 % de la consommation en eau journalière d'une personne. La REUT est également appliquée par la ville de Tokyo pour la restauration des cours d'eau et la chaleur des eaux usées est valorisée pour la fonte de la neige des rues.

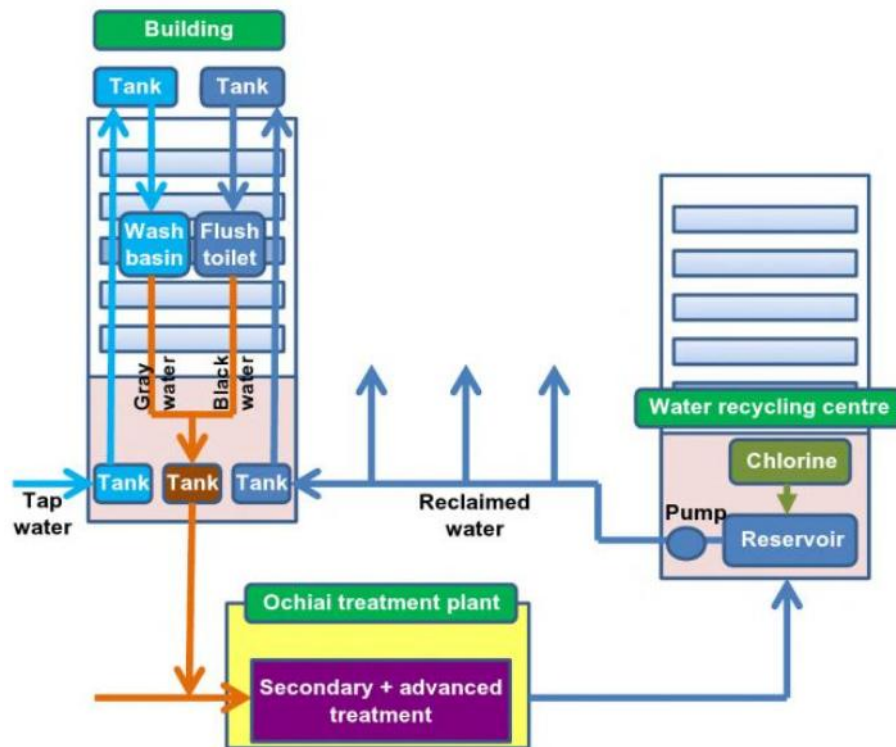


Figure 6 : Schéma de la filière de réutilisation des eaux usées dans le quartier de Shinjuku (Tokyo, Japon) pour l'alimentation des chasses d'eau d'immeubles (Lazarova et al., 2013a)

3. Usages industriels

a. Enjeux

L'eau est une ressource indispensable au bon fonctionnement de la plupart des industries. Un des enjeux les plus importants à l'heure actuelle est de limiter la dépendance de ce secteur aux ressources destinées à produire de l'eau potable. En effet, lors d'un stress hydrique, les priorités d'utilisation sont d'abord données aux usages

domestiques, puis aux usages agricoles, et en dernier lieu aux industries, ce qui représente un risque économique important pour ces dernières (Jiménez-Cisneros, 2014). Le recyclage des eaux de process in situ est une pratique courante. Néanmoins, la réutilisation inter-secteur (c'est-à-dire la réutilisation d'eaux provenant d'une station de traitement des eaux usées municipales par exemple) est également en plein développement, le frein principal étant comme pour les usages urbains la distance entre l'usine et l'installation de production d'EUT (Lazarova, 2013a). À l'heure actuelle, les installations de production d'énergie représentent environ 70 % des prélèvements d'eau pour l'industrie (installations hydroélectriques, nucléaires et thermiques) (PNUE, 2005b). Les autres secteurs gros consommateurs d'eau sont les installations de refroidissement, les chaudières industrielles, le secteur de la fabrication du papier, les industries textiles, les centres de lavage des voitures, etc... (Asano et al., 2007; Kim et al., 2008; Lazarova, 2013a).

Les industries représentent un débouché intéressant pour les installations de traitement des eaux usées municipales car la demande est généralement d'avoir un apport régulier en gros volumes d'eau de bonne qualité. La régularité de la demande est notamment un avantage par rapport aux demandes en agriculture qui sont plutôt saisonnières (Asano et al., 2007). Les exigences en termes de qualité d'eau dépendent évidemment de l'application industrielle envisagée. Par exemple, le risque le plus important pour les installations de refroidissement est l'inhalation de pathogènes de type légionnelles via les aérosols. Plus généralement, les principales problématiques pour les industriels sont liées à la prévention de la corrosion et du colmatage biologique ou chimique des équipements et du réseau de canalisations. Pour contrôler ces phénomènes, un choix approprié des matériaux doit être réalisé, comme cela est décrit dans la partie sur les usages urbains. En pratique, le choix est souvent fait d'utiliser des traitements membranaires poussés de type osmose inverse pour garantir l'absence d'ions responsables des dépôts dans les canalisations (Kim et al., 2008). De plus, une désinfection UV ou par chloration est mise en place pour se prémunir du risque biologique.

b. Exemples d'application

Réutilisation des eaux usées municipales pour l'industrie papetière – Durban (Afrique du Sud) (MEDWWRWG, 2007b; US EPA, 2012)

La ville de Durban a été confrontée en 1997 à une sous-capacité de ses installations d'assainissement. Devant le coût de construction d'un nouvel émissaire de rejet en mer des eaux usées traitées, d'autres exutoires ont été étudiés. Il a finalement été décidé de

construire une usine de traitement avancé des eaux usées pour répondre aux exigences d'une papeterie proche. Finalement, l'extension de la station à boues activées a permis d'augmenter le volume journalier traité de 50 000 à 77 000 m³ et la construction d'une unité de traitement tertiaire permet de réutiliser 47 500 m³/jour. Ce volume représente une économie d'eau potable équivalente à la consommation d'environ 220 000 habitants.

La station d'épuration est une station à boues activées classique avec traitement primaire (dégrillage, déshuilage, dessablage), traitement secondaire (boues activées) et clarification. L'unité de traitement tertiaire est constituée d'une étape de coagulation avec du sulfate d'alumine, floculation, puis décantation. Puis l'effluent est filtré sur une double couche sable et anthracite. Ces étapes ont principalement pour but d'éliminer le fer résiduel. Les étapes suivantes ont pour objet d'éliminer la demande chimique en oxygène (DCO) résiduelle : il s'agit de l'ozonation, puis filtration sur charbon actif en grains. Enfin, l'effluent est désinfecté par chloration. Les EUT correspondent ainsi aux exigences de l'industrie papetière : très faibles contaminations physico-chimiques qui pourraient détériorer la qualité du papier.

Le financement du projet d'une valeur totale de 11,3 millions d'euros a été réalisé par un montage complexe. Pour l'unité de traitement tertiaire, un partenariat public-privé a été mis en place entre la municipalité et un consortium d'investisseurs dont le constructeur OTV, réunis dans une structure commune : Durban Water Recycling Ltd. Cette structure finance le projet, et exploite en échange les installations pour une durée de 20 ans. Une redevance est payée à la municipalité pour l'occupation du terrain et le manque à gagner lié à la substitution de l'eau potable vendue aux industries par les EUT. Les revenus du consortium sont constitués par la vente d'eau aux industries. Ces dernières s'y retrouvent également puisque le prix du mètre cube d'EUT est environ 25 % moins cher que le mètre cube d'eau potable.

Arrosage de charbon pour le port de Cherbourg (France) (Synteau, 2012b, entretien avec Yannick Millet, directeur technique de Port de Cherbourg SAS)

Le port de Cherbourg a souhaité développer en 2012 une activité de fret de charbon. Mais la DREAL (Direction Régionale Environnement Aménagement Logement) a imposé l'arrosage des andains de charbon stocké afin d'éviter les échauffements et l'envol de poussières. Ainsi, de grandes quantités d'eau étaient nécessaires : 1 mm par heure sur 4 Ha, soit 960 m³/jour plus une réserve pour la protection incendie. L'utilisation d'eau potable n'était pas donc pas une solution viable économiquement ni techniquement (réseau non dimensionné pour ce besoin). En conséquence, la société

exploitante, Cherbourg Terminal Vrac SAS, a décidé d'investir dans la construction d'une unité d'ultrafiltration alimentée par les eaux traitées de la station d'épuration voisine (moins de 500 m) d'une capacité de 96 000 EH. L'unité pouvait délivrer 1 200 m³ d'eau par jour. Les exigences de qualité étaient très strictes puisque l'arrêté préfectoral d'autorisation ne tolère aucune contamination microbiologique quantifiable (analyses mensuelles). À noter que l'activité fret de charbon a été prématurément stoppée début 2014 pour des raisons économiques.

L'investissement a intégralement été pris en charge par la société exploitante sans demande de subvention, pour un montant d'environ 500 000 €. Une convention a été signée avec la station d'épuration, qui mettait à disposition gratuitement les EUT, seul l'entretien du poste de pompage était facturé. Le coût de revient au mètre cube était économiquement intéressant et l'investissement devait être amorti sur quelques années.

4. Usages environnementaux et récréatifs

a. Enjeux

L'urbanisation croissante et l'augmentation de la demande en eau ont des impacts importants sur les écosystèmes humides : cours d'eau, lacs, zones humides... La réutilisation des eaux usées traitées peut permettre de restaurer efficacement ces milieux qui ont une valeur d'usage importante directe (tourisme, usages récréatifs) ou indirecte (filtration naturelle de l'eau, piège à carbone...). Le maintien d'un débit minimum d'étiage d'un cours d'eau peut également être un objectif, d'autant plus que c'est une obligation réglementaire (JORF, 1992; US EPA, 2012). La qualité des EUT dépend du type d'usage envisagé. L'objectif général est que la qualité des eaux soit au moins égale à la qualité du milieu récepteur (Asano et al., 2007; Jiménez-Cisneros, 2014). Si les milieux sont accessibles au public (promenade, baignade), une attention particulière sera portée à la qualité biologique des EUT. Les paramètres importants pour les masses d'eau sensibles sont présentés dans le Tableau 2.

Le cas de la recharge artificielle d'aquifères souterrains par des eaux usées traitées est particulier car le sol est vu à la fois comme un stockage et comme un traitement complémentaire. Cette approche, également appelée « Soil Aquifer Treatment » (SAT) est massivement utilisée en Israël pour réutiliser les eaux usées (BRL Ingénierie, 2011; De Koning et al., 2006; Monchalain & Aviron-Violet, 2000). Les principaux objectifs de la recharge artificielle de nappe peuvent être (Asano et al., 2007) :

- de réduire voire inverser la diminution des niveaux d'eau dans les nappes phréatiques,
- de protéger les aquifères d'eau douce de l'intrusion d'eau salée près des côtes (biseau salin),
- de stocker les EUT pour un usage futur, avec l'avantage de minimiser les phénomènes d'évaporation,
- de faire face aux problèmes d'affaissement du sol.

Tableau 2 : Paramètres importants pour l'utilisation des EUT pour l'amélioration des masses d'eau de surface (Asano et al., 2007)

Paramètre	Valeurs recommandées	Remarques
Chlore résiduel	< 0,1 mg/L	Toxique pour les organismes aquatiques
Oxygène dissous	≥ 0,5 mg/L	Nécessaire pour la vie aquatique, valeur basée sur les besoins des organismes les plus sensibles
Matière organique (DBO ₅)	< 20 mg/L	La dégradation de la matière organique peut réduire la teneur en oxygène du milieu
Nutriments	Azote < 3 mg/L Phosphore < 1 mg/L	Contrôle de l'eutrophisation et des blooms algaux
Température	± 2,8°C par rapport à l'exutoire	Sensibilité des organismes aquatiques aux changements de température

Les principales méthodes pour la recharge de nappes sont présentées en Figure 7. Le bassin d'infiltration en surface est la méthode la plus simple : elle consiste à faire infiltrer et percoler l'eau dans le sol au travers de la zone non saturée en eau (ou zone vadose) jusqu'à la nappe phréatique. C'est la méthode la plus utilisée pour la recharge artificielle du fait du faible niveau de maintenance requis. Si de bonnes conditions hydrogéologiques sont présentes, le sol peut être utilisé comme un traitement complémentaire. Dans le cas du SAT pratiqué en Israël, on parle de système recharge-récupération car les eaux sont ensuite pompées puis dirigées vers leur exutoire (souvent agricole). Le colmatage progressif des bassins oblige à des assèchements et curages réguliers, mais il constitue également un puissant bio-filtre. La nappe doit également être suffisamment profonde pour ne pas s'opposer au processus de percolation. Les autres inconvénients sont la grande surface requise pour le bassin et le possible développement d'algues à la surface. C'est pourquoi dans certains cas les techniques d'injection directe sont utilisées. L'injection dans la nappe est plus coûteuse que l'injection dans la zone non saturée, mais le puits peut également être utilisé pour

le pompage de l'eau. Dans ces configurations la qualité des EUT doit être bien maîtrisée car le sol ne joue pas le rôle de tampon et il y a un risque de colmatage des canalisations (Asano et al., 2007; BRL Ingénierie, 2011; Rodriguez et al., 2009).

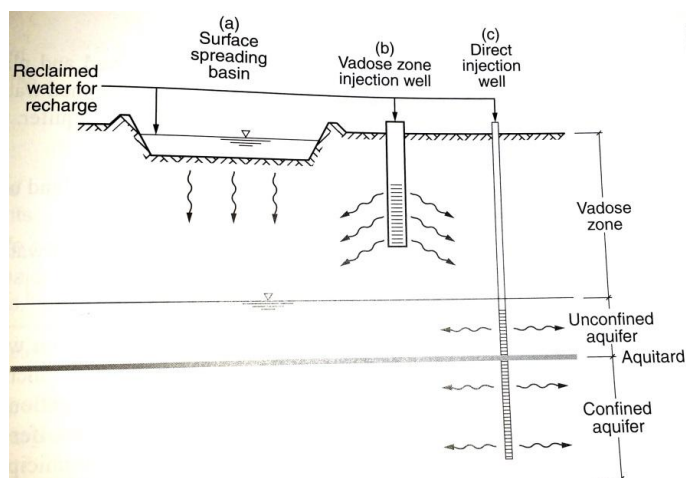


Figure 7 : Principales méthodes pour la recharge artificielle d'aquifères : a) bassin d'infiltration en surface ; b) puits d'injection dans la zone non saturée (ou zone vadose) ; c) puits d'injection directe (Asano et al., 2007)

Les eaux usées traitées rejetées dans l'environnement naturel sont de fait utilisées indirectement pour la production d'eau destinée à la consommation humaine à plus ou moins long terme selon la distance entre le point de rejet et la station de potabilisation et les ressources utilisées par cette dernière (eaux de surface ou souterraines). Néanmoins, on parle d'usage potable indirect des EUT lorsque cette ressource est utilisée de façon planifiée pour alimenter les réservoirs d'eau de surface ou les aquifères souterrains, et ainsi sécuriser le volume disponible pour la potabilisation. On considère alors le pouvoir tampon de l'aquifère de stockage (Rodriguez et al., 2009; Tchobanoglous et al., 2011). De la même façon que pour la production d'eau potable, une approche multi-barrières est adoptée, pour prévenir toute contamination biologique et chimique. Cela inclut un traitement membranaire poussé (combinaison de l'ultrafiltration et de l'osmose inverse) et une désinfection, voire l'utilisation de procédés d'oxydation avancée (Jacob et al., 2010; Rodriguez et al., 2009). Les exemples les plus connus dans le monde sont :

- le projet NeWater à Singapour (2000) : alimentation d'un réservoir de surface utilisé pour la production d'eau potable. Les EUT représentent 2,5 % du volume potabilisé (Asano et al., 2007; Rodriguez et al., 2009; Tare, 2011; US EPA, 2012).
- le projet de réalimentation des eaux souterraines du comté d'Orange, Californie, USA (2007) : alimentation d'une nappe souterraine utilisée pour la production d'eau potable. Les EUT représentent 15 à 18 % du volume de la nappe (Asano et

al., 2007; Rodriguez et al., 2009; Tare, 2011; Tchobanoglous et al., 2011; US EPA, 2012).

b. Exemple d'application

Recharge d'un aquifère dunaire, Wulpen (Belgique) (Dewettinck et al., 2001; Rodriguez et al., 2009; Salgot & Huertas, 2006)

La ville de Wulpen se situe sur la côte Nord de la Belgique. Sa localisation en fait une destination touristique importante, avec une population qui double, voire triple en été. La ressource principale pour la production d'eau potable est une nappe phréatique dunaire près de la côte, dans laquelle les volumes pouvant être prélevés sont limités à cause de l'intrusion du biseau salin. De fait la ville ne peut fournir de l'eau à tous ses habitants pendant l'été et est obligée d'acheter de l'eau aux communes voisines. Pendant de forts épisodes de sécheresse, des coupures d'eau ont même été enregistrées (pas de pression suffisante pour les points de livraison les plus hauts). La décision de réutiliser les eaux usées traitées a donc un double objectif :

- sécuriser la ressource en eau destinée à la consommation humaine d'un point de vue quantitatif (pas de dépendance aux achats d'eau) et qualitatif (limiter l'intrusion du biseau salin dans la nappe).
- protéger l'écosystème dunaire vulnérable en choisissant l'infiltration par des bassins en surface. Cela permet de préserver cette zone naturelle de l'urbanisation croissante.

La station d'épuration consiste en une filière à boues activées classique avec un traitement tertiaire poussé pour produire une « eau d'infiltration » (Figure 8). Le choix de ce traitement tertiaire s'est fait selon trois critères bien définis : 1) l'eau potable doit pouvoir être distribuée sans chloration supplémentaire ; 2) l'eau d'infiltration doit être de très bonne qualité au regard de la valeur écologique de l'écosystème dunaire ; 3) l'emprise des installations doit être limitée. C'est donc la combinaison de deux procédés membranaires qui a été retenue : microfiltration et osmose inverse. Une partie du débit (10 %) ne passe pas par l'osmose inverse et subit simplement une désinfection UV, ceci afin de maintenir une minéralisation minimale de l'eau. Le traitement de potabilisation des eaux pompées dans la nappe consiste simplement en une aération et une filtration sur sable avant distribution. Le volume d'EUT représente environ 7000 m³/jour. Un des points problématiques est la gestion des concentrats de l'osmose inverse et des eaux de contre-lavage de la microfiltration qui sont mélangés aux effluents secondaires non réutilisés et rejetés en mer via un émissaire. Plus l'effluent

rejeté est chargé en nutriments, plus la redevance à payer est élevée. Des solutions de traitements alternatifs sont à l'étude.

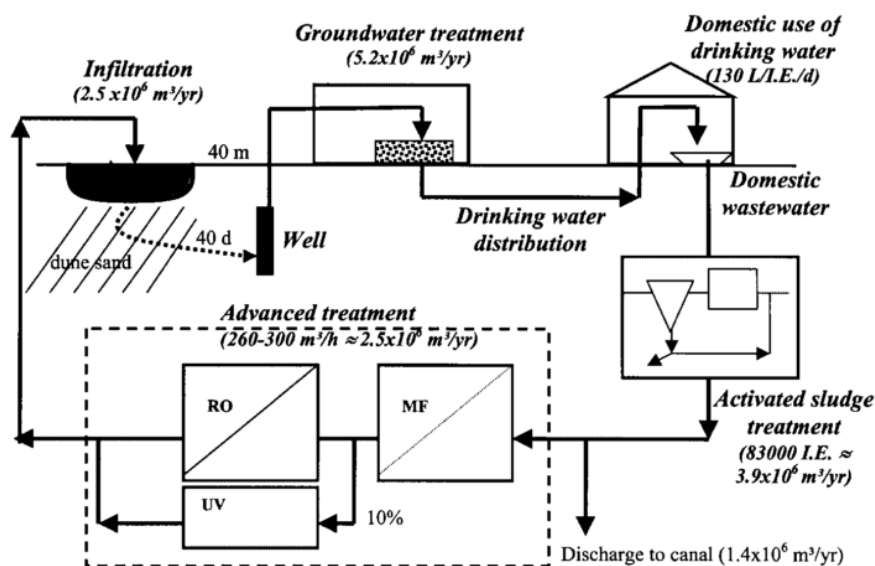


Figure 8 : Cycle de l'eau de la ville de Wulpen (Belgique) (Dewettinck et al., 2001)

Les travaux ont été réalisés en 2002 pour un montant de 6,5 millions d'euros. Les investissements ont été pris en charge par l'organisme public de gestion de l'eau (IWWA) et répercutés sur la facture des usagers. Les coûts par mètre cube traité sont répartis de la façon suivante (données de 2006) : environ 0,15 € pour l'investissement, environ 0,25 € pour le fonctionnement et environ 0,06 € pour la gestion des concentrats.

5. Usage potable direct

L'usage potable direct des eaux usées traitées peut être défini comme l'introduction d'EUT directement dans le réseau de distribution des eaux destinées à la consommation humaine, en aval de la station de potabilisation, ou juste en amont de celle-ci (Tchobanoglous et al., 2011). L'effet tampon de l'aquifère (de surface ou souterrain) n'existe pas (Figure 9). Le choix de réutiliser directement les eaux usées traitées dépend de facteurs bien précis (d'après Leverenz et al., 2011) :

- la présence d'un stress hydrique intense menace l'approvisionnement en eau potable,
- le coût de mobilisation d'une autre ressource est trop élevé (nappe phréatique trop profonde ou aquifère de surface trop éloigné),
- le coût de traitement d'une autre ressource est trop élevé par rapport à celui des eaux usées (faible qualité des eaux brutes),

- le choix d'un usage potable indirect est moins avantageux : hydrogéologie non adaptée à la recharge de nappe souterraine, conditions non adaptées à l'alimentation d'aquifères de surface (terrain non disponible, climat très aride favorisant l'évaporation, temps de séjour minimum élevé...),
- le choix de produire une eau de moindre qualité pour les usages non potables (et donc préserver l'eau pour les usages potables) est financièrement moins intéressant, notamment à cause du coût de construction et d'exploitation d'un double réseau de canalisations.

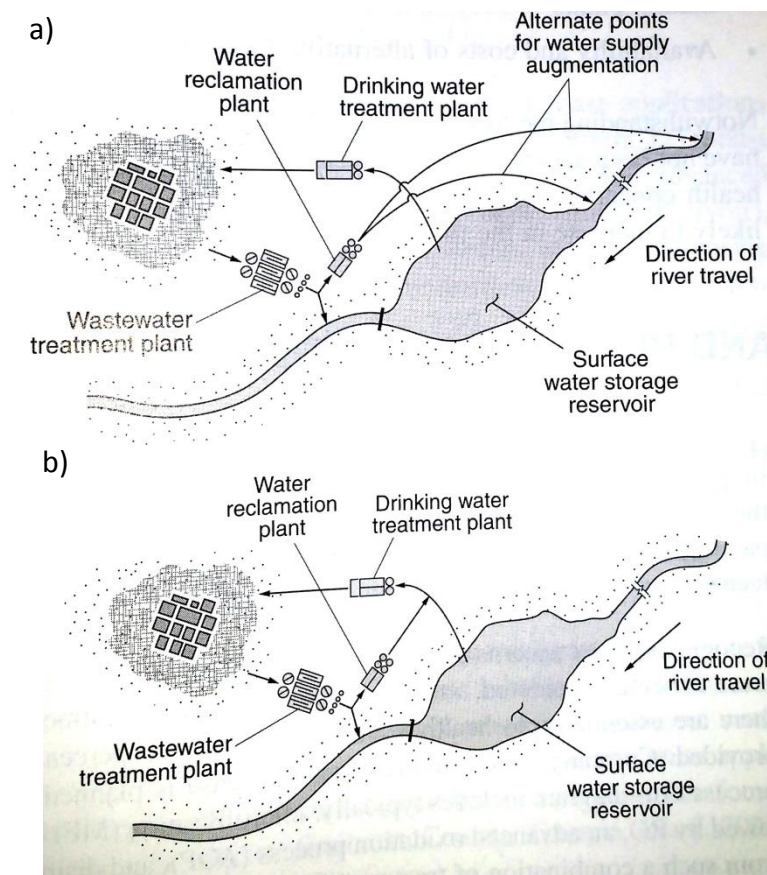


Figure 9 : Différence entre l'usage potable indirect (a) et l'usage potable direct (b) des EUT (Asano et al., 2007)

Le traitement des eaux usées pour ce type d'usage est évidemment très poussé et il répond au principe de l'approche multi-barrières. Une attention particulière doit être portée aux constituants qui pourraient être difficiles à éliminer et aux procédures de surveillance en continu de la qualité des eaux (Tchobanoglous et al., 2011). À l'heure actuelle, les projets d'usage potable direct des EUT sont peu nombreux. Le plus célèbre et le plus ancien est l'usine de Windhoek en Namibie qui est en service depuis 1968. Le

traitement a été amélioré en 2002 et permet actuellement de traiter 21 000 m³ par jour, qui sont directement injectés dans le réseau de distribution de l'eau potable en mélange à 25 % (35 % au maximum) avec les eaux issues de la station de potabilisation. Aucun effet sur la santé publique n'a été détecté à ce jour (Corsin & Le Strat, 2007; Lazarova, 2013a; Rodriguez et al., 2009; Tchobanoglous et al., 2011). Trois autres projets sont en cours actuellement :

- l'usine de Western Corridor en Australie (2008) qui a une capacité de 182 000 m³/jour pour fournir des EUT pour un usage industriel (centrales électriques majoritairement), pour un usage potable indirect et éventuellement pour un usage direct en cas de pénurie d'eau (Rodriguez et al., 2009),
- le projet de Big Spring, Colorado, USA (2012) qui a pour but de réutiliser 7000 m³/jour d'eaux usées pour alimenter à 15 % le réseau de distribution d'eau potable dans un contexte hydrologique défavorable et une situation de stress hydrique important (Sloan, 2011),
- le projet de Cloudcroft, Nouveau-Mexique, USA (2011) : faisabilité d'un projet à l'échelle d'un petit village (pic de consommation d'eau potable à 1400 m³/jour dont 400 m³ issus d'EUT). Le choix de l'usage potable direct découle notamment de la position géographique du village situé en altitude, en amont du bassin versant et dans une région aride : pas de ressource en surface et accès difficile à la ressource souterraine. La filière de traitement est présentée en Figure 10. Les EUT sont mélangées à environ 50 % avec des eaux issues de la nappe souterraine et maintenues pendant 1 à 2 mois dans un bassin tampon avant d'être potabilisées. L'investissement pour le projet s'élève à 2,3 millions de dollars américains avec un coût de fonctionnement d'environ 0,6 \$/m³ pendant la première année après la mise en service de l'installation (Livingston, 2008).

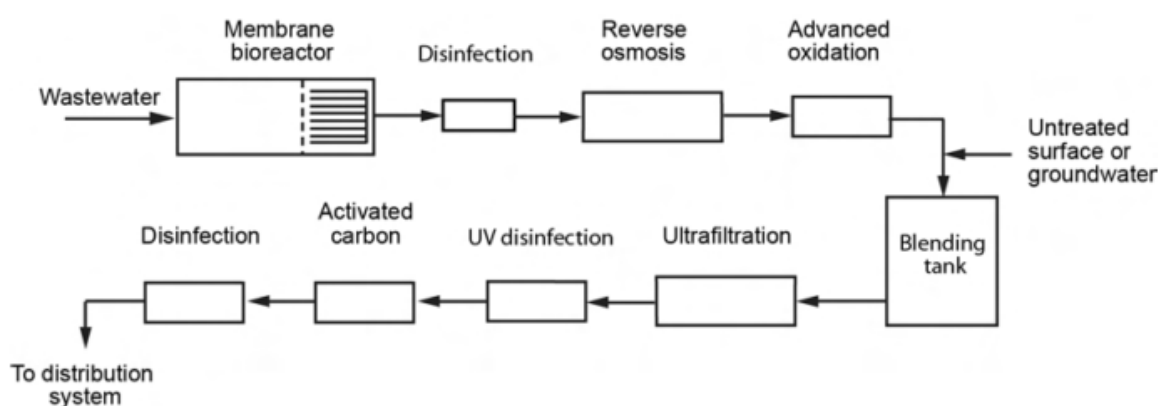


Figure 10 : Schéma de la filière de réutilisation des EUT pour un usage potable direct de Cloudcroft, Nouveau-Mexique, USA (Livingston, 2008; Tchobanoglous et al., 2011)

6. Conclusion

Pour chaque usage, les exemples d'application présentés illustrent la diversité des motivations des projets de réutilisation des eaux usées traitées. Outre l'enjeu principal lié au stress hydrique, l'aspect économique est également un levier important : soit le rejet des eaux usées traitées présente des contraintes telles que d'autres exutoires comme la REUT sont recherchés (notamment en zones côtières), soit les ressources alternatives en cas de pénurie pour la production d'eau potable sont difficilement mobilisables (notamment en zones montagneuses arides).

Le modèle économique adopté pour chaque projet est unique et dépend du contexte politique et de l'usage envisagé. Les coûts d'investissement liés au traitement à mettre en œuvre sont souvent à la charge du producteur des eaux usées (collectivité), et une redevance est payée par l'utilisateur des EUT. Pour l'usage agricole, il s'agit souvent d'une décision politique de maintien de l'activité, et le coût du traitement n'est pas supporté par l'agriculteur, ou faiblement. La question du « qui paye quoi ? » se pose spécifiquement pour chaque projet, que ce soit pour l'investissement ou le fonctionnement des installations. Le cas de la réutilisation en eau potable est particulier, dans le sens où l'utilisateur final est aussi le producteur.

Les principaux enjeux liés aux usages présentés sont résumés dans le Tableau 3. L'enjeu principal commun est la protection de l'utilisateur et/ou du consommateur, notamment vis-à-vis du risque biologique. Les autres enjeux importants sont la distance entre le point de production des EUT et le point d'usage, ainsi que la prévention du colmatage des canalisations. Cependant, certains enjeux sont parfois contradictoires, comme ceux liés à la présence de nutriments (souhaitable pour les usages agricoles, à éviter pour les usages environnementaux) ou à la présence de chlore résiduel (souhaitable pour les usages urbains, à éviter pour les usages environnementaux). L'ensemble de ces paramètres détermine la filière de traitement à mettre en œuvre (Tableau 3). Il est donc important de bien identifier les risques pour déterminer les traitements les plus adaptés.

Tableau 3 : Résumé des enjeux liés à chaque usage et exemples de filières de traitement tertiaire associées

Usages	Enjeux	Exemples de filières de traitement tertiaire des eaux usées
Agricoles	<ul style="list-style-type: none"> ◦ Protection des consommateurs et des travailleurs ◦ Récupération de nutriments ◦ Composition chimique des EUT (impact de la salinité et du chlore résiduel) ◦ Colmatage des systèmes d'irrigation (notamment goutte à goutte) 	<ul style="list-style-type: none"> ◦ Lagunage poussé et désinfection ◦ Filtration sur matériau granulaire et désinfection
Urbains	<p>Variable selon le type d'usage :</p> <ul style="list-style-type: none"> ◦ Protection des usagers ◦ Distance avec le point d'usage ◦ Double réseau de canalisations et risque de connexion avec le réseau d'eau potable ◦ Colmatage des canalisations 	<p>Selon le type d'usage et le type de collectivité :</p> <ul style="list-style-type: none"> ◦ Filtration sur matériau granulaire et désinfection (usage type « chasses d'eau ») ◦ Filtration membranaire de type ultrafiltration (UF) ou bioréacteur à membrane (BRM) ◦ Lagunage extensif avec maturation et désinfection (petites collectivités)
Industriels	<ul style="list-style-type: none"> ◦ Distance avec le point d'usage ◦ Qualité d'eau adaptée au process industriel ◦ Protection des travailleurs 	<p>Selon la qualité souhaitée :</p> <ul style="list-style-type: none"> ◦ Double filtration (matériau granulaire et charbon actif) et désinfection ◦ Filtration membranaire de type UF ou BRM ◦ Dans certains cas : eau ultrapure : ajout d'un étage d'osmose inverse (OI)
Environnementaux	<ul style="list-style-type: none"> ◦ Si contact avec le public : protection des usagers ◦ Qualité d'eau adaptée au milieu récepteur (peu de nutriments, teneur suffisante en oxygène dissous) 	<p>Si recharge de nappe</p> <ul style="list-style-type: none"> ◦ Filtration granulaire, désinfection et affinage possible par percolation dans le sol (SAT) <p>Mais le plus souvent :</p> <ul style="list-style-type: none"> ◦ Filtration membranaire de type UF ou BRM voire OI si usage potable indirect
Potable direct	<ul style="list-style-type: none"> ◦ Eau de qualité adaptée à la consommation humaine 	<ul style="list-style-type: none"> ◦ Traitement avancé : double filtration (UF – OI ou BRM – OI), procédés d'oxydation avancée, désinfection, mélange avec une autre ressource

USAGES NON POTABLES

USAGES POTABLES

IV. Les risques sanitaires liés à la REUT

La transmission d'infections par des organismes pathogènes est la principale préoccupation lors de la réutilisation d'eaux usées traitées. Cette partie vise à présenter l'ensemble de ces risques, puis à définir les indicateurs les plus adaptés pour les évaluer.

1. Les risques chimiques

Les eaux usées contiennent principalement trois types de pollution : carbonée, azotée et phosphorée. Ces pollutions peuvent être sous deux formes chimiques : organique ou minérale, et sous trois formes physiques : dissoute, colloïdale ou particulaire (ANSES, 2012). À ces pollutions s'ajoutent différentes contaminations à l'état de trace, que l'on nomme micropolluants. Ce terme désigne un ensemble de substances minérales ou organiques qui, même à de très faibles concentrations, de l'ordre du micro ou nanogramme par litre, peuvent être toxiques. Ils sont utilisés lors de processus industriels ou entrent dans la composition de nombreux produits d'usage industriel, agricole ou domestique (CGDD, 2011). Ces molécules peuvent être regroupées en plusieurs catégories : les pesticides, les résidus pharmaceutiques ou vétérinaires, les molécules organiques dérivées des plastiques, les sous-produits de désinfection, les métaux et métalloïdes (Figure 11). En dehors d'une pollution chimique exceptionnelle (déversement accidentel d'un industriel par exemple), ces composés représentent le principal risque chimique sur le plan sanitaire.

Les effets de ces composés sur la santé humaine sont difficile à évaluer dans le cadre de la réutilisation des eaux usées traitées du fait 1) de la diversité des contaminants à prendre en compte, 2) du manque de données quant aux concentrations dans les eaux usées et aux abattements dans les STEP, et 3) de la quasi-impossibilité de mettre en évidence un éventuel « effet cocktail » (ANSES, 2012; Joyeux, 2012). La directive européenne 2013/39 du 12 août 2013 définit 45 substances prioritaires pour une bonne qualité chimique des eaux de surfaces, avec des valeurs de qualité de référence (JOUE, 2013). Pour l'Homme, la toxicité de ces molécules est surtout liée à leur potentiel effet cancérigène, mutagène et/ou reprotoxique. Certaines substances sont à « effet déterministe » : l'effet toxique apparaît à partir d'une certaine dose. Dans ce cas, un seuil de protection peut être défini. D'autres substances sont à « effet probabiliste », la probabilité d'apparition d'un effet augmente avec la dose. Dans ce cas, un « seuil d'incidence acceptable » est défini (Joyeux, 2012). Une fois que ces seuils sont définis, il

faut établir des scénarios d'exposition, par voie respiratoire (inhalation) ou par voie cutanée. Il s'agit de définir un temps d'exposition journalier ou annuel afin d'estimer la quantité d'effluent à laquelle l'utilisateur est exposé. En se basant sur les seuils acceptables et l'exposition, et en prenant des facteurs de sécurité, il est alors possible de définir la concentration maximale acceptable dans l'effluent pour la ou les substances considérées et le comparer avec les valeurs rencontrées en réalité. L'ANSES (Agence Nationale de sécurité sanitaire, alimentation, environnement, travail) a fait ce travail en 2012 sur un panel de 10 substances prioritaires (contact par inhalation) et sans étudier l'effet cocktail, ce qui n'est pas exhaustif. Néanmoins, leur conclusion est que « ces substances ne devraient pas se retrouver dans les EUT à des concentrations pouvant induire un effet néfaste par voie respiratoire pour la santé des populations lors de l'irrigation par aspersion » (ANSES, 2012).

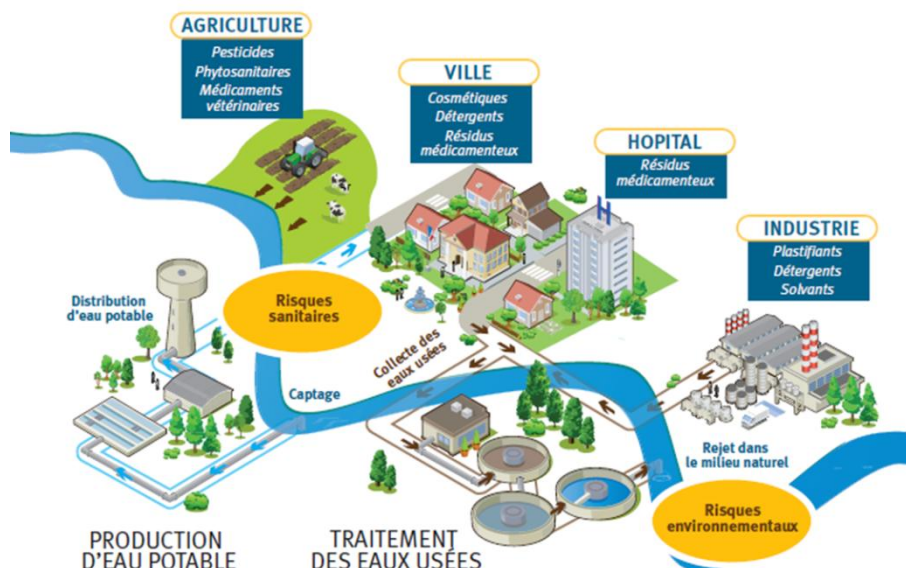


Figure 11 : Origine et impacts possibles des micropolluants (source SAUR)

2. Les risques biologiques

Les maladies d'origine hydrique rencontrées chez l'Homme sont liées à des microorganismes pathogènes qui peuvent être des bactéries, des protozoaires, des helminthes, ou des virus. Ces pathogènes, le plus souvent d'origine entérique, peuvent survivre dans l'eau et infecter les humains par ingestion et/ou contact cutanéomuqueux avec des eaux contaminées par des fèces humains ou animaux (Asano et al., 2007). Le risque dépend de la virulence intrinsèque du pathogène, mais aussi de sa capacité à survivre dans un environnement non optimal pour sa croissance (Drechsel et al., 2011).

a. Bactéries

Les bactéries sont des organismes microscopiques dont la taille varie entre 0,2 et 10 μm . Elles sont présentes partout dans l'environnement et peuvent s'adapter à des conditions très différentes de température, pression, rayonnement... La plupart des bactéries rencontrées chez l'Homme ne sont pas pathogènes et sont même indispensables à son métabolisme. Les bactéries pathogènes se propagent dans les eaux usées par l'intermédiaire des fèces des individus infectés (Asano et al., 2007; Drechsel et al., 2011; WHO, 2006). À l'heure actuelle, les techniques de biologie moléculaire basées sur l'horloge moléculaire ADNr 16S permettent de distinguer les différentes souches et espèces de bactéries. Néanmoins, on utilise encore la classification selon des caractéristiques physiologiques (présence d'une enzyme, métabolisme anaérobie facultatif, etc...) et morphologiques (sphère, bâtonnet...) pour le classement des indicateurs de contamination fécale. Deux grands groupes de bactéries peuvent ainsi être distingués selon le type de paroi cellulaire qu'elles possèdent : les bactéries Gram-positives et Gram-négatives (Figure 12). La distinction entre ces groupes se fait par la coloration de Gram. Certaines bactéries sont également capables de produire des structures appelées endospores par un processus particulier, la sporulation. Ce sont des cellules différenciées capables d'une grande résistance à la chaleur, aux produits chimiques, aux radiations... (Madigan et al., 2012).

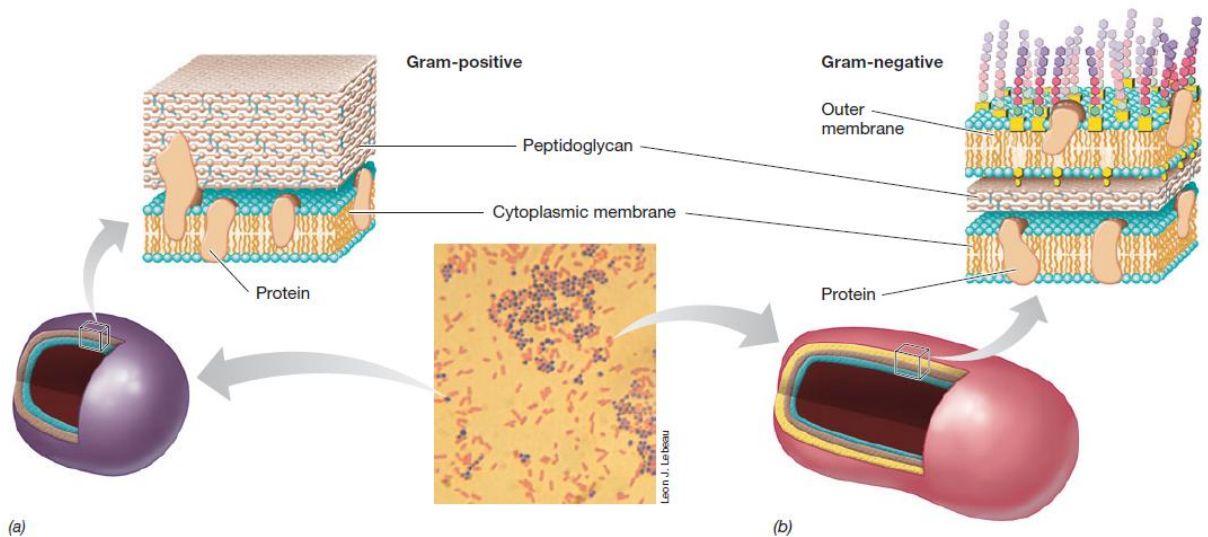


Figure 12 : Différence entre les bactéries Gram-positives (a) et les bactéries Gram-négatives (b) (Madigan et al., 2012)

Les principales bactéries pathogènes rencontrées dans les eaux usées sont présentées dans le Tableau 4. Les concentrations observées sont très variables selon les effluents étudiés (ANSES, 2012). La principale maladie véhiculée par les bactéries entériques est la diarrhée, et certaines espèces peuvent provoquer des symptômes graves. Les autres maladies d'origine hydrique comme la dysenterie, la typhoïde, le choléra ont quasiment disparu dans les pays développés mais restent une préoccupation majeure dans les pays en développement. On estime par exemple que plus de 16 millions de personnes sont contaminées par la typhoïde dans le monde pour environ 600 000 décès par an (Drechsel et al., 2011).

Tableau 4 : Principales bactéries pathogènes rencontrées dans les eaux usées (d'après ANSES, 2012; Asano et al., 2007; Straub & Chandler, 2003)

Espèce ou genre pathogène	Coloration de Gram	Maladies et symptômes causés
<i>Escherichia coli</i> O157 :H7 et certaines autres souches	-	Diarrhée avec complication possible chez l'enfant
<i>Salmonella sp.</i>	-	Typhoïde et diarrhée
<i>Shigella sp.</i>	-	Diarrhée, dysenterie
<i>Yersinia enterocolitica</i>	-	Diarrhée
<i>Vibrio cholerae</i>	-	Choléra
<i>Plesiomonas shigelloides</i>	-	Gastroentérite, septicémie
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	Infections nosocomiales
<i>Campylobacter sp.</i>	-	Diarrhée
<i>Leptospira interrogans</i>	-	Leptospirose
<i>Legionella pneumophila</i>	-	Pneumonie et autres infections respiratoires
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	Pneumonies nosocomiales
<i>Enterococcus sp.</i>	+	Infections de la vessie ou de la prostate
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	Infections nosocomiales
<i>Clostridium perfringens</i>	+	Production d'une toxine nécrosante
<i>Listeria monocytogenes</i>	+	Listériose
<i>Mycobacterium sp.</i>	Ø - paroi riche en cires	Tuberculose, infections chez les immunodéprimés

b. Protozoaires

Les protozoaires sont des organismes monocellulaires. Les deux principaux genres pathogènes pour l'Homme sont les genres *Cryptosporidium* et *Giardia*. Ce sont tous les deux des parasites ubiquistes, dont certaines espèces sont pathogènes opportunistes pour l'Homme et l'animal. Chez *Cryptosporidium*, l'espèce pathogène est *C. parvum*, responsable de la cryptosporidiose. Les réservoirs de ce germe sont les matières fécales

des animaux (bovins, ovins, mais aussi les animaux familiers) et des humains (porteurs sains et malades). La transmission interhumaine (mains souillées par exemple) est la voie la plus incriminée dans le cas de cette maladie (Nakache, 2002). Néanmoins, la voie environnementale, c'est-à-dire la dispersion des germes dans l'eau de pluie et le sol pouvant amener à la contamination des eaux, n'est pas à négliger. Le cas le plus connu est l'épidémie de Milwaukee (USA) en 1993, avec 400 000 personnes contaminées dont 50 décès suite à un dysfonctionnement de l'unité de potabilisation des eaux et une détérioration de l'eau brute par des déjections animales (Asano et al., 2007).

Le cycle de vie de *Cryptosporidium* se compose de deux phases : une sexuée et une asexuée se déroulant dans le tube digestif de l'hôte. À la suite de ces phases, des cellules particulières sont excrétées dans les fèces : les oocystes, qui sont des formes de résistance du parasite d'une taille de 4 à 6 μm . 80 % des oocystes possèdent une paroi kystique épaisse leur conférant une forte résistance à leur environnement. Les 20 % restant présentent une paroi plus fine, et ne sont pas aussi résistants. Les oocystes renferment quatre sporozoïtes qui sont les organes infectieux libérés lors de la pénétration des oocystes dans l'épithélium intestinal de l'hôte et provoquent une gastro-entérite avec complications possibles chez les personnes immunodéprimées. La dose minimale infectieuse pour les personnes en bonne santé s'élève de quelques dizaines à quelques centaines d'oocystes. Le problème principal est qu'il n'existe à ce jour aucun traitement curatif connu contre cette maladie. Un autre protozoaire parasite opportuniste fréquemment rencontré dans les eaux usées est *Giardia lamblia*. Le mode de transmission est similaire à celui de la cryptosporidiose, mais des traitements antiparasitaires existent et sont efficaces (Asano et al., 2007; Nakache, 2002).

c. Helminthes

Les helminthes sont des vers pluricellulaires fréquemment rencontrés dans les eaux résiduaires. Tout comme les protozoaires, ce sont majoritairement des organismes parasites. La plupart ont des cycles de vie complexes comprenant un passage obligé par un hôte intermédiaire. Selon les espèces, le stade infectieux est l'organisme adulte, la larve (taille : quelques mm à plusieurs cm), ou les œufs (taille : quelques dizaines de μm). Les œufs et les larves sont résistants dans l'environnement (Boutin & Helmer, 2009). Le Tableau 5 présente les principales espèces rencontrées et les infections associées. Les helminthes sont une des principales causes de maladie chez l'Homme, avec entre deux et quatre milliards d'infections par an (Asano et al., 2007).

Tableau 5 : Principales espèces d'helminthes pathogènes rencontrées dans les eaux usées (d'après ANSES, 2012; Asano et al., 2007; Boutin & Helmer, 2009; Straub & Chandler, 2003)

Espèce ou genre pathogène	Maladies et symptômes causés
<i>Ascaris lumbricoides</i>	Ascariose
<i>Schistosoma mansoni</i>	Infections du foie, de la vessie, et des intestins
<i>Ancylostoma duodenale</i>	Ancylostomiase
<i>Ancylostoma sp.</i>	Anémie
<i>Necator americanus</i>	Necatoriose (contact cutané)
<i>Strongyloides stercoralis</i>	Strongyloïdase (contact cutané)
<i>Trichuris trichuria</i>	Trichuriase
<i>Taenia sp.</i>	Diarrhée, douleurs musculaires
<i>Hymenolepis sp.</i>	Nervosité, troubles digestifs...
<i>Toxocara sp.</i>	Fièvre, douleur abdominale
<i>Echinococcus granulosus</i>	Hydatidose

d. Virus

Les virus sont des parasites intracellulaires de très petite taille (10 à 350 nm) qui ne peuvent se multiplier que dans une cellule hôte. Ils sont composés d'un noyau d'acide nucléique entouré d'une enveloppe protéique protectrice qui leur permet de se maintenir longtemps dans un environnement hostile (Straub & Chandler, 2003). Les virus entériques sont des pathogènes humains obligatoires, plus de 120 sont identifiés à l'heure actuelle (Asano et al., 2007; Boutin & Helmer, 2009). La plupart des virus entériques causent des gastroentérites ou des infections respiratoires, mais certains peuvent causer des infections plus graves, comme la méningite (Tableau 6).

Tableau 6 : Principaux virus rencontrés dans les eaux usées (d'après ANSES, 2012; Asano et al., 2007; Straub & Chandler, 2003)

Virus	Maladies et symptômes causés
Entérovirus (Polio, Echo, Coxsackie...)	Méningites, paralysies, éruptions cutanées, maladies respiratoires, diarrhée
Virus des hépatites A et E	Infections hépatiques
Calciavirus (norovirus, sapporo)	Diarrhée, gastroentérite
Rotavirus	Diarrhée, gastroentérite
Astrovirus	Diarrhée
Adenovirus	Diarrhée
Réovirus	Diarrhée, infections entériques

e. Autres pathogènes et toxines

Les eaux usées peuvent également contenir des champignons, moisissures et levures, qui proviennent soit des fèces, soit de l'environnement. Certains peuvent entraîner des infections comme la levure *Candida albicans* qui touche les muqueuses (ANSES, 2012; Korzeniewska et al., 2009). Des toxines peuvent être également présentes dans les eaux usées et provoquer des maladies. Ces toxines peuvent avoir différentes origines (ANSES, 2012; Asano et al., 2007) :

- cyanobactéries : *Mycrosystis* (toxine provoquant des diarrhées) et *Anabaena* (toxine provoquant des dommages au foie),
- endotoxines libérées par certaines bactéries Gram-positives : provoquent des inflammations généralisées, voire un choc septique,
- toxines clostridiales libérées par *Clostridium perfringens* : provoquent des nécroses tissulaires et peuvent être létales.

3. Estimation des risques biologiques

Pour estimer le risque biologique dans le cadre de la REUT, il faut estimer la probabilité d'une infection par un microorganisme pathogène, elle-même dépendante de la probabilité d'exposition à cet organisme (Drechsel et al., 2011). La capacité d'un microorganisme à survivre aux traitements d'une station d'épuration et dans l'environnement détermine le risque de contact avec l'utilisateur. Ensuite, la dose à laquelle cet utilisateur est exposé est à prendre en compte. Enfin, la probabilité d'un effet pathogène à partir d'une dose donnée peut être calculée.

a. Effets des traitements sur les microorganismes pathogènes

Il est difficile d'évaluer les effets précis des traitements sur les microorganismes pathogènes, du fait des caractéristiques spécifiques de chaque configuration et des difficultés d'échantillonnage et d'analyse (ANSES, 2012). Néanmoins, des ordres de grandeur d'abattelements, exprimés en \log_{10} peuvent être donnés. Dans une station d'épuration, plusieurs types de traitements peuvent être appliqués (PNUE, 2008) :

- prétraitements : extraction des déchets solides, des graisses et des sables,
- traitements primaires : traitements physiques (décantation) associés ou non à des traitements chimiques (coagulation)
- traitements secondaires : un traitement de type biologique est couplé à une séparation physique. Les filières les plus courantes sont : boues activées +

clarification ; bioréacteur à membrane (microfiltration) ; lagunes aérées + bassin de sédimentation

- traitements tertiaires : affinage du traitement par une élimination poussée de l'azote et du phosphore, filtration tertiaire (matériaux granulaires ou membranes), désinfection de l'effluent

Les abattements attendus en fonction du type de traitement sont présentés dans le Tableau 7. Le traitement primaire permet seulement de faibles abattements, certains microorganismes étant adsorbés sur les matières décantées. Le traitement secondaire permet des abattements plus importants, surtout pour les helminthes. Les traitements tertiaires comprennent les traitements physiques de filtration qui permettent une bonne rétention des microorganismes de grande taille (selon le seuil de coupure), et les traitements de désinfection.

Le chlore est le désinfectant le plus utilisé en production d'eau potable, mais son utilisation pour la REUT pose la question des sous-produits toxiques liés à la présence de matière organique et il peut y avoir également un impact sur les plantes (Asano et al., 2007). L'ozone possède un pouvoir désinfectant supérieur à celui du chlore : son action désinfectante couvre également les virus. Cependant cette technique entraîne également la formation de sous-produits toxiques, les bromates (Moles, 2007). Le traitement par les ultraviolets (UV) est sans risque de génération de sous-produits de désinfection puisqu'il n'y a aucun ajout de produit chimique. Cependant, ce type de désinfection n'a pas d'effet rémanent (Tableau 7).

Tableau 7 : Ordres de grandeur des abattements (en unités \log_{10}) observés en station d'épuration selon le type de traitement et le type de microorganisme, et comparaison relative des principaux types de désinfection (d'après ANSES, 2012; Moles, 2007)

Type de traitement	Bactéries	Helminthes	Protozoaires	Virus
Primaire	0 – 1	0 – 3	0 – 1	0 – 1
Secondaire	1 – 3	1 – 3	0 – 1	0 – 2
Tertiaire – filtration sur matériau granulaire ou microfiltration	0 – 2,5	1 – 3	1 – 3	0,5 – 3
Tertiaire – ultrafiltration, osmose inverse ou similaire	3,5 – 6	≥ 3	≥ 6	2,5 – 6
Tertiaire – désinfection	2 – 6	0 – 3	0 – >3	1 – 6
<i>Chlore</i>	+++	–	–	+
<i>Ozone</i>	+++	+	–	+++
<i>Traitement UV</i>	+++	+	++	+++

b. Effet du stockage et de l'environnement sur les microorganismes pathogènes

Dans les eaux de surface, les microorganismes sont dilués et soumis à une prédation de la part des organismes aquatiques. Cependant, dans le cas de la REUT, les eaux sont la plupart du temps stockées avant usage. Plusieurs facteurs environnementaux influencent alors leur survie (Madigan et al., 2012) : la température, les rayonnements, l'acidité et l'alcalinité de l'effluent, et la teneur en oxygène.

Les bactéries pathogènes étant pour la plupart entériques, elles sont souvent mésophiles, c'est-à-dire que la plage de température optimale pour leur croissance est comprise entre 10 et 45°C, avec un optimum autour de 37°C (Madigan et al., 2012). Les protozoaires, helminthes et virus sont généralement plus résistants. Les rayonnements UV du soleil ont également un effet non négligeable sur ces organismes.

Ainsi, la croissance des pathogènes d'origine entérique est favorisée dans un milieu proche de leur milieu d'origine : ils sont plutôt neutrophiles ($5,5 < \text{pH} < 8$), et halotolérants à halophiles (teneur en sel entre 0 et 10 %). Selon leur métabolisme, ils supportent plus ou moins de faibles teneurs en oxygène. Par exemple, les entérocoques sont aérobies stricts. *Escherichia coli* est aérobie facultative et peut donc supporter une teneur en oxygène plus faible si les autres conditions à sa croissance sont réunies. Justement, les nutriments disponibles, liés à la teneur en matière organique biodégradable, sont également un facteur limitant à la survie des microorganismes (Jiménez-Cisneros & Asano, 2008; Madigan et al., 2012). Considérant tous ces facteurs, le Tableau 8 illustre la viabilité de certains pathogènes dans les eaux douces.

Tableau 8 : Survie de quelques pathogènes entériques dans des eaux douces superficielles (Asano et al., 2007; Feachem et al., 1983; Korhonen & Martikainen, 1991; Kutz & Gerba, 1988; McFeters & Terzieva, 1991)

Microorganisme	Temps nécessaire pour une réduction de 90 % de la viabilité
Coliformes	0,8 à 4,8 jours entre 10 et 20°C (moyenne 2,5 jours)
<i>E. coli</i>	3,7 jours à 15°C
<i>Yersinia</i>	7 jours entre 5 et 8,5°C
<i>Giardia</i>	14 à 143 jours entre 2 et 5°C 3,4 à 7,7 jours entre 12 et 20°C
Virus entériques	1,7 à 5,8 jours entre 4 et 30°C

c. Estimation quantitative du risque microbien (EQRM)

L'EQRM est une méthodologie développée par des chercheurs américains en 1999 (Haas et al., 1999) et renforcée par des chercheurs anglais en 2007 (Mara & Kramer, 2008). Elle consiste à estimer le risque d'infection pour un pathogène et un type d'exposition définis, à partir de l'évaluation de la dose reçue à chaque exposition et de la fréquence annuelle de contact (Figure 13). La dose reçue à chaque exposition dépend de la concentration du pathogène dans les EUT, du volume en contact avec l'utilisateur et la fréquence. Par exemple, on considère que l'ingestion de 100 g de laitue arrosée avec des EUT correspond à un volume ingéré de 10 mL. De la même façon, un travailleur exposé de façon accidentelle à des EUT en ingérerait environ 100 mL (Salgot & Huertas, 2006; WHO, 2006).

Pour déterminer le risque d'infection, deux principaux modèles existent : exponentiel ou Bêta-Poisson (Figure 13). Le choix du modèle dépend du pathogène pris en compte. Le modèle exponentiel prend comme hypothèse que la probabilité d'infection est directement proportionnelle à la dose de pathogènes : le pathogène est souvent libre dans les EUT et l'ingestion d'une seule unité peut provoquer l'infection. Il est utilisé par exemple pour *Cryptosporidium*. Le modèle Bêta-Poisson prend comme hypothèse que les pathogènes sont plutôt agrégés dans l'eau : pour des concentrations faibles, le risque est faible, mais il augmente rapidement pour des concentrations plus élevées. La probabilité d'infection varie selon une distribution de Poisson. Ce modèle est souvent utilisé pour les bactéries et les virus (Drechsel et al., 2011; Salgot & Huertas, 2006).

Cette approche est intéressante, mais elle comporte de nombreuses incertitudes : la concentration du pathogène dans les EUT étant mesurée de façon ponctuelle, il est difficile d'évaluer sa variabilité. De même, la quantification des volumes d'EUT reçus et de leur fréquence est assez imprécise. C'est pourquoi, il est préférable d'utiliser une série de valeurs pour chaque paramètre (par exemple 10 à 15 mL d'EUT sont présents dans 100 g de laitue après l'irrigation, également valable pour la concentration en pathogène). Un programme informatique sélectionne ensuite une valeur au hasard dans la série de valeurs, et détermine le risque annuel qui en découle (Figure 13). Le programme répète ensuite ces calculs un grand nombre de fois (habituellement 10 000), ce qui permet de renforcer la robustesse de l'estimation du risque. Ce processus est appelé simulation de Monte Carlo (Drechsel et al., 2011; Mara & Kramer, 2008).

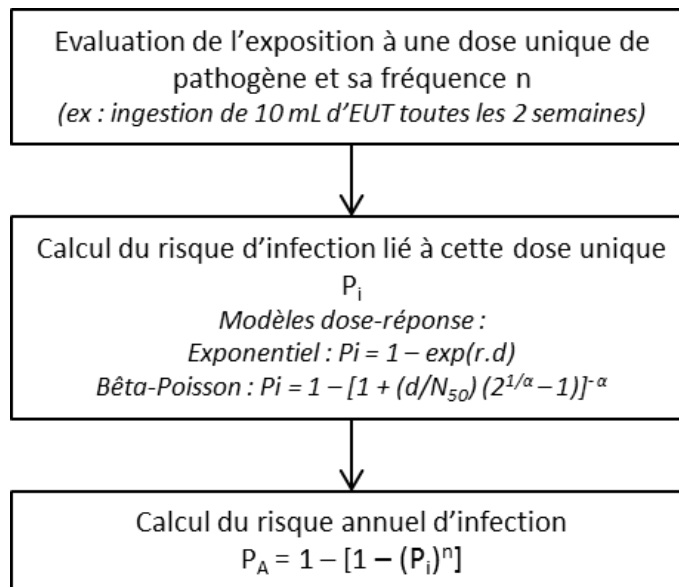


Figure 13 : Méthodologie générale de l'EQRM (n : fréquence d'exposition ; d : dose reçue à chaque exposition ; N₅₀ : dose infectieuse médiane ; α et r : constantes « d'infectiosité » du pathogène) (d'après Drechsel et al., 2011; Haas et al., 1999; Salgot & Huertas, 2006)

4. Les indicateurs de qualité des eaux usées traitées

a. Qu'est-ce qu'un bon indicateur ?

Le nombre et la variété des constituants chimiques et biologiques rencontrés dans les eaux usées traitées rendent impossible leur qualification et leur quantification exhaustives. Par conséquent, une sélection d'indicateurs pertinents est nécessaire pour évaluer la qualité des EUT (Jiménez-Cisneros, 2014). Un indicateur (par exemple la teneur en coliformes) est une information obtenue à partir d'un ou plusieurs estimateurs (mesures) qui permet une meilleure connaissance du système étudié (AFNOR, 2000b). Il faut noter qu'un paramètre (comme la turbidité par exemple) peut permettre d'estimer de façon indirecte un indicateur (comme la teneur en coliformes) et également donner de façon directe une information sur le système (Figure 14).

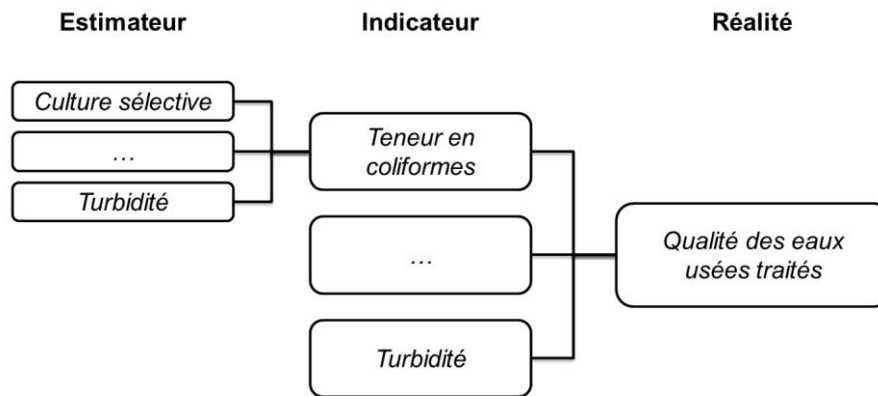


Figure 14 : Définition de la notion d'indicateur de qualité des EUT

Les principales qualités d'un bon indicateur sont (d'après AFNOR, 2000b) :

- la représentativité : l'indicateur est exhaustif par rapport au besoin de connaissance sur le système étudié et transposable à d'autres systèmes pour comparaison,
- la simplicité : il doit être facile à estimer, et à un coût acceptable,
- l'opérationnalité : l'indicateur doit donner une information suffisamment sensible et suffisamment rapide pour décrire la situation actuelle.

b. Les indicateurs de qualité physico-chimique

Les principaux constituants rencontrés dans les eaux usées traitées sont sous forme organique ou minérale d'une part, et sous forme particulaire, colloïdale ou dissoute d'autre part. La pollution particulaire peut être mesurée par filtration ou par des méthodes optiques. Dans le premier cas, l'échantillon passe au travers d'un filtre en fibre de verre avec un seuil de coupure de 1,2 μm pour retenir les matières en suspension (MES) et une partie des matières colloïdales. Le filtre est ensuite séché puis pesé, et la quantité de MES est ramenée au volume filtré (AFNOR, 2005). Les méthodes optiques sont basées sur la diffraction/absorption de la lumière par les particules. La plus connue est la néphélométrie, qui permet de mesurer la turbidité, exprimée en NTU (AFNOR, 2000a). La transmittance UV à 254 nm est aussi un bon indicateur de la pollution particulaire. Pour une caractérisation plus fine des tailles des particules en suspension, des méthodes granulométriques sont également employées (Azema et al., 2002).

La pollution organique des EUT est constituée de deux types de composés : les composés facilement biodégradables (protéines, organismes vivants, bioplastiques...), et les composés difficilement biodégradables (substances humiques, hydrocarbures...) (Thomas & Theraulaz, 2007). Généralement, ces composés ne sont pas mesurés

spécifiquement, mais des indicateurs globaux sont utilisés, les plus courants étant la Demande Chimique en Oxygène (DCO) pour la pollution organique totale et la Demande Biologique en Oxygène (DBO₅, généralement mesurée sur cinq jours) pour la pollution organique biodégradable. D'autres paramètres peuvent également être utilisés, comme le Carbone Organique Total (COT) ou l'absorption UV à 254 nm. Ces méthodes sont intéressantes d'un point de vue global, mais elles peuvent conduire à une surestimation : par exemple, la DCO prend en compte une partie des minéraux oxydables et la spectrophotométrie UV prend en compte une partie des minéraux absorbant à 254 nm, alors que ces composés ne devraient pas être mesurés pour estimer la pollution organique (Figure 15).

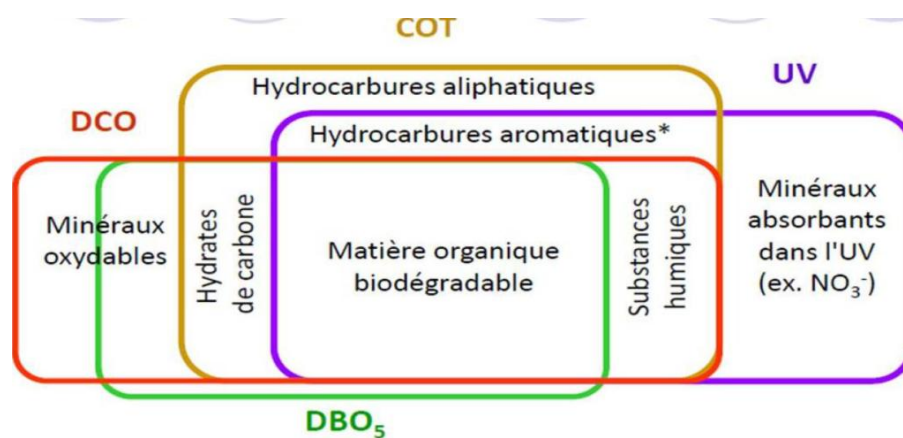


Figure 15 : Signification des indicateurs globaux de la pollution organique (Thomas & Theraulaz, 2007)

Au contraire des indicateurs globaux de pollution organique, les composés minéraux dans l'eau sont recherchés de façon plutôt spécifique. Un des plus courants est l'azote, qui peut être mesuré de façon globale : formes dissoutes (azote total filtré à 0,45 µm) ou formes dissoutes et particulaires (azote total non filtré). Les formes spécifiques peuvent aussi être mesurées : les nitrates, les nitrites, l'ammonium et l'azote Kjeldahl qui est un indicateur qui mesure les formes organiques et ammoniacales de l'azote (Figure 16). Le deuxième composé fréquemment mesuré est le phosphore, soit sous l'ensemble de ses formes organique et minérale (phosphore total), soit sous sa forme minérale (P-PO₄³⁻). Les métaux les plus fréquemment mesurés sont le fer (total, filtré) et le manganèse. La salinité et l'alcalinité des eaux sont mesurées soit de façon globale par la conductivité (donne une idée de la minéralisation), soit par des indicateurs spécifiques comme le TAC (Titre Alcalimétrique Complet, teneur en ions hydroxyde, bicarbonate et carbonate) ou le TH (Titre Hydrotimétrique, teneur en ions calcium et magnésium). Enfin, les éléments traces (pesticides, métaux, résidus médicamenteux)

sont mesurés soit de façon spécifique, soit de façon indirecte par la mesure d'effets induits (reprotoxiques par exemple) (Asano et al., 2007).

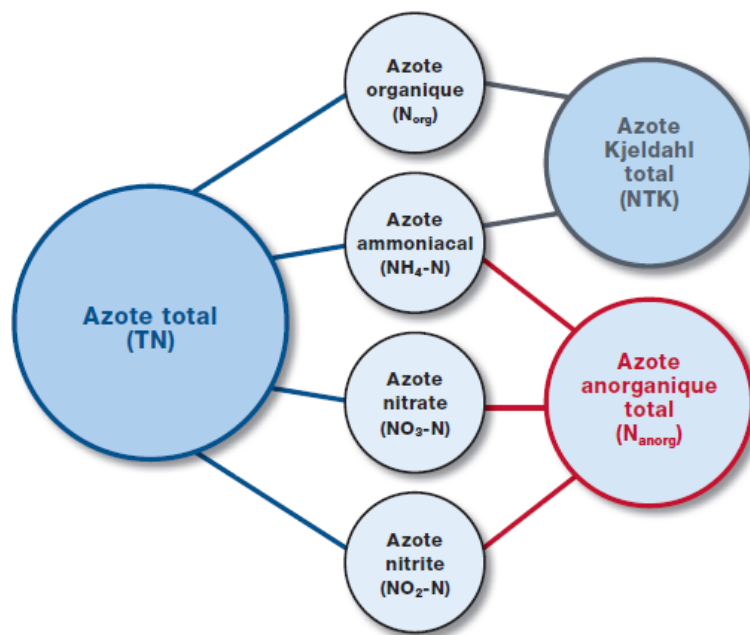


Figure 16 : Les différentes formes de l'azote et les indicateurs liés (d'après Asano et al., 2007)

c. Les indicateurs de qualité microbiologique

L'identification, l'isolement et le dénombrement de l'ensemble des microorganismes susceptibles d'avoir un impact sur la santé humaine représentent un coût et une durée d'analyse tellement importants que cette approche n'est pas envisagée, même pour la potabilisation de l'eau. C'est pourquoi des organismes indicateurs de contamination sont plutôt recherchés (Cabral, 2010; Drechsel et al., 2011; WHO, 2006). Ce type d'indicateurs possède les caractéristiques suivantes dans l'idéal (AFSSA, 2008; Asano et al., 2007; Cabral, 2010) :

- il est présent quand il y a contamination,
- il est présent en quantité supérieure ou égale à celle du ou des organismes cibles,
- sa résistance aux stress environnementaux et aux traitements est équivalente ou légèrement supérieure à celle du ou des organismes cibles,
- son identification et sa culture doivent être plus simples, plus rapides et moins coûteuses que pour le ou les organismes cibles,
- il ne doit pas présenter un risque pathogène trop important pour le personnel de laboratoire.

L'indicateur idéal qui remplit toutes ces conditions n'existe pas en pratique. Il est donc nécessaire de choisir plusieurs indicateurs complémentaires. La problématique est de choisir un nombre suffisant d'indicateurs pour s'assurer de la détection d'une contamination fécale, à un coût « viable » par rapport à l'usage et à la fréquence d'analyses envisagés. Certains indicateurs sont également utilisés pour vérifier le bon fonctionnement des étapes du traitement. Dans ce cas, les indicateurs choisis ne sont pas forcément les plus représentatifs du risque pathogène, mais ils sont les plus résistants au traitement étudié (AFSSA, 2008). Les principaux indicateurs de contamination actuellement utilisés sont les coliformes totaux, dont *Escherichia coli*, ainsi que les entérocoques (Salgot & Huertas, 2006; Uyttendaele et al., 2015; WHO, 2006).

Les coliformes sont définis comme l'ensemble des bactéries anaérobies facultatives gram-négatives, ne formant pas de spores, en forme de bâtonnets, qui sont capables de fermenter le lactose avec formation de gaz sous 48 heures à $35 \pm 2^\circ\text{C}$. Elles sont capables d'exprimer l'enzyme β -D-galactosidase (ISO, 2012; Madigan et al., 2012). Les coliformes possèdent aussi des flagelles et sont donc capables de se mouvoir dans leur environnement (Figure 17). Les coliformes fécaux ou thermotolérants sont parfois également recherchés : ils sont aussi capables de fermenter le lactose, mais à 44°C . *Escherichia coli* est une espèce particulière des coliformes fécaux capable d'exprimer l'enzyme β -D-glucuronidase (ISO, 2012). *E. coli* est à l'heure actuelle la souche la plus utilisée comme indicateur de contamination fécale (WHO, 2006). Comme la plupart des risques pathogènes sont associés à des organismes issus des fèces (bactéries, virus, protozoaires, helminthes), la présence de cet indicateur est un indice de contamination. Néanmoins, cette souche est également très sensible au stress environnemental ou lié aux traitements de désinfection, elle ne suffit donc pas à garantir l'efficacité de ce type de traitement sur l'ensemble des pathogènes (AFSSA, 2008; Harwood et al., 2005). Si la plupart des coliformes sont d'origine entérique, certaines souches peuvent être également présentes dans l'environnement, comme les genres *Erwinia* ou *Pantoea*. La détection de coliformes totaux ne garantit donc pas que la contamination soit d'origine fécale (Cabral, 2010). Néanmoins, le fait que certaines souches de coliformes soient plus résistantes permet de vérifier l'efficacité des traitements, notamment de désinfection (Harwood et al., 2005; NRC, 2004; Uyttendaele et al., 2015).



Figure 17 : Représentation d'une cellule de *Escherichia coli* (souche O157:H7). La longueur est d'environ 3 μm pour un diamètre d'environ 1 μm (Madigan et al., 2012)

Les entérocoques sont des cellules bactériennes sphériques ou ovoïdes, gram-positives, ne formant pas de spores, à métabolisme anaérobie facultatif, capables de fermenter le lactose. Ils possèdent l'enzyme β -D-glucosidase (Byappanahalli et al., 2012; ISO, 1999). Les entérocoques se regroupent en paires ou en chaînes, et ne sont pas mobiles (Figure 18). Ils sont plus résistants dans l'environnement et sont donc intéressants comme indicateurs de contamination fécale, même si certaines souches sont retrouvées naturellement dans les sédiments ou les sols (Byappanahalli et al., 2012). Plusieurs études montrent l'intérêt des entérocoques comme indicateurs de la présence et de la résistance des virus entériques pendant les différentes étapes du traitement des eaux usées (AFSSA, 2008; Byappanahalli et al., 2012; Harwood et al., 2005; NRC, 2004; Uyttendaele et al., 2015). Concernant les protozoaires et les helminthes, la présence des entérocoques est significativement corrélée à la présence de ces pathogènes, mais l'absence d'entérocoques ne signifie pas forcément l'absence de risque, notamment car les entérocoques sont moins résistants aux traitements de désinfection que les protozoaires (Byappanahalli et al., 2012; Harwood et al., 2005; NRC, 2004).

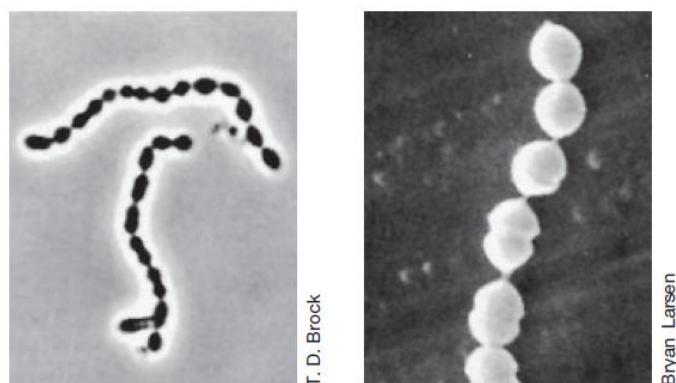


Figure 18 : Photos d'entérocoques au microscope électronique à balayage. Le diamètre des cellules varie entre 0,5 et 1 μm (Madigan et al., 2012)

La présence des virus, protozoaires et helminthes est donc globalement plus difficile à évaluer par des indicateurs bactériens. L'utilisation des bactériophages (virus qui infectent les bactéries) est intéressante comme indicateur de présence pour les virus car leur taille, forme et résistance sont proches, et les bactériophages (notamment les coliphages ARN-F spécifiques) sont présents en quantité importante dans les eaux usées (Asano et al., 2007; NRC, 2004). Les spores des bactéries anaérobies sulfite-réductrices (BASR) comme *Clostridium* sont considérées comme un modèle intéressant pour les oocystes de *Cryptosporidium* et *Giardia* car elles sont également résistantes aux traitements, notamment de désinfection (NRC, 2004). Néanmoins, aucune étude n'a pu montrer à ce jour l'intérêt de ces deux paramètres additionnels pour mettre en évidence un risque de contamination fécale (Boutin & Helmer, 2009; Uyttendaele et al., 2015). La turbidité est également un indicateur intéressant : des valeurs inférieures à 2 NTU dans les EUT témoignent d'un faible risque en contamination par *Cryptosporidium* et *Giardia* (AFSSA, 2008). Concernant les helminthes, il n'y a pas d'indicateur de remplacement, la seule méthode valable étant le comptage direct des œufs (Drechsel et al., 2011; NRC, 2004).

En conclusion, plusieurs indicateurs peuvent être utilisés pour estimer le risque pathogène, notamment issu d'une contamination fécale (Figure 19). Cependant aucun indicateur n'est exhaustif. Le choix de la combinaison d'indicateurs de suivi est un compromis entre la spécificité des indicateurs, et le coût (et donc la fréquence) des analyses. Les indicateurs les plus couramment utilisés (*E. coli*, coliformes totaux, entérocoques) permettent un suivi régulier et « robuste » de l'efficacité du traitement des EUT. Des paramètres supplémentaires (spores de BASR, bactériophages ARN-F spécifiques, œufs d'helminthes) permettent un suivi plus exhaustif, mais les analyses représentent un coût et/ou une complexité élevés ce qui diminue la fréquence des

analyses. Ces indicateurs sont repris dans les textes réglementaires nationaux et internationaux concernant la REUT.

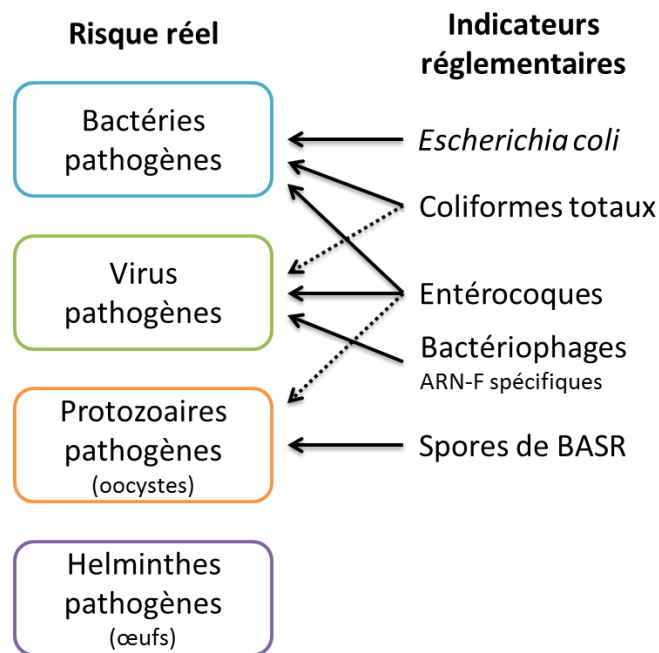


Figure 19 : Principaux pathogènes rencontrés dans les eaux usées et principaux indicateurs microbiologiques de contamination

V. Principaux pays pratiquant la REUT et réglementations associées

Il est difficile d'établir un classement des pays réutilisant les eaux usées car la REUT est mesurée différemment (volume total, volume par habitant, pourcentage de l'eau utilisée...) selon les pays d'une part, et d'autre part car la représentation de la REUT à l'échelle d'un pays peut cacher des disparités importantes à l'échelle locale. Par exemple, les états de Californie et de Floride pratiquent beaucoup plus la REUT que le reste des USA (Jiménez-Cisneros & Asano, 2008). Le Tableau 9 représente les dix principaux pays pratiquant la réutilisation des eaux usées traitées (les eaux usées non traitées ne sont pas prises en compte) selon deux critères : le volume total et le volume par habitant. En volume total, les Etats-Unis, l'Arabie Saoudite et l'Égypte sont les principaux pays. En ramenant les volumes au nombre d'habitants, les pays les plus concernés sont ceux situés entre l'est du bassin méditerranéen et le golfe Persique (Qatar, Israël, Koweït...). La France arrive en 36^{ème} place de ce classement avec environ 20 000 m³ d'eau réutilisés par jour.

Tableau 9 : Classement des pays pratiquant la réutilisation des eaux usées traitées, selon deux critères (Jiménez-Cisneros & Asano, 2008)

Rang	Pays	REUT (m ³ /jour)	Pays	REUT (m ³ /jour/ million d'habitants)
1	USA	7 600 000	Qatar	170 323
2	Arabie Saoudite	1 847 000	Israël	166 230
3	Égypte	1 780 821	Koweït	163 330
4	Syrie	1 014 000	EAU*	126 713
5	Israël	1 014 000	Chypre	88 952
6	Espagne	821 920	Arabie Saoudite	75 081
7	Mexique	767 280	Bahreïn	56 301
8	Chine	670 000	Syrie	55 109
9	Japon	573 800	Tunisie	51 233
10	Tunisie	512 328	Jordanie	40 179

*EAU : Émirats Arabes Unis

À l'échelle mondiale, deux textes proposent des bonnes pratiques concernant la REUT : une directive de l'OMS de 2006 et une norme ISO de 2015. La plupart des réglementations nationales sont basées sur ces textes.

1. Le cadre de l'OMS

Les directives de l'OMS définissent les bonnes pratiques pour l'utilisation sans risque des eaux usées, des excréta et des eaux ménagères. Le volume II est plus précisément consacré à l'utilisation des eaux usées en agriculture (WHO, 2006). L'approche utilisée est basée sur l'évaluation quantitative des risques microbiens (EQRM) décrite précédemment. Un risque acceptable est calculé selon les applications. Le choix de cette approche a été motivé par le fait que l'important n'est pas la teneur en microorganismes pathogènes dans les eaux usées traitées, mais plutôt la quantité d'entre eux pouvant être ingérée selon les usages visés (Mara & Kramer, 2008). Le postulat de base est que l'ingestion d'eaux usées traitées ne doit pas entraîner une perte de plus de 10^{-6} AVCI (Années de Vie Corrigées de l'Incapacité) par personne et par année. Les AVCI tentent de mesurer le temps perdu pour cause d'incapacité ou de décès découlant d'une maladie par rapport à une longue vie sans incapacité en l'absence de la maladie. Les AVCI sont calculées en ajoutant les années de vie perdues découlant d'un décès prématuré aux années vécues avec une incapacité (Drechsel et al., 2011).

Trois microorganismes « de référence » ont été sélectionnés parmi les plus pathogènes : le rotavirus (pathogène viral), le *Campylobacter* (pathogène bactérien) et *Cryptosporidium* (protozoaire). Le risque acceptable est calculé à partir du nombre d'AVCI perdues en cas de maladie pour un pathogène donné et en prenant en compte la valeur acceptable de 10^{-6} AVCI. Cette valeur correspond à un risque annuel d'infection de 10^{-4} pour le rotavirus. Grâce à l'EQRM et en déterminant l'exposition pour un usage donné, il est possible de calculer la teneur maximale en pathogène admissible dans les eaux usées traitées. Pour le rotavirus, dans le cas de l'irrigation de légumes consommés crus, la dose équivalente à un risque annuel d'infection de 10^{-4} est estimée à $5 \cdot 10^{-5}$ pour 10 mL ingérés ponctuellement soit 5 par m^3 . En supposant que la teneur en rotavirus est de $5 \cdot 10^6/m^3$ dans les eaux brutes, un abattement de minimum 6 log est requis. Si on considère une teneur en *Escherichia coli* de 10^7 à 10^8 UFC (Unité Formant une Colonie) pour 100 mL dans les eaux brutes, l'abattement de 6 log requis conduit à une valeur maximale de 1000 UFC/100 mL dans les eaux traitées, en considérant qu'une réduction de deux à trois unités logarithmiques peut-être atteinte grâce aux mesures de contrôle post-traitement (Drechsel et al., 2011). Les volumes d'EUT ingérés correspondant à la valeur de risque 10^{-4} sont présentés dans le Tableau 10. En se basant sur ce type de raisonnement, l'OMS recommande l'utilisation d'*Escherichia coli* comme indicateur pour la surveillance, avec une valeur guide de 10^3 UFC/100 mL pour l'irrigation de tout type de cultures. Pour les œufs d'helminthes, une valeur guide de 1 œuf par litre d'EUT est définie (WHO, 2006). Différents types de traitements sont également proposés, que

ce soit au niveau de la production d'EUT qu'au niveau de l'utilisation des produits issus de cultures irriguées avec ce type d'eau (cuisson / désinfection des légumes par exemple).

Tableau 10 : Volume d'eaux usées traitées ingéré entraînant un risque d'infection de 10^{-4} (Salgot & Huertas, 2006)

Microorganisme	Volume (L)
Rotavirus (très infectieux)	1,65
Echovirus (peu infectieux)	500
<i>Cryptosporidium</i>	2,9
<i>Giardia</i>	1,0

2. Les normes ISO 16075

Les normes ISO 16075 sont issues des réflexions du comité ISO/TC 282. Elles se focalisent plus précisément sur l'utilisation des EUT pour l'irrigation, et n'ont pas de caractère obligatoire (bonnes pratiques). Dans le même domaine, l'ISO 20760 définit les principes de conception et de gestion d'un système de REUT centralisé, mais il s'agit d'un cadre très général. D'autres projets de normes sont à l'étude, sur l'évaluation des performances et des risques des systèmes de REUT (ISO 20426) par exemple (ISO, 2016). Les normes ISO 16075 sont divisées en quatre parties (ISO, 2015a, 2015b, 2015c, 2015d) :

- Partie 1 : Bases d'un projet de réutilisation en irrigation : définit les paramètres, notamment physico-chimiques, ayant un impact possible sur le sol et les cultures,
- Partie 2 : Développement du projet : définit les critères à prendre en compte pour prévenir les risques sanitaires liés aux projets d'irrigation avec les EUT,
- Partie 3 : Composantes d'un projet de réutilisation en irrigation : présente les différents systèmes de pompage, traitement, stockage et distribution des EUT,
- Partie 4 : Surveillance : systèmes de surveillance mis en place.

La partie 2 suggère des niveaux de qualité à atteindre pour les eaux usées traitées selon l'usage envisagé (Tableau 11). Comme pour la directive de l'OMS, le concept de barrières multiples est développé, ce qui permet l'utilisation d'EUT de qualité moindre si des barrières supplémentaires sont mises en places. Certaines barrières, comme la désinfection des eaux, sont obligatoires selon les usages. Voici deux exemples pour illustrer ce concept (ISO, 2015b) :

- Irrigation de légumes consommés crus : la norme prévoit soit l'utilisation d'EUT de très haute qualité (catégorie A), soit l'utilisation d'EUT de bonne qualité

(catégorie C) avec trois barrières supplémentaires (ce qui correspond par exemple à l'irrigation souterraine par goutte à goutte). L'utilisation d'EUT de qualité inférieure à la catégorie C est interdite pour cet usage.

- Irrigation d'espaces verts avec accès au public : la norme prévoit soit l'utilisation d'EUT de très haute qualité (catégorie A), soit l'utilisation d'EUT de haute qualité (catégorie B) avec une barrière supplémentaire (ce qui correspond par exemple à l'irrigation pendant la nuit). L'utilisation d'EUT de qualité inférieure à la catégorie B est interdite pour cet usage.

Tableau 11 : Qualité suggérée des EUT par la norme ISO 16075-2 en fonction des paramètres physico-chimiques et biologiques (ISO, 2015b)

Cat.	Type d'eaux usées traitées	DBO ^{b j}		MES		Turbidité ^c		Coliformes thermotolérants ^d		Nématodes intestinaux ^{e l}		Utilisations possibles sans barrière	Traitement correspondant éventuel
		mg·l ⁻¹		mg·l ⁻¹		NTU		nombre/100 ml		œufs·l ⁻¹			
		Moy.	Max	Moy.	Max	Moy.	Max	95 ^e centile	Max	Moy.	Max		
A	Eaux usées traitées de très haute qualité ^d	≤ 5 mg/l	10 mg/l	≤ 5 mg/l	10 mg/l	≤ 2	5	≤ 10 ou en deçà de la limite de détection	100	–	–	Irrigation urbaine non restreinte ^l et irrigation agricole des cultures vivrières dont les produits sont consommés crus	Secondaire ^f , filtration sur lit de contact ou filtration sur membrane ^g et désinfection ^h
B	Eaux usées traitées de haute qualité ^d	≤ 10 mg/l	20 mg/l	≤ 10 mg/l	25 mg/l	–	–	≤ 200	1 000	–	–	Irrigation urbaine restreinte et irrigation agricole des cultures vivrières dont les produits sont transformés	Secondaire ^f , filtration ^g et désinfection ^h
C	Eaux usées traitées de bonne qualité	≤ 20 mg/l	35 mg/l	≤ 30 mg/l	50 mg/l	–	–	≤ 1 000	10 000	≤ 1	–	Irrigation agricole des cultures non vivrières	Secondaire ^f et désinfection ^h
D	Eaux usées traitées de qualité moyenne ^{f 1}	≤ 60 mg/l	100 mg/l	≤ 90 mg/l	140 mg/l	–	–	–	–	≤ 1	5	Irrigation restreinte des cultures industrielles et de semences	Secondaire ^f ou clarification à grande vitesse avec coagulation, floculation ⁱ
E	Eaux usées après traitement extensif	≤ 20 mg/l	35 mg/l	–	–	–	–	–	–	≤ 1	5	Irrigation restreinte des cultures industrielles et de semences	Systèmes de lagunage et zones humides ^j

3. Les réglementations nationales et locales

Le Tableau 12 présente les niveaux de qualité pour quelques pays ou régions. Seules les normes relatives à un ou plusieurs des usages suivants sont présentées : irrigation de cultures non transformées, usage urbain non restreint (contact direct potentiel du public avec les EUT), usage environnemental non restreint, usage potable indirect. Ces niveaux de qualité sont souvent les plus élevés pour les pays ou régions étudiés. Ils s'accompagnent également la plupart du temps de prescriptions sur l'usage des eaux usées traitées (barrières multiples), notamment pour l'irrigation par aspersion : irrigation seulement la nuit, contraintes de distance par rapport aux habitations, arrêt de l'irrigation à partir d'un seuil de vitesse de vent...

Certains pays choisissent de définir des normes très strictes pour la réutilisation. C'est notamment le cas des USA et plus particulièrement de la Californie. Les normes australiennes sont fondées sur le même principe. Ces standards sont également accompagnés de prescriptions de traitements tertiaires à mettre en œuvre : le plus souvent filtration tertiaire et désinfection. En pratique, ces normes sont tellement strictes qu'elles nécessitent la mise en place de filtrations membranaires et d'une désinfection poussée (haute dose UV par exemple) pour atteindre la quasi absence de coliformes dans les eaux traitées. Plusieurs experts estiment que ces normes rigoureuses ne sont pas justifiées et minimisent inutilement les risques sanitaires avec des coûts de traitement souvent prohibitifs (PNUE, 2005a). Dans le bassin méditerranéen, des normes très strictes sont également rencontrées dans certains pays du nord (Italie, Grèce) et en Israël (ainsi que pour les pays du golfe Persique). Elles ne sont par contre pas accompagnées de prescriptions de traitement, une approche de validation au cas par cas avec les autorités locales étant privilégiée (Sanz & Gawlik, 2014). La plupart des réglementations sur la REUT établies par les pays du sud du bassin méditerranéen sont basées sur la directive de l'OMS. Elles imposent des teneurs en *Escherichia coli* entre 100 et 1000 UFC/100 mL pour les usages étudiés. Le cas de la France est un peu particulier puisque les experts ont estimé qu'une approche basée sur l'évaluation quantitative du risque microbien n'est pas pertinente pour l'irrigation par aspersion, du fait d'un manque d'études liées à l'évaluation de l'exposition des populations et à l'établissement de relations dose-réponse pour les pathogènes considérés (ANSES, 2012).

Dans la plupart des pays, les coliformes ou *Escherichia coli* sont les seuls indicateurs microbiologiques pris en compte. Pour les réglementations inspirées par la directive de l'OMS, cela est lié au fait qu'un niveau défini de *E. coli* en sortie de

traitement est supposé assurer que le traitement a une efficacité acceptable pour les pathogènes, en combinaison avec la vérification de l'absence d'œufs d'Helminthes (ou œufs de nématodes intestinaux) (WHO, 2006). Pour les réglementations plus strictes comme en Californie, c'est le niveau de traitement imposé qui est censé garantir l'élimination des pathogènes, avec une procédure stricte d'autorisation pour chaque nouveau procédé. Certains pays comme l'Italie ou l'Espagne imposent également l'absence de salmonelles ou de légionnelles en cas d'aérosolisation des EUT. En France, une approche plus sécuritaire a été adoptée, puisque d'autres indicateurs (entérocoques, bactériophages ARNf-spécifiques, spores de BASR) ont été considérés pour garantir l'efficacité des traitements, avec des abattements minimum à atteindre (AFSSA, 2008; ANSES, 2012). Néanmoins, ces indicateurs étant coûteux et complexes à analyser, la fréquence imposée pour leur suivi est faible. De la même façon, l'analyse de la plupart des paramètres microbiologiques présentés dans le Tableau 12 n'est imposée que de façon ponctuelle. Pour le suivi en routine, ce sont *E. coli* ou les coliformes qui sont utilisés, avec une fréquence d'analyse journalière à bi-hebdomadaire selon les pays et les usages.

Concernant les indicateurs physico-chimiques, deux approches sont considérées. Certains pays (comme les USA, la Californie) ont une approche essentiellement sanitaire, avec le suivi de paramètres garantissant une faible teneur en particules organiques pouvant conduire à une recontamination : DBO, DCO, turbidité, MES. D'autres pays prennent en compte l'usage potable indirect, et imposent des normes sanitaires similaires à celles de l'eau potable pour ces usages : métaux lourds, micropolluants... (comme l'Espagne ou l'Italie). Enfin, dans les pays où l'usage agricole est important (Israël, Italie, Espagne, Jordanie, Tunisie), les paramètres pouvant affecter la fertilité des sols (voir paragraphe 3.1.1), comme la conductivité, sont pris en compte. En France, une étude sur les sols doit être réalisée tous les dix ans (JORF, 2014).

Tableau 12 : Exemples de normes de qualité pour des EUT destinées à au moins un des usages suivants : irrigation de cultures non transformées, usage urbain non restreint, usage environnemental non restreint ou usage potable indirect (* : lignes directrices ; Abb. : abattement entre l'entrée et la sortie de l'ensemble du traitement des eaux usées)

Pays	Usages autorisés	Paramètres physico-chimiques	Paramètres microbiologiques	Traitements minimum requis	Références
USA*	Cultures non transformées Usage urbain non restreint Usage environnemental non restreint Usage potable indirect	pH entre 6 et 9 DBO ≤ 10 mg/L Turbidité ≤ 2 NTU	Coliformes fécaux non détectés dans 100 mL Chlore résiduel à 1 mg/L	Secondaire Filtration Désinfection	(US EPA, 2012)
Californie	Cultures non transformées Usage urbain non restreint Usage environnemental non restreint	Turbidité ≤ 0,2 NTU	Coliformes totaux ≤ 2,2 UFC/100 mL (médiane sur 7 jours)	Secondaire Filtration Désinfection	(State of California, 2001)
Victoria (Australie)*	Cultures non transformées Usage urbain non restreint	pH entre 6 et 9 DBO ≤ 10 mg/L MES ≤ 10 mg/L Turbidité ≤ 2 NTU	<i>E. coli</i> ≤ 10 UFC/100 mL Œufs d'Helminthes < 1/L Protozoaires < 1/50 L Virus < 1/50L Chlore résiduel à 1 mg/L	Secondaire Filtration Désinfection	(EPA Victoria, 2003)
Israël	Cultures non transformées Usage urbain non restreint	pH entre 6,5 et 8,5 DBO ≤ 10 mg/L DCO ≤ 100 mg/L MES ≤ 10 mg/L Azote total ≤ 25 mg/L Phosphore total ≤ 5 mg/L Conductivité < 1400 µS/cm Oxygène dissous ≥ 0,5 mg/L	<i>E. coli</i> ≤ 10 UFC/100 mL Chlore résiduel à 1 mg/L	/	(MERAP, 2010; Ministry of health of Israel, 1999)

Tableau 12 (suite)

Tunisie	Cultures non transformées	pH entre 6,5 et 8,5 DBO ≤ 30 mg/L DCO ≤ 90 mg/L MES ≤ 30 mg/L Azote total ≤ 100 mg/L Phosphore total ≤ 10 mg/L	Coliformes fécaux ≤ 2000 UFC/100 mL Streptocoques fécaux ≤ 1000 UFC/100 mL Salmonelles : absence dans 5 L Vibrions cholériques : absence dans 5 L	/	(INNORPI, 1989)
Italie	Cultures non transformées Usage urbain non restreint	pH entre 6 et 9,5 DBO ≤ 20 mg/L DCO ≤ 100 mg/L MES ≤ 10 mg/L Azote total ≤ 15 mg/L Phosphore total ≤ 2 mg/L Conductivité < 3000 µS/cm	<i>E. coli</i> ≤ 10 UFC/100 mL (50 si lagunage) Salmonelles : absence dans 1 L	/	(GU, 2006)
Espagne	Cultures non transformées	MES ≤ 20 mg/L Turbidité ≤ 10 NTU	<i>E. coli</i> ≤ 100 UFC/100 mL Œufs de nématodes < 1/10 L (<i>Legionella sp.</i> ≤ 1000 UFC/L si aspersion)	/	(BOE, 2007)
	Usage urbain non restreint Usage potable indirect	MES ≤ 35 mg/L	<i>E. coli</i> ≤ 200 UFC/100 mL Œufs de nématodes < 1/10 L <i>E. coli</i> ≤ 1000 UFC/100 mL		
France	Cultures non transformées Usage urbain non restreint (irrigation d'espaces verts seulement)	DCO ≤ 60 mg/L MES ≤ 15 mg/L	<i>E. coli</i> ≤ 250 UFC/100 mL Entérocoques fécaux, Bactériophages ARNf- spécifiques, Spores de BASR : Abb. ≥ 4 log ou ≤ 10 UFC/100 mL	/	(DGS, 2016; JORF, 2014)

4. Conclusion

Les pays ou régions pratiquant le plus la REUT sont aussi ceux où le stress hydrique est le plus important : ouest des États-Unis, pourtour du bassin méditerranéen et du golfe Persique (Figure 2). À l'échelle mondiale, deux textes définissant des bonnes pratiques existent actuellement : la directive OMS de 2006 et les normes ISO 16075. Une proposition réglementaire d'exigences minimales de qualité pour la réutilisation des eaux en irrigation et en recharge d'aquifère est en cours d'élaboration à l'échelle de l'Union Européenne (European Commission, 2016). La plupart des réglementations nationales sont inspirées de la directive de l'OMS et utilisent l'évaluation quantitative des risques microbiens pour définir différents niveaux de qualité. Les indicateurs de suivi sont *Escherichia coli* et les œufs d'Helminthes. Certaines réglementations (comme en Californie) sont très strictes avec des niveaux de qualité très élevés (quasi absence de coliformes dans les EUT). En France, plusieurs indicateurs prennent en compte la diversité des pathogènes avec des abattements minimum requis pour garantir l'efficacité du système. Dans tous les cas, un seul indicateur est choisi pour le suivi du traitement en routine : il s'agit le plus souvent d'*E. coli* ou des coliformes totaux. Ces deux types de stratégies au niveau des normes de qualité conduisent à deux types de traitement : poussé pour garantir une qualité élevée (dans les pays développés et les grandes collectivités) ou adapté pour répondre à l'usage visé (dans les pays en développement et les petites collectivités). Les travaux de recherche sur la REUT s'articulent donc autour de ces deux stratégies.

VI. État des lieux de la recherche sur la réutilisation des eaux usées traitées

Avec plus de 550 publications sur le sujet depuis 2010 (requête « wastewater reuse » sur Web Of Science (Thomson Reuters, Londres, UK)), la REUT est une thématique de recherche importante. Tous les aspects sont abordés dans les publications : aspects techniques des filières de traitement, impact environnemental, acceptabilité sociale... Des projets européens et français sont également en cours sur le sujet, dont le projet NOWMMA, auquel cette thèse est adossée. Ainsi, cette partie a pour objectif de dégager les grandes thématiques de recherche récentes sur la REUT.

1. Filières de traitement abordées dans les publications

Une grande variété de filières de traitement tertiaire pour la REUT est abordée dans les publications. Cependant deux grands types de systèmes sont observés : les systèmes de traitement de « haute technologie » (filtration membranaire, adsorption sur charbon actif...), et les systèmes de traitement de « faible technologie » (bassins de maturation, filtration lente...).

Les systèmes de traitement de « haute technologie » comprennent d'une part les traitements membranaires intégrés au traitement secondaire (comme les BRM) et d'autre part les traitements tertiaires d'affinage par adsorption sur charbon actif, ultrafiltration ou osmose inverse. Les bioréacteurs à membranes sont des membranes de micro ou d'ultrafiltration (porosité de 0,02 à 0,4 μm) le plus souvent disposées sous forme de panneaux au sein du bassin d'aération. Ces systèmes combinent donc le traitement biologique et la clarification pour obtenir un effluent de très bonne qualité physico-chimique (Grasmick et al., 2007). Le seuil de coupure des membranes permet la rétention de la plupart des microorganismes pathogènes : bactéries, protozoaires, et helminthes. Concernant les virus, Marti et al. (2011) montrent que l'efficacité de rétention est variable suivant le colmatage des membranes : entre 2,6 (pas de colmatage) et 5,6 unités log (colmatage important). L'exploitation est donc délicate (cycles de filtration / lavage) et demande un suivi régulier de l'intégrité des membranes. Zahid & El-Shafai (2011) proposent l'utilisation de matériaux textiles (acrylate, polyester, nylon) pour les membranes, avec une porosité plus élevée. Cela réduit le colmatage des membranes et une bonne qualité physico-chimique est tout de même atteinte (turbidité 1 NTU et MES 2 mg/L). Une désinfection supplémentaire est toutefois à envisager au vu de la qualité microbiologique (3 log de coliformes fécaux pour 100 mL) selon l'usage des EUT.

Parmi les technologies en cours de développement pour réduire le colmatage rencontré pour les BRM en ultrafiltration, il y a l'osmose directe. Ces membranes organiques sont semi-sélectives et sont une barrière importante aux pathogènes et aux contaminants émergents (Husnain et al., 2015). Le transfert de matière se fait par un gradient de pression osmotique entre l'effluent à traiter et une solution artificiellement concentrée en sels. Le perméat est donc progressivement dilué jusqu'à un certain point, puis régénéré par un procédé de concentration des sels : osmose inverse ou distillation (Figure 20). La consommation d'énergie est donc importante, mais le colmatage est mieux géré car la membrane d'osmose inverse utilisée pour produire la solution saline est moins affectée par le colmatage du fait de la meilleure rétention des composés organiques par la membrane d'osmose directe (Achilli et al., 2009; Husnain et al., 2015). Ce procédé, même s'il doit être encore amélioré, semble donc plus intéressant que la combinaison ultrafiltration – osmose inverse pour produire un effluent de très bonne qualité, adapté à des usages spécifiques pour la REUT (industriels, usages potables indirects...). Ce système peut également réduire son empreinte énergétique en produisant de l'énergie : c'est le concept de la biopile microbienne. Son principe est le suivant : le biofilm bactérien se développe sur une anode placée dans l'effluent à traiter et dégrade les molécules carbonées, en produisant du CO₂ et des protons. Ces protons traversent sélectivement la membrane d'osmose directe et sont transférés à la cathode, produisant ainsi de l'énergie (Ge et al., 2013).

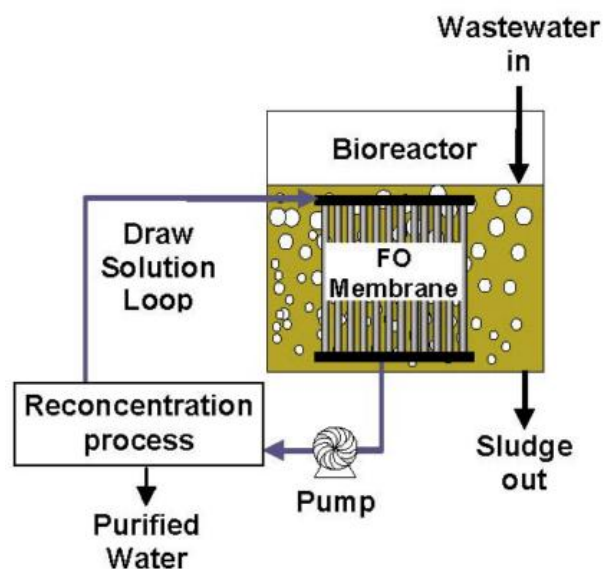


Figure 20 : Principe de l'osmose directe (Achilli et al., 2009)

Les systèmes de traitement de « faible technologie » sont plutôt développés pour les communautés rurales et dans l'objectif d'une réutilisation en irrigation, agricole

notamment. Reinoso et al. (2008) ont étudié l'abattement en pathogènes d'un système de lagunage pour le traitement des eaux usées de 150 habitants en Espagne. Ce système est composé de trois bassins, avec des temps de séjour de 76, 1,2 et 5,7 jours respectivement. Les pathogènes parasites (protozoaires et helminthes) sont bien éliminés par ce type de traitement, notamment par sédimentation au fond du bassin. Concernant les bactéries (coliformes, entérocoques) et les indicateurs viraux (coliphages), les abattements sont de l'ordre de 1 à 2 unités log, ce qui n'est pas suffisant pour une réutilisation sans risques des EUT (Reinoso et al., 2008). Des résultats similaires ont été obtenus par Verbyla et al. (2016) pour des procédés de traitement du même type en Bolivie. Il faut de plus noter que ces systèmes sont souvent mal entretenus, ce qui conduit à une accumulation des boues et donc à une réduction du temps de séjour initial qui peut être divisé par dix en une dizaine d'années (Verbyla et al., 2016). À l'opposé de ces systèmes extensifs, des systèmes compacts et autonomes sont utilisés par les petites collectivités. Kim et al. (2014) ont étudié ce type de système en Corée du Sud, composé d'une pré-filtration, d'un filtre à tamis, d'un filtre à charbon actif et d'une lampe UV. Ils ont montré que ce type de système compact peut tout à fait répondre aux exigences de la REUT pour l'irrigation sans restrictions.

Globalement, les études montrent qu'un système de désinfection est nécessaire, que ce soit pour sécuriser le traitement en cas de dysfonctionnement de la filtration membranaire, ou pour atteindre la qualité biologique requise pour la REUT dans le cas de systèmes plus simples (lagunage, filtration sur media) (Kalavrouziotis et al., 2015). La désinfection UV est privilégiée par rapport aux autres techniques de désinfection (chloration, ozonation) du fait de leurs inconvénients, comme le stockage de produits chimiques ou la génération de sous-produits potentiellement toxiques (Bischoff, 2012; Lazarova et al., 1999). Les principaux axes de recherches concernant la désinfection UV sont liés à la maintenance de tels systèmes (vieillessement, encrassement des lampes UV), à la présence de matières en suspension pouvant affecter l'efficacité des UV en protégeant les microorganismes, et aux mécanismes de réparation spontanée des dommages causés par les rayonnements UV (Bischoff, 2012; Haaken et al., 2014; Lazarova et al., 1999; Madge & Jensen, 2006; Schmidlein et al., 2015).

La grande majorité des publications traitant de la qualité biologique des EUT travaillent avec *Escherichia coli* ou les coliformes fécaux comme indicateur. Marti et al. (2011) utilisent aussi les spores de BASR, les coliphages et les bactériophages ARNf spécifiques pour tester les performances d'un BRM. Reinoso et al. (2008) utilisent les mêmes indicateurs (sauf les bactériophages) plus les oocystes de *Cryptosporidium*, *Giardia* et les œufs d'helminthes pour tester les performances d'un système de lagunage. Ils montrent qu'une corrélation existe entre tous ces indicateurs dans les

eaux brutes, mais pas pour les eaux traitées, ce qui suggère une réponse différente de chaque indicateur face aux traitements.

2. Principaux projets européens et français

Deux grands projets sont en cours à l'échelle européenne au moment de la rédaction de ce mémoire : le projet DEMOWARE et le projet R3WATER. Quelques exemples de projets sur la REUT à l'échelle française sont également présentés. La présentation du projet NOWMMA est quant à elle détaillée dans la partie suivante.

a. Le projet DEMOWARE (DEMOWARE, 2015; IWA, 2014)

Le projet DEMOWARE est un projet européen financé par le programme FP7 de l'Union Européenne à hauteur d'environ 60% de son coût total (10,5 millions d'euros). D'une durée de 2 ans (2014 – 2016), il réunit 24 partenaires dont des acteurs de la recherche publique (coordinateur : institut technologique CTM, Espagne), des start-ups (Biomonitech, Blue Biolabs), des industriels traiteurs d'eau (Mekorot, Veolia Recherche et Innovation), et des collectivités locales (IWVA, Vendée Eau). Ses deux ambitions principales sont d'améliorer la fiabilité et l'offre des solutions innovantes pour la REUT, et de fédérer les professionnels à l'échelle européenne (dont Israël) pour structurer ce secteur. Le projet s'appuie sur plusieurs sites d'étude représentatifs des différents usages possibles de la REUT : agricole, urbain, industriel, environnemental (Figure 21). Une étude de cas a été menée avec Vendée Eau, pour étudier les potentiels de la REUT à l'échelle de ce territoire. La SAUR a été fortement impliquée dans cette étude (avec le bureau d'études IRH), du fait de sa collaboration historique avec Vendée Eau. Les filières abordées dans le cadre du projet font plutôt partie des systèmes de « haute technologie » : BRM, bioréacteur anaérobie, osmose directe, ultrafiltration et osmose inverse. Les résultats attendus comprennent l'optimisation de ces procédés, la mise au point de méthodes de contrôle de la contamination biologique et chimique (et de l'intégrité des membranes), la maîtrise des risques et des impacts environnementaux, le business model, une étude sur la gouvernance des projets de REUT, et la promotion de la REUT notamment via la création d'une association européenne de professionnels.

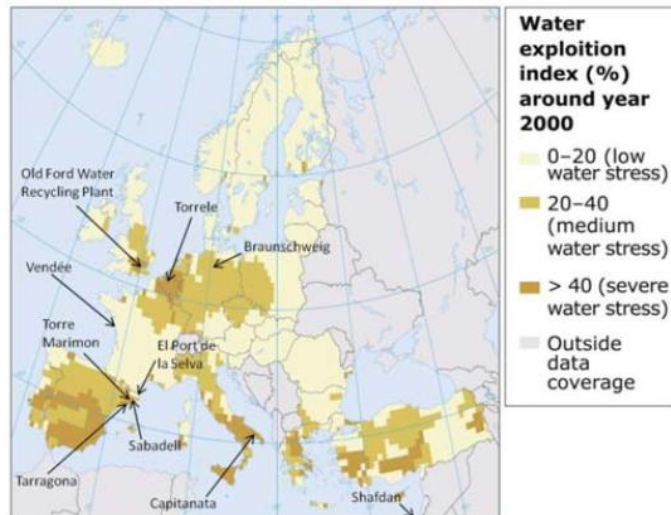


Figure 21 : Les sites d'études du projet DEMOWARE, mis en perspective avec la disponibilité de la ressource en eau à l'échelle européenne (IWA, 2014)

b. Le projet R3WATER (R3WATER, 2015)

Le projet R3WATER (Reuse of water, Recovery of valuables and Resource efficiency in urban wastewater treatment) est un projet européen également financé par le programme FP7 à hauteur d'environ 70% de son coût total (7,8 millions d'euros). D'une durée de 3 ans (2014-2017), il réunit 12 partenaires dont des acteurs de la recherche publique (coordinateur : IVL, Suède), des start-ups, des traiteurs d'eau (Teqma, Espagne) et des industriels de la métrologie de l'eau (Prediktor, ADASA). Trois sites d'études sont intégrés au projet, en Belgique, Suède, et Espagne. Les trois principaux axes du projet sont :

- le développement de technologies innovantes pour la REUT, notamment pour le suivi de la qualité biologique : systèmes d'analyse en ligne de pathogènes,
- l'amélioration de l'efficacité énergétique des stations de traitement, notamment par un meilleur contrôle de l'aération,
- le développement de systèmes de récupération de composés d'intérêt dans les eaux usées et les boues (phosphore notamment).

c. Exemples de projets en France

Des projets existent à une plus petite échelle en France et sont financés soit par l'État, soit par les collectivités locales pour des problématiques ponctuelles comme par exemple :

- micro-irrigation des vignes, projet Irrialt'Eau (2013 – 2015, 1 525 k€), financé par l'agglomération du Grand Narbonne et la région Languedoc-Roussillon.

L'objectif est l'atteinte d'un niveau de qualité d'eau pour une irrigation restreinte (Pôle Eau, 2013).

- étude de faisabilité pour l'arrosage d'un golf (2011, 300 k€), financé par la ville de Dax. Le niveau de qualité à atteindre est le plus élevé défini par la réglementation française (Dutertre, 2015).

Les agences de l'eau commencent aussi à s'intéresser au sujet, notamment dans les zones géographiques où le stress hydrique est présent. Ainsi l'agence de l'eau Rhône Méditerranée Corse a lancé un appel à projets fin 2015 sur la REUT. Cet appel s'adresse aux collectivités territoriales, aux organismes de recherche en association avec ces collectivités, ou aux industriels. Doté d'un budget de 7 millions d'euros, il vise à financer des études d'opportunités, des travaux ou l'installation de pilotes à l'échelle industrielle (Agence de l'eau Rhône Méditerranée Corse, 2015).

3. Le projet NOWMMA

Le projet NOWMMA (New process for Optimizing Wastewater Reuse from Mauguio to the Mediterranean Area in support of the French Reuse Directive) est un projet financé par la Direction Générale des Entreprises (ministère de l'économie, de l'industrie, et des finances) pour un montant total de 2,2 millions d'euros dans le cadre de l'appel à projets « Eco-industries » de 2011. Il a démarré fin 2011 pour une durée de 36 mois, et a été prolongé pour un an jusqu'à fin 2015. Il regroupe huit partenaires :

- industriels : SAUR (traiteur d'eau, leader du projet), BRL Ingénierie (études), Perax (instrumentation, télégestion), Bio-UV (désinfection UV),
- acteurs de la recherche publique : école des mines d'Alès, IRSTEA et l'INSA de Toulouse,
- start-up : ApoH (suivi de la qualité biologique des eaux).

L'objectif général du projet est de développer une filière complète de REUT transposable en France et dans le bassin méditerranéen, facilement adaptable aux situations locales, et pour laquelle la maîtrise des risques sanitaires et technologiques est démontrée. Le présent travail de recherche s'intègre au sein du projet (Figure 22).

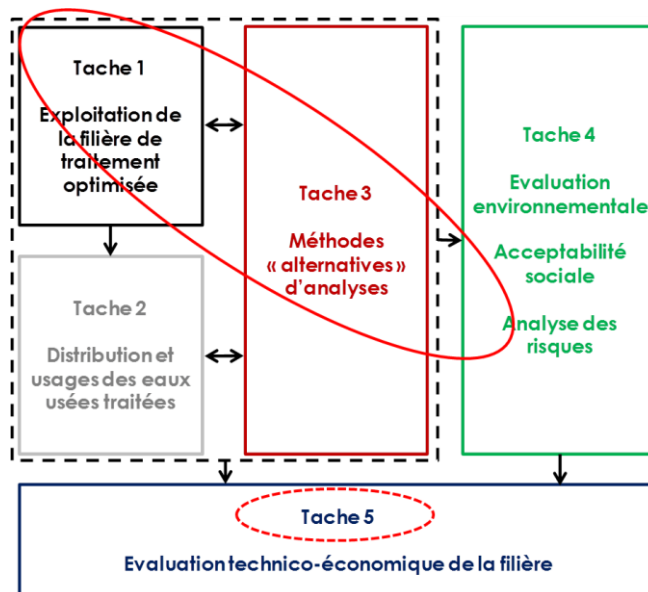


Figure 22 : Positionnement de la thèse autour des tâches du projet NOWMMA

Le projet s'appuie sur une plateforme expérimentale installée sur une station d'épuration dans le sud de la France (Figure 23). Cette station a été mise en service en 2008. Elle a une capacité de 24 000 équivalents-habitants (EH) soit une charge organique de 1 440 kg DBO₅/jour et une charge hydraulique comprise entre 4 680 et 5 960 m³/jour (faible charge). Les niveaux de rejet définis par arrêté préfectoral sont présentés dans le Tableau 13. Ils nécessitent un traitement de l'azote et du phosphore, tels que prévu par la réglementation dans le cadre d'un rejet en zone sensible. Le traitement, de type boues activées, est composé des étapes principales suivantes :

- Dégrillage / tamisage
- Déshuilage / dessablage
- Bassin d'aération constitué d'une zone anaérobie et d'une zone d'aération syncopée avec injection de chlorure ferrique
- Dégazage
- Clarification

Tableau 13 : Niveaux de rejets autorisés de la STEP étudiée dans le cadre du projet

paramètres	concentration maximale en mg/L	<u>OU</u> rendement minimal en %
DBO ₅	25	80%
DCO	125	75%
MES	35	90%
NGI	10	70%
Pt	1	80%



Figure 23 : Implantation de la plateforme expérimentale du projet NOWMMA au sein de la STEP étudiée dans le cadre du projet. P désigne les installations de traitement (photo de droite) et I la parcelle d'irrigation. Le trait bleu représente la canalisation d'amenée de l'effluent secondaire du canal venturi de la STEP vers la plateforme.

Les filières de traitement développées prennent en compte les contraintes technologiques, économiques et de maîtrise du risque sanitaire liées à une utilisation en irrigation. Deux types de configurations sont étudiées (Figure 24) :

- Filtration – stockage court – désinfection : la configuration à stockage court désigne l'association d'un stockage en cuve et d'un réacteur UV en ligne en aval : aucun temps de latence n'est nécessaire entre la production et l'utilisation de l'eau traitée,
- Filtration – stockage long – désinfection : la configuration à stockage long désigne l'association d'un stockage en cuve et de lampes UV immergées : un temps de latence est nécessaire entre la production et l'utilisation de l'eau traitée.

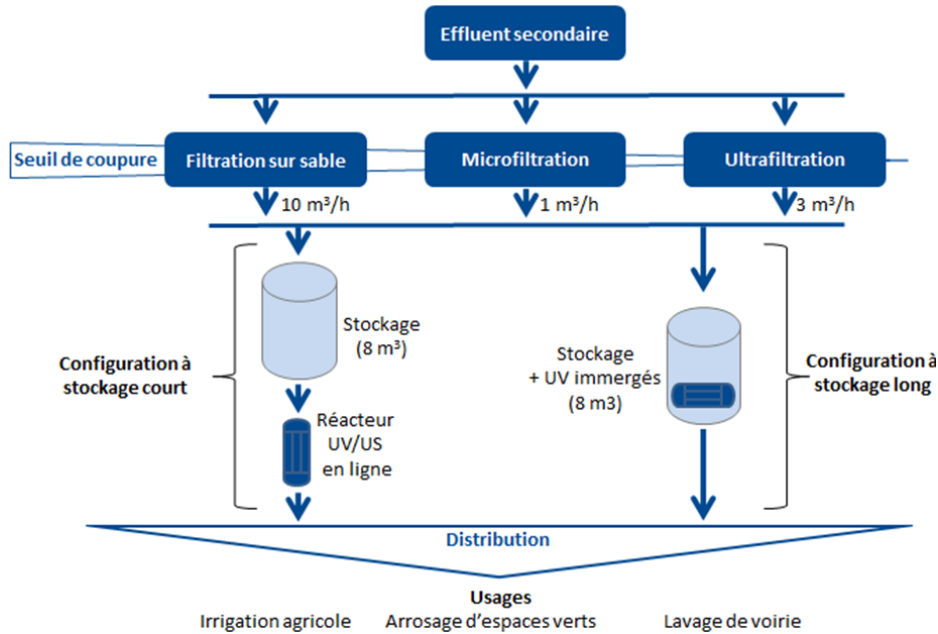


Figure 24 : Description des filières de traitement tertiaire pour la réutilisation des eaux usées traitées développées dans le cadre du projet NOWMMA.

L'intégration du projet NOWMMA dans le contexte du bassin méditerranéen implique la prise en compte de contraintes locales, comme la disponibilité de l'énergie ou le niveau de qualification des opérateurs tout en assurant une complète maîtrise des risques. De ce fait, le site d'étude choisi est à replacer dans le contexte de l'épuration des eaux usées dans cette zone géographique. Le Programme des Nations Unies pour l'Environnement (PNUE) a réalisé une étude à ce sujet en 2008 sur les villes côtières du bassin méditerranéen entre 2000 et 10 000 équivalent-habitants. Il faut noter que 40% des villes étudiées ne possèdent pas de système d'épuration. Cette étude montre que 40% des systèmes d'épuration de cette zone permettent un traitement secondaire des eaux usées (c'est-à-dire une élimination de 50 à 70% des MES et de la DBO₅, et de 20% des nutriments), et environ 30% permettent un traitement tertiaire (c'est-à-dire une élimination de plus de 80% des nutriments) (Figure 25). La typologie généralement rencontrée définit plutôt ce traitement tertiaire comme un traitement secondaire poussé, la notion de traitement tertiaire recouvrant plutôt les opérations unitaires d'affinage (filtration, désinfection). La station d'épuration étudiée dans le cadre du projet s'inscrit dans cette dernière catégorie. Cependant, il faut noter que dans de nombreux cas, ces systèmes fonctionnent mal ou sont en surcharge et les abattements précédents ne sont donc pas valables (Bahri, 2008). D'où la nécessité d'un traitement secondaire simple et adapté (de type lagunage poussé par exemple) et d'une volonté politique pour mettre en place et maintenir la filière (Bahri, 2008; Verbyla et al., 2016).

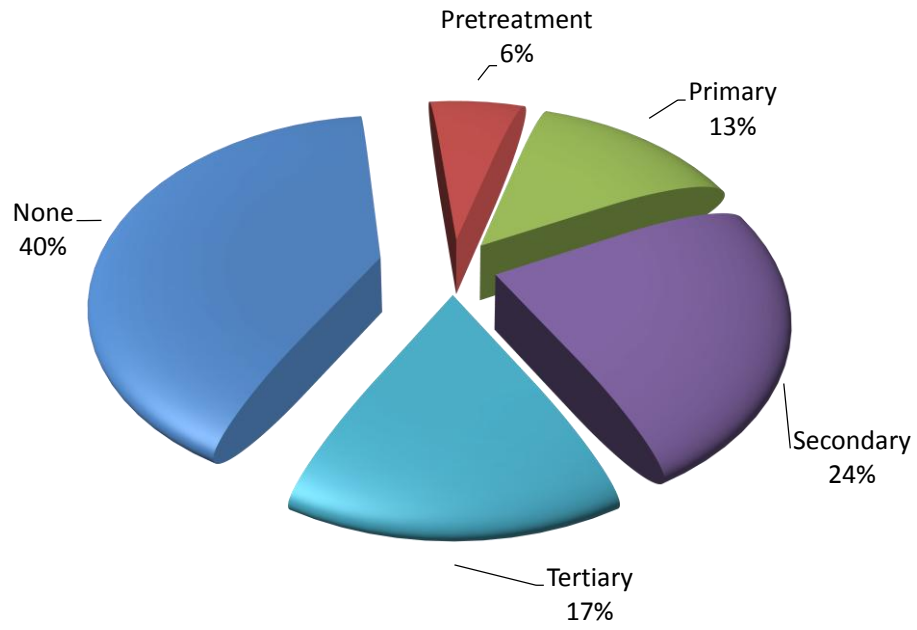


Figure 25 : Répartition du degré de traitement des eaux usées des stations d'épuration des villes côtières du bassin méditerranéen entre 2000 et 10 000 EH (PNUE, 2008)

VII. Objectifs de la thèse

Le moteur principal de la réutilisation des eaux usées traitées est le stress hydrique, même si d'autres aspects (économiques, environnementaux...) sont également déterminants pour l'émergence de projets. Le traitement des eaux usées pour la réutilisation doit prendre en compte les enjeux des usages visés. Les risques pour l'utilisateur final sont principalement d'ordre microbiologique et liés à la présence potentielle de pathogènes dans les eaux traitées : bactéries, protozoaires, helminthes et virus. Comme il n'est pas possible de dénombrer l'ensemble de ces microorganismes de façon spécifique et exhaustive, des indicateurs sont définis pour vérifier l'efficacité des traitements et la maîtrise du risque pour les usagers. La combinaison des indicateurs coliformes totaux dont *Escherichia coli* et entérocoques est un bon compromis entre représentativité du risque pathogène et coût (et donc fréquence des analyses). Ces indicateurs sont les plus fréquemment rencontrés dans les textes réglementaires liés à la REUT. Ils sont complétés par une caractérisation physico-chimique de ces eaux : pollution particulaire, carbonée, présence de nutriments (azote, phosphore) et d'autres composés (métaux notamment).

Plusieurs typologies de qualité des eaux usées traitées existent en fonction des usages visés. De plus les niveaux de qualité définis par les réglementations sont associées à chaque usage. Ainsi, pour un usage de type irrigation sans restriction (irrigation de cultures consommées crues, irrigation d'espaces verts urbains avec accès au public sous conditions), les concentrations maximales acceptables en sortie de la filière peuvent varier entre 100 et 1000 UFC/100 mL pour *Escherichia coli* selon les réglementations.

La problématique générale de cette thèse est de définir les conditions nécessaires pour garantir la fiabilité d'une filière de traitement tertiaire pour la réutilisation. Ce travail, tout comme le projet NOWMMA, se place dans le contexte du bassin méditerranéen. Il s'agit donc de proposer une filière robuste, avec une maîtrise des méthodes de caractérisation des effluents, et une maîtrise des procédés de traitement. Cette filière s'inscrit à la suite d'un traitement de type secondaire (avec ou sans traitement poussé de l'azote et du phosphore), ce qui correspond à environ 70% des systèmes d'épuration de cette zone géographique, même si nombre d'entre eux sont mal entretenus ou sous-dimensionnés. Selon l'usage visé, la filière pourrait s'inscrire également à la suite d'un traitement primaire, c'est-à-dire avec une réduction d'au moins 50 % de la pollution particulaire et d'au moins 20 % de la charge organique.

La caractérisation de la qualité biologique des eaux traitées est indispensable pour les usages sensibles identifiés. Pour les indicateurs identifiés (*E. coli*, coliformes, entérocoques), il est nécessaire de disposer de méthodes pouvant facilement être mises en œuvre sur le terrain et fiables pour permettre un suivi adéquat. La première partie de cette thèse s'attache donc à identifier les limites de ces méthodes, notamment en étudiant l'impact des matières en suspension sur leur fiabilité.

La désinfection UV est le plus souvent employée pour abattre la contamination biologique des eaux usées traitées. La deuxième partie de cette thèse vise à comprendre les mécanismes pouvant affecter l'efficacité des UV, là encore souvent liés à la présence de particules dans les effluents à traiter. Ce type de désinfection n'ayant pas d'effet rémanent, il est également nécessaire d'étudier les risques de reviviscence, notamment pendant l'étape de stockage avant distribution.

Une fois les conditions limites de fonctionnement de la désinfection UV identifiées, il faut définir les prétraitements les plus adaptés pour garantir que ces seuils ne seront pas dépassés. L'étude des filières de traitement rencontrées dans la littérature et la nécessité de choisir des systèmes simples et robustes au vu du contexte de l'étude incitent à se tourner vers la filtration sur média granulaire. La troisième partie de cette thèse consiste donc à déterminer les paramètres de filtration les plus adaptés à l'effluent à traiter et à la désinfection UV en aval. Un système de contrôle doit également être mis en œuvre pour une adaptation continue de la filière à l'effluent à traiter et à la qualité visée pour l'usage. Ainsi, l'utilisation de la spectrophotométrie UV/Visible pour l'estimation des paramètres physico-chimiques est considérée.

Deuxième partie

Fiabilité des méthodes de caractérisation de la contamination biologique

I. Introduction

Pour assurer la conformité de la qualité des eaux usées traitées avec les usages visés, il faut garantir d'une part le bon fonctionnement de la filière de traitement et d'autre part le respect constant des normes de qualité pour les indicateurs physico-chimiques et biologiques. Plus l'usage visé est « sensible » (risque de contact direct avec les usagers), plus la surveillance doit être renforcée.

Concernant les indicateurs microbiologiques, les méthodes d'estimation retenues dans la réglementation pour le contrôle de qualité des eaux destinées à la consommation humaine (EDCH) sont des méthodes dites « énumératives », c'est-à-dire par ensemencement sur milieu gélosé, le plus souvent après filtration de l'échantillon. La détermination de la charge bactérienne se fait par comptage direct des colonies après incubation (AFNOR, 2014). Ces méthodes sont plutôt complexes à mettre en œuvre car elles impliquent l'incubation sur un ou plusieurs milieux sélectifs avec parfois une étape de confirmation par repiquage des colonies sur un autre milieu ou par des tests biochimiques (ISO, 2000a, 2000b). Les méthodes retenues dans la réglementation pour le contrôle de qualité des eaux de baignade sont quant à elles des méthodes dites « quantiques », c'est-à-dire par ensemencement sur un milieu liquide (AFNOR, 2014). La détermination de la charge bactérienne passe par le calcul du nombre le plus probable (NPP). C'est cette approche méthodologique qui est retenue par la réglementation française sur la REUT pour l'analyse d'*Escherichia coli* et des entérocoques (DGS, 2016).

Les méthodes mises en œuvre dans le cadre de l'autocontrôle d'une filière de REUT telle que définie dans la problématique se doivent d'être en adéquation avec le contexte du bassin méditerranéen : elles doivent pouvoir être déployées sur le terrain (dans un laboratoire peu équipé ou un espace propre avec un accès à une source d'énergie) et utilisables par des non spécialistes (Bain et al., 2012). Les méthodes par détermination du NPP se prêtent bien à ce contexte. Les travaux menés dans le cadre de cette thèse s'appuient sur les méthodes Colilert et Entérolert du fournisseur IDEXX pour le dénombrement des coliformes, *E. coli* et entérocoques, qui sont parmi les plus utilisées (Dichter, 2015; ISO, 2014). Des méthodes par culture sur plaques avec un milieu de culture déshydraté sont également bien adaptées à ce contexte car elles sont plus simples à utiliser que les méthodes normées. La méthode Compact Dry (EC : *Escherichia coli* et coliformes ; ETC : entérocoques) du fournisseur HyServe a été retenue du fait de son coût relativement faible et de sa simplicité.

Les principales limites identifiées pour les méthodes par culture sont le temps d'incubation nécessaire, la difficulté de mettre en évidence les bactéries viables mais non cultivables et l'agrégation des microorganismes entre eux ou aux particules en suspension. L'objectif de cette partie est de mieux appréhender cette dernière problématique en étudiant son impact sur la fiabilité des méthodes par culture. Après une présentation des principes et des limites de ces méthodes, les différentes possibilités pour caractériser l'impact des particules sont ensuite présentées, puis la stratégie expérimentale mise en œuvre est détaillée. L'analyse critique des résultats doit permettre de mettre en évidence les conditions limites d'utilisation de ces méthodes par culture.

II. Principes et limites des méthodes par culture

1. Méthodes par détermination du Nombre le Plus Probable (NPP)

a. Principe

Ces méthodes sont basées sur l'hydrolyse spécifique d'un substrat par l'espèce ou le groupe de microorganismes recherchés. Les produits de dégradation de ces substrats sont marqués par une sonde colorée ou fluorescente, ce qui permet leur détection. L'espèce ou le groupe de microorganismes recherché est donc défini par la présence d'une enzyme capable de dégrader spécifiquement le substrat défini (Dichter, 2015; Eckner, 1998; ISO, 2014). Pour les indicateurs recherchés dans le cadre de ces travaux, deux tests du fournisseur IDEXX (Saint-Denis, France) sont utilisés : Colilert-18 pour la quantification des coliformes et *Escherichia coli*, et Enterolert-E pour la quantification des entérocoques. Les réactions enzymatiques impliquées dans ces tests sont présentés dans le Tableau 1. Ces méthodes ont été validées pour plusieurs matrices d'eau (eau potable, eaux de baignade) et fournissent des résultats équivalents aux méthodes normées par culture sur boîte (Budnick et al., 1996; Eckner, 1998; ISO, 2014).

Tableau 1 : Réactions enzymatiques impliquées dans les tests Idexx Colilert-18 (coliformes et *E. coli*) et Enterolert-E (entérocoques) (ISO, 2014)

Microorganismes cibles	Enzyme recherchée	Substrat spécifique	Produit de dégradation
Coliformes	β -D-galactosidase	Ortho-nitrophényl- β -galactoside (ONPG)	O-nitrophényl (ON) – coloration jaune
<i>Escherichia coli</i>	β -D-glucuronidase	4-méthylumbelliferyl- β -D-glucuronide (MUG)	Méthylumbellifèrone (MUF) – fluorescent
Entérocoques	β -D-glucosidase	4-méthylumbelliferyl- β -D-glucoside (MUD)	sous UV

La culture est réalisée dans un milieu liquide reconstitué par mélange d'eau stérile avec un milieu déshydraté. Ce milieu contient le ou les substrats spécifiques, mais aussi les nutriments nécessaires pour favoriser la croissance des bactéries recherchées. Il contient également des inhibiteurs de croissance des microorganismes non recherchés. Par exemple le milieu pour le test Colilert-18 contient trois antibiotiques, à des concentrations entre 1 et 5 mg/L (ISO, 2014) :

- la vancomycine : inhibiteur de la synthèse du peptidoglycane de la paroi bactérienne, ne peut affecter que les bactéries Gram positif,
- la cefsulodine : inhibiteur spécifique de *Pseudomonas aeruginosa* qui peut entraîner des faux positifs pour la détection d'*E. coli*,
- l'amphotéricine B : antibiotique antifongique.

La composition du milieu Enterolert n'est pas précisément divulguée. La présence de composés inhibant la croissance des bactéries Gram négatif (comme l'azoture de sodium ou l'acide nalidixique) est néanmoins probable (Ferguson et al., 2013).

b. Quantification

La quantification des microorganismes est effectuée par la méthode du Nombre le Plus Probable (NPP) ou « dilution limite ». Pour cela, la suspension à analyser est répartie dans des puits sur une plaque scellée. La plaque utilisée dans nos essais est le Quanti-Tray 2000, qui inclut deux dilutions : 49 puits de 1,86 mL et 48 puits de 0,186 mL. La méthode du NPP est basée sur deux hypothèses principales (Dichter, 2015; Madigan et al., 2012) :

- les microorganismes sont distribués **aléatoirement** au sein du volume
- un puits sera positif si au moins un microorganisme cible est présent

Dans ce cas, la probabilité qu'un puits contienne k microorganismes est donnée par la loi de Poisson :

$$P(X = k) = e^{-\mu} \frac{\mu^k}{k!} \quad (1)$$

μ est l'espérance de la loi, c'est-à-dire la quantité moyenne de microorganismes dans un puits. La meilleure estimation de μ , notée $\hat{\mu}$ peut être calculée à partir de l'observation du nombre de puits négatifs, qui permet d'estimer $P(X = 0)$:

$$\hat{\mu} = -\ln(P(X = 0)) \quad (2)$$

Dans le cas de dilutions multiples, le calcul de l'espérance devient plus complexe. C'est pourquoi une table de calcul du NPP est fournie avec la méthode (exemple dans le Tableau 2). Les méthodes de calcul et les tables sont détaillées dans la norme ISO

9308-2 (ISO, 2014). Une approximation peut être donnée par la formule de Thomas (Thomas, 1942) :

$$NPP/100\text{ mL} = \frac{\text{Nombre de puits positifs} \times 100}{\sqrt{(\text{volume total dans les puits négatifs} \times \text{volume total dans les puits})}} \quad (3)$$

Tableau 2 : Exemple de calcul du NPP par la plaque Quanti-Tray 2000 (d'après Dichter, 2015; ISO, 2014)

	Grands puits	Petits puits
Volume par puits (mL)	1,86	0,186
Nombre de puits (n)	49	48
Puits négatifs (exemple) (n ₀)	39	42
P (X = 0) obs (n ₀ / n)	0,796	0,875
$\hat{\mu}$	0,228	0,134
P (X = 1)	1,82E-01	1,17E-01
P (X = 2)	2,07E-02	7,80E-03
P (X = 3)	1,58E-03	3,47E-04
P (X = 4)	9,00E-05	6,91E-06
P (X = 5)	4,11E-06	2,39E-13
Puits positifs ($\Sigma P \times n$)	10,01	6,01
NPP/100 mL (approximation de Thomas)		17,9
NPP/100 mL (table IDEXX)		17,7

La plage de mesure pour le Quanti-Tray 2000 va de 1 NPP/100 mL (au moins un puits positif) à 2419,6 NPP/100 mL (49 grands puits et 47 petits puits positifs).

Les distributions de l'incertitude pour un résultat donné sont considérées comme suivant une loi normale (Dichter, 2015). Dès lors les limites de confiance à 95 % peuvent être déterminées selon la formule suivante, avec l'utilisation du + pour la limite supérieure ou du – pour la limite inférieure (ISO, 2014) :

$$L_{95} = (\ln NPP \pm 1,96). \varepsilon. (\ln NPP) \quad (4)$$

où ε est l'erreur-type. Son calcul est détaillé dans la norme ISO 9308-2 (ISO, 2014). La norme donne également une table des limites de confiance inférieures et supérieures pour chaque combinaison grands puits / petits puits.

Sur la Figure 1, ces limites de confiance sont représentées en fonction du NPP calculé. Les valeurs de NPP et les limites de confiance sont exprimées en \log_{10} NPP/100 mL. Pour les NPP entre 30 et 1600 pour 100 mL (soit entre 1,5 et 3,2 \log NPP/100 mL), l'intervalle de confiance à 95 % est proche de 0,2 \log , soit une variation

de plus ou moins 60 % par rapport au NPP. Pour des valeurs de NPP inférieures à 10 pour 100 mL, les intervalles de confiance sont beaucoup plus larges, et ces mesures peuvent être considérées comme simplement semi-quantitatives (ISO, 2001).

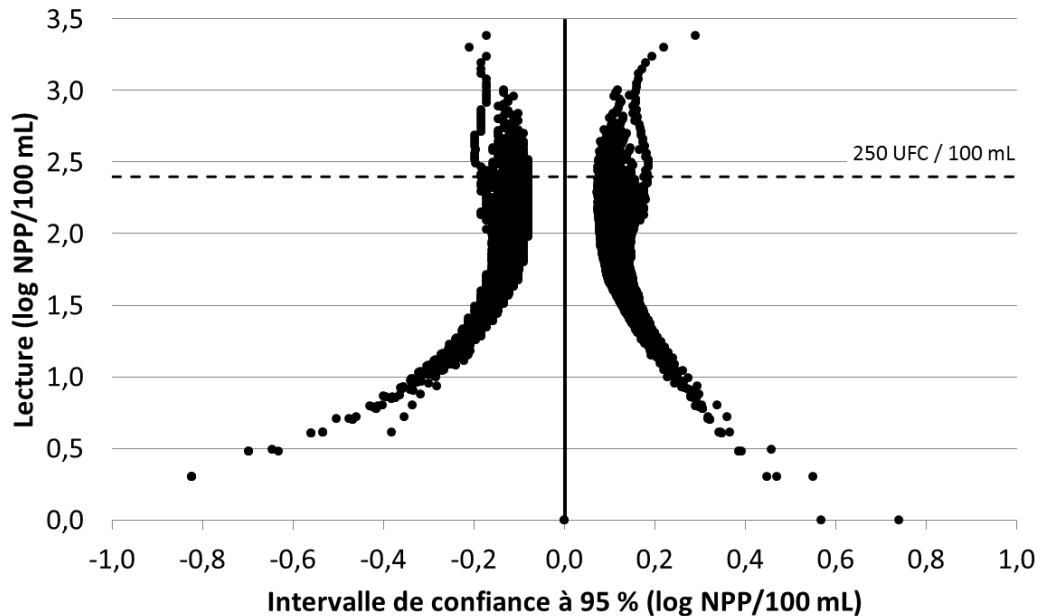


Figure 1 : Représentation des intervalles de confiance à 95 % négatifs et positifs pour les valeurs de NPP données par la table IDEXX pour chaque combinaison grands puits / petits puits de la plaque Quanti-Tray 2000 (d'après ISO, 2014)

c. Aspects pratiques et économiques

Le principal avantage des méthodes Colilert et Enterolert est leur facilité de mise en œuvre. L'échantillon (éventuellement dilué) est placé dans un flacon en plastique de 100 mL puis le substrat déshydraté sous forme de poudre est dissous dans ce volume. L'ensemble est ensuite versé dans une plaque Quanti-Tray 2000. Le scellage de la plaque permet une répartition homogène dans les puits. Après incubation, la lecture s'effectue par simple comptage des puits positifs (colorés ou fluorescents selon le test).

Le coût (hors main d'œuvre) d'une analyse par échantillon est assez élevé (environ 8 €) du fait des consommables et réactifs nécessaires (Tableau 3) ; et la quantité de déchets biologiques à traiter est également importante. Malgré cela, les conditions d'utilisation et de stockage des réactifs et consommables sont compatibles avec une utilisation sur le terrain.

Tableau 3 : Aspects pratiques et économiques des méthodes IDEXX Colilert-18 et Enterolert-E

Coûts	
Matériel (hors étuves)	≈ 5000 € (scelleuse et chambre UV pour lecture)
Réactifs et consommables	6 à 8 € / échantillon
Durée et technicité de l'analyse	
Mise en culture	5 min / échantillon (sans dilution) (Utilisateur novice)
Incubation	18 à 22 h à 37°C (Colilert) 24 h à 41°C (Enterolert)
Comptage	2 min / échantillon (Utilisateur novice)
Stockage des réactifs et déchets	
Température	2 – 25 °C
Durée	12 mois
Déchets (poids)	150 g / échantillon

2. Méthodes par comptage direct

a. Principe

Ces méthodes sont également basées sur la dégradation spécifique d'un substrat, avec coloration du produit de dégradation. Alors que la culture est réalisée en milieu liquide pour les méthodes par détermination du NPP, la culture est réalisée sur un milieu gélosé dans le cas des méthodes par comptage. Deux tests du fournisseur HyServe (Uffing, Allemagne) sont utilisés pour les indicateurs recherchés dans le cadre de ces travaux : Compact Dry EC pour la quantification des coliformes et *Escherichia coli*, et Compact Dry ETC pour la quantification des entérocoques. Les réactions enzymatiques impliquées dans ces tests sont présentées dans le Tableau 4. Pour le test Compact Dry EC, des sels biliaires sont ajoutés au milieu pour inhiber la croissance des bactéries Gram-positif. De même, le milieu Compact Dry ETC contient des antibiotiques pour sélectionner les entérocoques.

Les milieux sont fournis déshydratés dans des boîtes de contact pré-coulées d'une surface de 20 cm². La réhydratation du milieu est effectuée par application de 1 mL d'échantillon au centre de la plaque. Les microorganismes sont ainsi répartis sur toute la surface par capillarité.

Tableau 4 : Réactions enzymatiques impliquées dans les tests Compact Dry EC (coliformes et *E. coli*) et ETC (entérocoques) (Nissui, 2009)

Microorganismes cibles		Enzyme recherchée	Substrat spécifique	Coloration du produit de dégradation
Coliformes	β -D-galactosidase		5-bromo-6-chloro-3-indoxyl- β -D-galactopyranoside (Magenta-Gal)	Rose - rouge
<i>Escherichia coli</i>	β -D-glucuronidase		5-bromo-4-chloro-3-indoxyl- β -D-glucuronide(X-Gluc)	Bleu- violet
Entérocoques	β -D-glucosidase		5-bromo-4-chloro-3-indoxyl- β -D-glucoside (X-Gluc)	Bleu - vert

b. Quantification

La quantification s'effectue par comptage des colonies présentant la coloration recherchée. Si les microorganismes sont répartis aléatoirement sur la surface de la plaque et bien séparés les uns des autres, une colonie après incubation est considérée comme issue d'un microorganisme unique (ISO, 2001; Sutton, 2011). On parle d'Unité Formant une Colonie (UFC). Le comptage est plus complexe que pour la détermination du NPP car il est plus dépendant de l'interprétation de l'opérateur (éclairage, colonies qui se chevauchent...) (Sutton, 2011). L'incertitude liée au comptage peut être modélisée mathématiquement par la distribution de Poisson (ISO, 2001) : la variance de la distribution est égale à sa moyenne et l'écart-type relatif ou coefficient de variation CV peut être exprimé par rapport au comptage total C de la série (ISO, 2001; Sutton, 2011) :

$$CV = \sqrt{1/C} \quad (5)$$

Par exemple, pour un comptage de 48 colonies sur une plaque, le coefficient de variation est de $1/\sqrt{48} = 14\%$. La Figure 2 montre que l'incertitude sur le comptage s'accroît rapidement au fur et à mesure que le comptage de colonies décroît. Ainsi une gamme de comptage inférieure à 10 colonies ne peut être considérée que semi-quantitative du fait de son imprécision (ISO, 2001). De plus, le volume de travail est seulement de 1 mL pour cette méthode, contre 100 mL pour les tests par détermination du NPP décrits précédemment. En considérant comme quantifiables seulement les

comptages supérieurs à 10 UFC, la limite de quantification pour ces méthodes est de 1000 UFC/100 mL, ce qui est élevé.

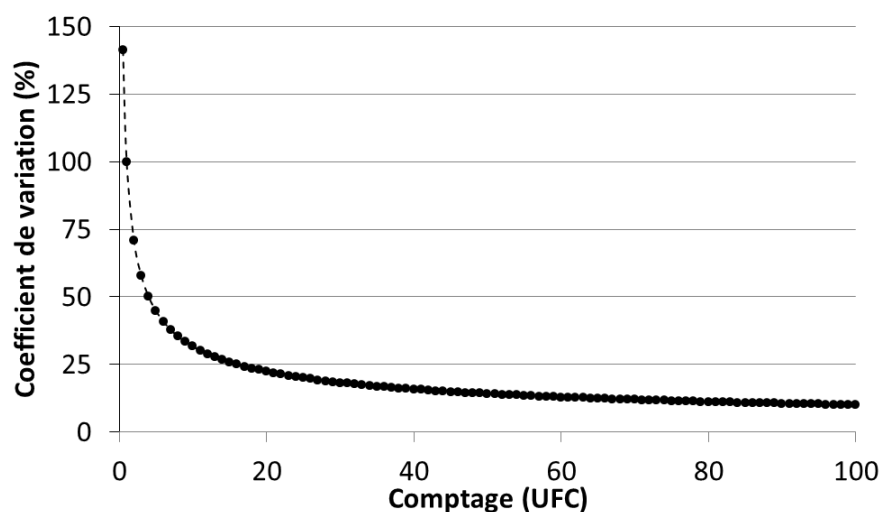


Figure 2 : Coefficient de variation du nombre de colonies comptées dans une suspension parfaitement homogénéisée suivant la loi de distribution de Poisson (d'après ISO, 2001)

La limite haute de comptage n'est quant à elle pas fixée par rapport aux aspects statistiques, mais par rapport aux aspects pratiques et biologiques. De nombreux facteurs sont pris en compte : surface de culture, taille et comportement des colonies recherchées (essaimage possible). Le nombre généralement admis est 250 – 300 colonies (Sutton, 2011). En réalité, c'est une estimation plutôt subjective. Si le nombre de colonies est considéré comme proche de cet ordre de grandeur (Figure 3a), le comptage peut être effectué sur seulement 1/20^{ème} de la surface de la plaque (1 cm²) à au moins trois endroits différents, moyenné, et ramené à la surface totale. Si le nombre de colonies est trop important (Figure 3b), une dilution de l'échantillon est nécessaire.

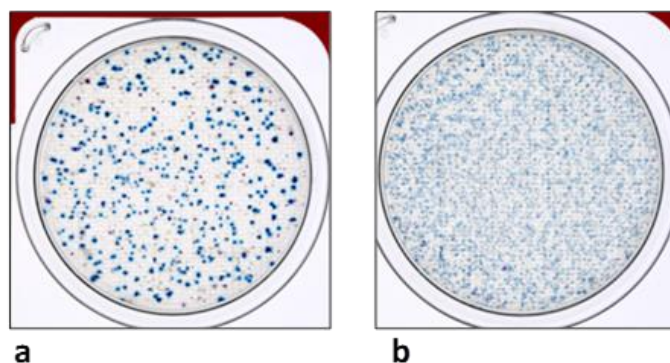


Figure 3 : Exemple de résultats pour Compact Dry EC. Dans le cas (a), le nombre de colonies est considéré comme proche de 300 et seule une partie de la surface est comptabilisée. Dans le cas (b), le nombre de colonies est considéré comme trop important et la dilution supérieure doit être prise en compte

c. Aspects pratiques et économiques

Le fait que les milieux de culture soient pré-conditionnés dans les plaques permet un gain de temps important lié aux étapes de préparation des milieux et de coulage des boîtes, qui sont nécessaires pour les méthodes classiques de culture sur boîtes. Cela permet aussi aux tests d'être utilisés par des opérateurs novices et sur le terrain, car ces étapes de préparation sont assez complexes d'un point de vue technique (chauffage de la gélose, stérilisation des milieux de culture, coulage en conditions aseptiques...). La mise en culture consiste à réhydrater le milieu avec 1 mL d'échantillon (éventuellement dilué) au centre de la plaque. Cependant, un minimum d'entraînement est nécessaire pour le comptage après incubation.

Tableau 5 : Aspects pratiques et économiques des méthodes Compact Dry EC et ETC

Coûts	
Matériel (hors étuves)	0 €
Réactifs et consommables	2 à 3 € / échantillon
Durée et technicité de l'analyse	
Mise en culture	2 min / échantillon (sans dilution) (Utilisateur novice)
Incubation	24 h à 37°C
Comptage	5 min / échantillon (Utilisateur entraîné)
Stockage des réactifs	
Température	1 – 30 °C
Durée	18 mois (Compact Dry EC) 12 mois (Compact Dry ETC)
Déchets (poids)	10 g / échantillon

Le coût (hors main d'œuvre) d'une analyse par échantillon est faible (environ 2 €) et surtout aucun équipement spécifique n'est à prévoir à l'exception des étuves pour l'incubation. De plus, la quantité de déchets générée par échantillon est faible (Tableau 5). Les conditions de stockage des plaques pré-coulées sont compatibles avec une utilisation sur le terrain (Tableau 5).

3. Limites des méthodes par culture

a. Temps d'incubation nécessaire

Afin d'assurer la qualité des eaux usées distribuées, un système de surveillance est nécessaire, idéalement en temps réel. Les méthodes par culture présentent l'inconvénient majeur d'un temps d'incubation long (18 h au minimum), ce qui entraîne un intervalle de temps important entre le prélèvement de l'échantillon et la détection d'une éventuelle anomalie, et l'impossibilité d'une surveillance en continu. Cette problématique est également présente pour l'analyse des eaux de baignade, avec un décalage entre le prélèvement et la décision d'autorisation ou non de la baignade (Henry, 2013; Lebaron et al., 2005). Cependant, alors qu'il est impossible de maîtriser tous les facteurs influençant la qualité des eaux de baignade, le contrôle de l'efficacité du traitement est réalisable dans le cadre de la REUT. Ce contrôle peut s'effectuer par la vérification continue du bon fonctionnement des équipements, en admettant comme indicateur de la qualité biologique des paramètres physico-chimiques (comme la turbidité) qui peuvent être suivis en continu. Une variation de ces paramètres peut indiquer une dégradation de la qualité biologique des eaux distribuées (Jung et al., 2014).

b. Bactéries viables mais non cultivables

Les méthodes avec culture ont pour postulat qu'un microorganisme est considéré comme viable s'il est capable de se multiplier dans des conditions considérées comme optimales pour l'espèce recherchée. Cependant, plusieurs études ont montré que des bactéries soumises préalablement à certaines conditions deviennent incultivables dans un milieu pourtant considéré comme optimal pour leur croissance, tout en conservant d'autres signes de viabilité et même leur virulence dans certains cas pour les bactéries pathogènes (Barcina et al., 1989; Oliver, 2005, 2016; Pommepeuy et al., 1996). Lorsqu'elle est soumise à un stress quelconque une bactérie peut entrer dans un état de « survie à long-terme » et perdre temporairement sa capacité à se dupliquer (Bogosian & Bourneuf, 2001). Mais ces bactéries peuvent récupérer un métabolisme

actif si les conditions redeviennent favorables (Oliver, 2016). On parle alors de bactéries viables mais non cultivables (Viable But Non Culturable, VBNC). La distinction entre « viabilité » et « cultivabilité » est toutefois sujette à caution puisque le changement d'état d'une bactérie peut changer également ses conditions optimales de culture. En d'autres termes, la bactérie n'est plus considérée comme cultivable dans son milieu habituel mais peut toujours être cultivable dans un autre milieu. Elle garde donc potentiellement son activité métabolique (Hammes et al., 2011; Kell et al., 1998). Dans d'autres cas, un stress peut conduire à l'inhibition du métabolisme cellulaire, notamment la synthèse des protéines. On parle alors de « dormance » (Oliver, 2016).

Pour définir la viabilité d'une cellule bactérienne, trois aspects principaux sont à prendre en compte (Figure 4) :

- la présence d'acides nucléiques fonctionnels qui permettent la traduction / transcription et la réplication de l'ADN
- la présence d'énergie (majoritairement sous forme d'ATP) qui permet le fonctionnement des processus cellulaires
- la présence d'une membrane cellulaire intacte et fonctionnelle, qui permet l'intégrité de l'environnement intracellulaire

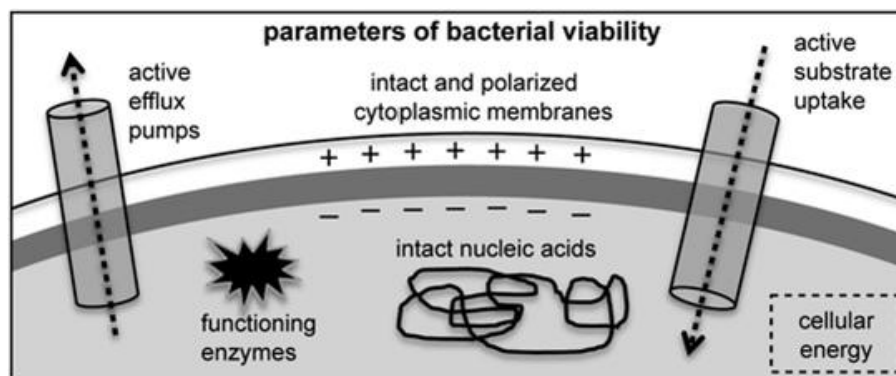


Figure 4 : Paramètres définissant la viabilité d'une cellule bactérienne (Hammes et al., 2011)

Un des processus cellulaires essentiels pour assurer la viabilité de la cellule bactérienne est le maintien d'un potentiel membranaire, c'est-à-dire une différence de tension électrique entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule. Le potentiel membranaire permet d'assurer plusieurs fonctions, comme la synthèse d'énergie ou le maintien de la pression osmotique et donc l'intégrité de la cellule (Hammes et al., 2011).

Les méthodes actuellement reconnues au niveau international pour estimer la contamination biologique des eaux ne permettent pas de s'affranchir de ce problème,

qui conduit potentiellement à la sous-estimation des populations de pathogènes. Néanmoins, les études épidémiologiques sont basées sur ces méthodes et ont montré qu'une relative confiance peut leur être accordée pour estimer le risque biologique (Cabral, 2010).

c. Association des microorganismes avec les particules en suspension

Il y a plusieurs types d'associations entre les particules et les microorganismes en suspension. Pour ces derniers, les particules sont un support de croissance, pouvant servir de base au développement de biofilms. Il peut s'agir également d'une source de nutriments dans un milieu pauvre (Mamane, 2008; Paerl, 1975; Stevik et al., 2004). L'adsorption de microorganismes sur la surface d'une particule est régie par la théorie de la double couche, selon laquelle l'attraction s'opère au niveau de deux zones autour de la particule : une zone « proche » (à moins de 1 nm de la surface) et une zone « éloignée » (5 à 10 nm de la surface) (Chahal et al., 2016; Stevik et al., 2004). L'association particule-microorganisme s'effectue donc en deux étapes (Chahal et al., 2016; Hipsey et al., 2006) :

- Adsorption : le microorganisme surmonte les forces de répulsion électrostatique et des liaisons faibles de type Van der Waal sont mises en place au niveau de la zone « éloignée ». Cette adsorption peut facilement être déstabilisée par l'application d'une contrainte physique, comme l'augmentation des forces de cisaillement.
- Adhésion : des liaisons fortes de type liaison hydrogène ou liaison dipôle – dipôle se forment au niveau de la zone « proche » de la surface de la particule. Ces liaisons sont facilitées par la synthèse de polymères extracellulaires (EPS), ce qui représente une dépense d'énergie importante pour le microorganisme. La stabilité de ces liaisons est cependant très importante, et elles sont plus résistantes aux contraintes physiques.

Ce mécanisme d'association avec les particules est commun pour tous les types de microorganismes : bactéries, virus, oocystes... (Chahal et al., 2016). Il est cependant influencé par plusieurs facteurs, notamment la taille des particules (Tableau 6). Les bactéries peuvent s'associer avec des particules de diamètre supérieur à 10 μm (Emerick et al., 1999) tandis que les virus peuvent se lier avec des particules plus petites, de diamètre inférieur à 2 μm (Templeton et al., 2005). Les protozoaires d'une taille plus importante que les bactéries, comme *Cryptosporidium*, ne pourront s'associer qu'à des particules de diamètre supérieur à 25 μm (Amoah et al., 2005). Ce mécanisme d'agrégation de particules avec les microorganismes est exploité pendant le

traitement secondaire des eaux usées afin de former des floccs qui sont ensuite séparés de l'eau traitée pendant l'étape de clarification (Figure 5).

Tableau 6 : Résumé des facteurs affectant l'association des bactéries avec les particules (d'après Chahal et al., 2016)

Facteurs physiques	
Température	Si la température décroît, cela diminue l'énergie disponible pour l'adsorption. L'adhésion est également plus difficile car la viscosité des polymères EPS augmente.
Débit	S'il augmente, cela diminue le temps de contact entre particules et bactéries. Les forces de cisaillement perturbent aussi l'adsorption.
Matière organique dissoute	Influence la charge positive ou négative des particules
Composition et taille des particules	Influence le nombre de sites d'adsorption.
Facteurs chimiques	
pH	Peut influencer la charge de la surface des particules et des bactéries. Les particules et les bactéries sont plutôt chargées négativement à pH neutre.
Hydrophobicité	Elle augmente pendant la phase de croissance exponentielle des bactéries, ce qui favorise l'adhésion aux particules.
Conductivité (force ionique)	Influe sur les forces d'attraction ou de répulsion électrostatiques. Si la conductivité de l'eau augmente, la répulsion augmente. La présence de cations (Ca ²⁺ , Mg ²⁺ , Cu ²⁺ ...) favorise au contraire l'adsorption.
Facteurs biologiques	
Surface des cellules	La présence d'appendices (flagelle, pili...) permet la mobilité et augmente la probabilité de contact bactérie – particule.
Taille des cellules	Les bactéries les plus petites sont plus susceptibles de se loger dans les interstices des particules.
Polymères extracellulaires (EPS)	Souvent des polysaccharides sécrétés pour former des liaisons stables avec les particules. Les bactéries pathogènes se développant peu dans l'environnement, elles sont moins susceptibles de produire des EPS.
Chimiotaxie	Attraction des bactéries pour certains composés chimiques, ce qui peut jouer un rôle dans l'adsorption sur les particules.
Concentration en bactéries	L'agrégation des bactéries entre elles et sur les particules est liée à leur concentration dans le milieu.

L'association de microorganismes entre eux ou avec des particules a des conséquences sur leur dénombrement par les méthodes par culture. En effet, ces méthodes ont pour postulat que les microorganismes sont répartis aléatoirement dans le milieu, ce qui n'est pas le cas ici. Le risque est donc de sous-estimer la quantité de microorganismes recherchés : dans le cas de la détermination du NPP la répartition

des microorganismes dans les puits ne suit plus une distribution de Poisson, et dans le cas d'une culture sur plaque une UFC ne sera plus issue d'une cellule isolée, mais d'un agrégat de cellules (Borst & Selvakumar, 2003; Garcia-Armisen & Servais, 2009; Plancherel & Cowen, 2007). Cette limitation est identifiée depuis longtemps (Fleisher, 1990), mais les conditions limites à partir desquelles les méthodes par culture sont affectées par l'association des microorganismes avec les particules restent peu documentées. Pour mieux comprendre l'impact de la qualité de l'effluent sur le dénombrement des indicateurs par les méthodes par culture, il est donc nécessaire de distinguer de façon claire la fraction de microorganismes libres et celle en agrégats ou liée aux particules.

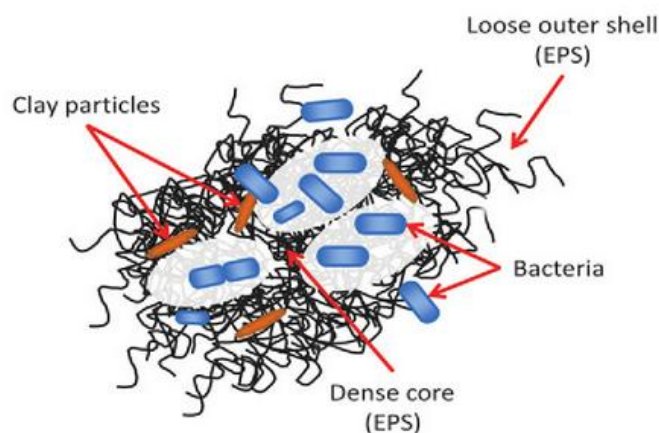


Figure 5 : Structure typique d'un floccule bactérien (Farnood, 2014)

4. Mise en évidence de l'agrégation des microorganismes

Le dénombrement des microorganismes liés aux particules a été étudié au travers de quatre grands prismes (Parker & Darby, 1995) : les particules de sol, les particules de charbon actif en grain, les particules rencontrées dans les eaux potables, et les particules rencontrées dans les eaux usées. La stratégie la plus souvent mise en œuvre est d'estimer deux fractions de l'échantillon :

- les microorganismes « libres » et non associés aux particules,
- la population totale de l'indicateur recherché, en s'affranchissant du biais lié à l'agrégation : soit par le traitement de l'échantillon pour disperser les microorganismes avant la mise en culture, soit par l'utilisation de méthodes alternatives de dénombrement

a. Séparation de la fraction des microorganismes « libres »

Trois méthodes peuvent être mise en œuvre pour séparer les microorganismes libres des microorganismes en agrégation (Soupir et al., 2008) :

- sédimentation en cône d'Imhoff (eaux turbides) : ce procédé est surtout utilisé pour séparer les sédiments (suspension de sol ou sédiments marins) et est donc peu adapté à la matrice « eaux usées »
- centrifugation
- filtration

La centrifugation est un procédé efficace, mais sous l'hypothèse que la proportion de bactéries liées aux particules n'augmente pas pendant le traitement, étant donné que la vitesse de rotation augmente les interactions entre particules et bactéries (Characklis et al., 2005). Soupir et al. (2008) utilisent une vitesse de rotation de 4 700 tours par minute (rpm) pendant 15 secondes et montrent que la quantité de bactéries libres ne varie pas en utilisant cette méthode. Characklis et al (2005) utilisent quant à eux une vitesse de 2 000 rpm pendant 10 minutes. Cette méthode est validée avec des particules en latex de diamètre 10 μm , dont plus de 80 % sont retenues. Le risque de remise en suspension des particules est cependant important et ce procédé est plutôt adapté aux effluents riches en sédiments (Characklis et al., 2005; Soupir et al., 2008).

La filtration est également un procédé permettant de séparer les microorganismes libres (perméat) de ceux associés aux particules (rétentat). Soupir et al (2008) choisissent un seuil de coupure de 3 μm et obtiennent un résultat de 10% de bactéries associées aux particules pour des eaux de ruissellement de terres agricoles. Garcia-Armisen & Servais (2009) choisissent pour leur part un seuil de coupure de 5 μm et obtiennent un résultat de 20% de bactéries associées aux particules pour des eaux de rivière contenant 20 mg/L de matières en suspension (MES). Pour définir le bon seuil de coupure, la taille des microorganismes recherchés est également à prendre en compte. Les entérocoques sont de forme sphérique de diamètre entre 0,5 et 1 μm tandis que les coliformes et notamment *Escherichia coli* ont la forme de bâtonnets de largeur 1 μm et de longueur entre 1 et 3 μm (Moxley & Stewart, 2013). Le seuil de 5 μm ne permet pas de différencier les microorganismes libres des agrégats de quelques cellules (2 à 3) ou des microorganismes liés à des particules de taille inférieure à 5 μm . Mais il est souvent retenu car la fraction filtrée est considérée comme non décantable et les indicateurs choisis sont considérés comme libres en suspension en dessous de ce seuil (Boutilier et al., 2009; Garcia-Armisen & Servais, 2009; Qualls et al., 1983).

b. Dispersion des microorganismes agrégés

La plupart des techniques pour la dispersion des microorganismes agrégés ou liés aux particules ont été développées pour des matrices spécifiques telles que les eaux de ruissellement, les sédiments marins ou les grains de charbon actif (Craig et al., 2002; Örmeci & Linden, 2005; Soupir et al., 2008). Les méthodes suivantes peuvent être utilisées seules ou combinées :

- techniques physiques : agitation manuelle, agitation mécanique ou sonication
- techniques chimiques : agents surfactants

La première technique chimique pour extraire les microorganismes des particules a été développée par Camper et al. (1985) dans le contexte des particules de charbon actif en grain. Le milieu de dispersion retenu est composé de la façon suivante : 10^{-6} M ($0,366 \text{ mg.L}^{-1}$) Zwittergent 3-12, 10^{-3} M EGTA, 0,1% peptone et 1 mM de tampon Tris. Caron et al. (2007) critiquent ce mélange dans le cadre de la dispersion de microorganismes avant l'exposition aux UV, car la présence de la peptone affecterait la transmittance UV du mélange en augmentant l'absorbance du rayonnement. Ils préfèrent l'utilisation du Zwittergent 3-12 seul, mais à une concentration plus importante (100 mg/L). Örmeci & Linden (2005) proposent également l'utilisation de l'EGTA (ethylene glycol tetraacetic acid) ou de l'EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) seuls à une concentration de 1 mM. Ces produits sont des agents chélateurs dont le but est de piéger les ions métalliques permettant les liaisons entre microorganismes et particules. L'utilisation de la solution de Camper et al. (1985) ou de l'EGTA à 1 mM ou de l'EDTA à 1 mM semblent donner des résultats équivalents (Örmeci & Linden, 2005 et Tableau 7).

Parmi les traitements physiques, la sonication conduit le plus souvent à une inactivation des microorganismes (c'est-à-dire l'inverse de l'effet recherché), même lorsque des puissances faibles sont utilisées (Örmeci & Linden, 2005; Parker & Darby, 1995). Concernant les techniques d'agitation, Örmeci & Linden (2005) ont montré que des vitesses d'agitation élevées (supérieures à $12\,000 \text{ tr/min}$) conduisent à une baisse des teneurs en coliformes totaux dans les effluents secondaires. Cette étude est en contradiction avec les résultats de Parker & Darby (1995) qui ont observé une augmentation de la teneur en coliformes avec des vitesses d'agitation de $19\,000 \text{ tr/min}$ (Tableau 7). Cependant des vitesses inférieures à $17\,000 \text{ tr/min}$ ne sont pas testées dans cette étude. Les microorganismes seraient affectés par des vitesses d'agitation trop importantes, mais aussi par une agitation prolongée à des vitesses faibles (Örmeci & Linden, 2005).

Tableau 7 : Liste non exhaustive de méthodes utilisées pour la dispersion des microorganismes liés aux particules. Le ratio observé correspond à la quantité de microorganismes dénombrés dans l'échantillon traité par rapport à la quantité de microorganismes dénombrés dans l'échantillon non traité. Les microorganismes sont dénombrés par des méthodes standards par culture.

Référence (type d'eau)	Indicateurs	Méthode	Ratio observé
Parker & Darby, 1995 (eaux usées)	Coliformes totaux	<i>Solution de Camper et al. (1985)</i> , agitation à 19 000 tr/min pendant 1,5 min	2,8
Perdek & Borst, 2000 (eaux de débordement de déversoir d'orage)	Coliformes fécaux, entérocoques	<i>Solution de Camper et al. (1985)</i> , agitation à 22 000 tr/min entre 0,5 et 3,5 min	> 10
Örmeci & Linden, 2005 (eaux usées)	Coliformes totaux	Agitation (barreau aimanté) à 1000 tr/min pendant 3 min	1,2 – 2
		Agitation (blender) à 3500 tr/min pendant 1 min	1,4 – 1,7
		<i>EGTA (ou EDTA)</i> , Agitation (blender) à 3500 tr/min pendant 1 min	1,6 – 2,2
		<i>Solution de Camper et al. (1985)</i> , mélange à 16 000 tr/min pendant 3 min	1,6
Caron et al., 2007 (eaux de surface)	Spores de bactéries aérobies	<i>Solution de Camper et al. (1985)</i> <i>modifiée</i> , agitation (blender) pendant 4 min avec 2 min de repos chaque min	1,5
Plancherel & Cowen, 2007 (eaux de surface)	Entérocoques, <i>Clostridium</i> <i>perfringens</i>	<i>Solution de Camper et al. (1985)</i> (<i>contact 30 min</i>), agitation à 16 000 tr/min pendant 3 min	1,1 – 1,5
Winward et al., 2008 (eaux grises)	Coliformes totaux	Agitation (blender) à 4000 tr/min pendant 1 min	1,7
Bichai et al., 2011 (eaux de surface)	Coliformes totaux	<i>Solution de Camper et al. (1985)</i> <i>modifiée</i> , agitation (blender) pendant 4 min avec 2 min de repos chaque min	1,4

Le Tableau 7 présente les résultats obtenus dans la littérature pour différentes techniques utilisées. La dispersion des microorganismes permettrait d'augmenter leur teneur d'un facteur 1,5 à 2 pour des effluents secondaires ou des eaux de surface. Perdek & Borst (2000) ont observé un ratio plus important, mais sur un effluent beaucoup plus riche en matières en suspension (eaux de déversoir d'orage). Il faut également noter que les caractéristiques et la composition des eaux usées étudiées sont susceptibles d'influencer le détachement des bactéries et des particules. La résistance des flocs au cisaillement peut varier en fonction de la teneur en polymères extracellulaires, de la concentration en cations, de l'âge des microorganismes notamment (Örmeci & Linden, 2005). Par exemple, Loge et al. (2002) ont montré que l'âge des boues conditionne la proportion de particules associées à des coliformes.

c. Méthodes alternatives de dénombrement

Des méthodes alternatives d'évaluation quantitative ou semi-quantitative de la qualité biologique des effluents ont été développées pour s'affranchir d'une ou plusieurs des limites présentées dans le paragraphe II.3. Plusieurs propriétés du type de microorganisme recherché peuvent être exploitées, avec ou sans mise en culture de l'échantillon (Noble & Weisberg, 2005; Rompré et al., 2002). Les avantages et limites de ces méthodes alternatives sont présentés dans le Tableau 9.

Afin de diminuer le temps nécessaire entre la prise d'échantillon et le résultat, le principe de la mise en culture en milieu liquide avec dégradation spécifique d'un substrat (tel que pour les méthodes IDEXX présentées) a été couplé avec une détection en temps réel du produit de dégradation. Un protocole a été développé par George et al. (2000) et légèrement modifié par Garcia-Armisen & Servais (2009) pour la mesure de la proportion d'*Escherichia coli* associée aux sédiments dans les eaux de surface en s'affranchissant des effets de l'agrégation. Le principe est présenté dans la Figure 6. Cette méthode a été adaptée et brevetée par Veolia Eau pour la surveillance de la qualité des eaux de baignade (procédé Coliplage, Lebaron et al., 2005). Un ajustement du pH de l'échantillon est nécessaire pour se placer dans les conditions d'émission maximale de fluorescence du produit de dégradation, ce qui permet d'estimer l'activité enzymatique en seulement 30 minutes. D'autres méthodes sur le même principe ont également été développées (Courtois et al., 2009; Fiksdal et al., 1994; Henry et al., 2013; Lopez-Roldan et al., 2013). Une bonne corrélation avec les méthodes de dénombrement classiques est observée, mais la limite de détection reste assez élevée (300 à 1000 UFC/100 mL selon les études et le temps d'incubation). Une autre méthode, développée par Bukh & Roslev (2010), est basée sur un autre type de substrats, les 1,2 dioxétanes. Ces molécules chimioluminescentes présenteraient une sensibilité cent fois plus importante que la détection basée sur la fluorescence ou l'absorbance (Bukh, 2011; Bukh & Roslev, 2010; Lopez-Roldan et al., 2013). Il faut également noter que l'activité enzymatique des microorganismes recherchés peut varier en fonction de différents facteurs : salinité, température, nutriments disponibles, exposition à un rayonnement UV... et donc influencer le résultat (Fiksdal et al., 1994).

Une autre méthode de culture en milieu spécifique pour le dénombrement d'*Escherichia coli* et des entérocoques est proposée par la société Biorad. La détection des microorganismes n'est pas basée sur la fluorescence du substrat dégradé, mais sur l'impédance (l'activité électrique) de l'échantillon. Les composants du milieu de culture (protéines, sucres...) étant plutôt neutres au départ, l'impédance est faible. Les bactéries recherchées dégradent ces composants en molécules plutôt chargées

négativement (acides aminés, lactate...), ce qui augmente l'impédance de l'échantillon. La courbe d'apparition de l'impédance a ainsi la même allure sigmoïdale qu'une courbe de croissance bactérienne classique. Le temps nécessaire pour atteindre un seuil prédéfini est directement proportionnel à la quantité de microorganismes présents dans l'échantillon (Henry et al., 2013; IPL, 2009). Cette méthode a été validée pour les eaux de surface et les eaux résiduaires (IPL, 2009).

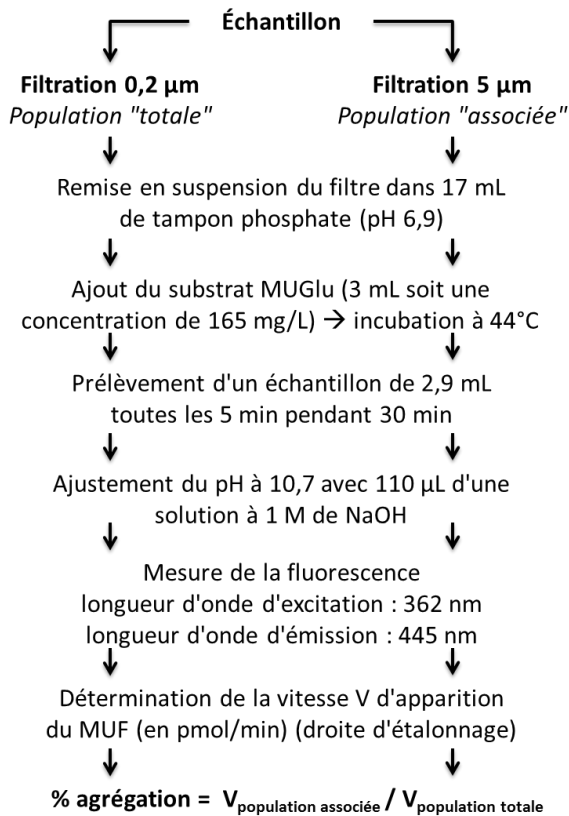


Figure 6 : Protocole expérimental pour la mesure du niveau d'agrégation chez *E. coli* (MUGlu : substrat spécifique ; MUF : produit de dégradation fluorescent) (Garcia-Armisen & Servais, 2009)

Parmi les méthodes sans culture, la concentration en ATP intracellulaire peut être utilisée comme un indicateur de la contamination microbiologique. L'Adénosine Triphosphate (ATP) est un intermédiaire énergétique produit et consommé par toutes les cellules vivantes. Le dosage de l'ATP est réalisé en mesurant la lumière émise par une réaction enzymatique de bioluminescence basée sur le complexe enzymatique luciférine/luciférase. L'ATP agit comme un coenzyme qui permet d'activer la luciférine grâce à son hydrolyse. La réaction de bioluminescence est ensuite réalisée par la luciférase en présence d'un catalyseur. Si les quantités de luciférine/luciférase sont maintenues en excès, la quantité de photons émise est proportionnelle à la quantité

d'ATP présente. Une filtration complémentaire à 0,45 µm retient les cellules, mais laisse passer l'ATP libre ou extracellulaire qui ne reflète pas la biomasse active et peut ainsi être retranché du premier résultat (Cho & Yoon, 2007; Floriot, 2008; Hammes et al., 2010). Si le gros avantage de l'ATPmétrie est la rapidité de l'analyse (moins de cinq minutes), son principal inconvénient est que la méthode estime l'ensemble de la biomasse et n'est pas spécifique à un indicateur particulier (Lopez-Roldan et al., 2013). Lee & Deininger (2004) ont proposé un couplage de l'ATPmétrie avec le piégeage spécifique d'*Escherichia coli* par des anticorps fixés sur des billes magnétiques. Cette méthode est néanmoins difficile à mettre en œuvre et sa spécificité n'est pas entièrement démontrée (Lebaron et al., 2005).

D'autres méthodes sans culture sont basées sur la détection de séquences d'ADN (acide désoxyribonucléique) ou d'ARN (acide ribonucléique) spécifiques du microorganisme indicateur recherché. Deux méthodes sont principalement utilisées : l'amplification spécifique de la séquence recherchée par la réaction de polymérisation des chaînes d'ADN (PCR) ou l'hybridation in-situ sans amplification. Dans le cadre de cette dernière technique, une sonde nucléotidique ciblant une séquence spécifique de l'ARN 16S du microorganisme recherché est souvent utilisée (Rompré et al., 2002). Cette sonde est généralement couplée à un marqueur fluorescent pour une détection des cellules colorées par microscopie à fluorescence ou par cytométrie en flux (Hammes et al., 2008). On parle alors d'hybridation in-situ en fluorescence (FISH). De nombreux protocoles basés sur cette technique ont été développés pour l'identification des indicateurs de contamination fécale dans l'eau (Lopez-Roldan et al., 2013; Rompré et al., 2002). L'avantage est la visualisation directe des cellules marquées et l'identification des microorganismes éventuellement liés aux particules (Ormecci & Linden, 2008). Par contre, il n'est pas possible de distinguer les cellules viables des cellules non viables, sauf si la FISH est couplée à un marqueur de viabilité des cellules (Garcia-Armisen & Servais, 2004). Un autre inconvénient de la méthode est sa sensibilité, car la quantité d'ARN dans une bactérie est faible dans des conditions de stress (Girones et al., 2010). Par exemple, le dénombrement d'*E. coli* à des concentrations inférieures à 10⁴ cellules/100 mL est quasiment impossible (Garcia-Armisen & Servais, 2004).

La PCR quantitative permet une quantification du produit de l'amplification d'une séquence d'ADN spécifique aux organismes recherchés. La quantité initiale d'ADN est corrélée au nombre d'UFC (Unités Formant Une Colonie) (Krometis et al., 2013; Noble et al., 2010). Même si les cibles des méthodes par culture et par PCR sont théoriquement les mêmes, des différences sont observées. La principale différence entre les méthodes par PCR et les méthodes par culture est que ces dernières ne prennent pas en compte les bactéries VBNC ni les bactéries non viables (Girones et al.,

2010; Hammes et al., 2011). Ainsi, Haugland et al. (2005) obtiennent des résultats 5 à 15 fois plus importants avec la qPCR qu'avec une méthode de culture (filtration sur membrane et incubation).

L'autre facteur pouvant expliquer les différences entre les méthodes PCR et par culture est la différence de spécificité, qui dépend de la spécificité du gène choisi pour la PCR. Pour *Escherichia coli*, c'est principalement le gène *uidA* codant pour la β -glucuronidase qui est utilisé car il est très spécifique à cette espèce (Tableau 8), même s'il peut être aussi rencontré chez les bactéries du genre *Shigella* (Molina et al., 2015). Pour les entérocoques, ce sont des gènes codant pour l'ARN ribosomique (ARNr) qui sont plutôt utilisés (Tableau 8). En effet, la séquence de ces gènes contient des régions spécifiques au groupe recherché (Bustin, 2004). Le gène codant pour la β -glucosidase ne semble pas utilisé, peut-être à cause des trop grandes similarités de sa séquence avec celles d'autres gènes. La grande majorité des espèces d'entérocoques issues d'une contamination fécale et rencontrées dans les eaux usées sont détectées à la fois par les méthodes par culture et par PCR (Maheux et al., 2009).

Tableau 8 : Principaux gènes utilisés pour la détection et/ou la quantification d'*E. coli*, des entérocoques et des coliformes par PCR

Microorganisme	Gène (fonction)	Référence
<i>Escherichia coli</i>	<i>uidA</i> (β -glucuronidase)	(Frahm & Obst, 2003; Lee et al., 2006; Molina et al., 2015; Sandhya et al., 2008; Shannon et al., 2007; Silkie et al., 2008)
	Gène codant pour l'ARN 16S	(Malinen et al., 2003)
	<i>yaiO</i> (protéine membranaire)	(Molina et al., 2015)
Entérocoques	Gène codant pour l'ARNr 16S	(Rinttilä et al., 2004)
	Gène codant pour l'ARNr 23S	(Frahm & Obst, 2003; Haugland et al., 2005; Wéry et al., 2008)
	<i>tuf</i> (facteur d'élongation EF-Tu)	(Maheux et al., 2009)
Coliformes	<i>lacZ</i> (β -galactosidase)	(Bej et al., 1990; Fricker & Fricker, 1994; Molina et al., 2015)

La première étape de la qPCR est l'extraction de l'ADN à partir de la matrice (ici les eaux usées traitées). Cette étape est importante car elle conditionne l'efficacité de la PCR : l'ADN purifié doit être en quantité suffisante et exempt de contaminants et d'inhibiteurs pouvant interférer avec les réactions suivantes (Bustin, 2004). Ensuite, la PCR se poursuit par une succession de cycles visant à amplifier la séquence d'ADN ciblée : les doubles brins de l'ADN sont séparés (dénaturation, à environ 95°C), puis il y a hybridation entre la séquence ciblée et des amorces sur chaque brin de l'ADN. Une

sonde se fixe également sur la séquence cible. L'étape suivante est l'élongation de la séquence ciblée à partir des amorces grâce à une enzyme (la polymérase) pour former le double brin complémentaire (à environ 60°C). À chaque cycle, la quantité d'ADN est mesurée, le plus souvent par fluorescence. Plus précisément, le nombre de cycles nécessaires pour dépasser un seuil déterminé de fluorescence est déterminé (Figure 7). Ce nombre, noté C_T est proportionnel à la quantité d'ADN cible initialement présente dans l'échantillon (Bustin, 2004).

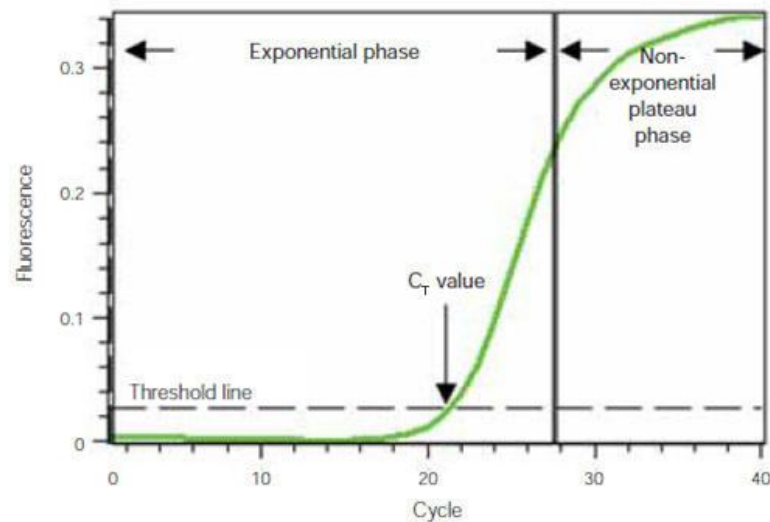


Figure 7 : Évolution de la quantité d'ADN mesurée par fluorescence durant un cycle de qPCR : C_T représente le nombre de cycles nécessaires pour atteindre le seuil de fluorescence (d'après Bustin, 2004)

Tableau 9 : Avantages et inconvénients des méthodes alternatives de dénombrement. Les méthodes sans mise en culture permettent la détection des bactéries VBNC. * Pour les méthodes avec mise en culture, la durée d'incubation dépend de la limite de détection souhaitée. Pour les méthodes sans culture, la rapidité dépend de la durée des manipulations nécessaires. Le coût par analyse est estimé seulement pour les réactifs et consommables (+ : de 1 à 10 € ; ++ : de 10 à 30 €)

Méthode	Mise en culture	Avantages	Limites	Rapidité Coût par analyse
Cinétique de l'activité enzymatique	Oui	<ul style="list-style-type: none"> • Même principe que pour les méthodes par culture 	<ul style="list-style-type: none"> • Sensibilité faible • Ajustement du pH nécessaire 	1 à 8 heures * +
Mesure de l'impédance	Oui	<ul style="list-style-type: none"> • Milieu de croissance sélectif équivalent aux méthodes par culture • Méthode validée pour les eaux résiduaires 	<ul style="list-style-type: none"> • Coût d'investissement élevé (matériel spécifique) 	6 à 8 heures * ++
ATPmétrie	Non	<ul style="list-style-type: none"> • Simple à mettre en œuvre 	<ul style="list-style-type: none"> • Non spécifique 	5 minutes ++
Hybridation in-situ	Non	<ul style="list-style-type: none"> • Visualisation directe de l'agrégation 	<ul style="list-style-type: none"> • Coût d'investissement élevé (matériel spécifique) • Chronophage (si comptage manuel) • Prise en compte des bactéries non viables (test complémentaire de discrimination possible) 	Quelques heures +
q-PCR	Non	<ul style="list-style-type: none"> • Spécificité importante • Bonne corrélation avec les méthodes par culture 	<ul style="list-style-type: none"> • Coût d'investissement élevé (matériel spécifique) • Prise en compte des bactéries non viables 	Quelques heures +

5. Conclusion : définition de la stratégie expérimentale

L'objectif de la présente étude est d'étudier l'impact de l'association des microorganismes aux particules sur leur dénombrement par les méthodes par culture. Les microorganismes indicateurs retenus sont les coliformes, *Escherichia coli* et les entérocoques. Deux types de méthodes par culture sont évaluées : les méthodes par détermination du NPP (tests Colilert et Enterolert) et les méthodes par culture sur plaque (tests Compact Dry EC et ETC). Pour analyser l'influence de l'association avec des particules lors d'une dégradation de qualité de l'effluent secondaire, le montage expérimental choisi consiste à doper un effluent secondaire de station d'épuration avec des matières en suspension. Ces effluents sont caractérisés au niveau physico-chimique par la mesure des MES, turbidité, transmittance UV à 254 nm, et par l'estimation de la distribution granulométrique des particules (Figure 8).

Le seuil de coupure de 5 µm est choisi pour séparer la fraction dite « libre » des microorganismes (filtrat) de la fraction agrégée aux particules (rétentat) (Figure 8). Pour s'affranchir du biais de l'agrégation pour l'estimation de la population totale, l'approche par les méthodes de dispersion n'est pas satisfaisante car 1) cela risque d'induire une mortalité chez les microorganismes et 2) il n'est pas possible de vérifier que la dispersion est exhaustive.

Parmi les méthodes alternatives de dénombrement disponibles, le choix a été fait de recourir à une méthode de quantification sans culture, la PCR quantitative. Cette technique est retenue car 1) la littérature montre qu'il existe de bonnes corrélations avec les méthodes par culture pour les indicateurs étudiés et 2) le laboratoire possède déjà les équipements nécessaires pour réaliser ce type d'analyses. Le biais lié à la prise en compte de bactéries non viables est supposé équivalent pour toutes les conditions testées.

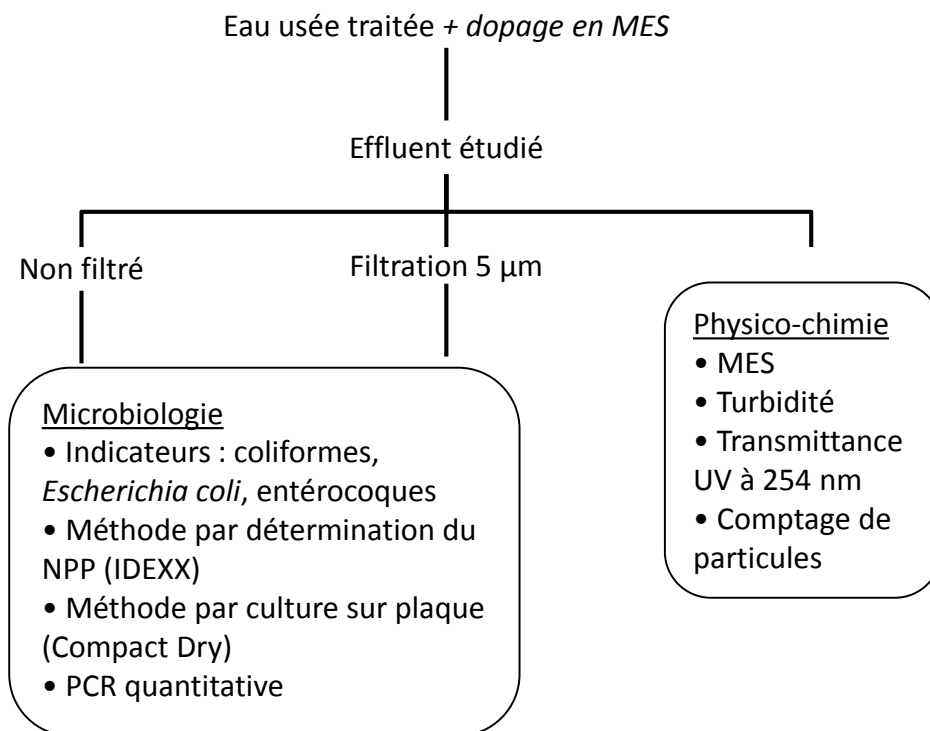


Figure 8 : Stratégie expérimentale retenue

III. Matériel et méthodes

1. Effluents étudiés et protocole expérimental

Les eaux usées traitées sont issues d'une station d'épuration du sud de la France qui traite les effluents de 230 000 EH (équivalents-habitant) majoritairement d'origine domestique, soit un débit d'environ 28 000 m³/jour. Le traitement primaire est constitué de tamis pour récupérer les débris de grande taille, et d'un ouvrage de récupération des sables et des graisses. Le traitement secondaire est de type boues activées, avec une élimination poussée de l'azote (aération séquentielle) et du phosphore (précipitation chimique avec du chlorure ferrique). La composition des eaux usées traitées est présentée dans le Tableau 10. Globalement, la station est performante et permet une très bonne élimination de la pollution carbonée, azotée et phosphorée.

Tableau 10 : Composition moyenne et médiane de l'effluent secondaire étudié (TUV : transmittance UV). Données issues de l'autocontrôle de l'exploitant pour l'année 2016.

Paramètre	Unité	Moyenne	Médiane	Ecart-type
DBO ₅	mg/L	1,9	1,5	0,9
DCO	mg/L	27,4	30,0	12,3
MES	mg/L	5,3	5,0	2,3
TUV 254 nm	%	68,3	68,4	4,3
NTK	mg/L	1,9	1,8	0,9
N-NH ₄	mg/L	0,7	0,5	0,4
N-NO ₂	mg/L	0,1	0,1	0,2
N-NO ₃	mg/L	3,3	2,7	2,0
Azote total	mg/L	5,3	4,6	2,2
Phosphore total	mg/L	0,8	0,6	0,6

Le dopage en MES est effectué en mélangeant à cet effluent secondaire un volume plus ou moins important de boues liquides en provenance du bassin d'aération de la station (traitement secondaire). La teneur en matière sèche de ces boues est comprise entre 3,5 et 5 g/L. Ce dopage vise à simuler une dégradation de qualité de l'effluent suite à un dysfonctionnement sur la filière secondaire.

L'effluent secondaire et les boues sont collectés directement sur la station d'épuration puis transportés jusqu'au laboratoire pour être analysés dans les trois heures après le prélèvement. Le mélange est réalisé dans six béchers de 1 L placés dans un jar-test pour uniformiser l'agitation (Floculateur 11196, Bioblock Scientific) (Figure 9). La température de l'eau est égale à la température de la pièce qui est

maintenue à 20°C. La vitesse d'agitation est fixée à 200 tours/minutes et le temps d'agitation minimum est de trois minutes. Trois conditions sont testées de cette façon (Tableau 11).

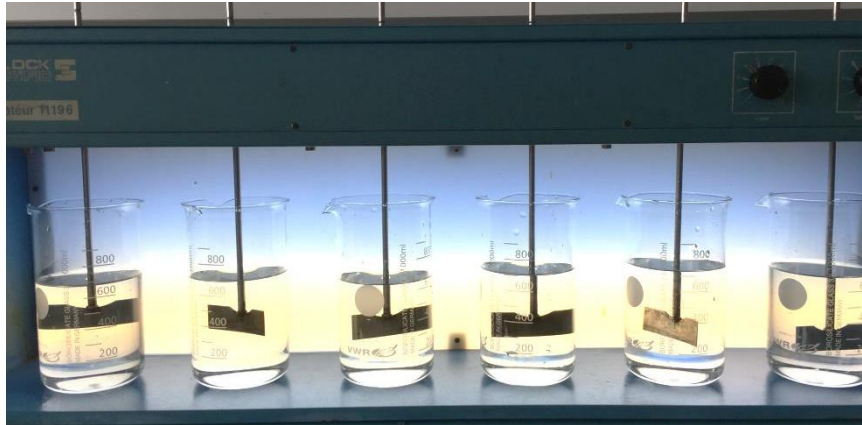


Figure 9 : Banc de mélange des effluents

Tableau 11 : Composition des mélanges pour les trois conditions testées. Les volumes sont donnés par bécher.

	Volume effluent secondaire (mL)	Volume boues (mL)	Pourcentage (v/v)
Condition A	700	0	0 %
Condition B	700	5,4	0,8 %
Condition C	700	12,5	1,8 %

Pour chaque condition, deux échantillons sont réalisés : un premier échantillon pour l'analyse de la distribution granulométrique des effluents et un deuxième échantillon pour l'analyse du reste des paramètres physico-chimiques et microbiologiques. Ainsi, six répétitions sont effectuées pour l'ensemble des paramètres analysés.

2. Analyses physico-chimiques

a. Matières en suspension (MES)

Les matières en suspension sont définies comme l'ensemble des particules retenues par un filtre de porosité définie, généralement 1,2 μm (AFNOR, 2005; Rodier et al., 2016). La détermination des MES est effectuée suivant la norme NF EN 872 (AFNOR, 2005). Les filtres en fibre de verre (GF/C, Whatman) de porosité 1,2 μm sont préalablement lavés avec de l'eau osmosée et séchés à 105°C pendant au moins 2 h. Les filtres sont ensuite pesés, la masse avant filtration est notée M0. Un filtre est ensuite

placé sur un dispositif de filtration relié à une pompe d'aspiration sous vide. Le volume d'échantillon filtré est compris entre 200 et 1000 mL selon la teneur supposée en MES (plus l'échantillon est chargé en MES, plus le volume filtré est faible). Il est mesuré et noté V . Le filtre est ensuite séché à 105°C pendant au moins 8 h et la masse du filtre après filtration et séchage (notée $M1$) est mesurée. La teneur en matières en suspension est donnée par l'expression :

$$MES = \frac{M1 - M0}{V} \quad (6)$$

b. Turbidité

La turbidité est un paramètre qui mesure le trouble de l'eau. Ce trouble est constitué par des particules colloïdales de faible diamètre (de 0,1 à 10 μm) en suspension dans l'eau. La gamme s'étend des particules d'origine minérale (sable, limon, argile...) à la matière organique morte ou vivante (algues, bactéries, parasites, substances humiques...) (Rodier et al., 2016). Il existe deux méthodes normalisées de mesure de la turbidité : la néphélométrie (gamme de 0 à 40 NFU) et l'opacimétrie (gamme de 40 à 4000 NFU). Seul le principe de la néphélométrie est développé ici, car c'est la méthode principalement utilisée dans le domaine de la potabilisation de l'eau. Les turbidimètres utilisant ce principe sont constitués d'une source lumineuse et d'un photodétecteur placé à 90° de cette source. Si le faisceau lumineux rencontre des particules en suspension, une partie de la lumière est dispersée. Le détecteur mesure donc l'intensité de la lumière diffusée à 90°, proportionnelle à la quantité de matières en suspension dans l'eau. Un deuxième photodétecteur est installé en face de la source lumineuse pour mesurer la lumière transmise et corriger le signal pour prendre en compte la coloration de l'eau et la granulométrie des particules (AFNOR, 2000a; Rodier et al., 2016). Les unités de mesure de la turbidité sont normalisées en utilisant des solutions à base de formazine comme étalon :

- NFU (Nephelometric Formazine Unit) : mesure la turbidité sous un angle de 90° à une longueur d'onde de 860 nm
- FAU (Formazine Attenuation Unit) : mesure la lumière transmise (180°) ; 1 FAU = 1 NFU
- NTU (Nephelometric Turbidity Unit), plutôt utilisée aux États-Unis ; 1 NTU = 1 NFU

Dans ces travaux, la turbidité est mesurée à l'aide d'un turbidimètre portable (HI 98703, Hanna instruments) selon la norme NF ISO 7027-1 (AFNOR, 2000a). Les valeurs sont exprimées en NTU. L'échantillon doit être bien homogénéisé, et il faut prendre garde à la formation de bulles, qui peuvent interférer avec la mesure.

c. Transmittance UV à 254 nm

L'absorbance UV à 254 nm d'un échantillon d'eau est influencée à la fois par les particules en suspension et par les matières organiques dissoutes. C'est notamment le cas des molécules aromatiques, comme les phénols ou les matières humiques. La mesure de l'absorbance UV à 254 nm est donc un paramètre important d'estimation de la qualité de l'eau (Rodier et al., 2016). La transmittance UV à 254 nm est définie par la différence d'intensité lumineuse entre le rayonnement émis et celui reçu par le capteur.

La mesure de la transmittance UV à 254 nm est mesurée à l'aide d'une cuve en quartz de trajet optique de 1 cm et d'un spectrophotomètre UV-visible (Anthélie, Secomam). Le zéro du spectrophotomètre est défini sur un blanc d'eau osmosée.

d. Distribution granulométrique des particules

Les particules inorganiques ou organiques sont de taille et de forme variables et peuvent même évoluer dans le temps pour les particules viables. Il existe de nombreuses techniques pour mesurer la distribution des tailles de particules dans un milieu liquide. Parmi les plus utilisées, on peut citer les méthodes par filtration, sédimentation, atténuation d'ondes ultrasonores, électrorésistance (compteur « Coulter »), et les méthodes optiques (Zhang et al., 2009). Parmi les méthodes optiques, trois principales techniques sont utilisées (Figure 10) :

- Compteurs à noyaux de condensation (CNC) : les particules sont grossies par condensation et peuvent ainsi être mesurées par un capteur optique (Ecomesure, 2011)
- Compteurs par diffraction et par blocage de la lumière : ces deux méthodes utilisent une source lumineuse monochromatique (laser) pour caractériser la taille et le nombre de particules qui coupent le faisceau. Quand ce faisceau atteint une particule, le rayonnement est divisé en trois parties : une partie passe à travers l'objet, une partie est réfléchi et le reste est absorbé. Les proportions de ces trois composantes dépendent des propriétés optiques et de la composition des particules (Zhang et al., 2009). Les compteurs par diffraction mesurent la partie réfléchi du rayonnement tandis que les compteurs par blocage mesurent la partie réfléchi et celle absorbée (Figure 11).

La calibration de ces appareils répond à la norme ISO 21501 (*Détermination of particle size distribution – single particle light interaction methods*) dont la partie 3 s'intéresse plus particulièrement à la méthode par blocage de la lumière (ISO, 2007).

Des particules de calibration sont utilisées : il s'agit le plus souvent de polystyrène latex (PSP). Ce sont des particules sphériques mono-dispersées dont la taille moyenne est connue avec une incertitude standard de 2,5 % (ISO, 2007).

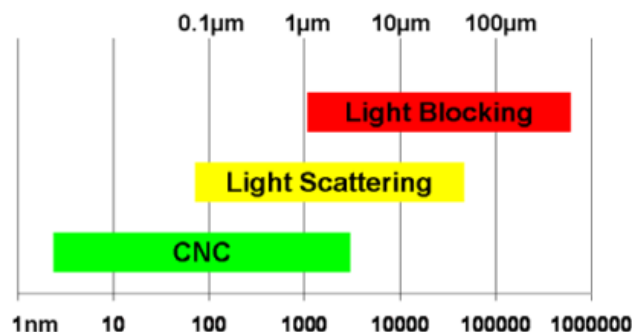


Figure 10 : Tailles de particules et méthodes optiques de comptage (Harrison & Latime, 2008)

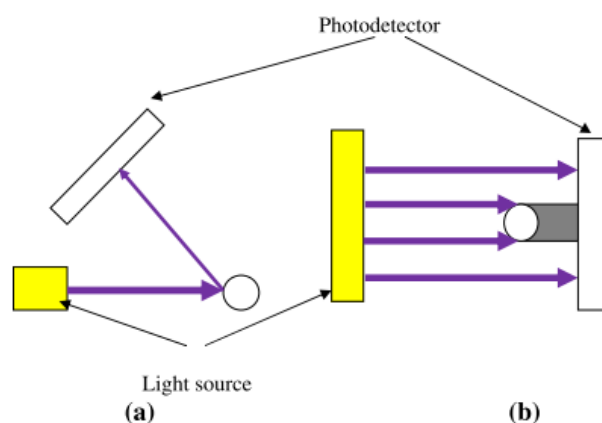


Figure 11 : Différence entre les méthodes par diffraction (a) et par blocage (b) de la lumière (Zhang et al., 2009)

L'appareil utilisé dans ces travaux est un compteur optique par blocage de la lumière (WPC-22, ARTI). Il mesure deux tailles de particules simultanément sur deux canaux : le canal 1 correspond aux particules de taille supérieure à la plus petite taille mesurée (2 μm) : cette valeur correspond donc au total des particules mesurables. Le canal 2 correspond aux particules de taille supérieure à la taille spécifiée (entrées possibles : 3, 5, 10, 15, 25, 50 et 100 μm).

L'étalonnage consiste à faire circuler un flot continu de particules standards en solution, qui correspond à un flux de pulsations électriques au niveau du capteur de rayonnement laser, ce flux étant proportionnel à la taille de chaque particule. L'étalonnage permet ainsi d'obtenir une distribution normale de pulsations, dont la

médiane est considérée comme étant le seuil idéal pour la taille étudiée. Dans la réalité, une particule exactement de la même taille aura une probabilité p d'être comptabilisée. L'efficacité de comptage pour cette taille sera donc de p %. La norme ISO 21501 indique que l'efficacité de comptage pour la plus petite taille mesurée (canal 1) doit être de 50 ± 20 %. De plus les particules de taille supérieure de 1,5 à 2 fois cette taille minimum doivent être comptabilisées avec une efficacité de 100 ± 20 % dans le même canal. Pour le WPC-22, cela signifie qu'une particule de $2 \mu\text{m}$ doit avoir une probabilité de 50 % d'être comptabilisée dans le total des particules (canal 1) tandis qu'une particule de $5 \mu\text{m}$ ou plus doit avoir une probabilité de 100 % d'être comptabilisée dans ce même total (ISO, 2007).

Ainsi, lors de la mesure de particules de taille nominale $t \mu\text{m}$, l'appareil réalise un ensemble de mesures qui forment une distribution gaussienne centrée sur t . Seules les mesures supérieures à la taille nominale (à droite du pic) sont comptabilisées. La limite principale de la méthode par blocage de la lumière est que sa sensibilité est déterminée par la surface de la particule et non par son volume (Harrison & Latime, 2008; Jonasz & Fournier, 2011). Selon Li et al. (2005), les distributions de tailles de particules non sphériques peuvent être très différentes selon la méthode de comptage utilisée. En effet la taille de ce genre de particules peut être appréhendée de plusieurs manières (Figure 12) : le diamètre de Feret (distance entre deux parallèles imaginaires tangentes à la particule et perpendiculaires à l'axe optique, surtout utilisé en microscopie), la largeur la plus grande, ou le diamètre équivalent à une particule sphérique. C'est cette dernière approximation qui est utilisée dans la méthode par blocage de la lumière, ce qui peut conduire à sous-estimer ou surestimer le nombre de particules comptabilisées. D'autres paramètres peuvent également influencer la mesure, comme la capacité de la particule à réfléchir le rayonnement laser (Jonasz & Fournier, 2011).

Le montage expérimental pour la mesure de la distribution granulométrique avec le compteur de particules est présenté en Figure 13. L'échantillon est homogénéisé grâce à un agitateur magnétique (MR1000, Heidolph). L'eau est pompée vers le compteur grâce à une pompe péristaltique (RZR2, Heidolph). Le débit est mesuré pour chaque échantillon et paramétré dans l'appareil. Il peut être compris entre 60 et 120 mL/min. La séquence de comptage est ensuite lancée : l'appareil mesure en continu la concentration en particules exprimée en particules par mL. Sur le canal 1, les particules de taille supérieure à $2 \mu\text{m}$ sont mesurées, tandis que le canal 2 mesure les particules de taille supérieure à la taille spécifiée. Toutes les 30 secondes, la mesure est enregistrée et la taille spécifiée change sur le canal 2. Le balayage est ainsi effectué pour les tailles 3 à $100 \mu\text{m}$. Pendant la mesure, le débit moyen est mesuré pour corriger les valeurs données par l'appareil en cas de changement par rapport au débit initialement paramétré.

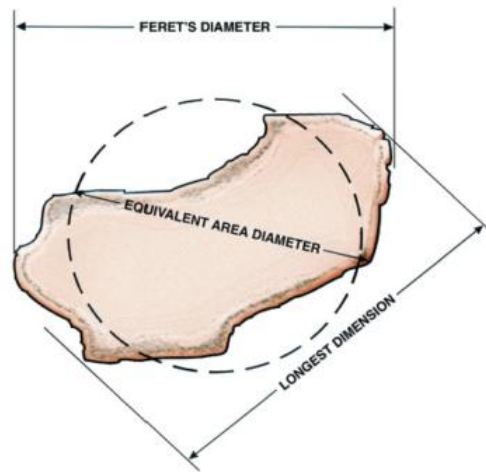


Figure 12 : Différentes interprétations de la taille d'une particule non sphérique (Particle Measuring Systems, 2011)

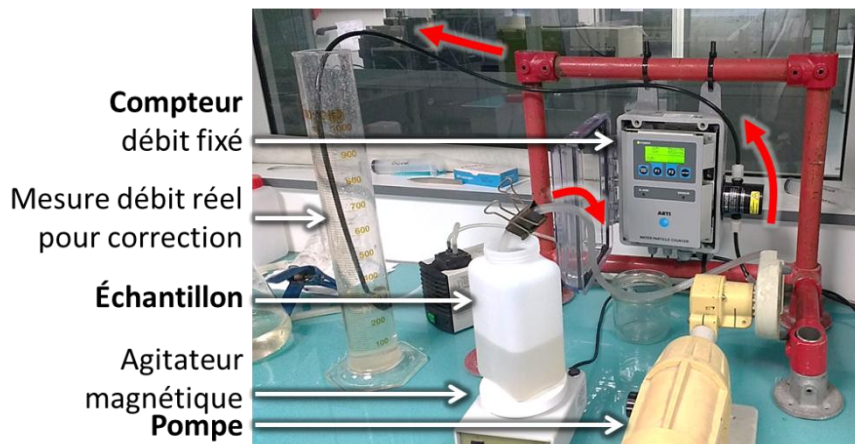


Figure 13 : Montage expérimental pour la mesure de la distribution granulométrique des particules d'un échantillon. Les flèches rouges indiquent l'écoulement de l'échantillon d'eau à analyser

3. Analyses microbiologiques : méthodes par culture

Les méthodes par cultures utilisées ont été précédemment décrites : il s'agit des méthodes Colilert-18 et Enterolert-E (IDEXX) et des méthodes Compact Dry EC et ETC (HyServe). Pour l'ensemble des conditions, les consommables jetables sont stériles et les consommables réutilisables sont préalablement stérilisés par autoclavage à 121°C (pression relative de 1,02 bar) pendant 20 minutes. L'eau stérile utilisée pour les dilutions et la préparation des milieux de culture est obtenue à partir d'eau osmosée autoclavée dans les mêmes conditions.

Pour chaque condition, un prélèvement de 100 mL d'échantillon est réalisé dans chacun des six béchers du jar-test. Après homogénéisation, une partie de ce volume est filtrée à l'aide d'un filtre seringue avec une membrane en acétate de cellulose d'une porosité de 5 µm (Ministart NML, Sartorius). Si une dilution est nécessaire, elle est effectuée en suivant le protocole présenté dans la Figure 14. Les mêmes dilutions sont appliquées pour les échantillons filtrés et non filtrés, sauf pour la condition B (Tableau 12). La méthode Compact Dry EC n'a pas pu être utilisée pour la condition B pour cause de rupture de stock au niveau du fournisseur.

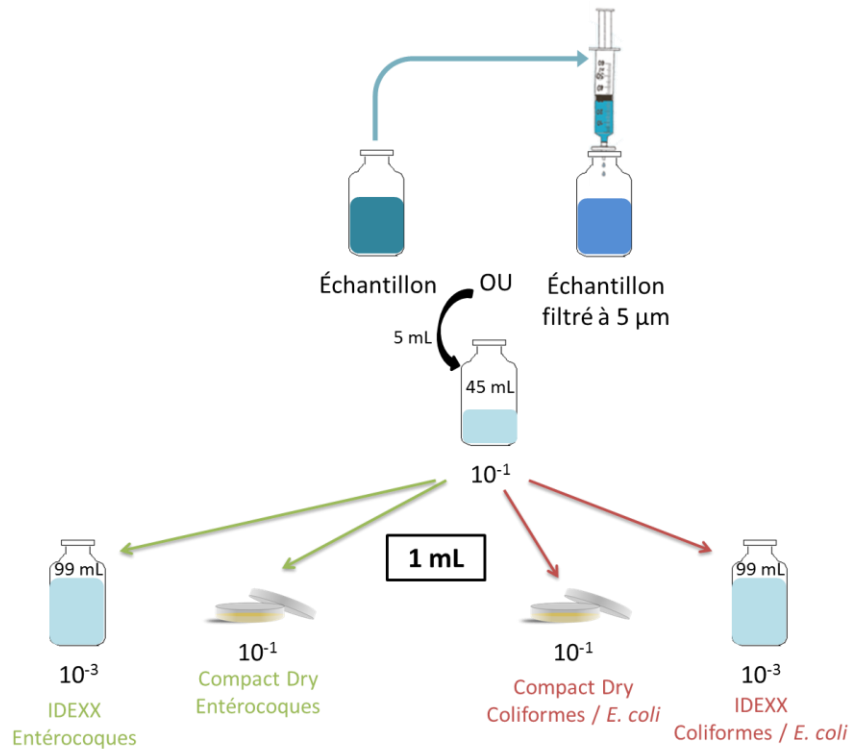


Figure 14 : Exemple de protocole de dilution des échantillons avant mise en culture pour la condition C. Les puissances correspondent aux coefficients de dilution

Tableau 12 : Facteurs de dilution appliqués pour les méthodes par culture et pour les trois conditions réalisées

	Coliformes / <i>E. coli</i>		Entérocoques	
	IDEXX	Compact Dry	IDEXX	Compact Dry
Condition A	10^{-3}	10^{-1}	10^{-2}	10^0
Condition B	10^{-3}	/	10^{-2}	10^{-1} (NF) / 10^0 (F)
Condition C	10^{-3}	10^{-1}	10^{-3}	10^{-1}

4. Analyses microbiologiques : PCR quantitative

Les analyses par PCR quantitative sont réalisées pour deux indicateurs : les entérocoques et *Escherichia coli*.

a. Extraction et purification de l'ADN

Cette étape est importante car elle doit permettre l'extraction de l'ensemble de l'ADN présent dans l'échantillon et sa purification pour éviter les interférences pendant la PCR. Il faut également choisir une méthode d'extraction qui permette de récupérer une quantité d'ADN cible suffisante pour être quantifiée. Les étapes d'extraction et de purification peuvent être réalisées simultanément par des kits commerciaux. Le kit choisi est le kit QIAamp DNAMicro de Qiagen. Les principales étapes du protocole d'extraction sont les suivantes (le protocole complet est présenté en Annexe A) :

- filtration de 20 mL (conditions A et B) ou 5 mL (condition C) d'échantillon sur un filtre seringue en polycarbonate de pore 0,2 μm (Nucleopore, Whatman)
- dissolution du filtre
- ajout d'une solution d'enzyme lysozyme (20 mg/L) et incubation pendant 30 min à 37°C : cette étape permet d'hydrolyser les parois résistantes des bactéries Gram-positives
- Ajout de l'enzyme protéinase K et du tampon, et incubation à 56°C pendant 30 min, puis à 95°C pendant 15 min
- ajout de 50 μL d'éthanol (96 – 100%),
- purification de l'ADN sur une colonne de silice, élution dans un volume de 30 μL

Le volume filtré est de 5 mL au lieu de 20 mL pour la condition C car l'effluent étudié dans cette condition est plus chargé en MES. Le risque est donc de colmater le filtre et de ne pas récupérer la totalité de l'ADN de l'échantillon. Pour toutes les conditions, l'extraction est réalisée dans les deux heures après la prise d'échantillon. Après extraction, l'ADN est stocké à -20°C pour analyse ultérieure.

b. Mesure de la quantité d'ADN extraite

La quantité d'ADN dans un échantillon est directement proportionnelle à l'absorbance à 260 nm : une unité d'absorbance à 260 nm (pour une largeur de cuve de 1 cm) correspond à une concentration en ADN de 50 ng/ μL (Kieleczawa, 2006; Thermo Scientific, 2008). La quantité d'ADN dans les échantillons après extraction est donc

estimée grâce à un spectrophotomètre (Nanodrop 2000/C, Thermo Scientific). Ce spectrophotomètre permet de réaliser les mesures avec seulement 1 μ L d'échantillon (l'absorbance est ramenée à une largeur de cuve de 1 cm). Il donne également une estimation de la pureté de l'ADN extrait avec deux ratios (Thermo Scientific, 2008) :

- A260/A280 : indicateur de la contamination par des protéines. Dans l'idéal ce ratio est proche de 1,8.
- A260/A230 : indicateur de la contamination par des molécules organiques comme les phénols. Dans l'idéal ce ratio est proche de 2.

c. Choix des séquences amplifiées et cycles d'amplification

Le choix a été fait pour cette étude de travailler en PCR simple, c'est-à-dire en séparant les amplifications pour *E. coli* et pour les entérocoques. Cela évite les interférences possibles dans le choix des séquences amplifiées et dans la conception des amorces et des sondes. Les sondes choisies dans cette étude sont des sondes classiques par hydrolyse (également connues sous le nom de sondes TaqMan). Ce type de sonde est constitué d'une séquence d'acides nucléiques complémentaire à une partie de la séquence d'ADN à amplifier. Un fluorophore est attaché de manière covalente au niveau de l'extrémité 5' de la sonde et un quencher est attaché de la même façon à l'extrémité 3' (Figure 15). Le quencher inhibe la fluorescence émise par le fluorophore lorsqu'il est excité par une source de lumière. Lors de la phase d'élongation et de polymérisation de la séquence complémentaire à la séquence à amplifier, la polymérase dégrade la sonde déjà hybridée au brin d'ADN. Le fluorophore et le quencher se retrouvent donc séparés et il y a émission de fluorescence de façon directement proportionnelle à la quantité d'ADN cible présente (Bustin, 2004 et Figure 15).

L'hybridation spécifique des amorces et des sondes est essentielle pour une bonne réussite de la qPCR. La conception des sondes doit par ailleurs prendre en compte les prescriptions suivantes (Bustin, 2004) :

- l'extrémité 5' de la sonde doit être proche de l'extrémité 3' de l'amorce correspondante pour s'assurer d'une hydrolyse rapide de la sonde,
- la séquence ne doit pas être trop importante (30 nucléotides maximum),
- éviter d'avoir un nucléotide guanine (G) à l'extrémité 5' de la sonde qui pourrait provoquer une interférence du même type que le quencher,
- éviter la succession de plus de 4 nucléotides identiques (surtout G),
- la température de fusion (T_m) de la sonde doit être de 10°C supérieure à la T_m des amorces, habituellement entre 68 et 70°C. Ainsi on s'assure que l'hybridation des sondes sera effectuée avant l'élongation du brin complémentaire à partir des amorces.

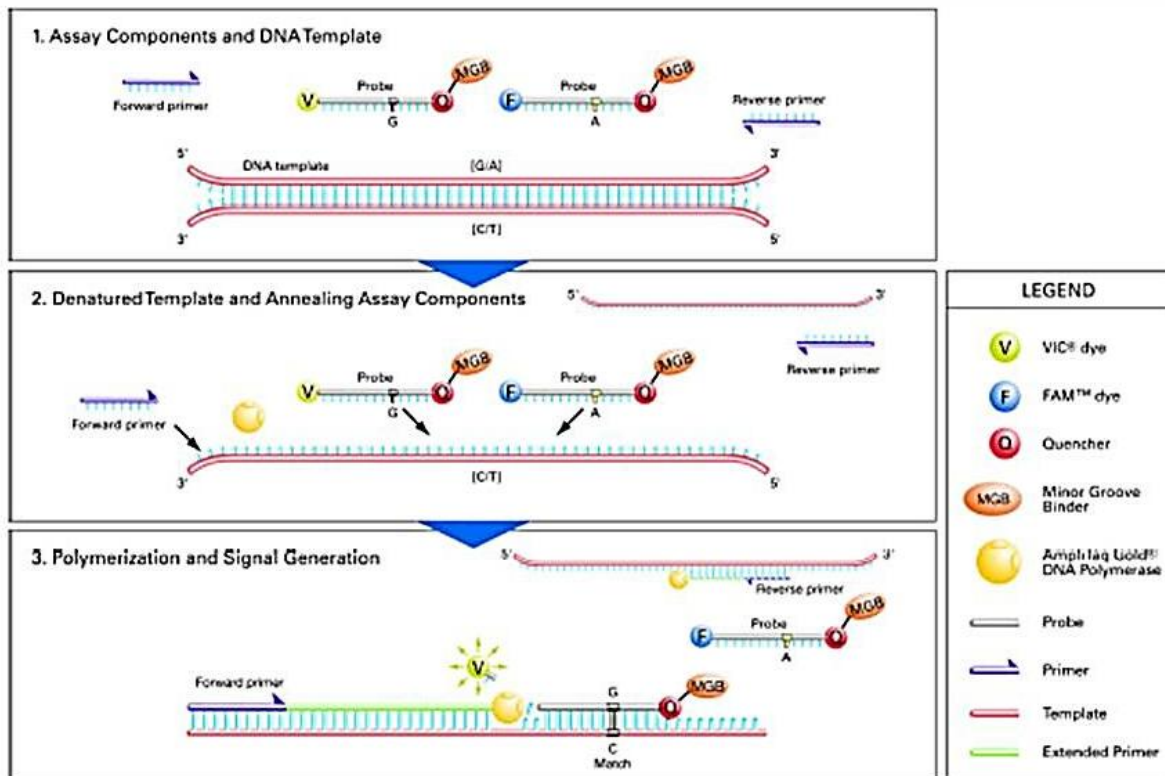


Figure 15 : Principe de la PCR avec hydrolyse des sondes (VIC et FAM sont des fluorophores) (DNA Vision, 2016)

Pour cette étude, les analyses par PCR quantitative sont basées sur le gène *uidA* pour *E. coli* car la fonction ciblée est la même que l'activité enzymatique ciblée par les méthodes par culture. Pour les entérocoques, la séquence du gène spécifique codant pour l'ARNr 23S (Frahm & Obst, 2003) a été retenue (Tableau 8). Les amorces et les sondes retenues sont celles utilisées par Frahm & Obst (2003) qui ont vérifié leur spécificité. Elles sont présentées dans le Tableau 13. Les amorces et sondes sont fournies par Eurofins Genomics sous forme déshydratée. Après réhydratation, chaque solution d'amorce est répartie dans des aliquotes de 10 µL (correspondant à 1 nmol d'amorce) et conservée à -80°C. Les solutions de sondes sont réparties dans des aliquotes de 5 µL (correspondant à 0,5 nmol d'amorce) et conservées à -80°C. Avant utilisation, les solutions d'amorces sont diluées à 1/20 (10 µL dans 190 µL), tout comme les solutions de sondes (5 µL dans 95 µL). Les dilutions sont réalisées avec de l'eau ultrapure.

Tableau 13 : Amorces et sondes utilisées dans le cadre des qPCR pour la quantification d'*E. coli* et des entérocoques. Pour les sondes, les fluorophores sont en couleur et les quenchers en gris (T_m : température de fusion).

Microorganisme	Gène	Type	Séquence	Concentration (nmol/L ou nM)	T _m (°C)
<i>Escherichia coli</i>	<i>uidA</i>	Amorce (forward)	5'-GTG TGA TAT CTA CCC GCT TCG C-3'	900	61,7
		Amorce (reverse)	5'-AGA ACG GTT TGT GGT TAA TCA GGA-3'	300	61,7
		Sonde	5'- Cy5 -TCG GCA TCC GGT CAG TGG CAG T-BHQ2-3'	200	71,9
Entérocoques	ARNr 23S	Amorce (forward)	5'-AGA AAT TCC AAA CGA ACT TG-3'	200	53,1
		Amorce (reverse)	5'-CAG TGC TCT ACC TCC ATC ATT-3'	300	55,4
		Sonde	5'- Rox -TGG TTC TCT CCG AAA TAG CTT TAG GGC TA-TAM-3'	360	67,2

Les compositions des mélanges pour les amplifications sont présentées dans le Tableau 14. Le PCR Mix est une solution prête à l'emploi contenant l'ADN polymérase, les bases azotées (dNTPs) et autres composés nécessaires à l'amplification (GoTaq Probe qPCR Master, Promega). Les amplifications sont réalisées par un thermocycleur qui permet également la mesure de fluorescence à chaque cycle (Rotor-Gene 6000, Corbett Research). La dénaturation de l'ADN est tout d'abord réalisée à 95°C pendant 3 minutes, puis 40 cycles d'amplification sont lancés. Chaque cycle comprend une phase de dénaturation à 95°C pendant 15 secondes puis une phase d'amplification à 60°C pendant 1 minute avec mesure de la fluorescence. Le résultat brut pour chaque échantillon est le C_T, c'est-à-dire le nombre de cycles nécessaire pour atteindre un seuil de fluorescence prédéfini. Plus la quantité d'ADN cible dans l'échantillon est importante, plus le C_T est faible. Une gamme d'étalonnage est nécessaire pour convertir ce C_T en quantité d'ADN cible. Chaque échantillon est amplifié en triplicat.

Tableau 14 : Composition des mélanges pour les amplifications

	Volume (µL)	
	<i>E. coli</i>	Entérocoques
Échantillon	2	2
Amorce F	1,2	0,8
Amorce R	(¾ F et ¼ R)	1,2
Sonde	0,8	1,44
PCR Mix	10	10
Eau ultrapure	6	4,56
TOTAL	20	20

d. Préparation des gammes d'étalonnage

Pour chaque indicateur choisi, l'établissement d'une gamme étalon est nécessaire pour relier le C_T au nombre de copies de l'indicateur initialement présentes dans l'échantillon. Cette gamme d'étalonnage est réalisée à partir de cultures pures représentatives de chaque indicateur. Les souches choisies sont des souches certifiées ATCC (American Type Culture Collection) : il s'agit de la souche *Escherichia coli* ATCC 15597, et de la souche *Enterococcus faecalis* ATCC 19433 pour les entérocoques (Fisher Scientific). Le protocole d'établissement de la gamme d'étalonnage est le suivant :

- à partir d'un inoculum en fin de phase exponentielle stocké pendant moins de 24h, mise en culture dans 10 à 12 mL de milieu approprié : bouillon Luria-Bertani (LB) pour *E. coli* et bouillon Rothe pour *E. faecalis* (CONDA Microbiologie). Incubation à 37°C jusqu'à la phase de croissance exponentielle
- prélèvement de 1 mL pour mise en culture sur plaques (Compact Dry EC et ETC) après dilution pour vérification des souches
- centrifugation à 5000 G pendant 10 minutes
- remise en suspension du culot avec la solution de lysozyme et poursuite du protocole d'extraction précédemment décrit : l'extraction est réalisée dans un volume de 100 μ L
- quantification de l'ADN au Nanodrop
- dilution en série de l'ADN (10^0 à 10^{-8}) : 2 μ L dans 18 μ L d'eau ultrapure
- amplification des dilutions : voir protocole précédemment décrit

L'intégrité de l'ADN extrait est vérifiée par électrophorèse sur gel (tampon Tris-EDTA avec 1% d'agarose). Un tampon de charge est ajouté aux échantillons. Après migration, les échantillons sont marqués au bromure d'éthidium (BET).

Les dilutions et leur amplification sont réalisées en triplicat et en même temps que l'amplification des échantillons. La quantité d'ADN extraite pour chaque souche est convertie en nombre de copies de la souche testée en se basant sur les informations suivantes :

- taille du génome de la souche *E. coli* ATCC 15597 : 4670 Kb (Kilobase, équivalent à 1000 paires de bases d'ADN) (Smith et al., 1987)
- taille du génome de la souche *E. faecalis* ATCC 19433 : 3020 Kb (Oana et al., 2002)
- 1 nanogramme d'ADN équivaut à 978.10^6 Kb (Bustin, 2004)

Ainsi le nombre de copies du microorganisme indicateur cible est donné par la relation suivante :

$$\text{Nombre de copies par } \mu\text{L} = \frac{C_{ADN \text{ extrait}}(\text{ng}/\mu\text{L}) \times 978.10^6}{\text{Taille du génome (Kb par copie)}} \quad (7)$$

La gamme d'étalonnage permet de relier le C_T au nombre de copies de l'indicateur recherché par unité de volume d'extraction pour chaque échantillon. Il faut ensuite prendre en compte le facteur de dilution lié à l'extraction pour obtenir la concentration dans l'échantillon de départ (en nombre de copies par mL) :

$$N (\text{copies par mL}) = N_{\text{extraction}}(\text{copies par } \mu\text{L}) \times \frac{\text{Volume d'extraction } (\mu\text{L})}{\text{Volume échantillon (mL)}} \quad (8)$$

Le facteur de dilution à prendre en compte est donc de 1,5 (30/20) pour les conditions A et B et de 6 (30/5) pour la condition C.

5. Traitement des données

L'exploitation des résultats et l'établissement des courbes d'étalonnage pour la PCR sont réalisés avec le logiciel fourni avec le thermocycleur (Rotor-Gene 6000 Series Software v1.7, Corbett Research). La mise en forme et le traitement statistique du reste des données sont réalisés sous Excel 2010 (Microsoft) et à l'aide du logiciel XLSTAT Base v18.07 (Addinsoft).

La distribution des échantillons est représentée sous forme de boîtes à moustaches (box plot). Cette représentation permet de visualiser simultanément plusieurs éléments comme la moyenne, la médiane, le premier (Q1) et le troisième (Q3) quartile de la distribution (Figure 16). Les valeurs minimum et maximum sont représentées par des points bleus. L'extrémité de la moustache inférieure est la valeur minimum dans les données qui est supérieure à l'indice : $Q1 - 1,5 \times (Q3 - Q1)$. L'extrémité de la moustache supérieure est la valeur maximum dans les données qui est inférieure à l'indice : $Q3 + 1,5 \times (Q3 - Q1)$ (Figure 16).

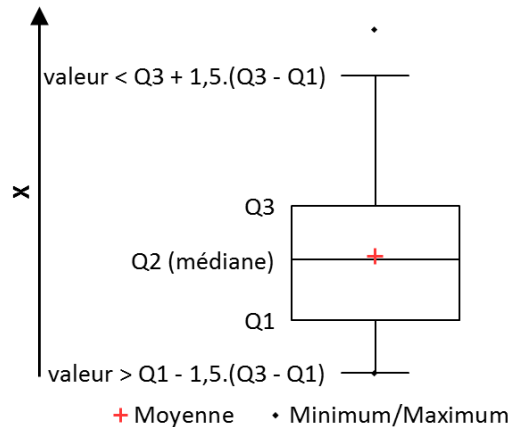


Figure 16 : Représentation de la distribution des données d'un échantillon sous forme de boîte à moustaches ou box plot

Plusieurs tests statistiques peuvent être utilisés pour mettre en évidence une différence significative entre des échantillons. Dans cette étude, seuls des tests non paramétriques sont utilisés du fait du faible nombre de données disponibles par échantillon ($N \leq 12$). Lorsque le nombre d'échantillons à comparer est supérieur à 3 et que les distributions sont indépendantes, le test de Kruskal-Wallis est utilisé et les différences par paires sont testées par la procédure de Conover-Iman avec la correction de Bonferroni. Lorsque le nombre d'échantillons à comparer est inférieur ou égal à 3, des comparaisons deux à deux sont privilégiées. Si les échantillons sont indépendants, le test de Mann-Whitney est utilisé. Si les échantillons sont appariés (c'est-à-dire si les mesures de chaque distribution sont liées), on utilise un test de Wilcoxon signé. Dans tous les cas, l'hypothèse nulle H_0 est l'absence de différence entre les distributions et l'hypothèse alternative H_a est la différence entre les distributions. Chaque test mesure la probabilité p de rejeter H_0 alors qu'elle est vraie. Le seuil de significativité retenu est 0,05 : si $p < 0,05$ on doit rejeter H_0 et retenir H_a .

IV. Résultats

1. Caractérisation physico-chimique des effluents

a. Paramètres globaux

Les résultats de caractérisation après mélange des effluents sont présentés dans le Tableau 15 pour les paramètres MES, turbidité et transmittance UV à 254 nm. La concentration en MES et la turbidité augmentent linéairement avec le pourcentage de boues ajouté à l'effluent secondaire ($R^2 = 0,99$ et $0,98$ respectivement). De même la transmittance UV à 254 nm baisse linéairement ($R^2 = 0,98$).

Tableau 15 : Caractérisation des effluents étudiés pour les paramètres MES, turbidité et transmittance UV (TUV) à 254 nm. Valeurs médianes sur six réplicats (les écarts-types sont indiqués entre parenthèses).

Paramètre	Unité	Condition A	Condition B	Condition C
MES	mg/L	4,9 (1,1)	28,0 (0,6)	66,4 (2,5)
Turbidité	NTU	1,0 (0,1)	11,7 (1,6)	38,0 (0,5)
TUV 254 nm	%	68,1 (0,1)	58,2 (1,3)	52,0 (1,2)

b. Distribution granulométrique des particules

Dans les eaux usées, il a été montré que le nombre de particules augmente quand le diamètre des particules décroît. La distribution granulométrique des particules suit donc une loi de puissance qui peut être exprimée de la façon suivante après linéarisation (Asano et al., 2007; Kavanaugh et al., 1980) :

$$\log \frac{\Delta N}{\Delta(d_{pi})} = \log A - \beta \cdot \log(d_p) \quad (9)$$

Avec :

d_p : diamètre moyen des particules entre deux canaux de comptage (μm)

ΔN : concentration en particules dans l'intervalle entre deux canaux de comptage (nombre/mL)

$\Delta(d_{pi})$: intervalle de taille entre deux canaux de comptage (μm)

A, β : constantes empiriques

Pour chaque condition, la régression linéaire $\log(\Delta N/\Delta(d_{pi})) = f(\log(d_p))$ a été calculée à partir de la distribution granulométrique moyenne issue des six réplicats mesurés.

Les constantes A et β ont été déterminées et sont présentées dans le Tableau 16. La constante $\log(A)$ diminue avec l'ajout de boues dans l'effluent secondaire (conditions B et C). De même, la constante β diminue et sa valeur est proche de 1 pour une teneur en MES de 66 mg/L (condition C).

Tableau 16 : constantes A et β issues des distributions granulométriques observées pour les trois conditions (valeurs moyennes sur six réplicats)

	Condition A	Condition B	Condition C
log (A)	4,19	3,55	3,16
β	2,37	1,55	1,05
R²	0,99	0,98	0,96

La distribution granulométrique peut être représentée graphiquement de plusieurs façons. La Figure 18a présente la concentration des particules (en quantité par unité de volume) en fonction de leur diamètre équivalent (chaque particule est modélisée sous forme sphérique). L'ajout d'une quantité faible de boues (condition B) entraîne une augmentation de la concentration en particules de taille supérieure à 5 μm mais également une diminution de la quantité de particules de petite taille (2 à 5 μm). Globalement, la quantité de particules reste équivalente à celle de l'effluent secondaire seul (condition A). Les mêmes tendances sont observées lorsque la quantité de boues ajoutée est doublée (condition C), mais avec une augmentation plus importante des particules de taille comprise entre 25 et 100 μm . La quantité de particules de taille supérieure ou égale à 100 μm est égale en moyenne à 211 particules/mL pour cet effluent, contre 49 particules/mL pour la condition B et 4 particules/mL pour la condition A.

Ces observations sont confirmées par la distribution granulométrique relative des particules (en pourcentage de la quantité totale de particules par unité de volume) (Figure 18b). Plus la quantité de boues ajoutée augmente, plus la proportion de petites particules (de taille inférieure à 5 μm) diminue au bénéfice des particules de plus grande taille. Cependant la proportion de particules de taille comprise entre 5 et 25 μm reste stable à environ 50 % des particules lorsque des boues sont ajoutées, quelle que soit la quantité. C'est la proportion de particules de taille supérieure ou égale à 25 μm qui augmente de façon proportionnelle à la quantité de boues ajoutée à l'effluent secondaire.

Même si la proportion de particules de taille supérieure ou égale à 100 μm reste faible (4 % du total des particules pour la condition C), le volume occupé par ces particules est très important. La Figure 18c présente la distribution relative du volume occupé par les particules en fonction de leur taille. Le volume est calculé à partir du

diamètre moyen des particules dans l'intervalle de taille considéré (les particules de taille supérieure à 100 µm sont assimilées à des particules sphériques de diamètre 100 µm). Globalement les particules de taille supérieure ou égale à 25 µm sont celles qui influencent le plus le volume occupé par les matières en suspension (Figure 18c). C'est pourquoi la concentration en particules de cette taille est bien corrélée avec les indicateurs globaux de pollution particulaire pour les effluents considérés (Figure 17).

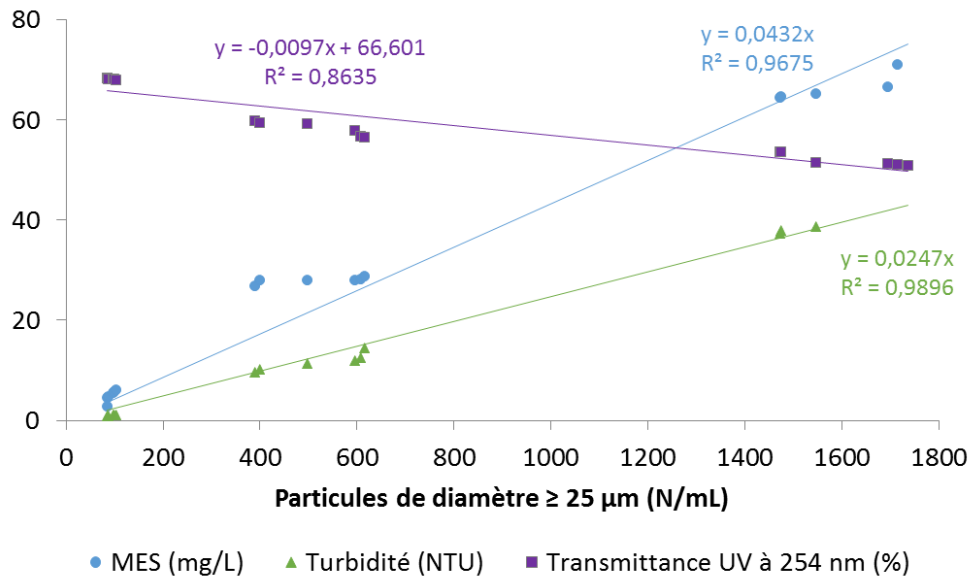


Figure 17 : Corrélations linéaires entre la concentration en particules de taille supérieure ou égale à 25 µm et les paramètres MES, turbidité et transmittance UV à 254 nm. Les données sont regroupées pour les trois effluents étudiés.

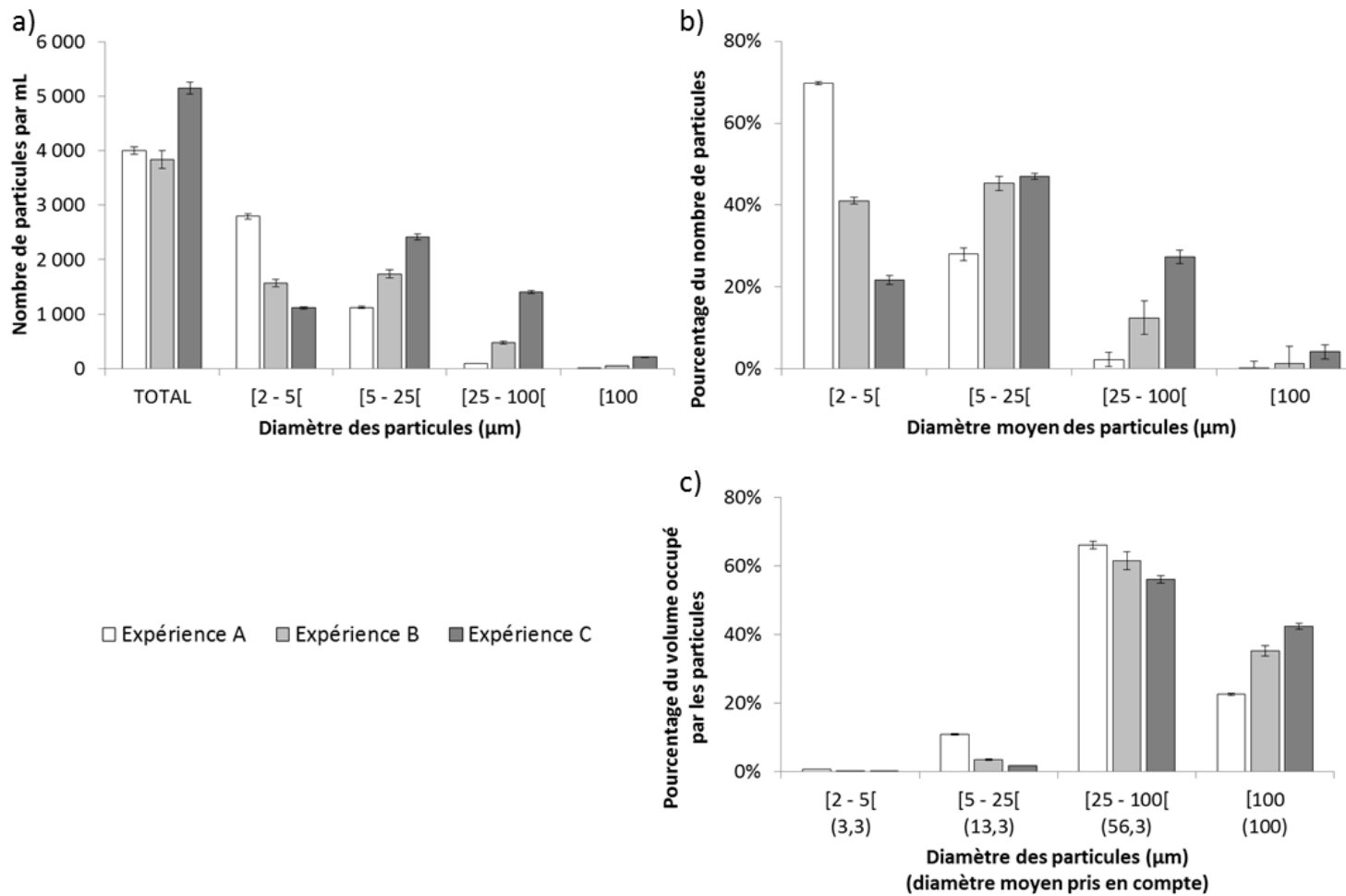


Figure 18 : Représentation graphique de la distribution granulométrique des particules pour les trois effluents étudiés (moyennes sur six réplicats) : a) distribution absolue ; b) distribution relative en nombre de particules ; c) distribution relative en volume occupé

2. Extraction de l'ADN et étalonnage pour la PCR

a. Extraction de l'ADN : aspects quantitatifs et qualitatifs

Les quantités d'ADN obtenues après extraction sont présentées dans le Tableau 17 pour les échantillons (6 réplicats par type d'effluent) et pour les cultures des souches d'*Escherichia coli* et d'*Enterococcus faecalis* utilisées pour les gammes étalons. La quantification par IDEXX pour les cultures souches donne des valeurs de l'ordre de 10^8 NPP/mL. C'est pourquoi les quantités d'ADN extrait sont importantes, autour de 300 ng/mL. Les valeurs des ratios A260/A280 et A260/A230 sont proches de 2 et ne mettent pas en évidence une contamination par les protéines ou autres molécules.

Afin de s'assurer de l'intégrité de l'ADN extrait pour les cultures souches, une électrophorèse sur gel d'agarose est réalisée. La molécule d'ADN étant chargée négativement, elle migre vers la cathode lorsque qu'un courant électrique est appliqué. La vitesse de migration est proportionnelle à la taille des fragments d'ADN présents. La Figure 19 présente le résultat de la migration pour les deux cultures souches étudiées. Seule une bande par souche est observée, ce qui signifie que l'ADN n'est pas dégradé. Pour les deux souches étudiées, l'ADN extrait est donc intègre et aucune contamination par un autre ADN n'est observée *a priori*.

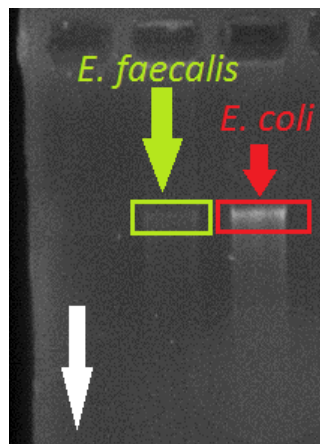


Figure 19 : Electrophorèse de l'ADN extrait issu des deux souches étudiées. Migration sur gel d'agarose 1 % et coloration de l'ADN au BET. La flèche blanche indique le sens de migration.

Les quantités d'ADN obtenues à partir des effluents étudiés sont plus faibles (Tableau 17). Pour les échantillons non filtrés, la quantité d'ADN extraite augmente avec la teneur en matières en suspension des effluents. Pour les échantillons filtrés, la

quantité d'ADN extraite est équivalente entre les conditions A et B (7 à 8 ng/mL) et elle est un peu plus importante pour la condition C (environ 20 ng/mL). Le rapport de la quantité d'ADN extrait entre les échantillons non filtrés et les échantillons filtrés à 5 µm est égal à 1,0 pour la condition A, à 4,7 pour la condition B et à 10,4 pour la condition C (valeurs moyennes). L'augmentation de ce rapport est directement proportionnelle avec la teneur en MES dans l'effluent ($R^2 = 0,99$).

Les valeurs du ratio A260/A280 sont proches de 1,8 pour les conditions B et C et plus faibles pour la condition A. Cela peut s'expliquer par la faible quantité d'ADN obtenue pour cette condition. Les ratios A260/A280 sont faibles (0,5 à 1) pour toutes les conditions, ce qui pourrait indiquer une contamination par des molécules organiques. Ces faibles ratios ont déjà été observés sur des eaux de process, sans impact significatif sur l'amplification surtout si celle-ci est spécifique (Thermo Scientific, 2008).

Tableau 17 : Résultats quantitatifs et qualitatifs de l'extraction d'ADN mesurés par spectrophotométrie pour les cultures de souches (pas de réplicat) et pour les effluents étudiés (six réplicats, Moy. : moyenne ; EC : écart-type). La concentration en ADN est exprimée par rapport au volume de l'échantillon avant extraction).

Matrice	[ADN] (ng/mL)		A260/A280		A260/A230	
	Moy.	EC	Moy.	EC	Moy.	EC
Culture <i>E. coli</i> n°1 (conditions A et B)	337	/	1,9	/	1,1	/
Culture <i>E. coli</i> n°2 (condition C)	1447	/	2,1	/	2,2	/
Culture <i>E. faecalis</i> (conditions A et B)	229	/	2,0	/	2,7	/
Culture <i>E. faecalis</i> n°2 (condition C)	271	/	2,2	/	2,8	/
Condition A <i>échantillons non filtrés</i>	8,7	3,8	1,3	0,2	0,5	0,2
Condition A <i>échantillons filtrés 5 µm</i>	8,4	3,1	1,1	0,5	0,3	0,1
Condition B <i>échantillons non filtrés</i>	36,4	14,3	1,7	0,1	0,9	0,5
Condition B <i>échantillons filtrés 5 µm</i>	7,7	2,6	1,5	0,1	0,5	0,2
Condition C <i>échantillons non filtrés</i>	187,4	32,1	1,7	0,3	0,9	0,5
Condition C <i>échantillons filtrés 5 µm</i>	17,9	1,7	1,6	0,1	0,2	0,0

b. Gammes d'étalonnage pour la qPCR

Comme les échantillons sont amplifiés séparément pour chaque condition, une gamme d'étalonnage est réalisée pour chaque condition et pour chacun des deux indicateurs. La Figure 20a présente un exemple de profil d'amplification pour une gamme d'étalonnage. Chaque échantillon est amplifié en triplicat, mais les réplicats aberrants ne sont pas pris en compte. Le seuil de fluorescence pour déterminer les C_T est défini automatiquement de manière à optimiser la droite d'étalonnage. Il doit être situé sur la phase de croissance exponentielle de la courbe d'amplification et être plus élevé que le bruit de fond tout en étant plus bas que le plateau de la courbe (Figure 20a).

La droite d'étalonnage correspondante est présentée en Figure 20b. Elle est de la forme $C_T = M.(C_{ADN}) + B$ où M et B sont des constantes. Dans une amplification idéale, la quantité d'ADN est doublée à chaque cycle d'amplification. Donc entre deux points de gamme optimale, si la concentration en ADN est multipliée par 10, le C_T est diminué de $\log_{(2)}(10) = -3,322$. L'efficacité E de la PCR, exprimée en pourcentage, est donc calculée par la formule (Bustin, 2004) :

$$E = (10^{(-1/M)}) - 1 \text{ avec } E = 1 \text{ si } M \approx -3,322 \quad (10)$$

Ainsi, la qualité de l'étalonnage peut être évaluée à la fois par le coefficient de détermination de la droite (R^2) et par l'efficacité de la PCR. Ces deux indices sont regroupés dans le Tableau 18. Les droites d'étalonnage pour l'ensemble des conditions sont présentées en Annexe B. Globalement la précision des gammes d'étalonnage est acceptable avec des coefficients de détermination supérieurs à 0,97 et des efficacités supérieures à 0,80.

Tableau 18 : Indices d'évaluation des gammes d'étalonnage de qPCR pour les indicateurs *E. coli* et entérocoques

	<i>Escherichia coli</i>		Entérocoques	
	E (%)	R^2	E (%)	R^2
Condition A	109	0,97	90	0,97
Condition B	96	0,98	82	0,99
Condition C	95	0,99	90	0,98

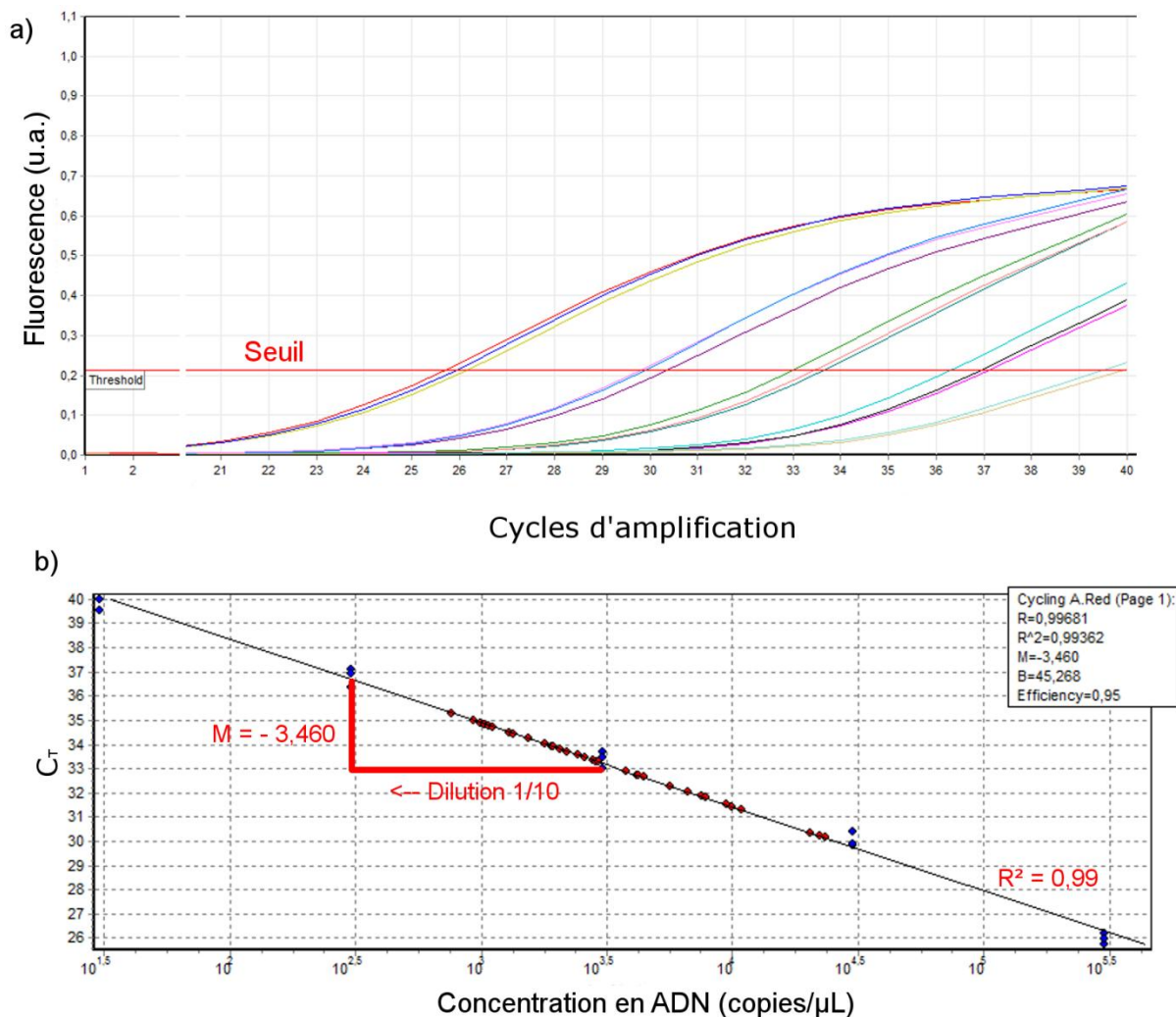


Figure 20 : Exemples de a) profil d'amplification et b) gamme d'étalonnage (points bleus) pour l'ADN extrait de la souche *E. coli*

3. Impact des matières en suspension sur la fiabilité des méthodes de quantification

a. Impact sur la quantification

Pour chaque condition, la qualité biologique des effluents est évaluée par trois indicateurs : *Escherichia coli*, coliformes et entérocoques. Les effluents sont analysés sans prétraitement ou après filtration à 5 μm. Trois méthodes de quantification sont utilisées : deux méthodes par culture (IDEXX et Compact Dry) et une méthode sans culture (qPCR). Pour cette dernière méthode, seuls les indicateurs *E. coli* et entérocoques sont évalués.

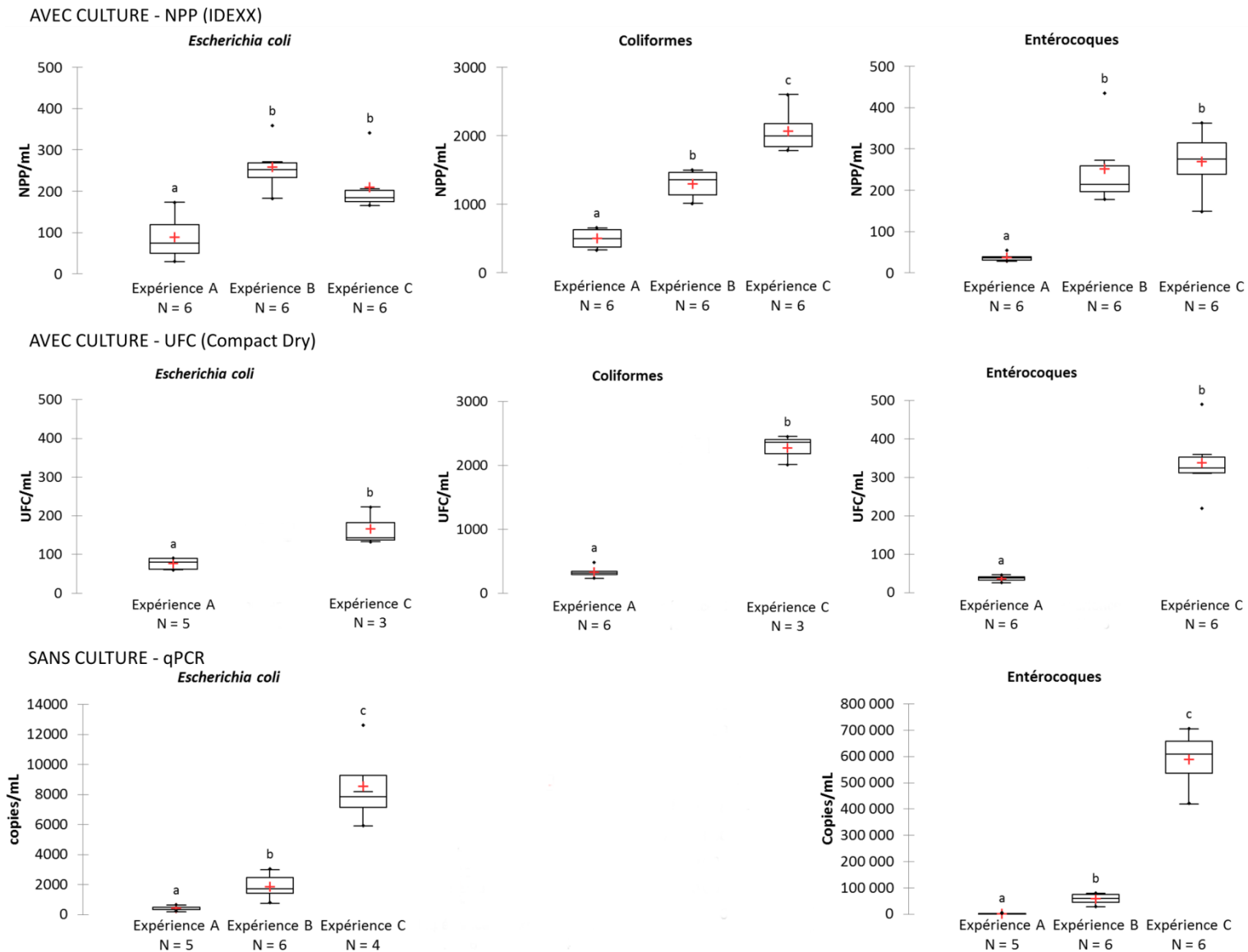


Figure 21 : Résultats de dénombrement pour les échantillons non filtrés. Les échantillons marqués par un exposant différent (a-c) pour un indicateur donné sont significativement différents les uns des autres (test de Mann-Whitney, $p < 0,05$)

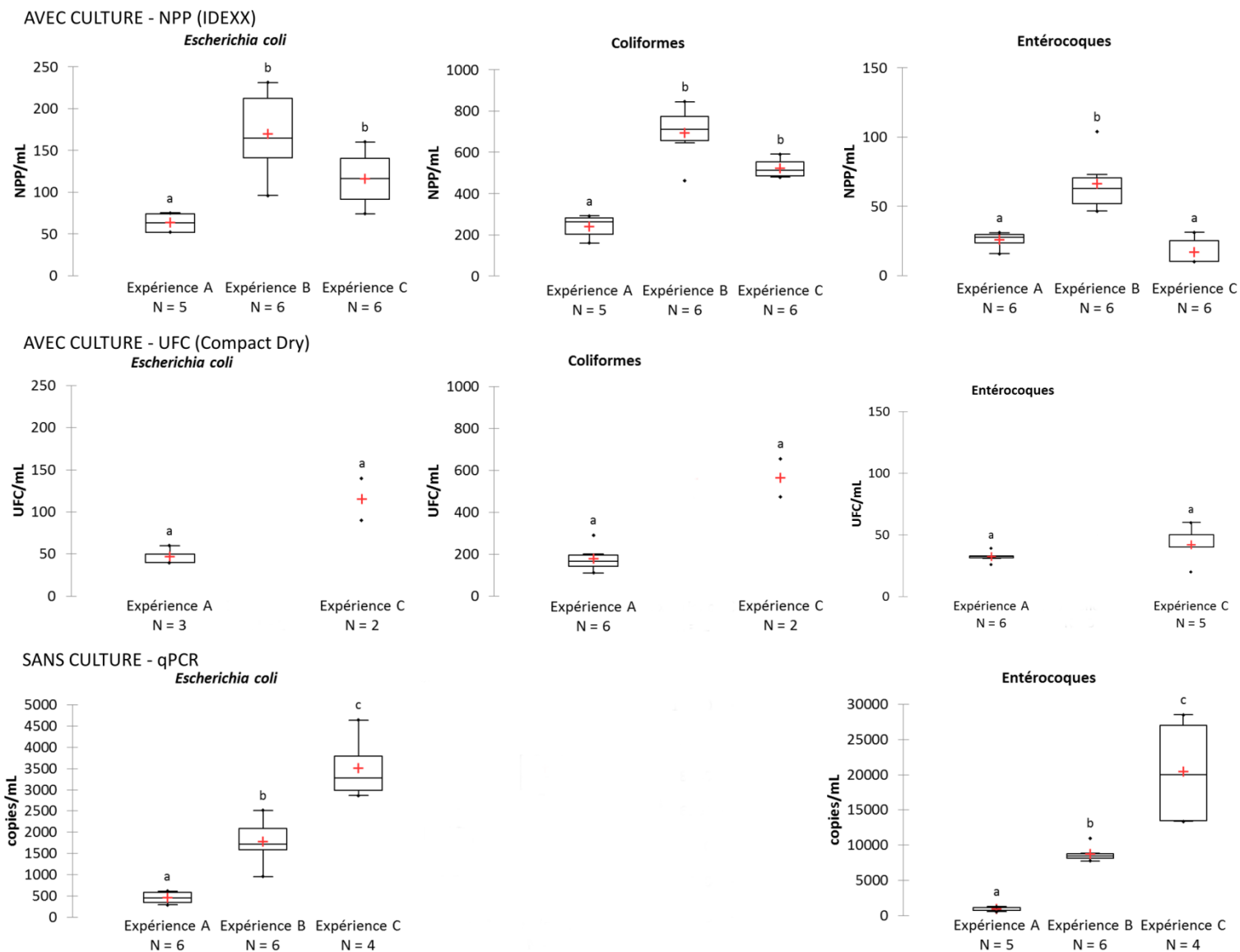


Figure 22 : Résultats de dénombrement pour les échantillons filtrés à 5 µm. Les échantillons marqués par un exposant différent (a-c) pour un indicateur donné sont significativement différents les uns des autres (test de Mann-Whitney, $p < 0,05$)

Les résultats de dénombrement pour les échantillons non filtrés sont présentés en Figure 21. Pour l'indicateur *Escherichia coli*, la teneur en microorganismes mesurée par la méthode IDEXX augmente d'un facteur 2 à 4 entre la condition A et la condition B, alors qu'il n'y a pas d'augmentation significative entre les conditions B et C. La méthode Compact Dry donne des résultats similaires, même s'il n'y a pas de données pour la condition B. Les résultats obtenus par qPCR et exprimés en nombre de copies du génome d'*E. coli* sont beaucoup plus élevés que les résultats des méthodes par culture exprimés en NPP ou en UFC. Cependant la même tendance est observée entre la condition A et la condition B : augmentation de la quantité de copies d'un facteur 2 à 5. La différence notable avec les méthodes par culture est qu'une augmentation du nombre de copies d'*E. coli* est observée entre les conditions B et C (d'un facteur 3 à 7).

Une augmentation de la teneur en entérocoques mesurée par les méthodes par culture est observée entre les conditions A et B (d'un facteur 3 à 7) (Figure 21). De la même façon que pour *E. coli*, il n'y a pas de différence significative entre les conditions B et C pour la méthode IDEXX. Les résultats obtenus par qPCR sont également beaucoup plus élevés que les résultats des méthodes par culture. Une augmentation importante du nombre de copies d'entérocoques est observée entre les conditions A et B (d'un facteur 14 à 30) et entre les conditions B et C (d'un facteur 10 environ) avec cette méthode de quantification.

La teneur en coliformes mesurée en NPP ou UFC augmente de façon proportionnelle à la quantité de MES dans l'effluent ($R^2 = 0,9$). Cet indicateur n'est pas mesuré par qPCR.

Les résultats de dénombrement par les méthodes par culture pour les échantillons filtrés à 5 μm sont globalement comparables aux résultats pour les échantillons non filtrés (Figure 22). Deux différences significatives peuvent néanmoins être soulignées :

- la teneur en coliformes mesurée par la méthode IDEXX reste stable entre les conditions B et C
- la teneur en entérocoques mesurée par la méthode IDEXX diminue également de façon significative entre les conditions B et C (test de Mann-Whitney, $p < 0,05$)

Concernant le dénombrement par qPCR, les mêmes tendances que pour les échantillons non filtrés sont observées, avec une augmentation du nombre de copies entre les conditions A et B (d'un facteur 3 à 4 pour *E. coli* et 8 à 14 pour les entérocoques) et entre les conditions B et C (d'un facteur 2 environ pour *E. coli* et pour les entérocoques) (Figure 22).

Il est possible de comparer le comptage des particules de diamètre supérieur à 5 µm à la différence des teneurs mesurées par PCR entre les échantillons non filtrés et les échantillons filtrés à 5 µm (Tableau 19). Pour *E. coli*, le rapport entre ces deux valeurs est proche de 0 pour les conditions A et B comme les teneurs des échantillons filtrés sont égales aux teneurs des échantillons non filtrés. Le nombre de particules de taille supérieure à 5 µm est proche du nombre de cellules d'*E. coli* retenu sur un filtre de porosité 5 µm dans l'effluent le plus chargé. Pour les entérocoques, la quantité de cellules ramenée au nombre de particules de taille supérieure à 5 µm augmente fortement avec l'ajout de boue dans l'effluent secondaire.

Tableau 19 : Rapport entre la quantité de cellules retenues sur un filtre de porosité 5 µm et la quantité de particules de taille supérieure à 5 µm (mesurée par compteur optique) pour les deux indicateurs et les trois effluents étudiés. Les ratios sont calculés à partir des moyennes des valeurs mesurées.

	<i>Escherichia coli</i>	Entérocoques
Condition A	≈ 0	0,95
Condition B	0,04	21,9
Condition C	1,3	141

b. Impact sur le rapport entre qPCR et méthodes par culture

Afin d'étudier les différences entre les deux méthodes par culture (IDEXX : NPP et Compact Dry : UFC), les couples de mesures sont présentés dans la Figure 23. Toutes les mesures sont regroupées pour l'ensemble des conditions et des indicateurs (échantillons filtrés et non filtrés). La droite de régression correspondante a une pente proche de 45° et un coefficient de détermination élevé ($R^2 = 0,9$). De plus, la comparaison des deux distributions avec un test de Wilcoxon signé (les échantillons sont appariés) confirme l'absence de différence significative ($p = 0,829 > 0,05$).

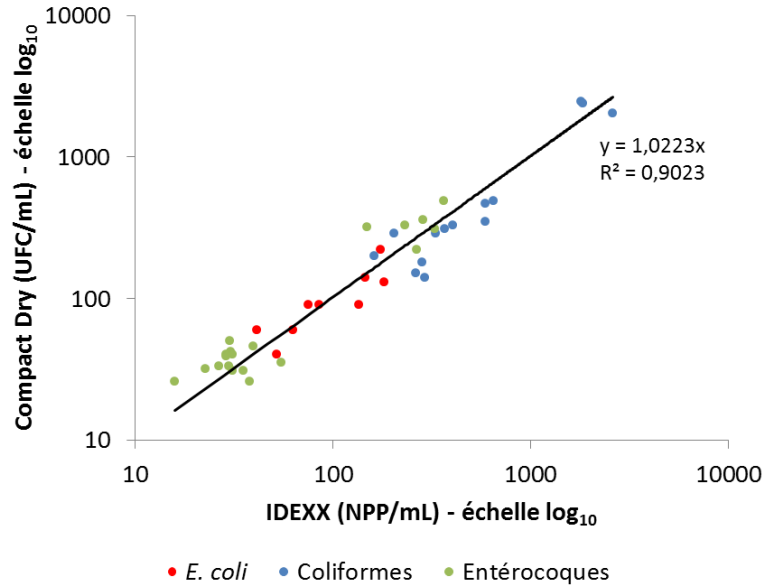


Figure 23 : Droite de régression entre les mesures avec la méthode IDEXX et la méthode Compact Dry. Le trait noir épais correspond à la régression sur l'ensemble des mesures (n = 46)

Le dénombrement par qPCR sur les mêmes échantillons donne des résultats significativement plus élevées, comme cela est montré dans le paragraphe précédent. Un ratio entre la valeur mesurée par qPCR et la valeur mesurée par les méthodes par culture (IDEXX et Compact Dry regroupés) peut être calculé pour chaque échantillon. Ces ratios sont présentés en Figure 24. Pour *Escherichia coli*, le dénombrement par PCR est 3 à 9 fois plus élevé que par les méthodes par culture pour la condition A (Figure 24A). Ce ratio n'est pas significativement différent pour la condition B (test de Mann-Whitney, $p = 0,368 > 0,05$). Pour la condition C, le ratio augmente significativement avec des valeurs entre 30 et 70. Cette augmentation est en lien avec les observations du paragraphe précédent : entre les conditions B et C la teneur en *E. coli* mesurée par qPCR augmente, alors qu'elle reste stable si elle est mesurée par IDEXX (Figure 21). Les résultats pour les échantillons filtrés à 5 μm sont comparables (Figure 24B).

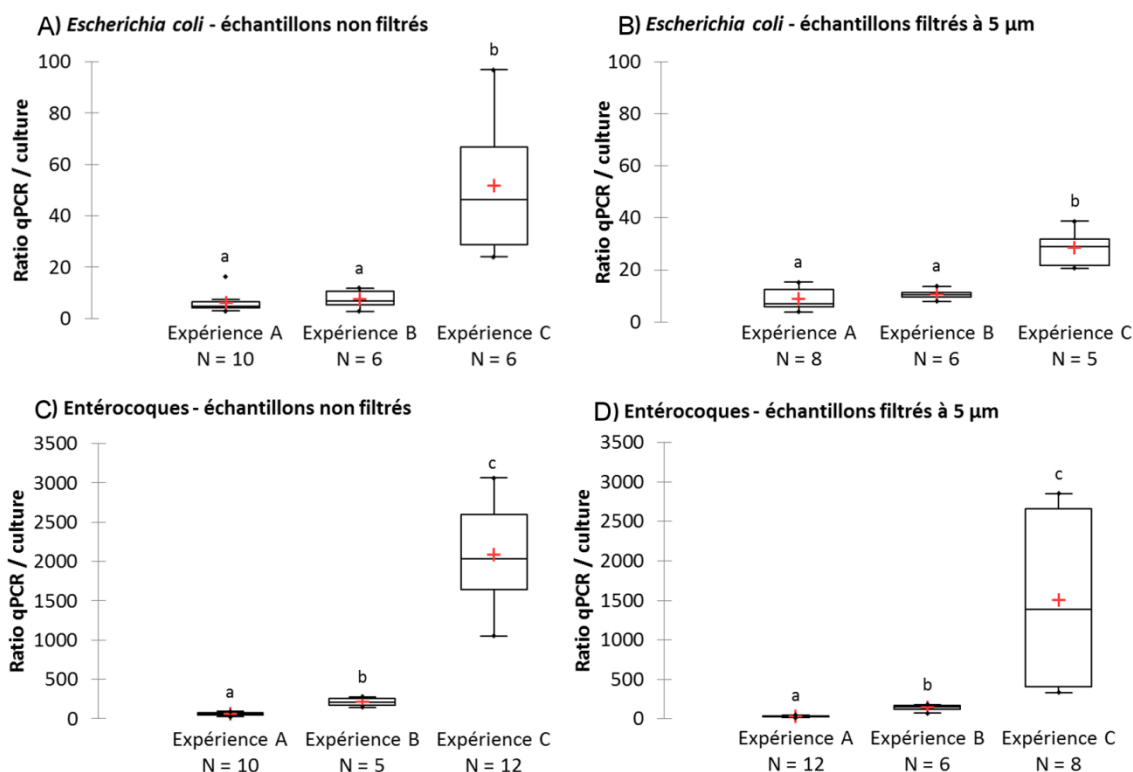


Figure 24 : Ratios entre les valeurs mesurées par qPCR et par les méthodes par culture pour les trois conditions et les indicateurs *E. coli* (A – échantillons non filtrés et B – échantillons filtrés à 5 µm) et entérocoques (C – échantillons non filtrés et D – échantillons filtrés à 5 µm). Les échantillons marqués par un exposant différent (a-c) pour un indicateur donné sont significativement différents les uns des autres (test de Mann-Whitney, $p < 0,05$).

Pour les entérocoques, le ratio entre les valeurs mesurées par qPCR et les valeurs mesurées par les méthodes par culture est compris entre 30 et 70 pour la condition A (Figure 24C). Ce ratio est multiplié par 4 pour la condition B, avec des valeurs comprises entre 120 et 260. Pour la condition C, le ratio qPCR/méthodes par culture est 8 à 10 fois plus important que pour la condition B (Figure 24C). Les résultats pour les échantillons filtrés à 5 µm sont comparables (Figure 24D). Comme pour *E. coli* ces observations s'expliquent par une augmentation de la teneur en entérocoques mesurée par qPCR tandis que les valeurs mesurées en IDEXX diminuent pour la condition C (Figure 21).

c. Impact sur le rapport entre les échantillons non filtrés et filtrés à 5 µm

La Figure 25 présente les rapports entre la valeur mesurée sur l'échantillon non filtré et la valeur mesurée sur l'échantillon filtré à 5 µm. Ce rapport est calculé à chaque condition pour les trois indicateurs et les trois méthodes étudiées. Pour *Escherichia coli*, aucune différence significative n'est observée entre les méthodes de quantification et entre les trois conditions (test de Kruskal-Wallis, $p = 0,086 > 0,05$). La valeur du rapport est proche de 1, ce qui indique que l'on n'observe pas de différence entre les échantillons non filtrés et filtrés, même après l'ajout de boues (conditions B et C).

Les valeurs du ratio entre échantillons non filtrés et filtrés pour les coliformes sont comprises entre 1 et 2 pour la condition A. Aucune différence n'est observée entre les méthodes de comptage par culture. La valeur mesurée par la méthode IDEXX pour la condition B est également dans cet ordre de grandeur. Pour la condition C, le ratio entre échantillons non filtrés et filtrés est doublé (Figure 25).

Concernant les entérocoques, la valeur du ratio entre les teneurs avant et après filtration à 5 µm est également proche de 1 pour la condition A. Le test de comparaison par paires de Conover-Iman avec la correction de Bonferroni ne met pas en évidence de différences significatives entre les trois méthodes de quantification pour cette condition. Pour la condition B, les ratios déterminés par qPCR sont significativement plus élevés que les ratios déterminés par IDEXX ($p < 0,001$). Pour la condition C, le rapport entre les échantillons non filtrés et filtrés à 5 µm est globalement plus important (valeurs comprises entre 10 et 30). Aucune différence significative n'est observée entre les ratios déterminés par IDEXX, Compact Dry, ou qPCR même si les valeurs déterminées avec cette dernière méthode sont légèrement plus élevées (Figure 25).

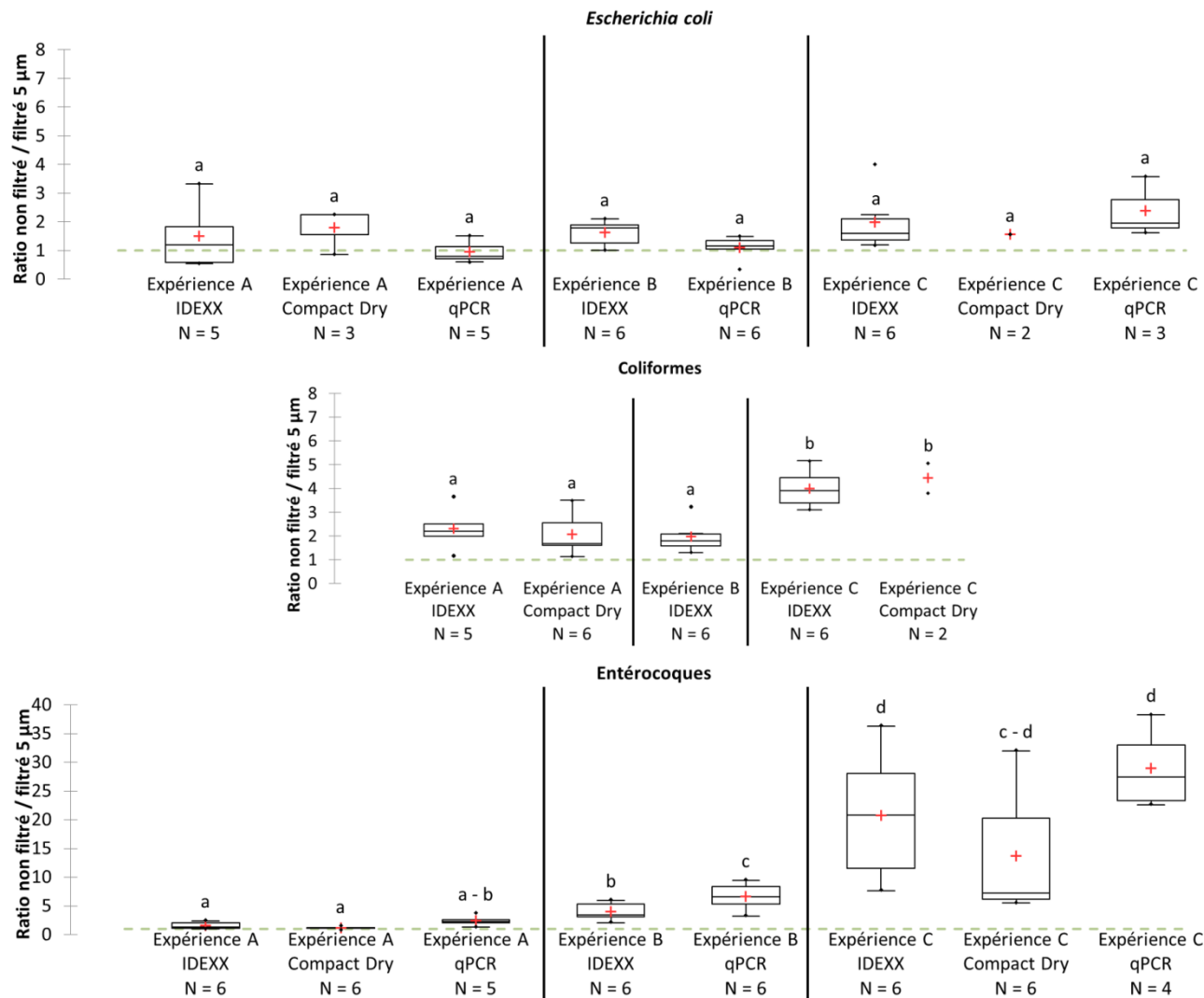


Figure 25 : Rapports entre les teneurs mesurées sur les échantillons non filtrés et les échantillons filtrés à 5 µm pour les trois indicateurs étudiés. Le trait vert en pointillés représente un ratio égal à 1. Les échantillons marqués par un exposant différent (a-c) pour un indicateur donné sont significativement différents les uns des autres (test de Kruskal-Wallis, suivi par la procédure de comparaison par paire de Conover-Iman avec correction de Bonferroni, $p < 0,05$).

V. Discussion

Pour étudier l'impact de la présence de particules sur le dénombrement des microorganismes par les méthodes par culture, une quantité plus ou moins importante de boues est mélangée à un effluent secondaire de station d'épuration. Cet effluent secondaire est caractérisé par une faible teneur en matières en suspension (MES), une faible turbidité et une transmittance UV à 254 nm proche de 70 % (condition A). L'ajout de boues à hauteur de 0,8 % du volume de l'effluent (condition B) permet d'atteindre une valeur en MES de l'ordre de 30 mg/L. De la même façon, l'ajout de boues à hauteur de 1,8 % du volume permet d'atteindre une valeur de l'ordre de 65 mg/L de MES. La turbidité et la transmittance UV évoluent également proportionnellement à la quantité de boues ajoutée.

La mesure de la distribution granulométrique de chaque effluent permet de caractériser de façon qualitative et quantitative l'apport en particules lié aux boues. Le calcul des coefficients A et β issus de ces distributions donne une indication sur la quantité et la répartition des particules. Une augmentation de la valeur de A traduit une augmentation globale du nombre de particules, tandis que le coefficient β est une mesure de la quantité relative de particules dans chaque catégorie de taille. Si β est inférieur à 1, la distribution est dominée par les grandes particules, tandis que si β est supérieur à 1, la distribution est dominée par les petites particules (Asano et al., 2007; Kavanaugh et al., 1980). Les valeurs pour les effluents étudiées montrent : 1) une diminution de la quantité globale de particules entre les conditions A et C (baisse du coefficient A) et 2) une augmentation du nombre de grosses particules avec l'ajout de boues dans l'effluent secondaire (le coefficient β diminue pour tendre vers 1).

De fait, la distribution granulométrique de l'effluent secondaire est dominée par des petites particules (1-10 μm), ce qui correspond aux distributions observées pour les effluents secondaires après un traitement de type « boues activées » (Wu et al., 2009). L'apport de boues augmente le nombre de particules de taille supérieure ou égale à 5 μm , ce qui est cohérent car les boues sont constituées majoritairement de floccs de taille comprise entre 10 et 1000 μm (Davies, 2005). Cependant une diminution significative du nombre de particules de taille inférieure à 5 μm est aussi observée lorsque la boue est ajoutée. Deux hypothèses peuvent être avancées pour expliquer cette diminution, sans qu'il ne soit possible d'en privilégier une avec les données à disposition :

- les petites particules présentes dans l'effluent secondaire ont tendance à s'agglutiner sur les floccs apportés par la boue ajoutée

- il s'agit d'un biais lié au compteur optique de particules : les petites particules ont tendance à être « masquées » par les plus grosses lors du passage dans le faisceau laser

Parmi les particules ajoutées à l'effluent dans les conditions B et C, ce sont les particules de taille supérieure ou égale à 25 μm qui occupent le plus de volume. Ainsi l'ajout de boue dans l'effluent secondaire se traduit par un apport en particules de taille supérieure ou égale à 5 μm si l'on s'exprime en nombre de particules. Si l'on s'exprime en volume occupé par les particules, c'est l'apport de particules de taille supérieure ou égale à 25 μm qui est le plus significatif et qui est en majeure partie responsable de l'évolution des indicateurs globaux de pollution particulaire (MES, turbidité et transmittance UV à 254 nm).

L'ajout de boue dans l'effluent secondaire est un moyen de simuler une dégradation de l'effluent par rapport à une station d'épuration de type « boues activées » fonctionnant de façon optimale avec un effluent de très bonne qualité. Le niveau de MES atteint pour la condition B est proche de 35 mg/L, qui est la concentration maximale à respecter (en moyenne journalière) pour les stations de traitement des eaux usées des agglomérations devant traiter une charge brute de pollution organique supérieure ou égale à 120 kg/j de DBO₅ selon la réglementation française (JORF, 2015). Le niveau de MES atteint pour la condition C correspond à une fuite de boues lors de la clarification suite à un fonctionnement dégradé au niveau du traitement secondaire. Ce fonctionnement dégradé peut être la conséquence d'un problème au niveau de l'exploitation (panne de l'aération, recirculation trop importante des boues...). Il peut également être lié à une perturbation de l'équilibre biologique de la biomasse épuratrice, comme la prolifération de bactéries filamenteuses (phénomène de « bulking ») ou la formation d'écumes (« foaming ») qui perturbent la clarification (Gray, 2004). Enfin, le fonctionnement dégradé peut aussi résulter d'une mauvaise conception ou utilisation des équipements, notamment du clarificateur. Plus précisément la profondeur du clarificateur a un rôle important dans la qualité de l'effluent : plus elle est importante, plus la variabilité de la teneur en MES de l'effluent est faible (Figure 26). De plus, la quantité de particules de diamètre supérieur à 25 μm dans l'effluent traité est plus importante quand la profondeur du clarificateur est faible (Asano et al., 2007).

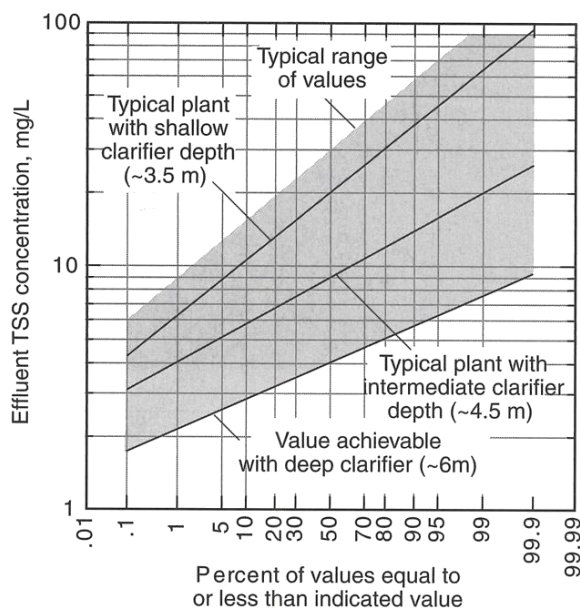


Figure 26 : Variabilité de la teneur en MES (TSS) des effluents issus de procédés de type « boues activées » (Asano et al., 2007). Une concentration en MES de 65 mg/L correspond approximativement au neuvième décile des valeurs rencontrées pour des clarificateurs de faible profondeur

Les teneurs en *Escherichia coli*, coliformes et entérocoques mesurées par les méthodes par culture sur l'effluent secondaire sans ajout de boue (condition A) sont de l'ordre de 10 à 10³ log UFC ou NPP par mL (soit 10³ à 10⁵ log pour 100 mL). Cela correspond aux données rencontrées dans la littérature (ANSES, 2012; Kay et al., 2008). Les ratios observés entre les mesures par qPCR et les mesures avec les méthodes par culture sont compris entre 3 et 9 pour *Escherichia coli* et entre 30 et 70 pour les entérocoques (condition A, échantillons non filtrés). Ces valeurs sont en accord avec les ratios rencontrés dans la littérature pour des effluents secondaires ou des eaux de surface (Haugland et al., 2005; Lavender & Kinzelman, 2009). Par exemple, Lavender & Kinzelman (2009) obtiennent des ratios entre valeurs obtenues par qPCR et valeurs mesurées en NPP par culture qui sont compris entre 3 et 5 pour *E. coli* et entre 30 et 85 pour les entérocoques (eaux de surface). Les gènes ciblés dans leur étude pour la qPCR sont les mêmes que ceux utilisés dans notre travail. Wéry et al. (2008) obtiennent des ratios beaucoup plus élevés (de l'ordre de 80) pour *E. coli* et un effluent secondaire en utilisant le gène *lacZ* qui code pour la β -galactosidase. *lacZ* n'est pas spécifique à *E. coli* mais à l'ensemble des coliformes, ce qui induit manifestement un biais.

Au vu de la distribution granulométrique des effluents secondaires et des données de la littérature, on peut considérer qu'il n'y a pas ou peu d'agrégation dans l'effluent secondaire pour les indicateurs étudiés. L'effluent secondaire seul est donc considéré

comme la référence par rapport aux effluents dopés en boue. Dans l'effluent secondaire, la différence observée entre les résultats obtenus par qPCR et ceux obtenus par culture est donc principalement liée à la prise en compte par la PCR de l'ensemble de l'ADN présent dans l'échantillon pour l'indicateur recherché : ADN issu des cellules viables et cultivables, ADN issu des cellules viables mais non cultivables (VBNC) et ADN libre issu des cellules non viables (perte de l'intégrité membranaire). Cependant on peut considérer qu'une grande partie de l'ADN libre est éliminé par l'étape de filtration sur filtre en polycarbonate de porosité 0,2 µm pendant la phase d'extraction de l'ADN. Pour le confirmer, il aurait été possible d'utiliser des intercalants chimiques qui ne traversent pas les membranes biologiques pour bloquer la réplication de l'ADN libre (Deshmukh et al., 2016), ou un traitement à la DNase préalable à l'extraction. En utilisant l'hybridation in situ couplée à un marqueur de viabilité et en comparant les mesures effectuées par cette technique et les mesures par culture, il est possible d'obtenir un ratio bactéries VBNC / bactéries cultivables. Les ratios obtenus par Garcia-Armisen & Servais (2004) avec cette méthode et l'indicateur *Escherichia coli* sont comparables aux ratios PCR / méthodes par culture obtenus dans cette étude et pour le même indicateur. C'est une autre indication que les différences entre les mesures par qPCR et les mesures par culture sont liées à la présence de bactéries VBNC plutôt qu'à la prise en compte de l'ADN issu des cellules non viables dans le cas de l'effluent secondaire étudié dans nos travaux. Les ratios sont plus importants pour les entérocoques probablement car plusieurs espèces sont prises en compte pour cet indicateur contrairement à l'indicateur *E. coli* et car certaines espèces d'entérocoques ne sont pas détectées par les méthodes par culture (Maheux et al., 2009).

Pour l'indicateur *Escherichia coli*, les conséquences notables de l'apport en particules dans l'effluent secondaire sont les suivantes :

- pour l'effluent moyennement chargé (condition B), l'augmentation de la teneur en *E. coli* est mesurée de façon similaire par la qPCR et par les méthodes par culture (échantillons avec ou sans filtration à 5 µm)
- pour l'effluent le plus chargé (condition C), l'augmentation de la teneur en *E. coli* est mesurée seulement par la qPCR et pas par les méthodes par culture (échantillons avec ou sans filtration à 5 µm)
- le ratio qPCR / méthodes par culture ne varie pas entre les conditions A et B alors qu'il augmente d'un facteur 10 entre les conditions B et C. Ce résultat est observé pour les échantillons non filtrés et les échantillons filtrés à 5 µm
- la filtration au seuil de 5 µm n'a pas d'impact sur le dénombrement d'*E. coli*, quelle que soit la méthode utilisée et pour les trois effluents étudiés
- il n'y a pas de différence significative entre la quantité de particules de taille supérieure à 5 µm (mesurée par compteur optique) et le nombre de cellules d'*E.*

coli retenues par un filtre de porosité 5 µm (mesuré par qPCR) pour l'effluent le plus chargé

Deux hypothèses peuvent expliquer l'augmentation du rapport entre les mesures par qPCR et les mesures par culture après ajout de boue dans l'effluent secondaire : 1) la proportion de bactéries VBNC augmente et 2) il y a agrégation des bactéries entre elles et sur les particules, ce qui conduit à une sous-estimation par les méthodes par culture. La perte de cultivabilité des bactéries est souvent associée à un stress environnemental, comme par exemple les radiations solaires ou le manque de nutriments (Garcia-Armisen & Servais, 2004; Hammes et al., 2011; Kell et al., 1998). L'ajout de boue dans un effluent secondaire n'est pas susceptible d'induire un stress supplémentaire pour les bactéries, étant donné qu'il s'agit plutôt d'un apport en nutriments et en supports de croissance (flocs). De plus, les mêmes contraintes physiques sont appliquées à tous les effluents étudiés (agitation et température contrôlées). Ainsi, même si l'hypothèse de l'augmentation de la proportion en bactéries VBNC n'est pas privilégiée *a priori*, l'agrégation doit être vérifiée par d'autres tests, comme la filtration des échantillons ou la comparaison avec la distribution granulométrique des particules.

Le seuil de filtration de 5 µm ne semble pas expliquer cette agrégation car les teneurs mesurées avant et après filtration ne sont pas significativement différentes. *Escherichia coli* ne se fixe donc pas sur les particules de grande taille apportées par la boue. Ces résultats sont cohérents avec les travaux de Emerick et al. (1999) qui ont montré que seul un faible pourcentage (inférieur à 10 %) de particules de diamètre supérieur à 10 µm est associé aux coliformes dans un effluent en sortie d'un traitement secondaire de type « boues activées ». Ce pourcentage est d'autant plus faible que le temps de séjour des boues (ou « âge des boues ») est élevé : il est quasiment nul pour des âges de boues supérieurs à 20 jours, comme c'est le cas pour la station d'épuration de cette étude (Loge et al., 2002).

L'agrégation d'*Escherichia coli* sur des particules de taille inférieure à 5 µm est peu probable d'après les données de la littérature. Cependant, l'augmentation de la densité cellulaire dans l'effluent le plus chargé pourrait conduire à une agrégation (Chahal et al., 2016). L'augmentation du ratio qPCR / méthodes par culture dans l'effluent le plus chargé va dans ce sens, même si la différence entre la quantité de cellules et le nombre de particules dans les échantillons filtrés est faible. Les agrégats formés seraient donc de petite taille avec une faible densité de cellules par agrégat. La distribution des cellules d'*E. coli* dans l'effluent le plus chargé n'est plus aléatoire, ce qui explique la sous-estimation par les méthodes par culture.

Pour l'indicateur « entérocoques », les conséquences notables de l'apport en particules dans l'effluent secondaire sont les suivantes :

- pour l'effluent moyennement chargé (condition B), l'augmentation de la teneur en entérocoques est plus importante d'après les mesures par qPCR que d'après les mesures par culture
- pour l'effluent le plus chargé (condition C), l'augmentation de la teneur en entérocoques est mesurée seulement par la qPCR et pas par les méthodes par culture (échantillons non filtrés). Pour les échantillons filtrés à 5 µm, une baisse de la teneur en entérocoques est même observée
- le ratio qPCR / méthodes par culture est multiplié par 4 entre les conditions A et B et par 10 entre les conditions B et C. Ce résultat est observé pour les échantillons non filtrés et les échantillons filtrés à 5 µm
- la filtration au seuil de 5 µm n'a pas d'impact sur le dénombrement des entérocoques pour l'effluent secondaire sans ajout de boue (quelle que soit la méthode utilisée). Pour l'effluent moyennement chargé, le rapport entre les teneurs des effluents non filtrés et les teneurs des échantillons filtrés est compris entre 4 et 10. Les ratios calculés sur la base des mesures en qPCR sont plus élevés que les ratios calculés sur la base des mesures par culture. De la même façon, le rapport entre les teneurs des effluents non filtrés et les teneurs des échantillons filtrés est compris entre 10 et 30 pour l'effluent le plus chargé
- le ratio entre la quantité de cellules d'entérocoques retenues par un filtre de porosité 5 µm et la quantité de particules de taille supérieure à 5 µm augmente fortement avec l'ajout de boue dans l'effluent secondaire pour atteindre 140 pour l'effluent le plus chargé

Dans le cas des entérocoques, une agrégation sur des particules de taille supérieure à 5 µm est observée dès l'ajout d'une faible quantité de boue dans l'effluent secondaire pour atteindre une teneur en MES d'environ 30 mg/L. Cette agrégation est vérifiée par l'augmentation de la quantité de cellules d'entérocoques par particule pour la fraction des échantillons retenue sur un filtre de porosité 5 µm. De plus, le ratio entre les mesures par qPCR et les méthodes par culture augmente significativement par rapport à l'effluent secondaire seul, ce qui indique une sous-estimation par les méthodes par culture. Les ratios entre les teneurs en entérocoques dans les échantillons non filtrés et filtrés sont plus importants avec les mesures par qPCR qu'avec les mesures par culture car les mesures sont sous-estimées par les méthodes par culture. L'agrégation est nettement accentuée pour l'effluent le plus chargé (65 mg/L MES). Ces observations sont cohérentes avec le comportement des entérocoques dans l'environnement : ils ne sont pas mobiles, se regroupent par chaînes ou paires et s'associent plus facilement aux floes (Byappanahalli et al., 2012). L'apport de boue dans l'effluent secondaire constitue donc un apport proportionnellement plus important en entérocoques qu'en *E. coli* car

les floccs contiendraient une quantité importante de cellules d'entérocoques alors qu'il a été mis en évidence qu'*E. coli* s'associe peu aux particules.

L'augmentation du ratio qPCR / méthodes par culture va dans le sens d'une agrégation des entérocoques entre eux ou sur des particules pour former également des floccs de taille inférieure à 5 µm. Les résultats de distribution granulométrique des effluents étudiés montrent que l'ajout de boue à l'effluent secondaire ne constitue pas *a priori* un apport en particules de petite taille. Les entérocoques auraient donc tendance à s'agréger entre eux en lien avec l'augmentation de la densité cellulaire liée à l'apport de boues. Le risque de sous-estimation par les méthodes par culture est donc mis en évidence pour des teneurs en MES supérieures ou égales à 30 mg/L. La sous-estimation est liée à la fois à l'association des entérocoques à des particules de taille supérieure à 5 µm et à l'augmentation de l'agrégation des entérocoques entre eux quand la densité cellulaire est plus élevée.

Pour l'indicateur « coliformes », les conséquences notables de l'apport en particules dans l'effluent secondaire sont les suivantes :

- la teneur en coliformes mesurée par culture augmente avec l'ajout de boue dans l'effluent secondaire pour les échantillons non filtrés
- la teneur en coliformes mesurée par culture augmente pour l'effluent moyennement chargé mais reste stable dans le cas des échantillons filtrés à 5 µm
- le ratio entre échantillons non filtrés et filtrés est stable entre les conditions A et B (compris entre 1 et 2) et il augmente pour l'effluent le plus chargé

Les ratios entre échantillons non filtrés et filtrés sont légèrement supérieurs à 1 dans l'effluent secondaire. Cependant la différence n'est pas significative du fait de l'incertitude liée aux méthodes par culture, qui est de l'ordre de 50 à 60 % de la valeur mesurée pour la méthode par détermination du NPP (voir paragraphe III). L'absence de mesures par qPCR pour cet indicateur rend difficile la mise en évidence d'un risque de sous-estimation par les méthodes par culture. Néanmoins les observations réalisées permettent de conclure que ce risque est limité pour l'effluent moyennement chargé (pas d'agrégation supérieure à 5 µm) et qu'il est élevé pour l'effluent le plus chargé (agrégation supérieure à 5 µm et baisse des teneurs mesurées pour les échantillons filtrés).

VI. Conclusion

La maîtrise de la qualité biologique des effluents dans le cadre d'une filière de réutilisation des eaux usées traitées passe par la réalisation d'autocontrôles réguliers. Ces autocontrôles consistent notamment en une mesure de la teneur en microorganismes indicateurs, notamment *Escherichia coli*, coliformes et entérocoques. Les méthodes d'analyses mises en œuvre doivent pouvoir être déployées sur le terrain et utilisables par des non spécialistes. Deux types de méthodes ont été identifiées comme pertinentes par rapport à cet objectif : une méthode par culture en milieu liquide et détermination du nombre le plus probable, et une méthode par culture sur plaque pré-coulée et détermination du nombre d'unités formant une colonie. Les principales limites de ces méthodes par culture sont la non-prise en compte des bactéries viables mais non cultivables et le possible biais lié à l'agrégation des microorganismes entre eux et/ou avec les particules en suspension. L'objectif de cette partie était de mettre en évidence l'impact des matières en suspension sur la fiabilité de la quantification des microorganismes par culture et de déterminer les conditions limites d'utilisation de ces méthodes.

L'agrégation des microorganismes peut être mise en évidence par plusieurs méthodes. D'une part, la fraction non agrégée des microorganismes est isolée par sédimentation, centrifugation ou filtration. D'autre part, la population totale est évaluée en s'affranchissant de l'agrégation : soit par dispersion des agrégats, soit par l'utilisation de méthodes de dénombrement alternatives. Après analyse de l'état de l'art, la stratégie expérimentale retenue dans cette étude est une séparation de la fraction « libre » par filtration à 5 μm et la comparaison du dénombrement par culture avec le dénombrement par qPCR, technique sans culture permettant de s'affranchir de l'agrégation. Des effluents chargés en MES ont été obtenus par dopage d'un effluent secondaire. Les analyses de ces effluents montrent que le dopage consiste en un apport en grosses particules (de taille supérieure à 5 μm) mais aussi en bactéries sous forme libre.

Les trois indicateurs étudiés ne présentent pas la même tendance à l'agrégation. Les entérocoques, de petite taille et non mobiles, se regroupent spontanément en chaînes et se fixent facilement aux floes. Les coliformes, et en particulier *E. coli* sont de plus grande taille et ils sont mobiles : les résultats montrent qu'ils sont peu associés aux particules de grande taille. Cependant, l'augmentation de la densité cellulaire dans l'échantillon conduit à une agrégation en floes de petite taille et ce pour tous les indicateurs étudiés. La distribution aléatoire des microorganismes dans l'échantillon n'est plus assurée, ce qui conduit à une sous-estimation du dénombrement par les

méthodes par culture qui peut aller jusqu'à 1 unité log pour *E. coli* et les coliformes et jusqu'à 2 unités log pour les entérocoques.

Les résultats obtenus permettent d'évaluer la fiabilité de ces méthodes en fonction de la charge en matières en suspension d'un effluent secondaire en vue de la réutilisation (Tableau 20). Ces préconisations ne sont valables que pour le type d'effluent étudié, elles ne conviennent pas par exemple au cas d'un échantillon dopé artificiellement par un inoculum de bactéries cultivées dans un milieu de culture. Pour des effluents dont la charge est inférieure à 15 mg/L de MES, le risque de sous-estimation par les méthodes par culture est faible, sous réserve de bien agiter l'échantillon avant l'analyse. Pour les effluents dont la charge est supérieure à 30 mg/L de MES, un risque de sous-estimation a été mis en évidence. Ce risque est plus élevé pour les entérocoques que pour les coliformes et *E. coli* car ces derniers sont majoritairement présents sous forme libre. Les résultats sont comparables pour les deux méthodes par culture testées.

Tableau 20 : Risque de sous-estimation par les méthodes par culture pour les indicateurs coliformes, *E. coli* et entérocoques en fonction de la teneur en MES pour un effluent issu d'un traitement secondaire des eaux usées

Teneur en MES (mg/L)	Risque de sous-estimation	
	<i>Escherichia coli</i> et coliformes	Entérocoques
< 30	Faible	Faible à Moyen si présence de grosses particules (> 5 µm)
30 à 70	Moyen <i>formation de petits agrégats si la densité cellulaire augmente</i>	Élevé <i>densité cellulaire élevée et agrégation importante sur les floes</i>
> 70	Élevé	Élevé

Pour s'affranchir du risque de sous-estimation dans les effluents chargés, des techniques alternatives de dénombrement peuvent être employées : qPCR, mesure de l'impédance, mesure de la cinétique de l'activité enzymatique... L'inconvénient majeur de ces techniques est leur difficulté de mise en œuvre sur le terrain, même si des progrès importants sont en cours sur l'automatisation et la miniaturisation. De plus, la charge en MES peut aussi avoir un impact sur la fiabilité de ces méthodes et conduire à adapter les protocoles. Enfin, certaines méthodes ont une cible plus large que les méthodes par culture et permettent notamment la prise en compte des bactéries non cultivables. Si de telles méthodes doivent être généralisées, il est nécessaire d'adapter les études d'évaluation du risque sanitaire, qui sont à l'heure actuelle majoritairement basées sur le dénombrement des indicateurs de contamination par les méthodes normées par culture.

Si les matières en suspension peuvent avoir un impact sur l'évaluation de la qualité biologique des effluents issus des filières de REUT, elles peuvent avoir également un impact sur l'efficacité des traitements mis en œuvre dans ces filières, notamment sur l'étape de désinfection des effluents. Une étude approfondie de cette question est nécessaire pour garantir la qualité biologique de l'eau distribuée.

Troisième partie

Conditions limites de l'utilisation de la désinfection UV

I. Introduction

Les effluents issus d'un traitement secondaire des eaux usées présentent généralement une bonne qualité d'un point de vue physico-chimique, mais ils contiennent une quantité importante de microorganismes dont certains peuvent être pathogènes. Une étape d'élimination de ces organismes est donc nécessaire pour atteindre un niveau de qualité compatible avec une utilisation des EUT pour tout type de culture. Parmi les technologies disponibles, la désinfection est un procédé permettant de prévenir les infections en détruisant les organismes qui en sont responsables. Il faut différencier cette notion du terme « stérilisation », qui consiste en la destruction de tous les organismes (Asano et al., 2007). Parmi les techniques de désinfection disponibles, les plus couramment utilisées sont les suivantes, classées dans l'ordre de technicité croissant : chloration, irradiation aux ultraviolets (UV), ozonation. Les procédés de filtration, qui n'altèrent pas la structure ou le métabolisme des organismes, ne peuvent être revendiqués comme une étape de désinfection (JORF, 2012). Le lagunage n'est pas considéré à proprement parler comme un procédé de désinfection, même si sa mise en œuvre peut être recommandée pour l'élimination des microorganismes (EPA Victoria, 2003).

Le lagunage tertiaire consiste en une suite de grands réservoirs qui permettent un affinage des eaux usées traitées. Ce type de traitement est très utilisé dans le sud du bassin méditerranéen, notamment en Israël et au Maroc (El Haïte, 2010). En France, l'exemple le plus connu et le plus ancien est la station d'épuration de Noirmoutier (AFSSA, 2010) : les lagunes ont été implantées pour le stockage avant utilisation, mais un abattement significatif des microorganismes pathogènes a été observé (Xu et al., 2002). Les principaux mécanismes permettant cet abattement sont : les lésions liées au rayonnement solaire, la formation de radicaux libres par photo-oxydation en lien avec la présence d'oxygène produit par des algues, la prédation et le manque de nutriments et les toxines algales (Xu et al., 2002). Il est néanmoins difficile d'atteindre le niveau de qualité requis pour l'irrigation de tout type de culture avec ce procédé du fait de la dépendance aux facteurs climatiques et de la possibilité d'une recontamination (Eme & Molle, 2013).

L'ozonation désigne la réaction chimique de décomposition de l'ozone en oxygène. Cette décomposition libère des groupements hydroxyles $\text{HO}\cdot$ qui ont un fort pouvoir oxydant capable de détruire les parois cellulaires, entraînant la lyse des organismes (Asano et al., 2007; Lazarova et al., 2013c). Il s'agit d'un procédé de désinfection très efficace capable d'affecter les bactéries, virus, helminthes et protozoaires, alors que ces derniers sont moins sensibles à d'autres procédés de désinfection comme la chloration

(Lazarova et al., 2013c). Les inconvénients de ce procédé sont que les coûts d'investissement sont élevés et l'exploitation nécessite une main d'œuvre très qualifiée et une importante quantité d'énergie pour produire l'ozone sur place (Asano et al., 2007; Lazarova et al., 1999). Ce type de procédé n'est donc pas adapté au contexte du bassin méditerranéen.

La chloration est le procédé de désinfection le plus utilisé en traitement de l'eau, notamment pour la production d'eau destinée à la consommation humaine. Dans ce domaine, l'intérêt principal est l'effet rémanent du chlore, qui permet de garantir la qualité sanitaire de l'eau sur tout le réseau de distribution. L'application de ce procédé pour la désinfection des eaux usées est cependant problématique car 1) les matières organiques résiduelles réagissent avec le chlore pour former des sous-produits de désinfection halogénés toxiques et 2) la dose de chlore résiduelle peut être toxique pour les plantes dans le cas d'un usage agricole (Asano et al., 2007).

L'effet désinfectant des ultraviolets est connu depuis longtemps : la première utilisation connue de cette technique pour traiter l'eau date de 1910 à Marseille. La technologie s'est développée aux États-Unis dans les années 1970, avec l'augmentation de l'inquiétude liée aux sous-produits de la chloration. En France, l'essor de la technologie UV est marqué par la circulaire de 1987 précisant les conditions de fonctionnement et d'utilisation des réacteurs UV (DGS, 1987). L'utilisation de cette technologie s'est largement développée pour la désinfection des eaux usées car elle est compétitive techniquement et économiquement avec la chloration (Parker & Darby, 1995). De plus, ce procédé est capable de traiter efficacement les protozoaires comme *Cryptosporidium*, mais à un coût moindre par rapport à l'ozonation (Linden & Rosenfeldt, 2011).

Les principaux enjeux du procédé de désinfection par ultraviolets sont la difficulté de mesurer la dose appliquée à l'effluent, le potentiel impact des particules en suspension sur l'efficacité de la désinfection et la reviviscence possible des microorganismes après la désinfection (Lazarova et al., 1999; Linden & Rosenfeldt, 2011). Ces deux derniers sujets sont étudiés dans cette partie avec pour objectif de mettre en évidence les conditions limites d'utilisation de la désinfection UV. Tout d'abord une analyse de l'état de l'art permet de mettre en exergue les informations supplémentaires nécessaires à une meilleure compréhension de ces problématiques. Ensuite les montages expérimentaux mis en œuvre dans cette étude sont détaillés. L'analyse des résultats doit permettre de formuler des préconisations sur l'utilisation de cette technique de désinfection.

II. État de l'art

1. Principe de la désinfection UV

a. Spectre d'émission et classification du rayonnement UV

Les ultraviolets regroupent les longueurs d'onde du spectre électromagnétique comprises entre 100 et 400 nm (Figure 1). Le spectre UV est divisé en quatre classes : les V-UV (100 – 200 nm) qui n'existent que dans le vide car ces longueurs d'onde sont absorbées par l'oxygène de l'air ; les UV-C (200 – 280 nm) ; les UV-B (280 – 315 nm) ; et les UV-A (315 – 400 nm) (US EPA, 2006). Ces longueurs d'onde sont émises par le rayonnement solaire, mais seule une partie des UV-A et UV-B traverse l'atmosphère (longueurs d'onde supérieures à 300 nm) et est nocive pour les êtres vivants dont l'Homme (vieillesse prématurée de la peau, atteinte de la cornée). Cependant ces radiations sont bénéfiques à faibles doses : par exemple les UV-B favorisent la production de vitamine D (OMS, 2014).

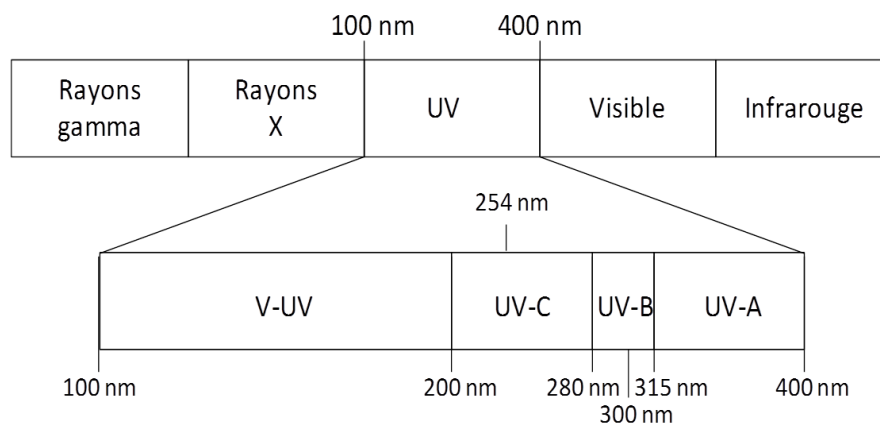


Figure 1 : Positionnement et classification des longueurs d'onde UV au sein du spectre électromagnétique (US EPA, 2006)

b. Action germicide

La classe des UV-C est considérée comme la plus germicide car ces longueurs d'onde sont fortement absorbées par les acides nucléiques. En effet, les spectres d'absorption des nucléotides présentent une bande d'absorption autour de 260 nm avec un maximum à 254 nm car l'ADN et l'ARN présentent un pic d'absorption à cette longueur d'onde (Figure 2). Le mécanisme principal de l'action des UV est la formation de dimères entre deux bases adjacentes de l'ADN ou de l'ARN (le plus souvent des

thymines) (Figure 2). Ces dimères empêchent la réplication des acides nucléiques, et donc des organismes pathogènes. Un organisme dont les acides nucléiques ne sont plus fonctionnels n'est pas capable de produire un effet pathogène, même s'il est toujours métaboliquement actif : ce phénomène est appelé inactivation (Moles, 2007). Les radiations UV-C peuvent également provoquer dans une moindre mesure la cassure d'un simple ou double brin d'ADN, la formation de liaisons ADN-ADN, la formation de liaisons protéine-ADN ou la dégradation des bases pyrimidiques (Harm, 1980). Les radiations UV-A et UV-B peuvent aussi provoquer des mécanismes de dégradation par la formation de radicaux libres, comme les radicaux hydroxyles ou le peroxyde d'hydrogène. Ces composés sont très instables et ils peuvent causer la peroxydation des lipides de la membrane ou la détérioration de l'ADN par exemple (He & Hader, 2002; Mamane, 2008). Ces effets sont liés de façon indirecte aux radiations UV et non directement à l'absorption de photons comme c'est le cas pour les UV-C (Khaengraeng & Reed, 2005). Ainsi, la désinfection d'eau de surface ou souterraine est parfois réalisée par simple irradiation solaire, quand aucun autre moyen de désinfection n'est disponible à un coût abordable (McGuigan et al., 2012).

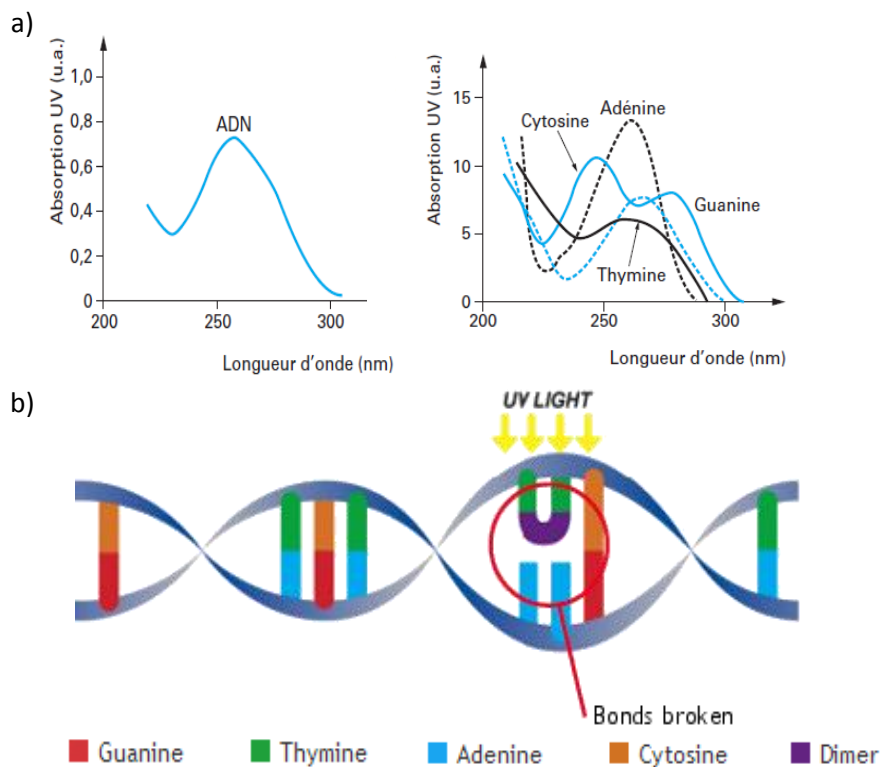


Figure 2 : Spectres d'absorption dans l'UV de l'ADN et de ses bases azotées (a), et mécanisme principal d'action des radiations UV (b) (International Water-Guard Industries, 2005; Moles, 2007)

c. Types de lampes UV

Les lampes les plus couramment utilisées pour la désinfection UV sont constituées de vapeur de mercure. L'électrode produit un arc électrique qui provoque l'excitation des atomes de mercure, puis l'émission de radiations par retour à leur état fondamental (Figure 3). Le spectre d'émission des lampes dépend de la pression de mercure dans les lampes. Dans les lampes basse pression, 85% du rayonnement UV émis est monochromatique à 253,7 nm, ce qui correspond à un effet germicide important (Figure 2). Parmi les lampes UV basse pression, on distingue les lampes à basse intensité des lampes à haute intensité. Ces dernières contiennent un alliage de mercure et de gallium ou d'indium qui permet de contrôler l'émission de vapeur de mercure et donc augmente l'intensité émise (deux à quatre fois plus importante que les lampes basse intensité) (Asano et al., 2007; Linden & Rosenfeldt, 2011).

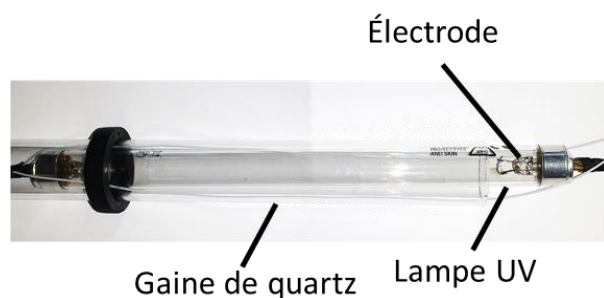


Figure 3 : Exemple de lampe UV basse pression et basse intensité

Durant la dernière décennie, des lampes UV moyenne pression ont été développées. Ces lampes ont un spectre d'émission polychromatique avec seulement 10 à 20 % du rayonnement émis à la longueur d'onde de 253,7 nm. Mais comme la puissance électrique de la lampe est plus importante, la pression du mercure est beaucoup plus élevée, tout comme l'intensité globale émise (Figure 4). Ce type de lampe est principalement mis en œuvre pour traiter de gros débits afin de diminuer la taille de l'installation. Les inconvénients majeurs des lampes UV moyenne pression sont leur durée de vie moindre et leur plus grande tendance à l'encrassement du fait des températures plus élevées à la surface de la lampe (Asano et al., 2007; Linden & Rosenfeldt, 2011). De plus, la conversion d'une partie des nitrates en nitrites (composé toxique) est possible pour les lampes moyenne pression émettant à des longueurs d'ondes inférieures à 225 nm, même si l'application de filtres sur les gaines de quartz est possible pour éviter cette problématique (US EPA, 2006).

La gestion de la fin de vie des lampes à vapeur de mercure est complexe en raison de la toxicité de ce composé pour l'environnement et la santé humaine. C'est pourquoi de

nouvelles technologies de lampes UV sont apparues sur le marché. Une des alternatives les plus répandues est la lumière UV pulsée, dont le spectre d'émission est polychromatique, mais avec un haut niveau d'intensité atteint grâce à la présence d'un gaz rare comme le xénon dans la lampe (Bohrerova et al., 2008). Cette technologie est très utilisée dans l'industrie agroalimentaire, mais son application pour le traitement de l'eau est peu répandue, car le ratio entre consommation électrique et efficacité germicide est plus faible que pour les lampes à vapeur de mercure (Linden & Rosenfeldt, 2011). Cependant, son efficacité pour traiter les eaux usées est démontrée (Uslu et al., 2015). La technologie LED (light emitting diode) a également été appliquée à la désinfection UV. Chevremont et al. (2012) ont montré que le couplage de LEDs émettant dans la gamme des UV-C et des UV-A permet un abattement important des indicateurs de contamination fécale dans les eaux usées. Cependant, ces expériences ont été réalisées en laboratoire. Le passage à l'échelle industrielle pose le problème de la quantité de LEDs à mettre en œuvre, or ces dernières ont un coût unitaire élevé et une durée de vie plus courte que les lampes à base de vapeur de mercure actuellement utilisées (Chatterley & Linden, 2010).

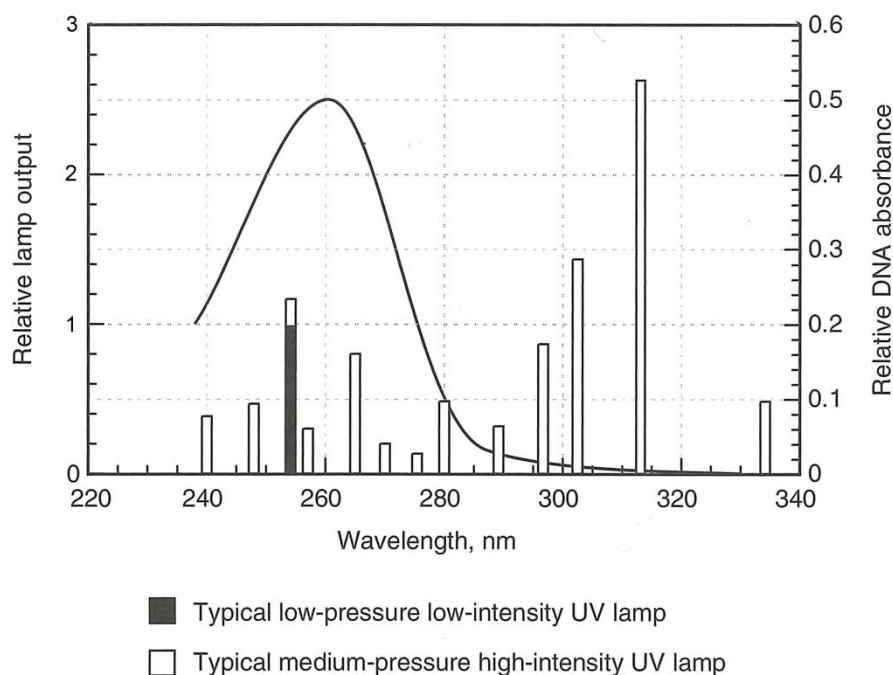


Figure 4 : Spectre d'émission UV pour une lampe basse pression basse intensité et pour une lampe moyenne pression. L'intensité relative de la lampe moyenne pression par rapport à la lampe basse pression est représentée sous forme d'histogramme pour chaque longueur d'onde (axe de gauche). Le spectre d'absorption de l'ADN dans les UV est également représenté (en proportion de l'absorbance totale dans la gamme 220 – 240 nm, axe de droite) (Linden & Rosenfeldt, 2011)

d. Configurations pour la mise en œuvre sur une filière de traitement

Les conditions de mise en œuvre de la désinfection UV sont primordiales pour assurer l'efficacité du traitement. Les lampes sont le plus souvent immergées dans l'effluent à traiter, isolées par une gaine de quartz (qui n'absorbe pas les UV) (Figure 3). La conception hydraulique des systèmes de contact doit permettre l'irradiation uniforme de l'ensemble de l'effluent. Deux types de configurations sont principalement rencontrés : les configurations en canal ouvert ou les configurations en réacteur fermé (Figure 5). Dans la configuration en canal ouvert les lampes peuvent être placées soit de façon horizontale (parallèle à l'écoulement), soit de façon verticale (perpendiculaire à l'écoulement). Au moins deux bancs de lampes sont généralement placés en série. Cette configuration peut être adaptée à la réhabilitation d'un canal de comptage en sortie de station d'épuration. Les configurations en réacteur fermé sont néanmoins préférées car il est plus facile de contrôler l'hydraulique dans ce système. De la même façon, les lampes peuvent être placées en parallèle ou en perpendiculaire de l'écoulement (Linden & Rosenfeldt, 2011).

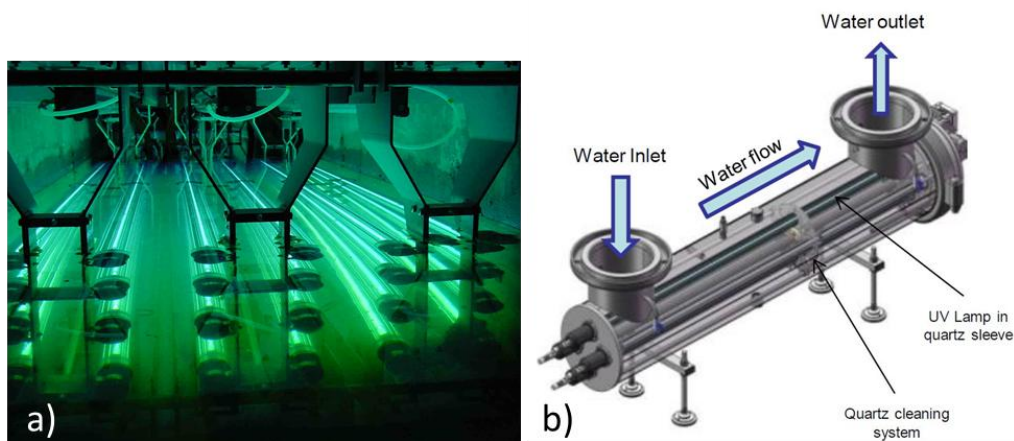


Figure 5 : Exemples de systèmes de désinfection UV : a) configuration en canal ouvert (© SAUR) et b) configuration en réacteur fermé (© BIO-UV). Dans ces deux exemples, les lampes sont placées de façon parallèle à l'écoulement

Une baisse de l'efficacité des lampes UV est observée après une certaine durée de fonctionnement. Cela peut être dû au vieillissement des lampes et/ou à leur encrassement. Le facteur de vieillissement est généralement calculé par l'industriel en comparant l'intensité émise par une lampe neuve avec l'intensité émise par une lampe après une certaine durée de fonctionnement. Cela permet d'estimer la durée de vie acceptable d'une lampe, typiquement comprise entre 8 000 et 12 000 heures pour une

lampe UV basse pression. Le facteur d'encrassement est dépendant de la composition de l'effluent. Il est donc le plus souvent déterminé de façon empirique par des observations sur site ou sur pilote. De plus, des systèmes de nettoyage automatique des gaines de quartz sont la plupart du temps mis en œuvre. Le dimensionnement de l'installation doit prendre en compte ces facteurs de vieillissement et d'encrassement (Asano et al., 2007; US EPA, 2006).

2. Détermination de la dose appliquée à l'effluent

a. Aspects théoriques

Pour un volume donné d'effluent à traiter, la dose UV appliquée correspond au produit entre l'intensité moyenne appliquée et le temps de contact :

$$D = I_{moy} \times t \quad (1)$$

L'intensité ou irradiance est la quantité d'énergie émise par le rayonnement UV et par unité de surface. Cette mesure est exprimée en W/m^2 ou $J.s^{-1}/m^2$. Le temps de contact étant exprimé en secondes, la dose est donc exprimée en J/m^2 ou plus souvent en mJ/cm^2 ($1 J/m^2 = 0,1 mJ/cm^2$) (Linden & Rosenfeldt, 2011).

L'intensité moyenne appliquée dépend de l'intensité émise par les lampes et de son atténuation dans l'effluent. Cette atténuation est décrite par la loi de Beer-Lambert :

$$A = -\log\left(\frac{I}{I_0}\right) = \varepsilon(\lambda).l.C \quad (2)$$

Avec A : absorbance ou densité optique de la solution, sans unité

I_0 : intensité de référence (eau distillée) : blanc ou zéro (W/m^2)

I : intensité de la solution testée (W/m^2)

l : longueur du trajet optique (généralement 1 cm)

ε : coefficient d'absorption molaire de la solution ($M^{-1} cm^{-1}$) à la longueur d'onde λ

C : concentration molaire du ou des composés absorbant le rayonnement (M ou mol/L)

L'absorbance est le plus souvent mesurée à la longueur d'onde la plus germicide, soit 254 nm. La transmittance UV est reliée à l'absorbance par la formule $T = 10^{-A}$, ce qui se traduit comme le rapport entre l'intensité de la solution à tester et l'intensité de la solution de référence (correspondant à 100% de transmittance) à 254 nm. Le pourcentage de transmittance UV (TUV) d'une solution est donné par la relation :

$$\%TUV = 100 \times I/I_0 \quad (3)$$

La transmittance de l'effluent est un paramètre déterminant pour évaluer l'efficacité de la désinfection UV. L'hydraulique des réacteurs et la puissance des lampes UV doivent être adaptées en tenant compte de ce paramètre. Dans le cas des eaux usées (TUV comprise entre 50 et 65 %), Bolton et al. (2001) ont montré que l'intensité appliquée à l'effluent diminue de 95% dans un rayon de 4 cm autour de la lampe dans le cas d'un réacteur cylindrique (Figure 6), d'où l'importance de l'homogénéisation dans le réacteur. Si le diamètre du réacteur est trop important, cela risque de diminuer l'efficacité de l'homogénéisation. Dans le cas contraire, une partie des radiations UV est absorbée par les parois du réacteur, ce qui diminue le rendement de désinfection.

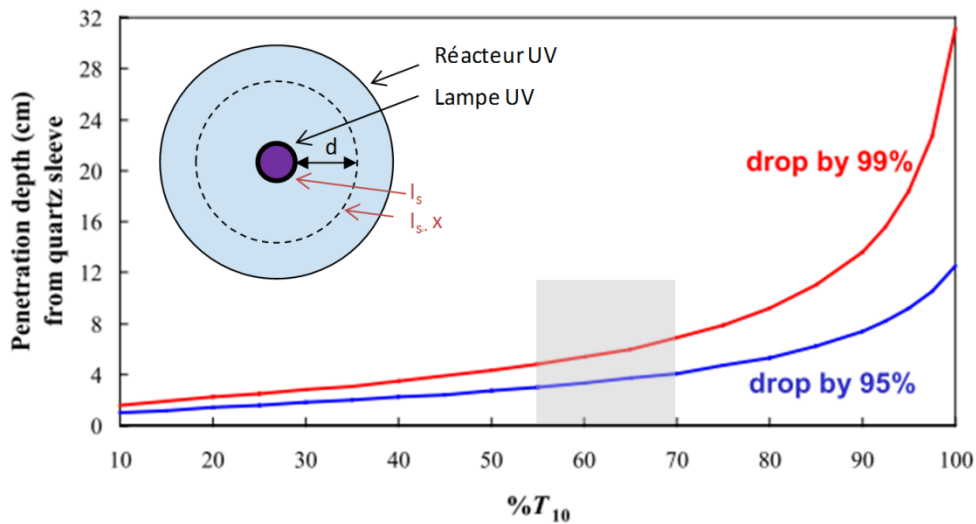


Figure 6 : Profondeur de pénétration du rayonnement UV (d en cm à partir de la surface de la gaine de quartz de la lampe) en fonction de la transmittance de l'eau à traiter (cuve de 10 mm). La courbe rouge correspond à une chute de 99% (x = 0,01) de l'intensité I_s et la courbe bleue correspond à une chute de 95% (x = 0,05) de l'intensité I_s (d'après Bolton et al., 2001). La zone grisée correspond aux transmittances typiquement rencontrées pour les EUT

En pratique, l'intensité est déterminée en un ou plusieurs endroits du système de désinfection UV par des capteurs radiométriques mesurant l'irradiance incidente à la surface du capteur. Si ces mesures sont utiles pour le suivi de la désinfection, elles ne permettent pas de déterminer l'intensité moyenne (et donc la dose réelle) reçue par l'effluent. Pour ce faire, plusieurs méthodes peuvent être utilisées : les modèles mathématiques, les essais chimiques, et les bio-essais. Parmi les méthodes de modélisation, la méthode « PSS » (point source summation) est la plus simple. Elle

considère chaque lampe UV comme un point fixe d'émission de rayonnement UV, qui décroît en cercles concentriques en fonction de la transmittance de l'effluent (Figure 6). Un logiciel mathématique permet de calculer l'intensité moyenne. Cette approche est aujourd'hui abandonnée car elle ne prend pas en compte l'hydraulique du réacteur, même si les résultats peuvent être acceptables en première approche (Braunstein et al., 1996). Les approches plus récentes sont basées sur la dynamique des fluides (CFD – computational fluid dynamics) qui permet d'obtenir à la fois la distribution des intensités UV et les profils de vitesse d'écoulement dans le système (Wright et al., 2014). Cette approche est très utilisée par les fabricants d'équipements UV pendant la phase de dimensionnement, mais elle n'est pas utilisée pour la validation des doses appliquées à l'effluent car la procédure n'est pas normalisée et elle est dépendante de la précision de la modélisation géométrique du réacteur.

La détermination des doses appliquées par des techniques chimiques, ou actinométrie, consiste à mesurer les changements produits par l'exposition aux UV sur un composé chimique. Les composés principalement utilisés sont l'iodure de potassium ou l'uridine car ces molécules présentent un pic d'absorption dans la gamme de longueurs d'onde germicides (autour de 260 nm). Si la réponse d'un composé en fonction de la dose UV appliquée est connue, alors l'actinométrie peut être utilisée pour déterminer la dose UV appliquée dans un réacteur. Cette technique est peu utilisée en pratique car la réaction d'un composé chimique est peu représentative de la réponse des microorganismes lors d'une exposition aux UV (Linden & Rosenfeldt, 2011). La méthode la plus répandue à l'heure actuelle est basée sur l'utilisation des bio-essais ou biodosimétrie car c'est l'approche la plus sécuritaire pour déterminer la dose UV appliquée (Hartfelder, 2002).

b. Détermination de la dose UV appliquée par biodosimétrie

La modélisation des intensités appliquées dans un système de désinfection UV est complexe car ces intensités ne sont pas uniformes et dépendent de plusieurs caractéristiques du réacteur parfois difficiles à évaluer. L'utilisation d'un microorganisme indicateur dont la réponse aux UV est connue permet de s'affranchir d'une caractérisation complète du réacteur.

L'inactivation d'un microorganisme est mesurée en comparant le dénombrement dans l'effluent avant (N_0) et après application d'une dose D d'UV (N_D). Pour des microorganismes totalement dispersés dans l'effluent, la modélisation de l'inactivation est donnée par l'équation (Jagger, 1967; Oliver & Cosgrove, 1975; Qualls et al., 1983) :

$$\log_{10} \left(\frac{N_D}{N_0} \right) = -k \cdot D \quad (4)$$

Avec N_0 : quantité de microorganismes dans l'effluent à traiter

N_D : quantité de microorganismes résiduelle après l'application d'une dose D d'UV

k : constante d'inactivation (cm^2/mJ)

D : dose UV appliquée (mJ/cm^2)

Ce modèle de désinfection du premier ordre (Figure 7) est comparable à celui utilisé pour les désinfectants chimiques et développé par Chick (1908) et Watson (1908).

La détermination de la dose UV appliquée dans un système par biosimétrie est effectuée en deux étapes (Figure 7) :

- établissement d'une courbe d'inactivation = $f(\text{dose UV})$ pour le microorganisme indicateur choisi
- mesure de l'inactivation dans le système de désinfection testé et calcul de la dose UV correspondante

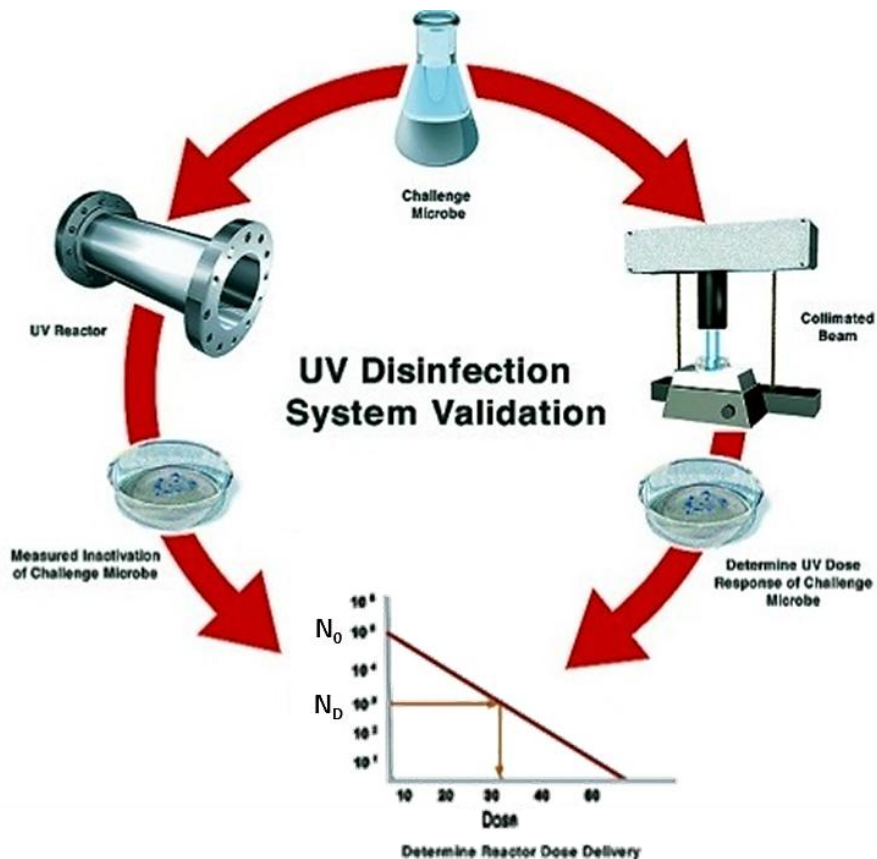


Figure 7 : Procédure de validation de la dose UV appliquée par biosimétrie (Trojan technologies)

La détermination de la courbe dose-réponse pour le microorganisme indicateur choisi implique de se placer dans des conditions expérimentales très contrôlées pour considérer que l'intensité UV mesurée correspond à l'intensité réelle appliquée. Il est nécessaire d'utiliser un faible volume d'effluent parfaitement agité et un rayonnement UV appliqué de façon uniforme sur la surface de l'effluent à traiter. On utilise pour cette procédure un réacteur de désinfection UV à lumière collimatée (« collimated beam reactor ») (Figure 8). Le tube permet de diriger les faisceaux de lumière UV perpendiculairement à la surface de l'effluent à traiter, qui est placé dans une boîte de Pétri. L'intensité UV mesurée au centre de la boîte de Pétri est ensuite corrigée par plusieurs facteurs, dont certains dépendent du montage expérimental (distance de la lampe, taille de la boîte de Pétri, profondeur de la lame d'eau) et d'autres dépendent de l'effluent à traiter (transmittance à 254 nm). L'intensité moyenne réelle appliquée à l'effluent est donc égale à l'intensité mesurée au centre de la boîte de Pétri multipliée par les facteurs de correction présentés dans le Tableau 1. Les doses appliquées sont ensuite simplement calculées en multipliant l'intensité moyenne par le temps de contact. Les autres prescriptions techniques à respecter sont détaillées par Bolton et al. (2003).

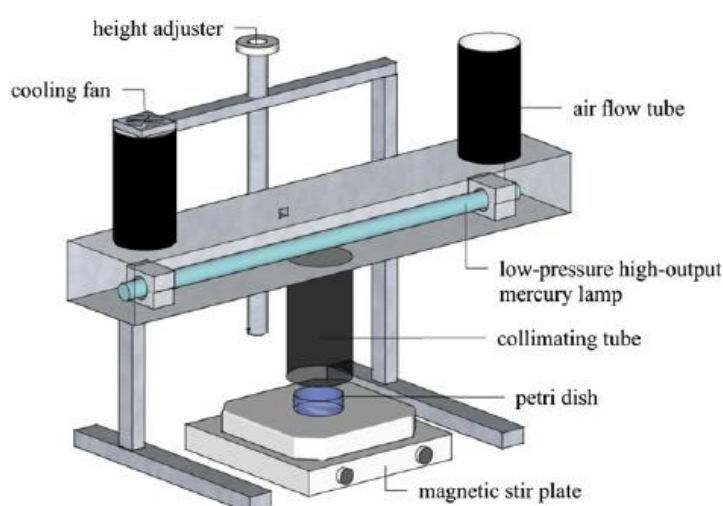


Figure 8 : Exemple de montage expérimental de type « réacteur UV à lumière collimatée » (Sarathy & Mohseni, 2010)

Tableau 1 : Facteurs de correction de l'intensité mesurée au centre de la boîte de Pétri pour déterminer l'intensité réelle appliquée à l'effluent dans le cadre d'un montage de type « réacteur UV à lumière collimatée » pour des lampes UV basse pression (Bolton et al., 2003)

Facteur	Description	Calcul
Petri factor	Représente la variation d'intensité sur la surface traitée	Moyenne des ratios entre les mesures d'intensité sur l'ensemble de la surface et l'intensité au centre de la boîte de Pétri Doit être supérieur à 0,9
Reflection factor	Représente la part du rayonnement réfléchi lors du changement de matrice air-eau	Loi de Fresnel ($200 < \lambda < 300 \text{ nm}$) : Reflection factor = 0,975
Water factor	Représente la part du rayonnement absorbée dans l'effluent	$\frac{1 - 10^{-a.l}}{a.l.\ln(10)}$
Divergence factor	Corrige la divergence du rayonnement UV possible malgré la canalisation des faisceaux	$\frac{L}{(L + l)}$

a : absorbance de l'effluent à 254 nm (cuve de 1 cm)

l : profondeur de la lame d'eau dans la boîte de Pétri

L : distance entre la lampe UV et la surface de l'effluent à traiter

Les courbes doses-réponses sont établies indépendamment de la transmittance de l'effluent car le temps de contact pour le calcul de chaque dose appliquée est corrigé pour tenir compte de l'atténuation du rayonnement UV (voir équations 2 et 3). Lors de l'étude de l'inactivation du microorganisme indicateur dans le réacteur pilote, les mesures sont au contraire valables seulement pour la transmittance mesurée sur l'effluent étudié. La comparaison de l'inactivation du microorganisme avec la courbe dose-réponse permet de déterminer les doses de réduction équivalentes (DRE) aux différents temps de contact dans le réacteur.

3. Impact des particules en suspension sur l'efficacité de la désinfection UV

a. Interaction des particules avec le rayonnement UV et avec les microorganismes

Dans un effluent, quatre types de composés peuvent être caractérisés selon leur taille (Levine et al., 1991) : la fraction dissoute ($< 0,001 \mu\text{m}$), la fraction colloïdale

(0,001 – 1 μm), la fraction supracolloïdale (1 – 100 μm) et la fraction décantable (> 100 μm). Les particules inorganiques proviennent essentiellement des phénomènes de transport des eaux usées (ruissellement). Il peut s'agir d'argiles, de silices, ou de particules métalliques. Les macromolécules organiques sont majoritairement issues de la dégradation biologique (Figure 9) : composés humiques et fulviques, polysaccharides, protéines... Dans l'ensemble, ces composés définissent la matière organique naturelle (MON). La MON est considérée comme dissoute si elle n'est pas retenue lors d'une filtration à 0,45 μm , même si certains colloïdes peuvent se retrouver dans cette fraction (Mamane, 2008). Les interactions entre un faisceau lumineux et des particules sont complexes et dépendent majoritairement de leur forme et de leur taille (Azema et al., 2002; Vaillant et al., 2002). Les phénomènes impliqués sont la diffusion (qui englobe les phénomènes de réfraction, réflexion et diffraction) et dans une moindre mesure l'absorption (Figure 10).

L'impact des particules en suspension sur l'efficacité de la désinfection UV est étudié depuis longtemps et sur plusieurs types d'eaux (eaux souterraines pour la potabilisation, eaux de surface, eaux usées...) (Christensen & Linden, 2003; Parker & Darby, 1995; Qualls et al., 1983; Walters et al., 2013). Les microorganismes associés aux particules (généralement de grande taille) sont plus protégés des rayonnements UV (voir 2^{ème} partie, paragraphe II.3.c). Néanmoins, d'autres phénomènes liés aux particules affectent également l'efficacité de la désinfection. Ainsi, des microorganismes « libres » peuvent être protégés par la diffusion de la lumière UV liée à une concentration élevée en petites particules (Figure 10).

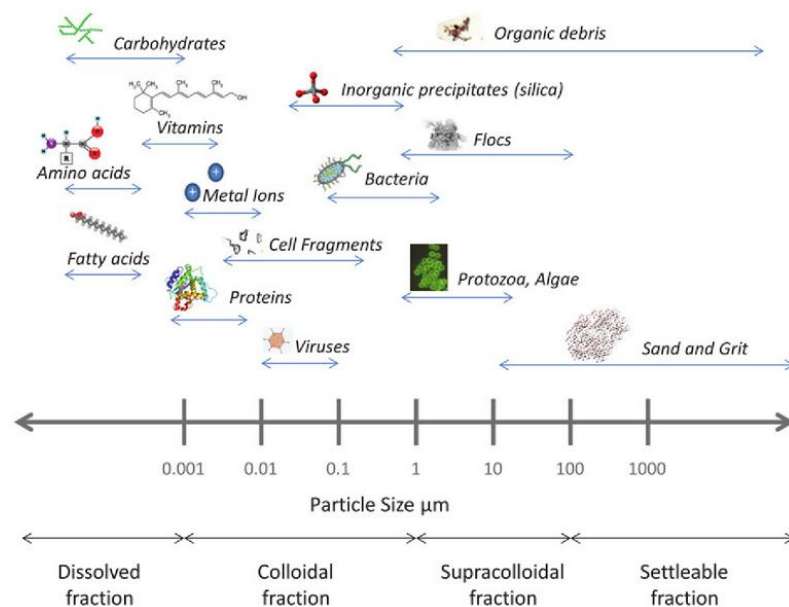


Figure 9 : Taille des différents types de particules présentes dans les eaux usées (Chahal et al., 2016)

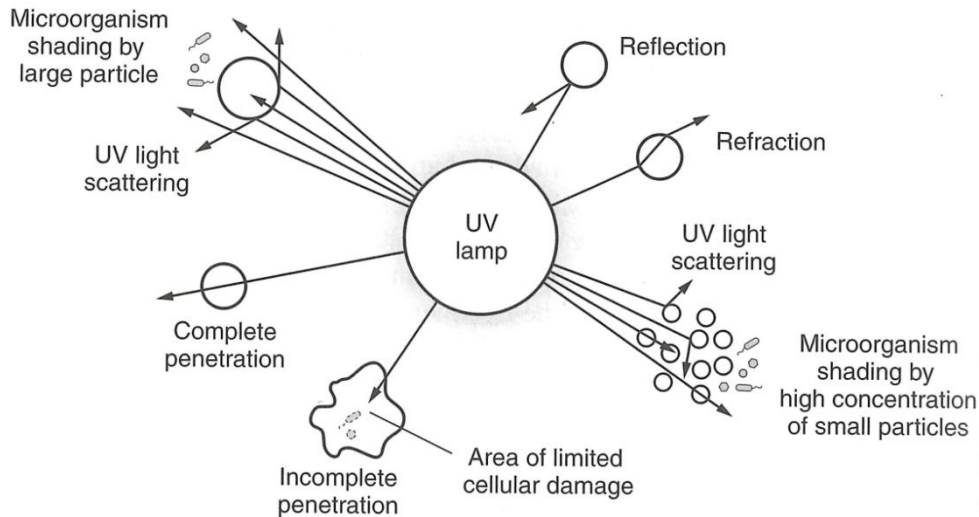


Figure 10 : Interactions entre les particules et le rayonnement UV qui affectent l'efficacité de la désinfection (Asano et al., 2007)

b. Modélisation de l'impact sur la désinfection

Le modèle de désinfection du premier ordre (Figure 11a) a été adapté suite à plusieurs travaux sur des microorganismes connus pour leur résistance aux UV, comme les spores de bactéries ou les virus (Hijnen et al., 2006; Hoyer & Clasen, 2002; Mamane-Gravetz & Linden, 2005). Pour ce type de microorganismes, s'ils sont parfaitement dispersés dans l'effluent, un seuil est observé sur la courbe d'inactivation : pour de faibles doses appliquées, aucune inactivation n'est observée, puis l'inactivation suit un modèle de premier ordre au-delà de cette dose « seuil » (Figure 11b). Le modèle modifié pour les microorganismes résistants aux UV s'écrit donc (Hijnen et al., 2006) :

$$\log_{10} \left(\frac{N_D}{N_0} \right) = -k \cdot D + b \quad (5)$$

avec b l'intersection de la courbe d'inactivation avec l'axe des ordonnées

Les particules en suspension perturbent également le modèle d'inactivation du premier ordre : la constante d'inactivation est très faible voire nulle pour de hautes doses UV appliquées. Cela correspond aux microorganismes abrités par les particules qui sont protégés du rayonnement UV. Ce phénomène est appelé l'effet de traîne (tailing effect en anglais) (Emerick et al., 2000; Oliver & Cosgrove, 1975; Parker & Darby, 1995) (Figure 11c). Il a été observé pour les bactéries, mais également pour les virus, les oocystes de *Cryptosporidium* et les cystes de *Giardia* (Amoah et al., 2005; Templeton et al., 2005). Ces modèles peuvent facilement être combinés pour prendre en

compte l'effet de seuil dans le cas de microorganismes résistants aux UV (éq. 5) (Azimi et al., 2013; Farnood, 2014; Madge & Jensen, 2006).

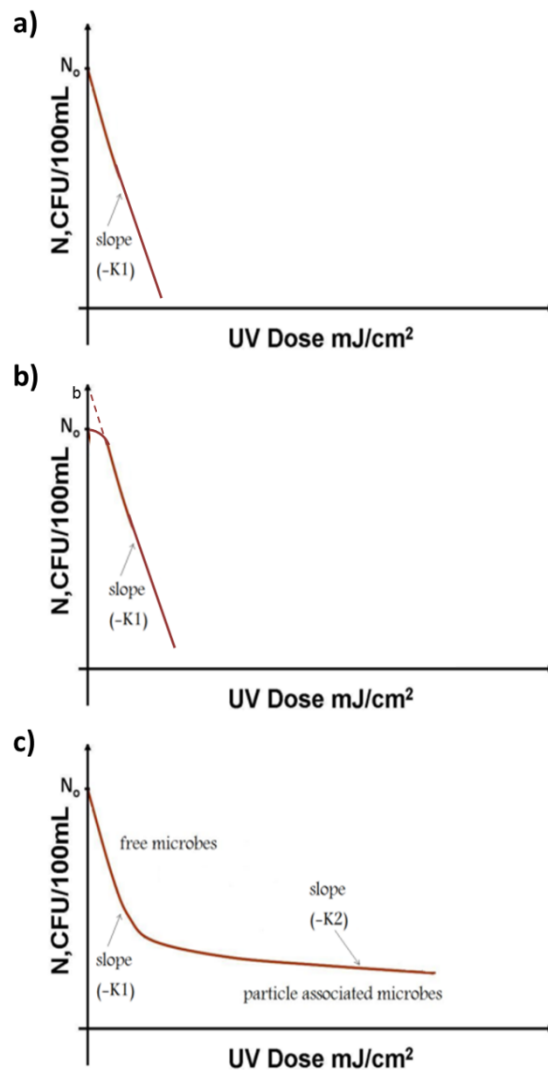


Figure 11 : Modélisation de la désinfection UV : a) premier ordre ; b) microorganismes résistants aux UV ; c) prise en compte de l'effet de traîne (en ordonnée, quantité résiduelle de microorganismes à partir d'une quantité initiale N_0) (d'après Emerick et al., 2000)

La modélisation du phénomène de traîne est complexe car elle dépend de plusieurs facteurs parfois difficilement mesurables (Mamane, 2008). L'approche la plus simple pour modéliser l'effet de traîne est celle proposée par Scheible (1987). La quantité de microorganismes liés aux particules est considérée comme protégée des rayonnements UV, quelle que soit la dose appliquée :

$$\log_{10} \left(\frac{N_D}{N_0} \right) = -k \cdot D + \log(N_P) \quad (6)$$

avec N_P la quantité de microorganismes protégés par les particules

Selon le modèle développé par Scheible (1987), la valeur de N_P est directement reliée à la teneur en MES de l'effluent par la relation $N_P = c(\text{MES})^m$. Les coefficients c et m sont déterminés de façon empirique. Ce modèle est considéré comme simpliste car 1) l'inactivation des microorganismes associés aux particules est possible avec l'application de fortes doses UV même si cette inactivation est faible et 2) les coefficients c et m sont différents pour chaque type d'effluent (Loge et al., 1996). Une autre modélisation très empirique a été proposée dans laquelle la quantité de microorganismes résiduelle est reliée à la dose appliquée, la quantité initiale de microorganismes, la transmittance et la teneur en MES de l'effluent (Loge et al., 1996). Les nombreux coefficients de ce modèle doivent également être déterminés de façon expérimentale pour chaque type d'effluent, ce qui le rend difficilement généralisable. De plus, ce modèle n'est pas très robuste statistiquement (Mamane, 2008).

Un modèle à double exponentielle a été proposé par Jagger (1967) pour mettre en évidence les deux constantes d'inactivation correspondant aux deux populations de microorganismes :

$$\log_{10} \left(\frac{N_D}{N_0} \right) = (1 - \beta) \cdot (-k_1 \cdot D) + \beta \cdot (-k_2 \cdot D) \quad (7)$$

Avec β : proportion de microorganismes protégés des UV

k_1 : constante d'inactivation des microorganismes « libres » exposés aux UV

k_2 : constante d'inactivation des microorganismes « abrités » résistants aux UV

Une adaptation de ce modèle a été développée par Emerick et al. (2000) en tenant compte du nombre de particules associées à des coliformes. Selon ce modèle la probabilité d'inactiver les coliformes associés aux particules est indépendante de la forme ou de la taille de ces particules. L'inactivation globale revient donc à :

$$\frac{N_D}{N_0} = e^{-k \cdot D} + \frac{P}{k \cdot D} (1 - e^{-k \cdot D}) \quad (8)$$

avec P le nombre de particules associées à au moins un coliforme

4. Réactivation après exposition aux UV

L'exposition aux UV endommage les acides nucléiques des microorganismes. Si les dommages sont trop importants, le métabolisme de la cellule n'est plus fonctionnel, ce qui conduit à une perte de l'intégrité membranaire et donc à la désintégration de ladite cellule (Hammes et al., 2011). Cependant la cellule reste la plupart du temps fonctionnelle d'un point de vue métabolique après exposition aux UV. Trois possibilités peuvent alors être envisagées :

- la cellule n'arrive pas à réparer les acides nucléiques endommagés : elle ne peut pas renouveler ses protéines via la transcription des gènes et finira par se désintégrer
- la cellule arrive à réparer les acides nucléiques endommagés, mais elle rentre dans une phase de « dormance », elle est donc viable mais non cultivable (VBNC). Cette théorie est appuyée par les travaux de Zhang et al. (2015), mais plusieurs biais méthodologiques ont été pointés dans cette étude (Linden et al., 2015)
- la cellule arrive à réparer les acides nucléiques endommagés et redevient cultivable : c'est le cas pour les mécanismes de réparation à la lumière (photoréactivation) et à l'obscurité (« dark repair »)

a. Photoréactivation

La photoréactivation est un mécanisme enzymatique basé sur la photolyase. La réparation est effectuée en deux étapes (Figure 12). Tout d'abord l'enzyme se fixe sur les lésions (dimères) formées par le rayonnement UV. Ensuite, la photolyase utilise l'énergie de la « lumière bleue » ($300 < \lambda < 500$ nm) pour rompre la liaison entre les deux thymines qui formaient le dimère (Sancar, 2016). La photolyase est une enzyme présente chez de nombreux organismes comme les bactéries, les protozoaires et même chez l'Homme où elle joue un rôle préventif contre l'apparition des cancers de la peau (Asano et al., 2007; Oguma et al., 2001; Sancar, 2016). Néanmoins chez *Cryptosporidium* la réparation de l'ADN après exposition aux rayonnements UV ne semble pas être suffisante pour regagner un caractère infectieux (Oguma et al., 2001). Certains virus, comme les baculovirus possèdent également la photolyase (Biernat et al., 2012). Les virus ne possédant pas cette enzyme ont la capacité d'effectuer la réparation de leur ADN en utilisant les enzymes de l'hôte (Asano et al., 2007).

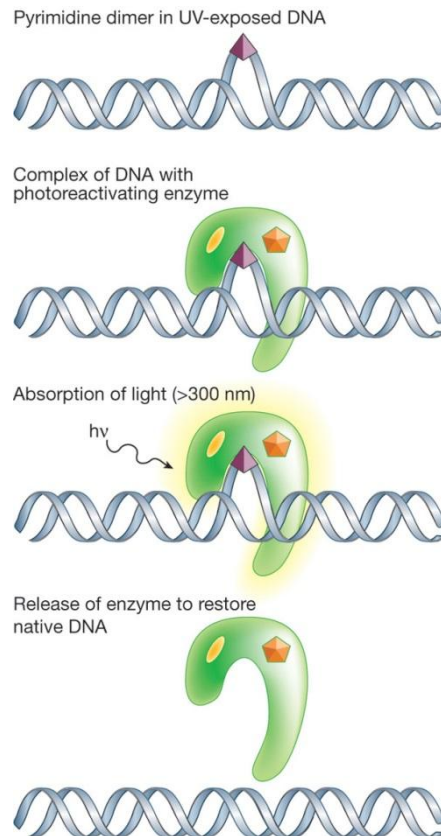


Figure 12 : Action de la photolyase pour réparer les atteintes à l'ADN causées par les UV (photoréactivation) (Friedberg, 2003)

b. Réparation à l'obscurité (« dark repair »)

Lors des études sur la photoréactivation, des observations sur les témoins à l'obscurité ont montré que des mécanismes de réparation existent aussi en l'absence de lumière (Sancar, 2016). Deux principaux mécanismes ont été identifiés : la réparation par recombinaison avec un brin d'ADN complémentaire et la réparation par excision (Asano et al., 2007; Linden & Rosenfeldt, 2011). Ce dernier mécanisme est prépondérant : les dimères de thymine sont excisés sous la forme d'oligomères de quelques nucléotides et la séquence manquante est synthétisée (Figure 13).

Les expériences de désinfection UV sur les eaux usées traitées ont montré que les mécanismes de réparation à l'obscurité sont négligeables par rapport aux phénomènes de photoréactivation (Guo et al., 2013; Nebot Sanz et al., 2007). Cela pourrait être expliqué par la nécessité pour les microorganismes de disposer d'une source d'énergie pour réaliser ces mécanismes de réparation à l'obscurité (Sancar, 2016). Or les eaux usées sont généralement pauvres en nutriments, ce qui pourrait limiter les réparations par ce principe.

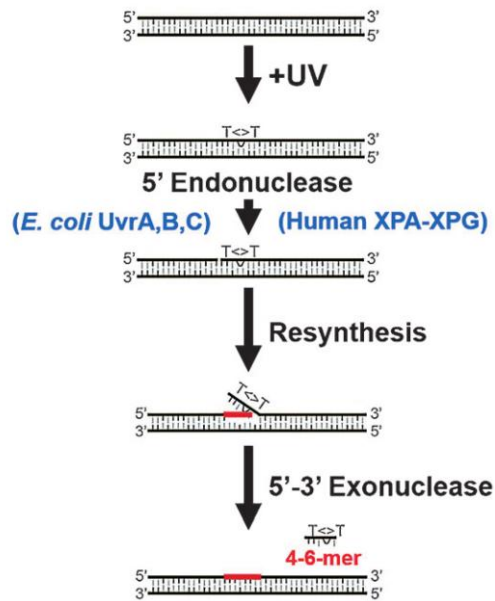


Figure 13 : Mécanisme de réparation « à l'obscurité » de l'ADN par excision. Les gènes impliqués dans ce mécanisme sont indiqués entre parenthèses (Sancar, 2016)

c. Modélisation de la réactivation

La réactivation après exposition aux UV est modélisée par plusieurs auteurs comme une réaction cinétique de premier ordre avec une phase initiale de latence (Guo et al., 2013; Hijnen et al., 2006). Néanmoins l'important dans ce cas est plutôt de prévoir la quantité maximale de microorganismes pouvant être atteinte après réactivation. Selon Hijnen et al. (2006), cette quantité maximale est atteinte après 2 à 3 h de latence, alors que Guo et al. (2013) obtiennent une quantité maximale après environ 8 h d'exposition à la lumière. La quantité maximale atteinte varie également selon le type de microorganisme : elle serait plus importante pour les coliformes que pour les entérocoques (Hijnen et al., 2006). Nebot Sanz et al. (2007) proposent un modèle empirique pour prédire le ratio maximal de survie après la photoréactivation, noté S_m :

$$S_m = \frac{N_m}{N_0} = b \cdot e^{-a \cdot D} \quad (9)$$

Avec N_m : quantité maximale résiduelle de microorganismes après réactivation
 N_0 : quantité initiale de microorganismes avant désinfection UV
 a, b : constantes dépendantes du type de microorganisme

Guo et al. (2013) proposent également un modèle de prédiction de S_m basé sur des constantes empiriques α et β pour chaque type de microorganismes :

$$S_m = \alpha \cdot D^{-\beta} \quad (10)$$

Plusieurs études montrent que la réactivation est limitée si une dose UV suffisante est appliquée, typiquement supérieure à 40 mJ/cm² pour un effluent secondaire (Guo et al., 2009, 2013; Hoyer, 1998; Nebot Sanz et al., 2007). L'utilisation de lampes UV moyenne pression permettrait également d'empêcher la réactivation (Guo et al., 2009; Linden & Rosenfeldt, 2011). Néanmoins ces études sont généralement réalisées avec *E. coli* dont la réponse pourrait ne pas être représentative de l'ensemble des bactéries. Par exemple *Legionella pneumophila* aurait une grande capacité de photoréactivation après désinfection avec des lampes UV basse ou moyenne pression (Oguma et al., 2004).

5. Autres facteurs affectant l'efficacité de la désinfection UV

a. Composition chimique de l'effluent

La transmission des radiations UV dans l'eau à traiter peut être affectée par de nombreux constituants de cette eau, qui peuvent absorber les UV. La qualité de l'eau influence également l'encrassement de l'enveloppe de quartz qui entoure les lampes UV. Les composés susceptibles d'absorber les longueurs d'onde UV et donc de diminuer l'absorbance ou la transmittance de l'eau à traiter sont principalement des molécules organiques (molécules aromatiques telles que les acides humiques ou fulviques, ou ayant une structure phénolique) et des ions (Linden & Rosenfeldt, 2011).

Parmi ces derniers, le fer ferrique Fe³⁺ est particulièrement surveillé car il peut être présent selon le procédé utilisé en amont et son coefficient d'absorption molaire est très important. La concentration en fer ferrique à partir de laquelle une diminution significative de l'absorbance à 254 nm est observée est proche de 0,06 mg/L (Linden & Rosenfeldt, 2011 ; Tableau 2). Selon Moles (2007), il est déconseillé d'appliquer des techniques de désinfection UV à des eaux contenant plus de 0,1 mg/L de fer ferrique et ayant une dureté supérieure à 15°F.

Si un coagulant à base de fer est utilisé en amont de la désinfection UV pendant le traitement, il faut s'assurer de l'absence de fer dissous résiduel. Les ions calcium, fer,

et magnésium précédemment cités peuvent également précipiter et se déposer sur les gaines de quartz des lampes UV du fait de l'augmentation locale de température qui diminue la solubilité de ces ions. Pour parer à ce problème, la plupart des réacteurs UV comprennent un système de nettoyage automatique des gaines.

Tableau 2 : Absorbance UV à 254 nm de composés chimiques fréquemment rencontrés dans les eaux usées (d'après Asano et al., 2007; Bolton et al., 2001; US EPA, 2006)

Composé ^a	Coefficient d'absorption molaire (M ⁻¹ .cm ⁻¹)	Seuil d'impact ^b (mg/L)
Ozone (O ₃) aqueux	3250	0,071
Fer ferrique (Fe ³⁺)	3069	0,057
Permanganate (MnO ₄ ⁻)	657	0,91
Matière organique naturelle (MON)	80 à 350	/
Thiosulfate (S ₂ O ₃ ²⁻)	201	2,7
Hypochlorite (ClO ⁻)	29,5	8,4
Fer ferreux (Fe ²⁺)	28	9,6
Sulfite (SO ₃ ²⁻)	16,5	23
Nitrate (NO ₃ ⁻)	3,4	/

^a Les composés suivants ont également été évalués et ne présentent pas d'absorbance significative à 254 nm : ammoniacque (NH₃), ammonium (NH₄⁺), calcium (Ca²⁺), hydroxyde (OH⁻), magnésium (Mg²⁺), manganèse (Mn²⁺), phosphate (PO₄³⁻), sulfate (SO₄²⁻)

^b Concentration provoquant une baisse d'un point de la transmittance UV à 254 nm

b. Caractéristiques des microorganismes

La dose UV appliquée pour atteindre une inactivation suffisante dépend du type de microorganisme ciblé. La Figure 14 présente les doses nécessaires pour atteindre 4 log (99,99 %) d'inactivation de plusieurs pathogènes. Les différences observées sont principalement liées à la nature des acides nucléiques des microorganismes. Par exemple *Cryptosporidium* est très résistant à la chloration mais très sensible au rayonnement UV car son ADN est riche en base azotée thymine : la proportion de liaisons A-T est proche de 70 % (Xu et al., 2004). Au contraire, les virus à ARN comme les adénovirus sont moins sensibles aux UV car dans l'ARN la base azotée thymine est remplacée par l'uracile, qui forme moins facilement des dimères quand elle est exposée aux UV (Sommer, 2001). L'utilisation de ce type de virus (notamment le phage MS2) est ainsi préconisée pour l'évaluation des doses appliquées dans un système de désinfection UV car une large gamme de doses peut ainsi être mesurée (NWRI, 2012).

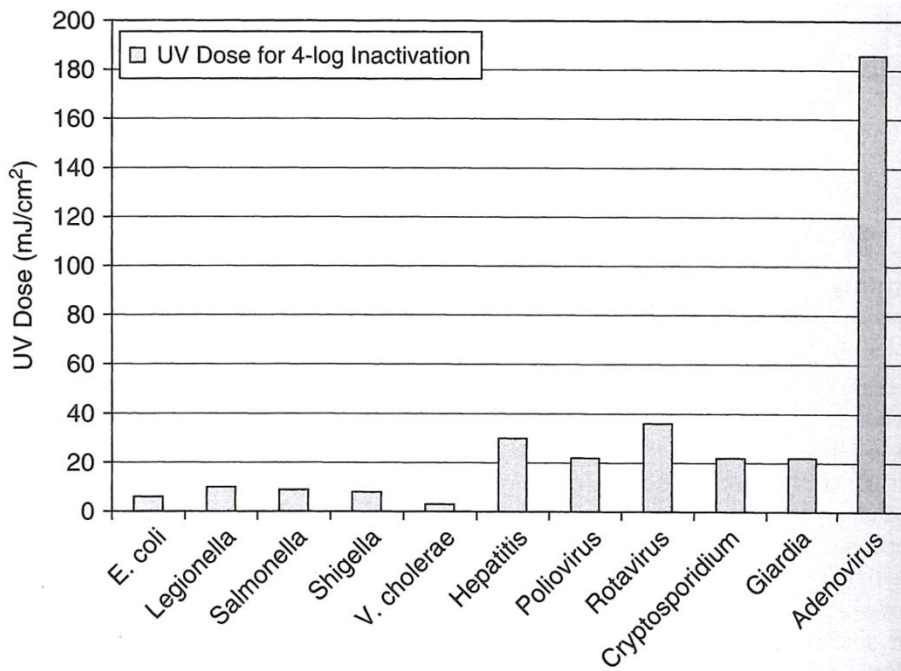


Figure 14 : Doses UV requises pour une inactivation de 4 log de plusieurs microorganismes pathogènes avec une lampe UV basse pression (Linden & Rosenfeldt, 2011 d'après Hijnen et al., 2006; US EPA, 2006). L'information génétique est sous forme d'ARN pour les virus et sous forme d'ADN pour les autres microorganismes (et le virus de l'hépatite B)

6. Conclusion

La désinfection UV est adaptée aux filières de traitement pour la réutilisation des eaux usées traitées du fait de son coût compétitif par rapport aux autres techniques de désinfection et étant donné sa simplicité de mise en œuvre. Plusieurs configurations et types de lampes peuvent être envisagés, les lampes à base de vapeur de mercure à basse pression étant parmi les plus répandues actuellement. Pour valider la dose UV appliquée dans un système, la méthode recommandée est basée sur l'utilisation d'un microorganisme indicateur dont la réponse aux UV est connue (biodosimétrie). Afin de généraliser les résultats obtenus dans cette étude à partir d'un réacteur pilote, une caractérisation des doses appliquées en se basant sur cette approche est réalisée. Pendant la phase d'exploitation, le respect de cette dose appliquée est vérifié par un capteur d'intensité UV.

Une des principales limites de l'utilisation des UV est l'interaction des microorganismes avec les particules en suspension, qui provoque un phénomène appelé « effet de traîne » : l'inactivation d'une fraction résiduelle de microorganismes est très faible voire nulle, même pour de hautes doses UV appliquées. Plusieurs travaux ont

tenté de modéliser cet effet : la méthode la plus simple est la détermination des deux constantes d'inactivation correspondant respectivement aux microorganismes « libres » et aux microorganismes abrités par les particules en suspension. Un des objectifs de cette partie est de déterminer les conditions limites pour empêcher ou limiter cet effet de traîne et d'identifier le ou les paramètres pertinents pour définir ces conditions.

La désinfection UV a pour effet de dégrader les acides nucléiques des microorganismes, ce qui les empêche de se dupliquer. Ils peuvent néanmoins conserver pendant un certain temps un métabolisme actif et mettre en place des mécanismes de réparation des atteintes causées par les UV. Le principal mécanisme identifié est lié à une enzyme (la photolyase) qui nécessite l'accès à une source de lumière (photoréactivation). De façon plus générale, l'augmentation des teneurs en microorganismes pathogènes après la désinfection peut être liée à plusieurs facteurs : réactivation mais aussi multiplication des microorganismes non affectés par les UV si les conditions de croissance (nutriments, oxygène, température...) sont présentes. Cette partie a également pour objet d'évaluer les risques liés à la réactivation et plus généralement au stockage des eaux usées traitées après la désinfection UV.

III. Matériel et méthodes

1. Caractérisation du réacteur pilote

En vue d'étudier l'impact des particules en suspension sur la désinfection UV, un réacteur pilote de désinfection est mis en œuvre. Pour pouvoir généraliser les résultats obtenus avec ce pilote aux autres systèmes de désinfection UV, il faut que le mélange soit optimal pour appliquer une dose UV homogène à l'ensemble de l'effluent traité. Le deuxième prérequis est d'estimer les doses réelles appliquées. Pour ce faire, une approche de type biodosimétrie est employée avec l'utilisation d'un réacteur UV à lumière collimatée pour établir la courbe dose-réponse du microorganisme indicateur choisi.

a. Établissement d'une courbe dose-réponse

Le microorganisme indicateur choisi pour la calibration des doses appliquées est *E. coli* (souche ATCC 15597). L'avantage de cette souche est sa facilité de mise en culture. Son inconvénient est qu'elle est sensible aux UV, ce qui limite la gamme de doses UV mesurable : en effet un abattement de 6 log est obtenu avec une dose proche de 15 mJ/cm² pour *E. coli* (Hijnen et al., 2006). L'utilisation du phage MS2 telle que préconisée par les lignes directrices américaines (NWRI, 2012) permet de mesurer une gamme de doses UV plus large : un abattement de 6 log est obtenu avec une dose de 130 mJ/cm² environ (Hijnen et al., 2006). Cependant les conditions de mise en culture et de quantification sont complexes à mettre en œuvre, c'est pourquoi un indicateur plus simple est utilisé.

La courbe dose-réponse est établie à l'aide d'un réacteur UV à lumière collimatée (Atlantium). Le réacteur est constitué des éléments suivants :

- lampe UV à vapeur de mercure basse pression d'une puissance de 15 W (TUV 15W G15T8, Philips)
- tube de collimation de 24 cm de longueur et de 7,5 cm de diamètre, recouvert d'une peinture noire ne réfléchissant pas les UV
- plateforme de support à hauteur variable
- agitateur magnétique (MR1000, Heidolph)

Les autres caractéristiques des essais sont présentées dans le Tableau 3. Le « Petri factor » est déterminé à partir de la mesure d'intensité UV par intervalle de 0,5 cm (Figure 15). Les mesures d'intensité sont effectuées à l'aide d'un radiomètre optique

portable (MS-100, UVP) équipé d'un capteur pour la longueur d'onde 254 nm (MS-125 UV sensor, UVP). Trois essais de calibration sont effectués. Pour chaque essai, un inoculum en fin de phase exponentielle stocké pendant moins de 24h de la souche *E. coli* est placé en incubation à 37°C dans le bouillon Luria-Bertani (CONDA Microbiologie) pendant une durée de 2 à 4 heures pour atteindre la phase de croissance exponentielle (absorbance à 600 nm supérieure à 1). Cette culture est ensuite diluée dans de l'eau stérile pour atteindre une transmittance UV à 254 nm supérieure à 60 % et une teneur en *E. coli* proche de 10⁶ UFC/mL. Les mesures d'absorbance et de transmittance sont réalisées avec un spectrophotomètre UV-visible (Anthélie, Secomam) et une cuve en quartz de trajet optique 1 cm. Les doses UV testées sont comprises entre 0 et 50 mJ/cm² en tenant compte de la transmittance de l'effluent pour déterminer les temps d'exposition correspondants (Tableau 3). Pour chaque essai, les mesures sont effectuées en triplicats pour chaque dose et les échantillons sont réalisés de façon aléatoire, conformément aux préconisations (Bolton et al., 2003).

Tableau 3 : Détermination des doses UV appliquées à l'effluent à l'aide d'un réacteur UV à lumière collimatée (Bolton et al., 2003)

Paramètre	Unité	Essai n°1	Essai n°2	Essai n°3
Diamètre interne de la boîte de Pétri	cm		5,3	
Volume d'effluent	mL		15	
Volume de l'agitateur	mL		0,0707	
Volume total dans la boîte de Pétri	mL		15,0707	
Lame d'eau	cm		0,8	
Distance lampe UV – surface de l'effluent	cm		29	
Divergence factor	/		0,9732	
Reflection factor	/		0,9750	
Petri factor	/		0,9026	
Transmittance à 254 nm	%	63,1	74,2	64,5
Water factor	/	0,8365	0,8893	0,8430
Intensité au centre de la boîte de Pétri	mW/cm ²	0,17	0,17	0,15
Intensité moyenne	mW/cm ²	0,12	0,13	0,11
Temps d'exposition pour une dose de 1 mJ/cm ²	s	8,21	7,72	9,23

Après l'exposition aux UV, chaque échantillon est prélevé dans un tube stérile de 10 mL, conservé à 4°C à l'obscurité et analysé dans les deux heures. Les analyses sont effectuées à partir de 1 mL d'échantillon (éventuellement dilué) par la méthode Compact Dry EC (HyServe). Après incubation à 37°C pendant 24h, les unités formant une colonie (UFC) sont comptabilisées et ramenées au volume d'échantillon (en

prenant en compte le facteur de dilution le cas échéant). L'inactivation est calculée par la formule $\log_{10}(N_0/N)$ avec N_0 la moyenne des teneurs en *E. coli* des échantillons non traités par les UV et N la teneur en *E. coli* de l'échantillon exposé à une dose UV donnée.

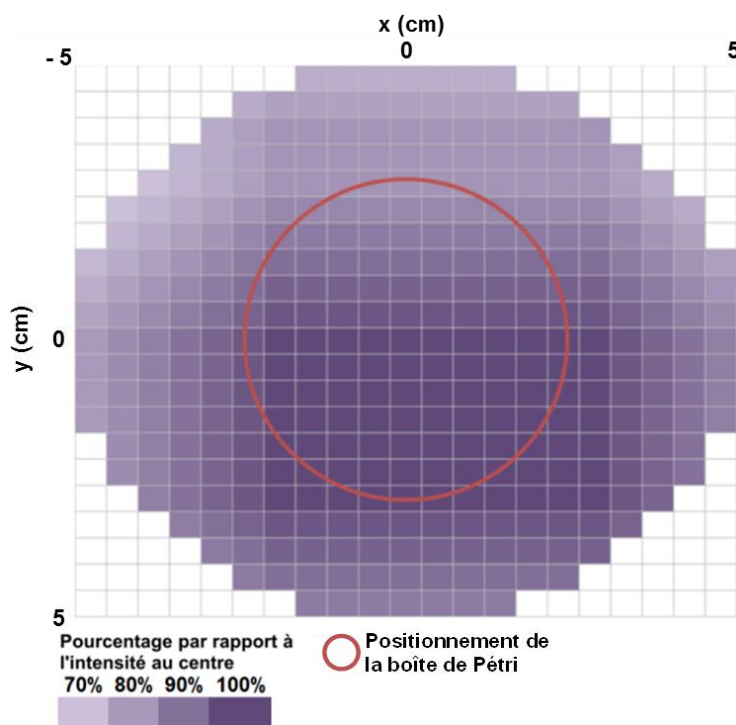


Figure 15 : Mesure de l'intensité reçue sur l'ensemble de la surface traitée : « Petri factor » = 0,9026

b. Caractérisation du réacteur pilote : hydraulique

Le réacteur pilote est conçu et fabriqué par la société BIO-UV. Il s'agit d'un réacteur cylindrique en inox d'un volume utile de 50 L (Figure 16). Les équipements du pilote sont les suivants :

- lampe UV à vapeur de mercure basse pression d'une puissance de 6 W (TUV 6W G6T5, Philips) reliée à un ballast électronique (Delta UV). Le ballast électronique sert à réguler le courant fourni à la lampe. La lampe est également protégée par une gaine en quartz
- capteur d'intensité UV (D-SICONORM, ZED)
- agitateur à hélice (Hei-TORQUE Value 200, Heidolph) et pâle d'agitation à palette (R1375, IKA)

La vitesse d'agitation est fixée à 400 tours/minute. Afin de vérifier que cette agitation est homogène sur l'ensemble du réacteur, un test de mélange cinétique est réalisé. Il consiste en l'ajout de 0,1 g/L de fécule de maïs dans le réacteur rempli d'eau du robinet pour atteindre une turbidité de 20 NTU. La turbidité est ensuite mesurée toutes les 30 secondes jusqu'à la stabilisation de la valeur. Ce test permet de déterminer le temps minimum requis pour assurer l'homogénéisation.

Le risque est également que les conditions d'agitation appliquées aient un impact sur les populations de microorganismes étudiées. Pour vérifier l'absence d'impact, un effluent secondaire de station d'épuration est soumis à l'agitation dans le réacteur pendant 1h30. Des prélèvements sont effectués à intervalles réguliers et les indicateurs *E. coli*, coliformes et entérocoques sont quantifiés par les méthodes IDEXX (Colilert-18 et Enterolert-E).

Les conditions idéales de mélange dans une cuve sont définies dans la littérature (Roustan et al., 2015). Dans le cas du réacteur pilote, ces conditions sont globalement remplies, même si la taille de la pale d'agitation devrait idéalement être plus grande par rapport à la taille du réacteur (Tableau 4). La tige d'agitation est idéalement placée au centre de la cuve, mais cet emplacement est déjà occupé par la lampe UV.

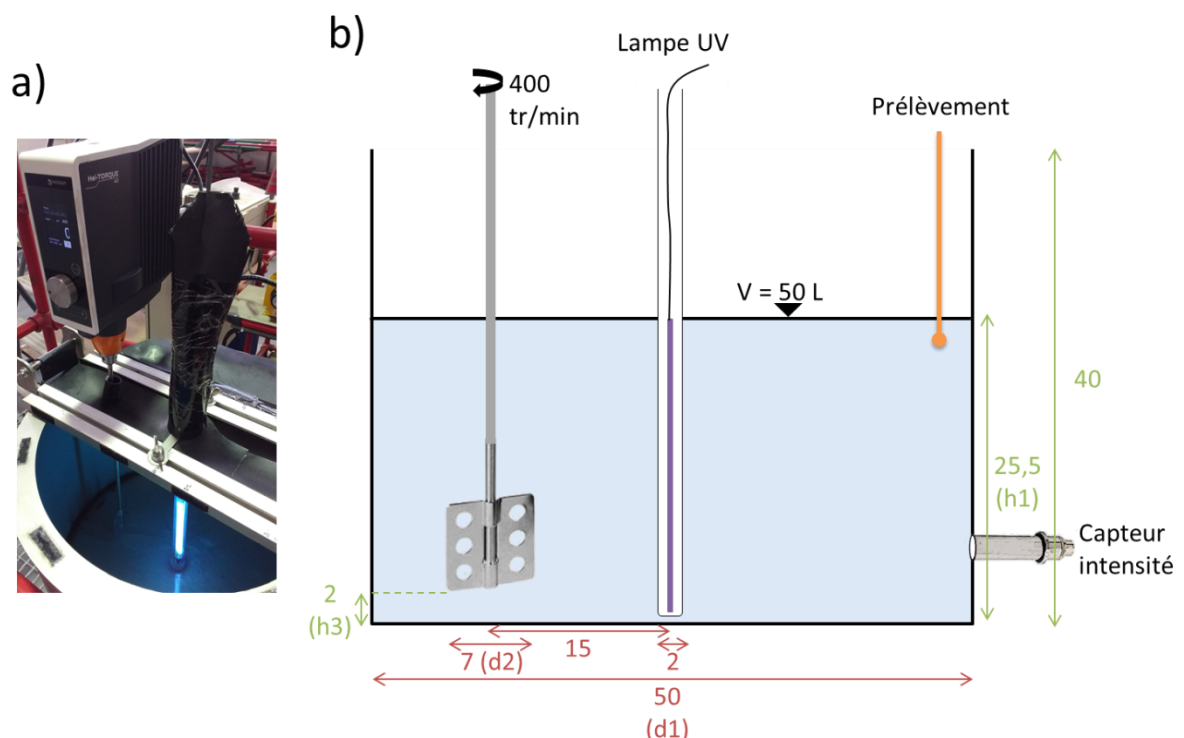


Figure 16 : Réacteur pilote de désinfection UV : a) vue de dessus et b) représentation schématique en coupe

Tableau 4 : Dimensions caractéristiques du réacteur et comparaison avec les valeurs « standards ». Les dénominations des longueurs et hauteurs renvoient à la Figure 16

Indice	Valeur	Valeur guide (Roustan et al., 2015)
h3/d2	0,29	0,3
d2/d1	0,14	0,3 – 0,6
h1/d1	0,51	≤ 1
Nombre de Reynolds $Re = \frac{\rho \cdot N \cdot d2^2}{\mu}$	28 770	Re > 2000 (régime turbulent)

$\rho = 999 \text{ kg/m}^3$; $\mu = 1,14 \cdot 10^{-3} \text{ Pa.s}$; N : vitesse de rotation en s^{-1} ;
d2 : diamètre de la pâle en m

c. Caractérisation du réacteur : doses de réduction équivalente (DRE)

La mesure des doses de réduction équivalentes (DRE) dans le réacteur est basée sur les mesures de l'inactivation d'*E. coli* ATCC 15597 pour plusieurs temps de contact, et sur la comparaison de ces mesures avec la courbe dose réponse précédemment établie. Quatre essais sont réalisés, répartis sur la période d'étude pour mettre en évidence un éventuel changement d'efficacité du réacteur. Pour chaque essai, un inoculum en fin de phase exponentielle stocké pendant moins de 24h de la souche *E. coli* est placé en incubation dans 300 mL de bouillon Luria-Bertani pendant une durée de 2 à 4 heures pour atteindre la phase de croissance exponentielle (absorbance à 600 nm supérieure à 1). Cette culture est ensuite mélangée dans le réacteur rempli d'eau du robinet (50 L) pour atteindre une transmittance UV à 254 nm supérieure à 60 %. Les transmittances à 254 nm mesurées pour les quatre essais sont : 64,8 %, 67,1 %, 68,6 % et 67,9 %. Pour la mesure du temps d'exposition aux UV, le chronomètre est lancé au moment de l'allumage de la lampe. Des prélèvements de 10 mL sont ensuite réalisés à plusieurs intervalles entre 0 et 90 minutes d'exposition dans le réacteur, conservés à 4°C à l'obscurité et analysés dans les deux heures. Les analyses sont effectuées à partir de 1 mL d'échantillon (éventuellement dilué) par la méthode Compact Dry EC (HyServe). L'inactivation calculée pour chaque temps de contact est comparée avec la courbe dose réponse établie grâce aux mesures dans le réacteur à lumière collimatée.

2. Étude de l'impact des particules en suspension sur l'efficacité de la désinfection UV

a. Effluents étudiés

Les effluents secondaires considérés dans ces travaux sont les mêmes que les effluents considérés dans l'étude sur les méthodes d'analyse biologique. Une description de ces effluents est proposée dans la 2^{ème} partie – paragraphe III.1. Le dopage en MES est effectué en mélangeant à cet effluent secondaire un volume plus ou moins important de boues liquides en provenance du bassin d'aération de la station. La teneur en matière sèche des boues est comprise entre 3,5 et 5 g/L. L'effluent secondaire et les boues sont collectés directement sur la station d'épuration puis transportés jusqu'au laboratoire pour être analysés dans les trois heures après le prélèvement. La température de l'eau est égale à la température de la pièce, proche de 15°C. Les effluents secondaires avec ou sans ajout de boues sont mélangés dans le réacteur pilote selon les conditions précédemment définies (Figure 16). Un temps d'homogénéisation d'au minimum 3 minutes est respecté avant de démarrer les tests. Pour chaque condition étudiée, les essais sont réalisés en triplicats (Tableau 5).

Tableau 5 : Composition des mélanges pour les différentes conditions testées (essais en triplicats pour chaque condition)

Effluent	Teneur en MES visée (mg/L)	Volume effluent secondaire (L)	Volume boues (mL)
Effluent secondaire	5	50	0
Effluent secondaire + boues	15	50	179 (0,4%)
Effluent secondaire + boues	30	50	360 (0,8%)
Effluent secondaire + boues	60	50	700 (1,4%)

b. Essais sur le réacteur à lumière collimatée

Des essais de désinfection des effluents sont réalisés à petite échelle dans le réacteur UV à lumière collimatée. Trois types d'effluent sont étudiés : effluent secondaire, effluent secondaire + 0,8% de boues (objectif : 30 mg/L de MES) et effluent secondaire + 1,4% de boues (objectif : 60 mg/L de MES). Les doses appliquées correspondent aux doses appliquées à l'effluent secondaire seul. Du fait du faible volume d'échantillon (15 mL), les analyses biologiques sont effectuées avec la méthode Compact Dry EC : seuls *E. coli* et les coliformes sont étudiés.

c. Essais sur le réacteur pilote

Avant l'allumage de la lampe UV, plusieurs analyses physico-chimiques sont réalisées sur le mélange : distribution granulométrique des particules, turbidité, transmittance UV à 254 nm, MES et fer. L'analyse du fer total est réalisée par spectrophotométrie selon la norme ASTM E1615-16 (ASTM, 2016) par dosage du complexe fer-ferrozine (Hach Lange) avec le spectrophotomètre portable DR890 (Hach Lange). Les protocoles pour les autres analyses sont détaillés dans la 2^{ème} partie – paragraphe III.2. Les paramètres transmittance UV et fer total sont également mesurés sur la fraction dissoute des effluents, obtenue après filtration à 0,45 µm à l'aide d'un filtre seringue stérile en PVDF (Millex HV Syringe Filter, Millipore). L'ensemble des paramètres physico-chimiques (sauf le comptage de particules) est également analysé après les essais de désinfection pour mettre en évidence une éventuelle évolution.

Des prélèvements de 100 mL sont effectués après différents temps d'exposition aux UV (le chronomètre est lancé à l'allumage de la lampe) : 0, 5, 10, 20, 40, 60 et 90 minutes. L'échantillonnage est réalisé toujours au même endroit dans le réacteur et directement dans l'effluent à l'aide d'une pipette stérile de 50 mL (Figure 16). Les prélèvements sont stockés à l'obscurité et à 4°C pour analyse dans les deux heures. Le dénombrement des indicateurs *E. coli*, coliformes et entérocoques est effectué par les méthodes IDEXX Colilert-18 et Enterolert-E sur 100 mL (après une éventuelle dilution). Les principes et limites de ces méthodes sont détaillés et discutés dans la deuxième partie de ce mémoire. L'inactivation est calculée en faisant le rapport entre les concentrations mesurées avant exposition aux UV et les concentrations mesurées pour les différents temps de contact.

Pour mettre en évidence l'impact de la désinfection sur la fraction libre des microorganismes, certains prélèvements sont dupliqués pour être filtrés à 5 µm à l'aide d'un filtre seringue avec une membrane en acétate de cellulose (Ministart NML, Sartorius). Les mêmes dilutions sont appliquées pour les échantillons filtrés et non filtrés.

Pour mettre en évidence l'impact lié aux petites particules en suspension sur la désinfection UV, des essais sont réalisés dans le réacteur pilote avec l'effluent secondaire mélangé à de la fécule de maïs pour atteindre une turbidité de 15 NTU. Les analyses physico-chimiques et biologiques sont les mêmes que pour les autres conditions testées.

3. Stockage et réactivation : essais à l'échelle du laboratoire

Pour mettre en évidence l'impact du stockage sur l'évolution des microorganismes indicateurs après exposition aux UV, un prélèvement est effectué dans le réacteur après 10 (effluent secondaire seul) ou 20 minutes (effluent secondaire + boues) d'exposition au même endroit que les autres prélèvements à l'aide d'une pompe préalablement stérilisée et d'un flacon en verre borosilicaté de 1 L. L'échantillon (environ 900 mL) est ensuite divisé dans deux béciers en verre borosilicaté de 1 L, l'un étant recouvert de papier aluminium pour assurer l'obscurité et l'autre étant exposé à la lumière (Figure 17). La source lumineuse est une ampoule fluocompacte de 12 W (OSRAM) dont le spectre d'émission est compris entre 300 et 700 nm avec un pic à 360 nm. L'intensité lumineuse à 365 nm reçue sur la surface intérieure du flacon la plus exposée est de 0,15 mW/cm² (radiomètre optique MS-100 (UVP) équipé d'un capteur MS-136 (UVP) pour la longueur d'onde 365 nm). Cette configuration correspond à la configuration mise en œuvre par Nebot Sanz et al. (2007) pour l'étude de la photoréactivation. Les flacons ne sont pas agités pour se rapprocher de conditions réelles de stockage. Ils sont placés dans une pièce à température contrôlée et fixée à 20°C.

Deux prélèvements sont effectués dans les deux flacons après environ 2 h et après environ 19 h de stockage. Le dénombrement des indicateurs *E. coli*, coliformes et entérocoques est effectué par les méthodes IDEXX Colilert-18 et Enterolert-E sur 100 mL.

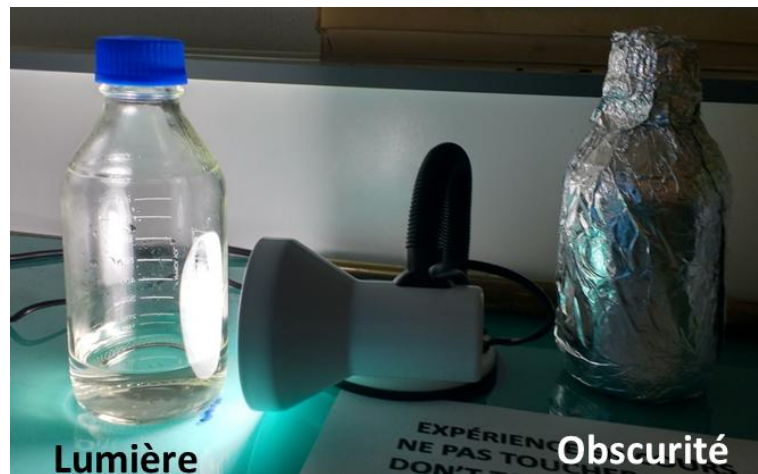


Figure 17 : Configuration expérimentale pour l'étude du stockage à l'obscurité ou à la lumière à l'échelle du laboratoire

4. Stockage et réactivation : essais à l'échelle du pilote industriel

Si l'étude du stockage en laboratoire présente l'avantage de contrôler certains paramètres comme la température ou l'exposition à la lumière, le suivi du stockage en conditions réelles permet d'étudier l'effet combiné de ces facteurs à une échelle plus représentative. Dans cette étude, le stockage à l'obscurité d'un effluent secondaire filtré est étudié, avec ou sans exposition à une faible dose UV.

a. Effluent étudié

Les eaux usées traitées sont issues de la station d'épuration étudiée dans le cadre du projet NOWMMA (voir 1^{ère} partie, paragraphe VI.3). Avant le stockage, les effluents secondaires subissent une filtration sur sable effectuée par un pilote capable de traiter un débit de 10 m³/h.

b. Cuve de stockage et dispositif de lampes UV

La cuve de stockage est une cuve cylindrique en PEHD de hauteur 2,8 m et de diamètre 2 m (Figure 18a). Son volume est de 8,8 m³ (volume utile : 6,5 m³). Le remplissage s'effectue à partir du trop-plein de la cuve de lavage du filtre à sable en 40 minutes environ. L'alimentation s'effectue par le haut de la cuve. La sortie de la cuve est située en bas de celle-ci et les eaux sont dirigées vers le réseau d'irrigation. Toutes les canalisations sont en PVC DN 50. Le point de prélèvement des eaux en sortie de cuve est un robinet en inox (Figure 18b).

Le dispositif de lampes UV comprend quatre lampes UV basse pression d'une puissance unitaire de 87 W (BIO-UV) (puissance totale installée : 348 W). Ces lampes sont fixées à des flotteurs pour monter ou descendre dans la cuve selon le niveau de l'eau et retenues par un filin pour ne pas toucher le fond de la cuve (Figure 18c). L'objectif de ce dispositif est d'exposer une partie des microorganismes à une faible dose UV pour mettre en évidence un éventuel phénomène de réactivation et/ou de croissance pendant le stockage.

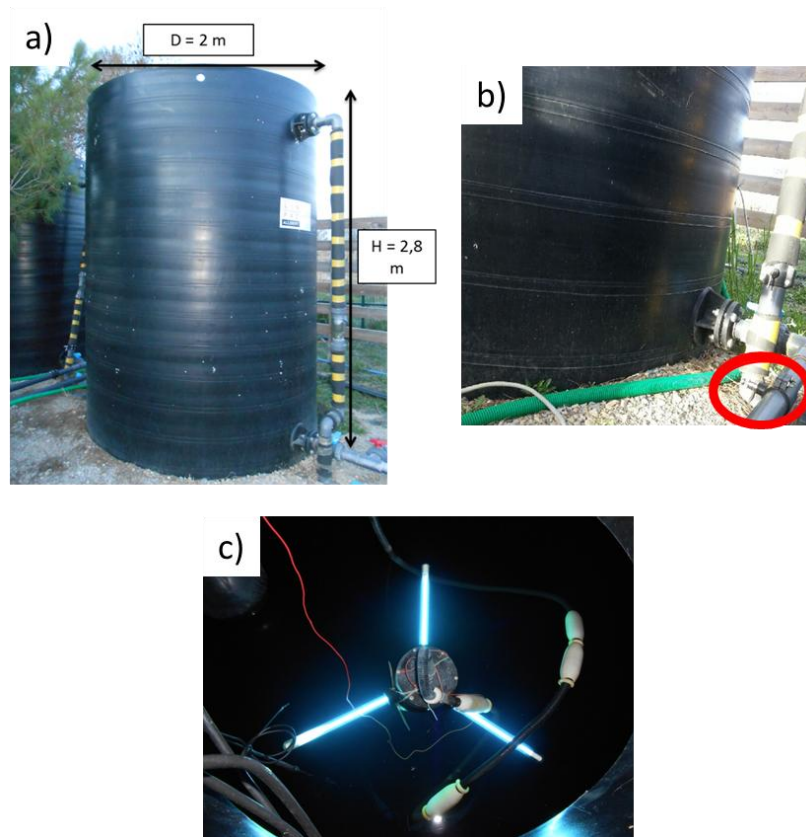


Figure 18 : Cuve de stockage étudiée : a) vue d'ensemble, b) point de prélèvement en sortie du stockage, c) dispositif de lampes UV immergées (vue de dessus)

c. Protocole de remplissage et d'échantillonnage

Avant chaque essai, la cuve est vidangée avec les lampes allumées, puis les lampes sont éteintes et la cuve est rincée à l'eau potable du réseau. Deux conditions sont testées pour le remplissage et le stockage :

- remplissage et stockage avec les lampes UV allumées
- remplissage et stockage avec les lampes UV éteintes

Pour chaque condition, trois essais ont été réalisés entre février et avril 2015 avec un temps de stockage maximum de 30 h après la fin du remplissage.

Pendant le remplissage de la cuve, un échantillon est prélevé en sortie du filtre à sable. À la fin du remplissage (T+0h), le suivi est réalisé selon la fréquence suivante : un prélèvement à T+ 0h, un prélèvement à T + 5h et un prélèvement à T + 29h (Figure 19). Le protocole de prélèvement est le suivant :

- ouverture du robinet au minimum 10 minutes avant le prélèvement pour chasser les éventuels dépôts dans la canalisation

- stérilisation du robinet à la flamme
- prélèvement dans des flacons de 100 mL en verre borosilicaté stériles

Les échantillons sont ensuite conservés en enceinte réfrigérée (4°C) et analysés dans les 6 h. Le dénombrement des indicateurs *E. coli*, coliformes et entérocoques est effectué par les méthodes IDEXX Colilert-18 et Enterolert-E sur 100 mL après dilution éventuelle. Les analyses sont réalisées en triplicats pour chaque prélèvement.

Un suivi des températures est effectué en continu dans la cuve (capteur PHEHT, Ponsel Mesures). D'autres paramètres physico-chimiques sont mesurés sur les échantillons prélevés en sortie du filtre à sable : pH (pH340, WTW), conductivité (Odeon, Ponsel Mesures), turbidité (Turb 550 IR, WTW), transmittance UV à 254 nm (DR6000, Hach Lange), demande chimique en oxygène (test LCK 414, Hach Lange) et matières en suspension (selon norme NF EN 872).

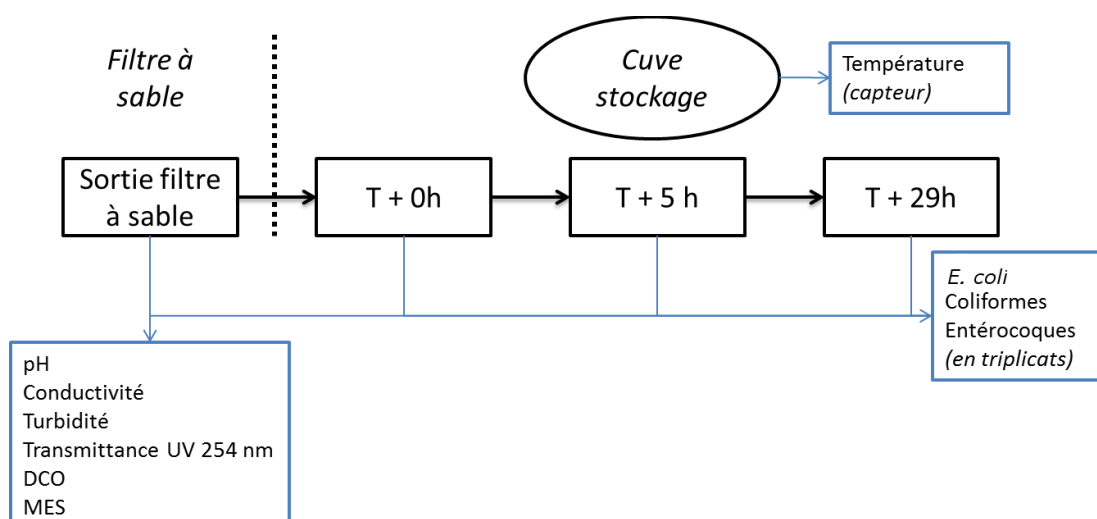


Figure 19 : Analyses réalisées lors de chaque essai

5. Analyse statistique des données

La mise en forme et le traitement statistique des données sont réalisés sous Excel 2010 (Microsoft) et à l'aide du logiciel XLSTAT Base v18.07 (Addinsoft). Les différences significatives entre les échantillons sont mises en évidence par des tests non paramétriques pour comparaisons par paires : test de Wilcoxon signé si les échantillons sont appariés et test de Mann-Whitney si les échantillons sont indépendants (voir 2^{ème} partie – paragraphe III.5). Le seuil de significativité retenu est 0,05.

Afin de mettre en évidence les corrélations entre plusieurs variables et des observations, deux analyses multivariées sont réalisées : l'analyse en composantes principales (ACP) et la classification ascendante hiérarchique (CAH) (Legendre & Legendre, 1988).

L'ACP est une méthode descriptive ayant pour objectif de réduire un jeu de données comprenant un nombre élevé de variables en une série de composantes qui les représentent au mieux pour faciliter l'interprétation. Les composantes principales sont issues d'une combinaison linéaire des variables initiales après standardisation (les variables sont centrées et réduites). Des liaisons plus complexes peuvent exister (quadratiques, logarithmiques...) mais elles ne sont pas étudiées avec cette méthode. Les composantes sont classées par ordre décroissant de variance expliquée. Ainsi, la plus grande partie de la variance du jeu de données peut être représentée à l'aide des premières composantes, dites principales. La représentation des variables de départ par rapport à ces nouvelles composantes se fait sur un cercle de rayon 1 en utilisant comme coordonnées les coefficients de corrélation entre les variables de départ et les composantes principales. Une variable est d'autant mieux représentée par un axe qu'elle est proche du bord du cercle. Deux variables colinéaires sont significativement corrélées (positivement ou négativement). Deux variables orthogonales sont significativement non-corrélées.

L'ACP peut être associée à une autre analyse multivariée descriptive : la CAH. La CAH est une méthode d'analyse par classification dont le principe est le regroupement de variables en classes selon des critères de ressemblance définis au préalable. La première étape est le calcul d'indices de dissimilarité ou de « distance » entre les variables. Pour donner un poids équivalent aux variables, les données sont préalablement centrées et réduites. Pour mesurer la distance entre les variables, le calcul de la distance euclidienne est le plus souvent utilisé. La deuxième étape est le choix d'une méthode de coupure entre les différentes classes. Parmi les nombreuses solutions existantes, c'est la méthode de Ward qui est la plus utilisée (Legendre & Legendre, 1988). Cette méthode revient à retenir comme distance entre deux groupes celle qui minimise la variance intragroupe tout en maximisant la variance intergroupe. Ces différentes classes sont représentées sur un arbre hiérarchique appelé dendrogramme. Le dendrogramme indique l'ordre dans lequel les agrégations successives ont été opérées ainsi que la valeur de l'indice de dissimilarité à chaque niveau d'agrégation. Les agrégations qui sont les plus significatives sont obtenues simplement en traçant une ligne horizontale sur le dendrogramme et en retenant les agrégations qui sont au-dessus de cette ligne. Il est généralement pertinent d'effectuer la coupure après les agrégations correspondant à des valeurs faibles d'indices de dissimilarité et avant des agrégations correspondant à des valeurs d'indices élevées.

IV. Résultats et discussion

1. Caractérisation du réacteur pilote

a. Établissement d'une courbe dose – réponse

Trois essais ont été réalisés dans le réacteur à lumière collimatée et avec le microorganisme indicateur *E. coli* ATCC 15597. Les mesures d'inactivation pour une dose donnée ne sont pas significativement différentes entre les trois essais (test de Wilcoxon signé $p = 0,08 > 0,05$) comme attendu, compte tenu de l'adaptation des temps d'exposition par rapport aux transmittances UV des effluents utilisés.

L'inactivation d'*E. coli* en fonction des doses UV appliquées est présentée en Figure 20a. Un infléchissement de la courbe est observé pour des doses supérieures à 20 mJ/cm², même si la pente reste marquée. Ce phénomène est décrit dans la littérature et peut être expliqué par plusieurs hypothèses (Hijnen et al., 2006) : mélange non homogène, agrégation des microorganismes entre eux ou existence d'une sous-population légèrement plus résistante aux UV. La première hypothèse est très peu plausible dans un réacteur à lumière collimatée. Il est difficile de trancher entre les deux dernières hypothèses, même si la teneur importante en microorganismes dans les échantillons testés (10⁶ UFC par mL) appuie l'hypothèse de l'agrégation qui accentuerait les phénomènes de diffusion du rayonnement UV (Figure 10) (Cantwell & Hofmann, 2008). Il pourrait également s'agir d'un biais lié à la méthode analytique. En effet, le résiduel après une dose appliquée supérieure à 30 mJ/cm² est inférieure à 10 UFC/mL. Pour ces concentrations faibles, l'incertitude liée au comptage (coefficient de variation supérieur à 50 %, voir 2^{ème} partie, paragraphe II.2). Pour une dose appliquée de 50 mJ/cm², aucun résiduel en *E. coli* n'est détectable par cette méthode.

Pour éviter ce biais, la constante d'inactivation est déterminée pour des doses appliquées inférieures à 15 mJ/cm², conformément aux préconisations de la littérature pour *E. coli* (Hijnen et al., 2006). La constante est donnée par la pente de la droite de régression linéaire des données d'inactivation en fonction de la dose appliquée entre 5 et 15 mJ/cm². Pour *E. coli* ATCC 15597, la valeur de la constante est égale à $0,308 \pm 0,019$ cm²/mJ ($R^2 = 0,91$) (Figure 20b). Les valeurs décrites dans la littérature pour *E. coli* sont comprises entre 0,360 et 0,724 cm²/mJ (Butler et al., 1987; Chang et al., 1985; Harris et al., 1987; Oguma et al., 2002; Quek & Hu, 2008; Sommer et al., 1996, 2000, 1989; Zimmer et al., 2003). La valeur obtenue dans cette étude est du même ordre de grandeur, bien que légèrement plus faible. Il faut cependant noter que la souche ATCC

15597 a été peu étudiée (Quek & Hu, 2008). Et il a été montré que la résistance aux UV peut être très variable entre différentes souches d'une même espèce (Hijnen et al., 2006). Ainsi, Quek & Hu (2008) ont étudié la réponse aux rayonnements UV de quatre souches d'*E. coli* et les constantes d'inactivation obtenues varient entre 0,4 et 1,3 cm²/mJ (lampe UV basse pression).

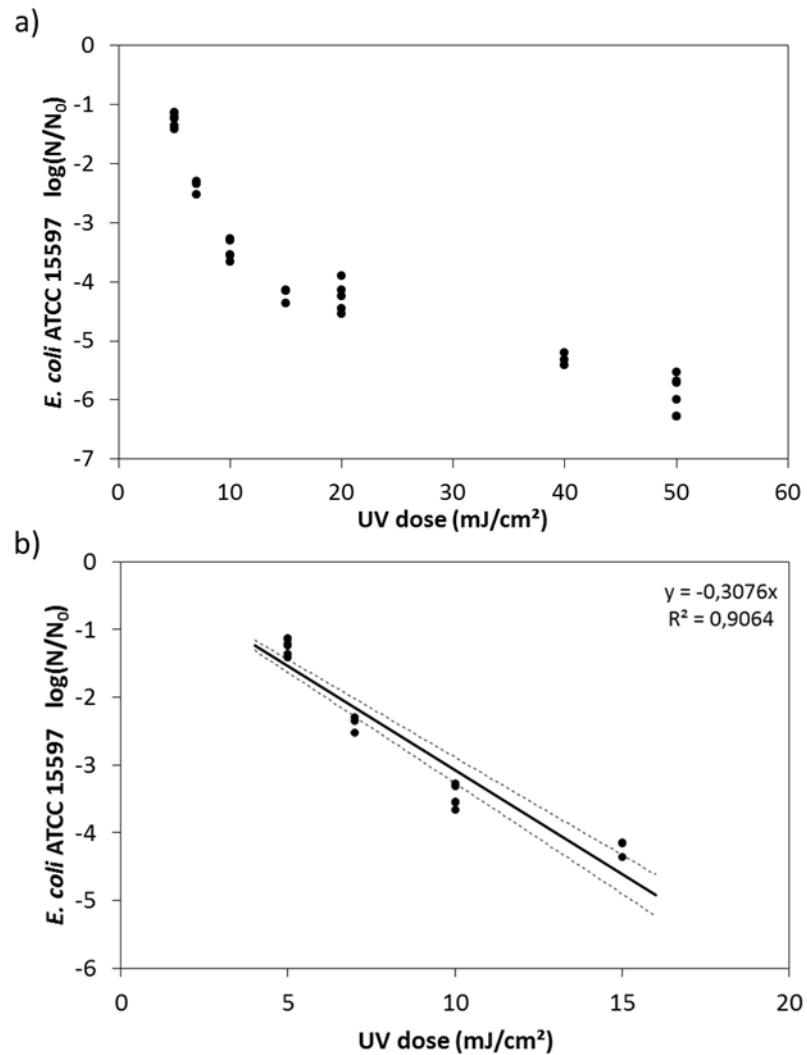


Figure 20 : Courbe dose – réponse obtenue avec le réacteur à lumière collimatée (3 essais) et *E. coli* ATCC 15597 : a) entre 0 et 50 mJ/cm² et b) zoom pour des doses appliquées inférieures à 20 mJ/cm². Les traits en pointillés représentent l'intervalle de confiance à 95% de la régression linéaire (n = 18)

b. Validation des conditions de mélange dans le réacteur

Les conditions et la vitesse de mélange dans le réacteur pilote sont validées par la détermination du temps nécessaire pour atteindre une valeur de turbidité stable (valeur cible : 20 NTU) après l'injection de fécule de maïs (0,1 g/L). La valeur de 20 NTU est atteinte dès 30 secondes après l'injection, mais elle est stable après 2 minutes de mélange. En prenant une marge de sécurité, le temps d'homogénéisation minimum est donc fixé à 3 minutes.

L'absence d'impact sur les microorganismes étudiés est également vérifiée : pas de changement significatif dans les dénombrements réalisés après 90 minutes d'agitation dans l'effluent secondaire étudié (Figure 21).

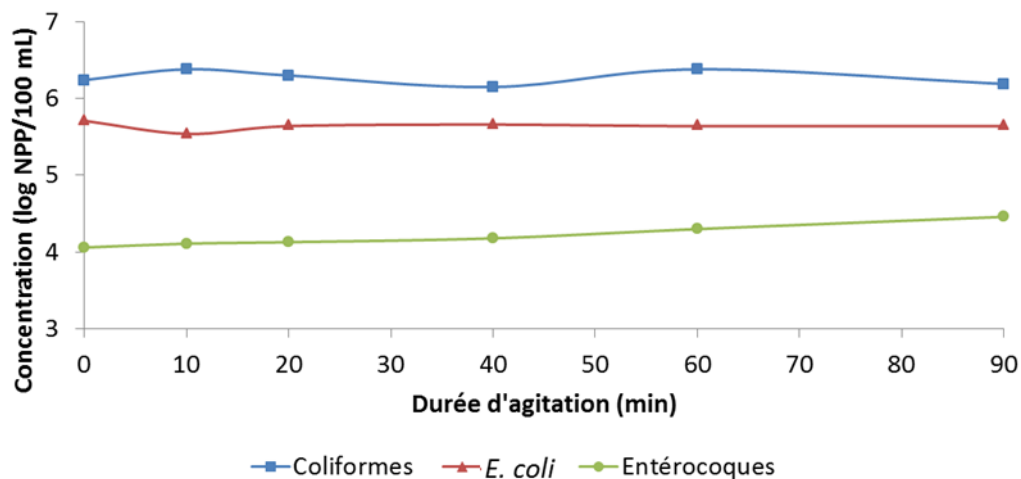


Figure 21 : Évolution des teneurs en coliformes, *E. coli* et entérocoques (effluent secondaire – dénombrement en Nombre le Plus Probable (NPP), méthode IDEXX) en fonction de la durée d'agitation dans le réacteur pilote (lampe UV éteinte). L'incertitude sur la mesure est égale à environ 0,3 log NPP/100 mL pour les concentrations mesurées

c. Estimation des doses de réduction équivalente dans le réacteur

L'inactivation d'*E. coli* ATCC 15597 dans le réacteur UV en fonction du temps de contact est présentée en Figure 22a. Les concentrations initiales en *E. coli* dans le réacteur sont proches de 10^6 UFC/mL pour tous les essais réalisés. Un épaulement des courbes est observé pour des temps de contact supérieurs à 20 minutes. Les

concentrations sont inférieures à 10 UFC/mL pour ces temps de contact, le résiduel peut donc être considéré comme nul étant donné l'incertitude sur le comptage.

L'estimation des DRE n'est donc valable que pour les temps de contact entre 0 et 20 minutes. (Figure 22b) Pour chaque temps de contact, l'inactivation ($\log_{10} N/N_0$) est convertie en dose grâce à la constante d'inactivation $k = 0,308 \text{ cm}^2/\text{mJ}$. Même si peu de points peuvent être pris en compte pour la régression, les facteurs de conversion pour les quatre essais sont comparables et proches de $1,3 \text{ mJ}/\text{cm}^2/\text{min}$ (Tableau 6). La dose appliquée étant directement proportionnelle au temps de contact (équation (1)), il est possible d'extrapoler les DRE calculées pour des temps de contact supérieurs à 20 min (Tableau 6).

Les incertitudes sur l'estimation du facteur de conversion sont cependant importantes du fait du cumul des incertitudes sur l'établissement de la courbe dose réponse et des incertitudes sur les mesures d'inactivation dans le réacteur. De plus il faut noter que la valeur estimée de $1,3 \text{ mJ}/\text{cm}^2/\text{min}$ permet de calculer les DRE correspondant à une transmittance UV de $67 \pm 2 \%$. Pour limiter les incertitudes au cours des études d'inactivation à suivre, les constantes d'inactivation sont d'abord calculées en fonction des temps de contact. Les DRE estimées servent à comparer les résultats avec les doses appliquées dans d'autres études.

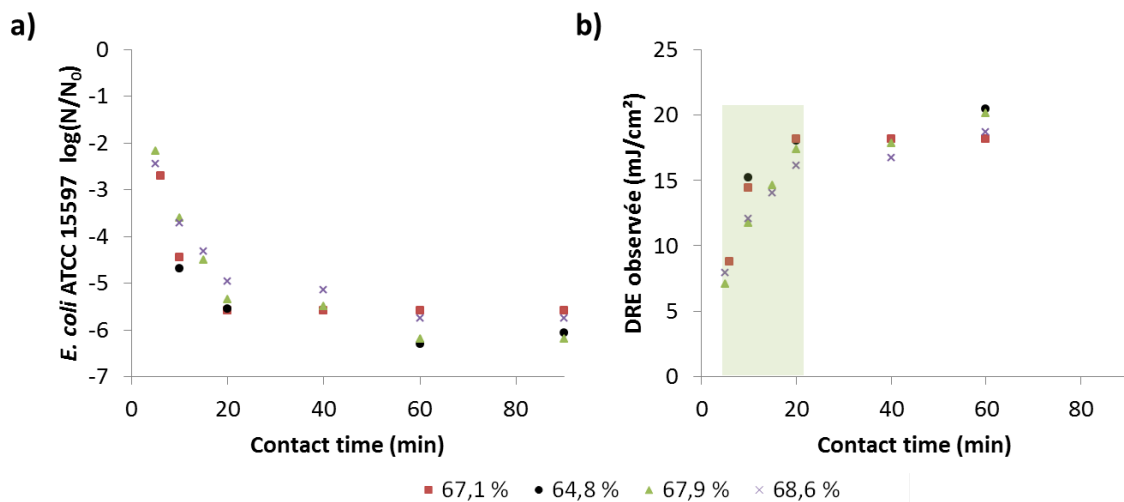


Figure 22 : a) Inactivation d'*E. coli* ATCC 15597 en fonction du temps de contact dans le réacteur pilote et de la transmittance UV à 254 nm du milieu et b) doses de réduction équivalentes. Les points mis en évidence sont ceux pris en compte pour la détermination du facteur de conversion par régression linéaire

Tableau 6 : Facteurs de conversion (a) calculés pour les 4 essais par régression linéaire (Figure 22b) avec $k = 0,308 \text{ cm}^2/\text{mJ}$ pour *E. coli* ATCC 15597 et estimation des doses de réduction équivalente pour différents temps de contact (en minutes) dans le réacteur pilote (N : nombre de points pris en compte)

	TUV 254 nm (%)	N*	a (mJ/cm ² /min)	R ²	DRE estimée (mJ/cm ²)				
					10 min	20 min	40 min	60 min	90 min
	64,8	2	1,36	0,60	14	27	54	82	122
	67,1	3	1,44	0,99	14	29	58	86	130
	67,9	4	1,17	0,64	12	23	47	70	105
	68,6	4	1,27	0,97	13	25	51	76	114
<i>Moyenne</i>	<i>67,1</i>	<i>/</i>	<i>1,3</i>	<i>/</i>	<i>13</i>	<i>26</i>	<i>52</i>	<i>79</i>	<i>118</i>
<i>Ecart-type</i>	<i>1,7</i>	<i>/</i>	<i>0,1</i>	<i>/</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>5</i>	<i>7</i>	<i>10</i>

* l'interception avec l'axe des ordonnées est fixée à l'origine

2. Impact des particules en suspension sur l'efficacité de la désinfection UV

a. Caractérisation physico-chimique des effluents

Les résultats pour les effluents étudiés avec le réacteur pilote de désinfection UV sont présentés dans le Tableau 7. Le dopage en boue de l'effluent secondaire est similaire à celui effectué pour l'étude sur les méthodes d'analyse biologique (2^{ème} partie). L'évolution des indicateurs globaux de pollution particulaire (transmittance UV à 254 nm, MES, turbidité) avec l'ajout de boue est majoritairement liée à l'apport en particules de taille supérieure ou égale à 25 μm (Tableau 7). Cet ajout de boue permet de simuler une dégradation de qualité par rapport à un effluent secondaire d'une station d'épuration de type « boues activées » fonctionnant de façon optimale : $\text{MES} \leq 5 \text{ mg/L}$, turbidité $\leq 1 \text{ NTU}$, TUV254 $> 65 \%$. Le premier niveau d'ajout de boue conduit à une teneur en MES proche de 15 mg/L, ce qui correspond au niveau de qualité lié à l'utilisation d'eaux usées traitées pour l'irrigation de tout type de cultures défini par la réglementation française (JORF, 2014). Le deuxième niveau d'ajout de boue conduit à une teneur en MES proche de 35 mg/L, ce qui correspond au niveau de rejet pour la plupart des stations de traitement des eaux usées selon la réglementation française (JORF, 2015). Enfin, le troisième niveau d'ajout de boue conduit à une teneur en MES proche de 60 mg/L, ce qui correspond à un dysfonctionnement du traitement secondaire (voir 2^{ème} partie – paragraphe V).

Tableau 7 : Résultats de caractérisation physico-chimique des effluents étudiés dans le réacteur pilote (trois essais en réplicats)

Effluent	Réplicat	MES (mg/L)	Turbidité (NTU)	TUV 254 (%)	Fer total (mg/L)	Quantité de particules (N/mL) par classe de taille (µm)			
						[2 – 5[[5 – 25[[25 –	Total (> 2)
Effluent secondaire seul	A	2,1	0,7	72,5	0,05	1198	471	45	1714
	B	1,6	0,7	68,3	0,04	1318	501	49	1868
	C	2,0	0,8	66,6	0,05	1248	433	47	1758
Effluent secondaire + 0,4% boue (V/V)	A	13,2	6,5	64,8	0,22	1354	1458	782	3594
	B	15,8	7,0	64,0	0,22	1901	1674	735	4310
	C	15,0	7,8	62,8	0,19	2480	2136	677	5293
Effluent secondaire + 0,8% boue (V/V)	A	33,4	13,0	61,2	0,33	1581	2833	1234	5648
	B	38,8	13,9	60,0	0,36	1418	3321	1689	6428
	C	31,8	13,7	60,3	0,29	1174	2486	1285	4945
Effluent secondaire + 1,4% boue (V/V)	A	56,8	21,2	58,9	0,53	1043	3175	2026	6244
	B	62,6	21,8	57,4	0,63	1070	2423	1808	5302
	C	70,5	22,5	57,1	0,66	911	2078	1744	4733
Effluent secondaire + féculé de maïs	A	66,1	19,2	65,6	0,10	4269	19 099	1331	24 699
	B	51,2	14,4	65,5	0,10	3702	18 944	1039	23 685
	C	66,1	18,9	63,7	0,10	4973	20 976	1670	27 618

Les essais réalisés en mélangeant de la fécule de maïs à l'effluent secondaire consistent à ajouter un grand nombre de particules majoritairement dans la gamme de taille 5 -25 μm . Les mesures de turbidité et de MES sont équivalentes aux effluents secondaires les plus chargés en boue, tandis que la transmittance UV est proche des effluents les moins chargés (64 – 66 %) (Tableau 7). La transmittance à 254 nm est donc peu affectée par les particules de taille inférieure à 25 μm . De plus, le nombre de particules de taille supérieure ou égale à 25 μm est équivalent à celui du mélange « effluent secondaire + 0,8 % de boue » alors que les transmittances sont différentes (Tableau 7). La taille des particules n'est donc pas l'élément majeur pour expliquer les variations de la transmittance UV à 254 nm. Ces variations peuvent être expliquées par la nature des particules : les particules apportées par la boue sont riches en molécules plus susceptibles d'absorber les UV (lipides, protéines, acides nucléiques) que la fécule de maïs (amidon) (Asano et al., 2007).

Comme chaque mesure est réalisée en triplicats pour les indicateurs MES, turbidité et quantité de particules, il est possible de calculer un coefficient de variation (CV = écart-type / moyenne) pour chaque essai. La distribution de l'ensemble des coefficients de variation permet d'estimer la précision des indicateurs. Ainsi, les mesures de turbidité et du nombre de particules de taille supérieure ou égale à 25 μm sont globalement plus précises (CV < 20 %) que les mesures de MES (Figure 23). La variation sur les mesures de transmittance UV à 254 nm n'est pas représentée car elle est très faible : inférieure ou égale à 0,2 points sur l'ensemble des mesures.

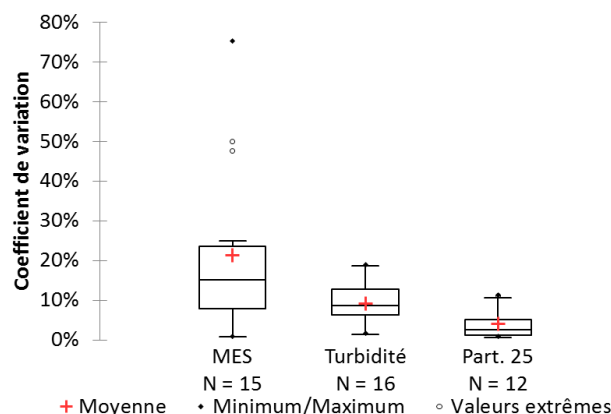


Figure 23 : Distribution des coefficients de variation des mesures de MES, turbidité et quantité de particules de taille supérieur ou égale à 25 μm réalisées sur les effluents étudiés (voir 2^{ème} partie – paragraphe III.5 pour l'interprétation des graphiques en boîtes à moustaches)

La transmittance UV à 254 nm après filtration à 0,45 μm est stable pour tous les effluents testés et égale à $70,7 \pm 0,5$ %. L'ajout de boue dans l'effluent secondaire ne

constitue donc pas un apport significatif en matière organique dissoute. La transmittance à 254 nm mesurée après filtration correspond à l'absorbance de molécules aromatiques (par exemple les phénols) présentes dans l'effluent secondaire (Azema et al., 2002; Rodier et al., 2016). De plus, il n'y a pas de modification significative de la composition physico-chimique des effluents étudiés pendant les essais de désinfection UV (transmittance, turbidité, teneur en fer).

La teneur en fer dissous est stable pour tous les effluents étudiés et égale à $0,06 \pm 0,01$ mg/L après filtration à $0,45 \mu\text{m}$. Cela correspond à la concentration en fer total de l'effluent secondaire (Tableau 7). Si l'on considère que le fer dissous est sous forme ferrique (la plus susceptible d'absorber les UV), cette concentration résiduelle correspondrait à une perte inférieure à 1 point de transmittance, en tenant compte de la loi de Beer-Lambert (équation (2)) et du coefficient d'absorption molaire de Fe^{3+} (Tableau 2). L'impact du fer dissous résiduel est donc négligeable pour la désinfection UV, même en cas de fuite de boues. Une augmentation de la teneur en fer particulaire est observée (Tableau 7), mais elle n'est pas de nature à perturber la transmittance UV (Kozak et al., 2010).

b. Représentativité des observations en réacteur batch

Le choix a été fait pour cette étude de travailler avec un réacteur pilote de grande taille (volume utile : 50 L) alors que la plupart des travaux sur la désinfection UV sont réalisés à l'aide d'un réacteur à lumière collimatée. Les avantages du réacteur à lumière collimatée sont le contrôle précis des doses appliquées et le temps de contact se rapproche d'un réacteur continu. Dans le réacteur pilote utilisé, la dose souhaitée est obtenue avec une lampe UV de faible intensité, mais un temps de contact relativement long (0 – 90 min). Les avantages de ce type de réacteur sont de :

- prendre en compte les conditions hydrodynamiques du mélange qui ne sont jamais aussi parfaites que dans un réacteur à lumière collimatée, même si elles sont optimisées dans un réacteur continu
- d'effectuer les dénombrements à partir d'un volume d'échantillon de 100 mL, ce qui permet d'améliorer la précision et surtout de baisser la limite de quantification (1 NPP/100 mL)

La dose appliquée dans le réacteur pilote a été déterminée à partir d'une souche connue et le facteur de conversion à appliquer au temps de contact est estimé à $1,3 \text{ mJ/cm}^2/\text{min}$ pour une transmittance de 67 %. La Figure 24 compare les courbes d'inactivation pour *E. coli* avec l'effluent secondaire seul et l'effluent secondaire + 1,4 % de boue obtenues avec le réacteur pilote et avec le réacteur à lumière collimatée. Pour

le réacteur pilote, la DRE pour une transmittance de 67 % est calculée avec le facteur de conversion et pour le réacteur à lumière collimatée la dose appliquée est calculée par rapport à la transmittance de l'effluent secondaire (proche de 70 %). Aucune différence significative n'est observée entre les deux réacteurs pour un effluent donné. Les résultats obtenus avec le réacteur pilote sont donc comparables aux essais avec un réacteur à lumière collimatée, qui sert lui-même de modèle pour le dimensionnement des réacteurs continus.

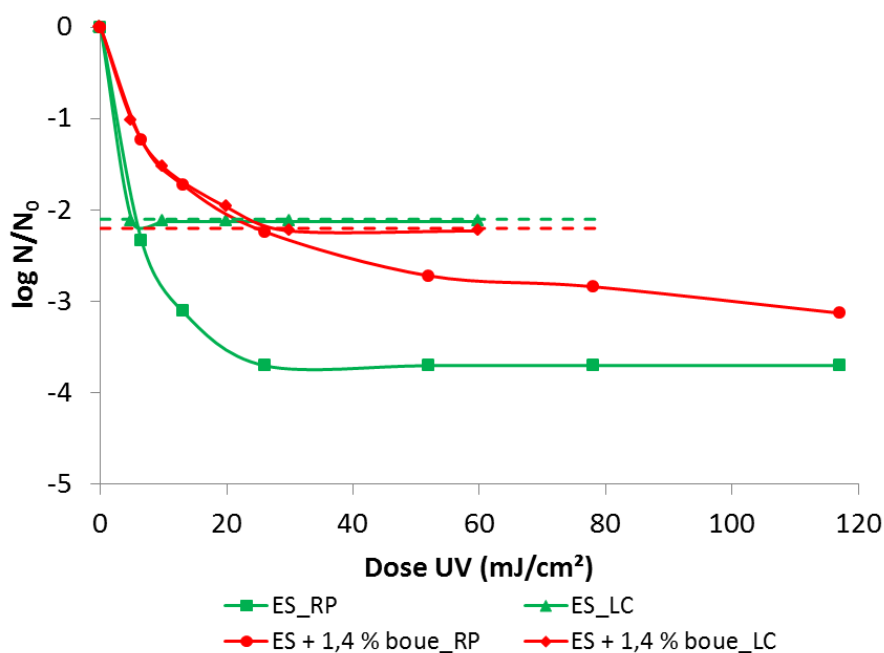


Figure 24 : Courbes d'inactivation pour *E. coli* avec l'effluent secondaire seul (ES) et l'effluent secondaire + 1,4 % de boue obtenues avec le réacteur pilote (RP) et avec le réacteur à lumière collimatée (LC). Les traits pointillés représentent la limite de quantification pour les essais avec le réacteur à lumière collimatée (2 log UFC/100 mL)

c. Modélisation de l'impact des particules sur la désinfection

Les courbes d'inactivation pour les essais de désinfection dans le réacteur pilote sont présentées en Figure 26a. L'expression de l'inactivation sous la forme $\log_{10}(N/N_0)$ permet de visualiser l'abattement en fonction du temps de contact mais ne permet pas de visualiser les concentrations résiduelles qui dépendent de la teneur de départ pour chaque microorganisme. Par exemple, l'abattement de 4 log pour les entérocoques correspond à une teneur résiduelle quasi nulle pour l'effluent secondaire seul et à une teneur résiduelle de plus d'un log pour l'effluent secondaire + 0,8 % (v/v) de boues après 90 minutes d'exposition aux UV. Pour visualiser ce phénomène, l'abattement peut être

normalisé par la teneur initiale sous la forme $(\log_{10} N - \log_{10} N_0) / \log_{10} N_0$. Cette représentation permet de mettre en évidence l'apparition d'un effet de traîne en lien avec l'ajout de boue dans l'effluent secondaire, et ce pour les trois indicateurs étudiés (Figure 26b). L'ajout d'une composante correspondant aux microorganismes résistants aux UV (Figure 11b) n'est pas pertinent pour les microorganismes étudiés.

Ces courbes d'inactivation peuvent être modélisées par deux droites correspondant respectivement à l'inactivation des microorganismes exposés aux UV et à l'inactivation des microorganismes protégés des UV. À partir des observations précédentes (Figure 26), les données d'inactivation à partir de 20 minutes d'exposition sont considérées comme faisant partie de ce dernier groupe. Plusieurs constantes peuvent ainsi être déterminées (Figure 25) :

- k_1 : constante d'inactivation des microorganismes exposés aux UV et correspondant à la pente de la droite de régression entre 0 et 10 minutes d'exposition et passant par l'origine
- k_2 : constante d'inactivation des microorganismes protégés des UV et correspondant à la pente de la droite de régression entre 20 et 90 minutes d'exposition
- IL : inactivation limite correspondant à l'ordonnée à l'origine de la droite de régression entre 20 et 90 minutes d'exposition
- Res_{40} : soit I_{40} l'inactivation correspondant à un temps d'exposition de 40 minutes selon la courbe $I_t = -k_2 + IL$. Alors $Res_{40} = \log N_0 + I_{40}$. Cette constante représente la teneur résiduelle attendue selon le modèle après 40 minutes d'exposition aux UV

Les valeurs des constantes calculées pour les effluents étudiés sont présentées dans le Tableau 8. Les valeurs aberrantes (inactivation anormalement faible après 20 minutes d'exposition) ne sont pas prises en compte. Globalement les coefficients de détermination des droites de régression sont supérieurs à 0,9 (Annexe C).

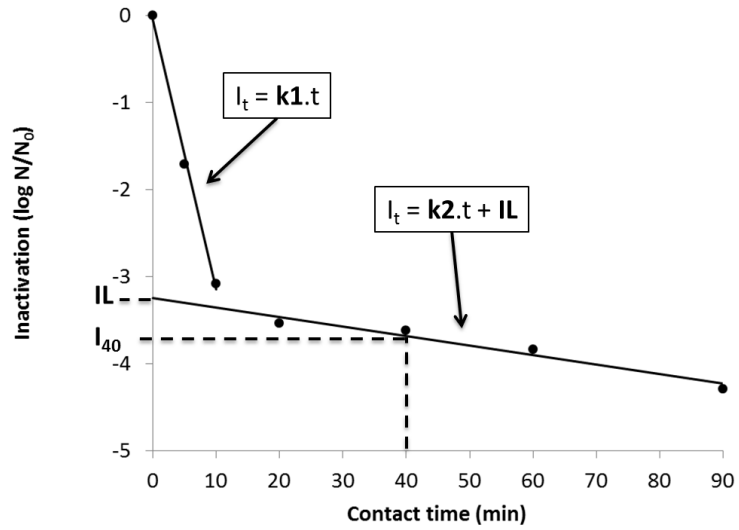
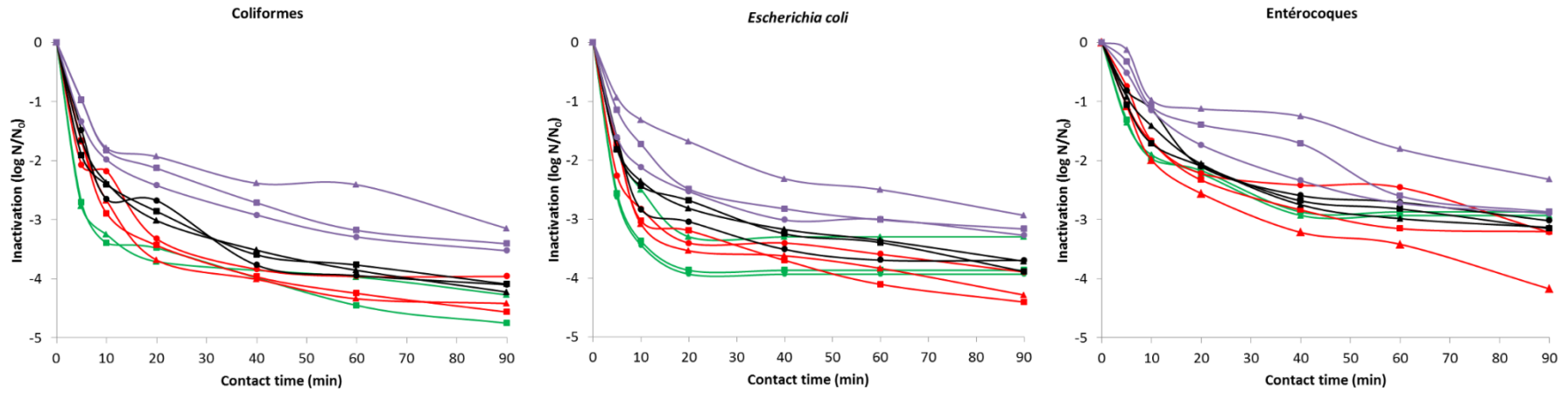


Figure 25 : Modélisation de l'inactivation par deux droites de régression correspondant respectivement aux microorganismes exposés aux UV et aux microorganismes protégés des UV

a) Courbes d'inactivation : $\log_{10}(N/N_0)$



b) Courbes d'inactivation normalisées : $\log_{10}(N/N_0)/\log_{10}(N_0)$

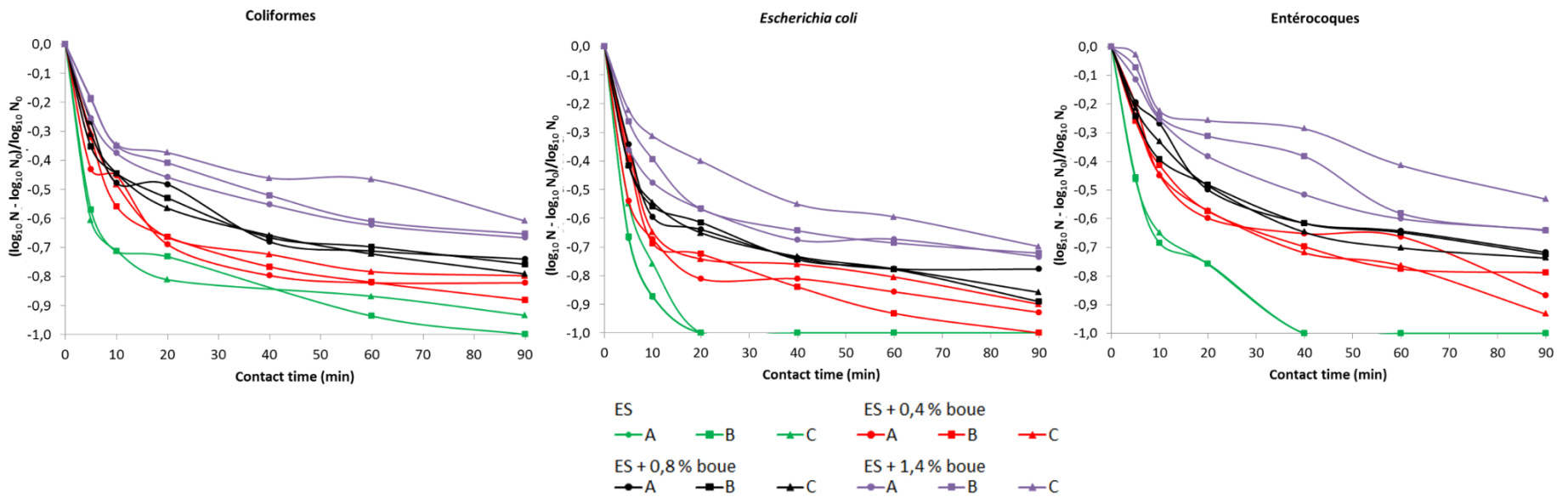


Figure 26 : Courbes d'inactivation (a) et courbes d'inactivation normalisées des coliformes, *E. coli* et entérocoques pour les essais de désinfection UV dans le réacteur pilote avec les différents effluents étudiés (ES : effluent secondaire)

Tableau 8 : Constantes des modèles pour l'inactivation des microorganismes exposés aux UV (Inactivation = - k1.t) et des microorganismes protégés des UV (Inactivation = - k2.t + IL). Res₄₀ correspond à la teneur attendue selon ce dernier modèle après 40 minutes d'exposition. Les valeurs aberrantes sont supprimées. Les erreurs-types et coefficients de détermination des droites de régression sont présentés en Annexe C (col : coliformes ; ecol : *E. coli* ; ent : entérocoques)

Effluent	Réplicat	k1 (min ⁻¹)			k2 (min ⁻¹)			Res ₄₀ (log NPP/100 mL)		
		col	ecol	ent	col	ecol	ent	col	ecol	ent
Effluent secondaire seul	A	/	0,38	/	/	0,00	/	/	0,0	/
	B	0,38	0,37	0,21	0,02	0,00	0,01	0,8	0,0	0,3
	C	0,37	/	0,21	0,01	0,00	0,01	0,7	0,0	0,3
Effluent secondaire + 0,4% boue (V/V)	A	/	0,32	/	0,01	0,01	0,00	1,1	0,7	1,3
	B	0,30	0,31	0,18	0,02	0,02	0,01	1,3	0,8	1,3
	C	0,28	0,32	0,20	0,01	0,01	0,02	1,6	1,1	1,4
Effluent secondaire + 0,8% boue (V/V)	A	0,27	0,29	0,12	0,02	0,01	0,01	2,1	1,4	1,8
	B	0,27	0,27	0,18	0,02	0,02	0,01	2,0	1,3	1,8
	C	0,26	0,26	0,15	0,02	0,01	0,01	1,9	1,2	1,7
Effluent secondaire + 1,4% boue (V/V)	A	0,21	0,23	0,11	0,02	0,01	0,02	2,4	1,6	2,3
	B	0,19	0,18	0,10	0,02	0,01	0,02	2,6	1,6	2,6
	C	0,18	0,14	0,08	0,02	0,02	0,02	2,9	2,1	3,0
Effluent secondaire + fécule de maïs	A	0,43	0,42	0,19	0,01	0,01	0,01	0,5	0,5	0,3
	B	0,42	0,44	0,27	0,01	0,00	0,01	0,2	0,2	0,0
	C	0,35	0,35	0,23	0,00	0,00	0,00	0,3	0,3	0,1

Pour comparer les valeurs de la constante k_1 aux données de la littérature, il est possible de faire une conversion en cm^2/mJ en utilisant le facteur de conversion estimé précédemment : $k_1 (\text{cm}^2/\text{mJ}) = k_1 (\text{min}^{-1}) / a$ avec $a = 1,3 \text{ mJ}/\text{cm}^2/\text{min}$ (Tableau 6). Ainsi les constantes d'inactivation des effluents secondaires seuls sont proches de $0,29 \text{ cm}^2/\text{mJ}$ pour les coliformes et *E. coli*, et proches de $0,16 \text{ cm}^2/\text{mJ}$ pour les entérocoques (Tableau 8). Les valeurs de k_1 ne sont pas significativement différentes pour *E. coli* et pour l'ensemble des coliformes (échantillons appariés, $p = 0,64 > 0,05$). Ces valeurs sont plus faibles que les données de la littérature : en moyenne $0,5 \text{ mJ}/\text{cm}^2$ pour *E. coli* (Beltran & Jiménez, 2008; Hijnen et al., 2006) et $0,3 \text{ mJ}/\text{cm}^2$ pour *Enterococcus faecalis* (Beltran & Jiménez, 2008; Chang et al., 1985; Harris et al., 1987). Le premier facteur qui peut expliquer ces différences est la diversité importante des souches présentes dans un effluent secondaire. Or il a été montré précédemment que les constantes d'inactivation peuvent varier de façon importante selon les souches. La constante d'inactivation mesurée pour *E. coli* ATCC 15597 afin d'estimer les DRE dans le réacteur pilote est d'ailleurs égale à $0,3 \text{ cm}^2/\text{mJ}$. Le second facteur est lié au fait que les constantes d'inactivation retrouvées dans la littérature sont le plus souvent mesurées sur des souches cultivées. Les souches environnementales sont généralement plus résistantes aux UV, un facteur de sept ayant même été mis en évidence entre une souche environnementale et une souche cultivée d'*Enterococcus faecalis* (Hijnen et al., 2006; Maya et al., 2003). De plus, les bactéries Gram+ (comme les entérocoques) sont généralement plus résistantes aux UV que les bactéries Gram-, ce qui pourrait expliquer une constante k_1 plus faible pour les entérocoques (Byappanahalli et al., 2012; Jagger, 1967; McKinney & Pruden, 2012).

Les valeurs de k_1 et de Res_{40} sont affectées par l'ajout de boue dans l'effluent secondaire, ce qui montre l'impact des particules en suspension à la fois sur les microorganismes exposés aux UV et sur les microorganismes protégés des UV.

d. Impact des particules sur la désinfection des microorganismes exposés aux UV

L'ajout de boue dans l'effluent secondaire, mesuré par les indicateurs MES, turbidité, transmittance UV à 254 nm et quantité de particules de taille supérieure ou égale à $25 \mu\text{m}$, est significativement corrélé à une diminution de la constante d'inactivation k_1 pour les trois indicateurs étudiés, avec des coefficients de détermination proches de 0,9 (Tableau 9 et Figure 27). L'ajout de boue dans l'effluent augmente la dose UV nécessaire pour atteindre la fraction des microorganismes pourtant considérée comme initialement exposée aux UV.

Même si peu de données ont pu être traitées, les constantes d'inactivation des effluents filtrés à 5 µm ne semblent pas suivre la régression linéaire précédemment établie (Figure 27). C'est donc la présence de particules de grande taille qui serait responsable de la baisse de la constante k1, comme le montre également le coefficient de détermination de la régression linéaire entre k1 et la quantité de particules de taille supérieure ou égale à 25 µm (Tableau 9). Or il a été aussi montré que les indicateurs de pollution particulaire (MES, turbidité, transmittance UV) sont fortement corrélés à la présence de ces particules dans le cadre d'un ajout de boue dans l'effluent secondaire.

Tableau 9 : Coefficients de détermination des droites de régression entre la constante k1 et les indicateurs de pollution particulaire. Le code couleur (vert --> rouge) correspond à un classement des R² par ordre décroissant pour chaque indicateur

	Coliformes	<i>E. coli</i>	Entérocoques
MES	0,92	0,94	0,87
Turbidité	0,96	0,92	0,85
TUV254	0,96	0,84	0,76
Particules de taille ≥ 25 µm	0,86	0,79	0,69

Les constantes k1 obtenues pour l'effluent secondaire mélangé à la fécule de maïs sont du même ordre de grandeur que pour l'effluent secondaire seul (Tableau 8). L'ajout de fécule de maïs provoque une augmentation de la turbidité et des MES, mais pas de la transmittance UV à 254 nm car les particules inorganiques absorbent peu le rayonnement. C'est pourquoi l'incorporation de ces essais pour construire les droites de régression modifie peu le R² pour la transmittance UV (0,7 au lieu de 0,9 pour les coliformes / *E. coli*) alors que cela impacte négativement le R² pour la turbidité (0,4 au lieu de 0,9 pour les coliformes / *E. coli*) (Figure 27).

Madge & Jensen (2006) mettent en évidence que les coliformes fécaux associés à des particules de taille supérieure à 20 µm présentent une constante d'inactivation significativement plus faible que les coliformes fécaux associés à des petits floes de taille inférieure à 5 µm. De même, plusieurs études montrent que la filtration des effluents augmente la constante d'inactivation par les UV (Azimi et al., 2012; Darby et al., 1993; Hijnen et al., 2006; Qualls et al., 1983). Cependant, les travaux de Madge & Jensen (2006) montrent que la corrélation entre la proportion de coliformes fécaux associés à des grosses particules (taille > 20 µm) et la constante d'inactivation de l'ensemble de l'effluent secondaire n'est pas très robuste (R² entre 0,2 et 0,4). Dans nos travaux, l'ajout de particules dans la gamme de taille 5 – 25 µm (fécule de maïs) n'impacte pas la transmittance UV ni la constante d'inactivation. Donc la diffusion du

rayonnement UV par les flocs diminuerait aussi l'exposition des bactéries libres ou associées à de petits flocs.

La baisse de la constante d'inactivation avec l'ajout de boue dans l'effluent secondaire serait donc liée à deux phénomènes indissociables : la taille des flocs et leur capacité à absorber le rayonnement UV. L'effet de la taille des flocs a été démontré dans le cadre de nos travaux, qui convergent avec ceux de Madge & Jensen (2006) : les particules de grande taille contiennent des bactéries exposées aux UV, mais tout de même plus protégées que les bactéries libres ou associées à de petits flocs. De plus, la taille des particules influence également leur capacité à diffuser le rayonnement UV. La présence sur ces particules de composés organiques absorbant les UV aurait aussi un effet, démontré de façon indirecte dans nos travaux par l'ajout de particules n'absorbant pas dans les UV ce qui n'a pas eu d'impact sur la constante d'inactivation k_1 . L'âge et la structure des flocs issus du traitement secondaire auraient une influence sur leur capacité à absorber les UV (Loge et al., 1996; Madge & Jensen, 2006). Ainsi, le paramètre le plus pertinent pour prédire la baisse de la constante d'inactivation des microorganismes exposés aux UV est la transmittance UV. Ce paramètre permet de prendre en compte à la fois la taille des particules, mais aussi la présence sur ces particules de composés absorbant le rayonnement UV. La turbidité permet seulement de mesurer la diffusion du rayonnement lié à la taille et à la concentration des particules, tandis que la teneur en MES est majoritairement liée à la quantité de particules de taille supérieure à 10 μm . Dans le cas d'une dégradation de qualité de l'effluent secondaire telle que simulée dans notre étude, l'impact majoritaire est lié à l'apport en particules de grande taille et ces trois indicateurs sont pertinents pour prédire la baisse de k_1 .

La conséquence pratique d'une baisse de la transmittance UV pour le système de désinfection est qu'il faut augmenter la dose UV appliquée (définie pour une transmittance donnée) pour atteindre l'objectif de performance fixé. Dans un réacteur continu, la dose appliquée peut être augmentée soit par diminution du débit de passage, ce qui augmente le temps de contact (sous réserve du maintien des conditions de mélange homogène dans le réacteur), soit par augmentation de l'intensité fournie par les lampes. C'est cette dernière option qui est le plus souvent mise en œuvre par les fabricants de systèmes de désinfection UV avec une boucle de régulation par le capteur d'intensité UV. Le surplus de puissance nécessaire est directement proportionnel à la baisse de k_1 . Ainsi, si la transmittance baisse de 72 % à 57 %, k_1 baisse de 0,4 min^{-1} (soit 0,30 cm^2/mJ) à 0,2 min^{-1} (soit 0,15 cm^2/mJ). Cela entraîne une augmentation de la consommation électrique au moins du même ordre de grandeur, en sachant que le « rendement germicide » (intensité émise à 254 nm par rapport à la puissance électrique) d'une lampe UV basse pression est compris entre 30 et 40 % (Asano et al.,

2007). Ainsi, pour une transmittance UV inférieure à 60 %, la constante d'inactivation est diminuée de 20 à 30 % par rapport à une TUV de 70 % (selon l'indicateur pris en compte). En-dessous de ce seuil de transmittance UV de 60 %, la surconsommation électrique nécessaire pour compenser la baisse de k_1 peut être considérée comme trop importante.

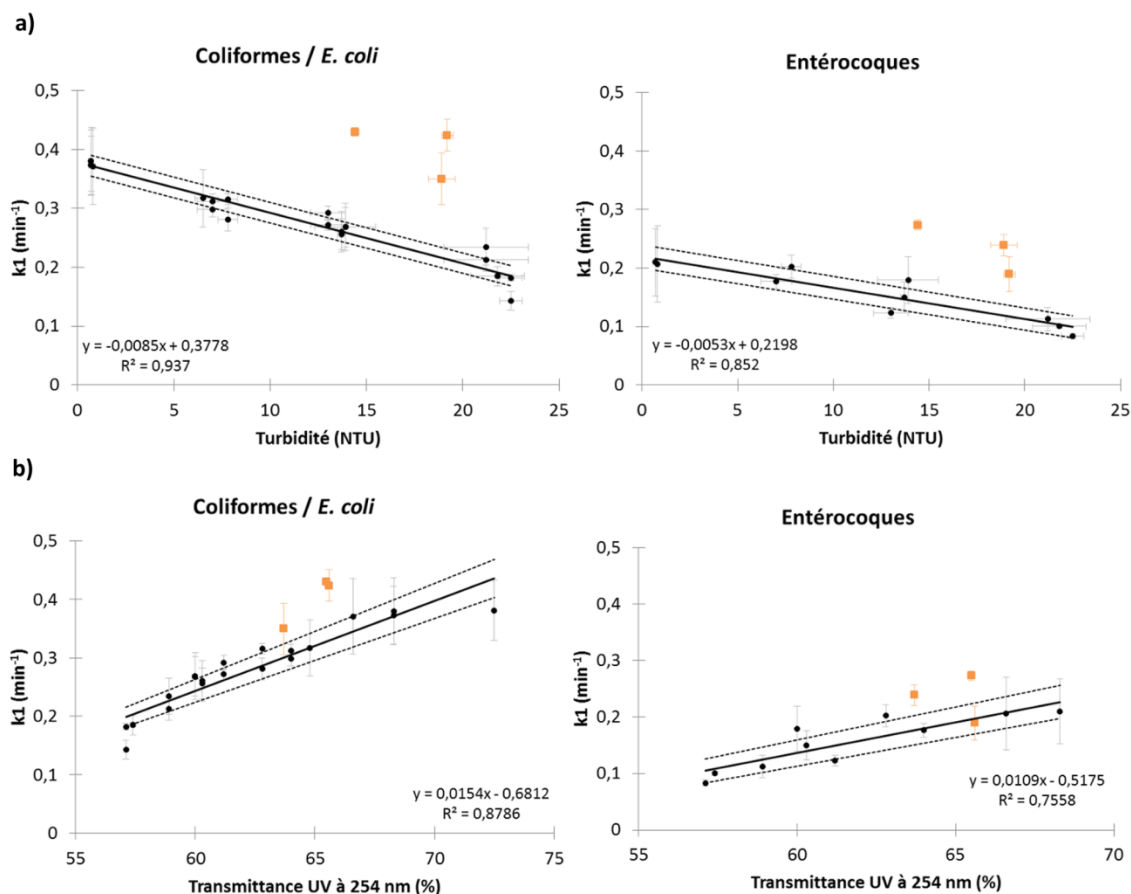


Figure 27 : Droites de régression (intervalle de confiance à 95% en traits pointillés) de la constante d'inactivation k_1 en fonction de a) la turbidité et b) la transmittance UV à 254 nm (effluent secondaire plus ou moins chargé en boue). Les points carrés orange correspondent aux essais avec la fécule de maïs et ne sont pas inclus dans la régression. Les barres représentent les erreurs-types sur les paramètres (négligeables pour la transmittance UV)

e. Impact des particules sur la désinfection des microorganismes protégés des UV

Les microorganismes protégés des UV sont définis comme les microorganismes non affectés par les UV et donc cultivables après exposition à une dose UV importante. Le

temps de contact choisi est 40 minutes, ce qui correspond à une dose d'environ 50 mJ/cm². Cette dose est largement supérieure à la dose théoriquement nécessaire pour atteindre un abattement de 4 log pour les microorganismes étudiés (Figure 14, Hijnen et al., 2006). L'ajout de boue dans l'effluent secondaire est significativement corrélé à une augmentation de Res₄₀ (Tableau 8) pour les indicateurs MES, turbidité, transmittance UV à 254 nm et quantité de particules de taille supérieure ou égale à 25 µm (Figure 29). Cela signifie que l'ajout de boue dans l'effluent augmente l'effet de traîne. L'apparition d'un effet de traîne avec l'augmentation de la quantité de MES dans l'effluent secondaire est bien décrite dans la littérature (Asano et al., 2007; Beltran & Jiménez, 2008; Emerick et al., 2000; Hijnen et al., 2006; Qualls et al., 1983). Cet effet de traîne serait lié à la présence de microorganismes associés aux particules (Amoah et al., 2005; Emerick et al., 1999; Loge et al., 1996; Templeton et al., 2005).

Selon Azimi (2013), la structure des floccs a un impact sur leur sensibilité à la désinfection. Une structure en deux parties a été proposée : un noyau dur très stable car riche en polymères extracellulaires (EPS) et une enveloppe externe plus instable (Eriksson et al., 1992; Sheng et al., 2006). Le modèle développé par Azimi (2013) prend en compte le microorganisme le plus abrité dans un flocc : s'il est situé dans l'enveloppe externe, il est exposé aux UV alors qu'il sera responsable de l'effet de traîne s'il est situé dans le noyau compact (Figure 28). Les grands floccs seraient plus susceptibles d'induire un effet de traîne car ils contiendraient plus de noyaux compacts.

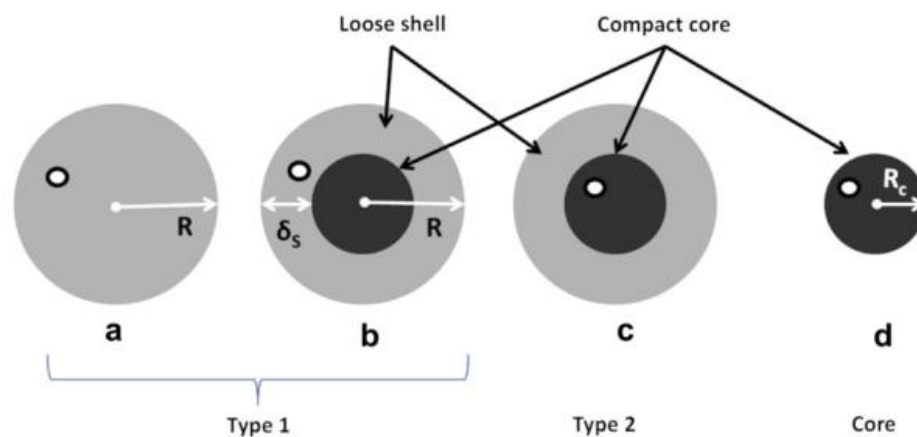


Figure 28 : Représentation schématique de modèles de floccs dans les eaux usées : type 1 (a,b) ou floccs exposés aux UV ; type 2 (c) ou floccs résistants aux UV ; (d) noyaux compacts. Le cercle blanc indique l'emplacement du microorganisme viable le plus abrité (Azimi, 2013)

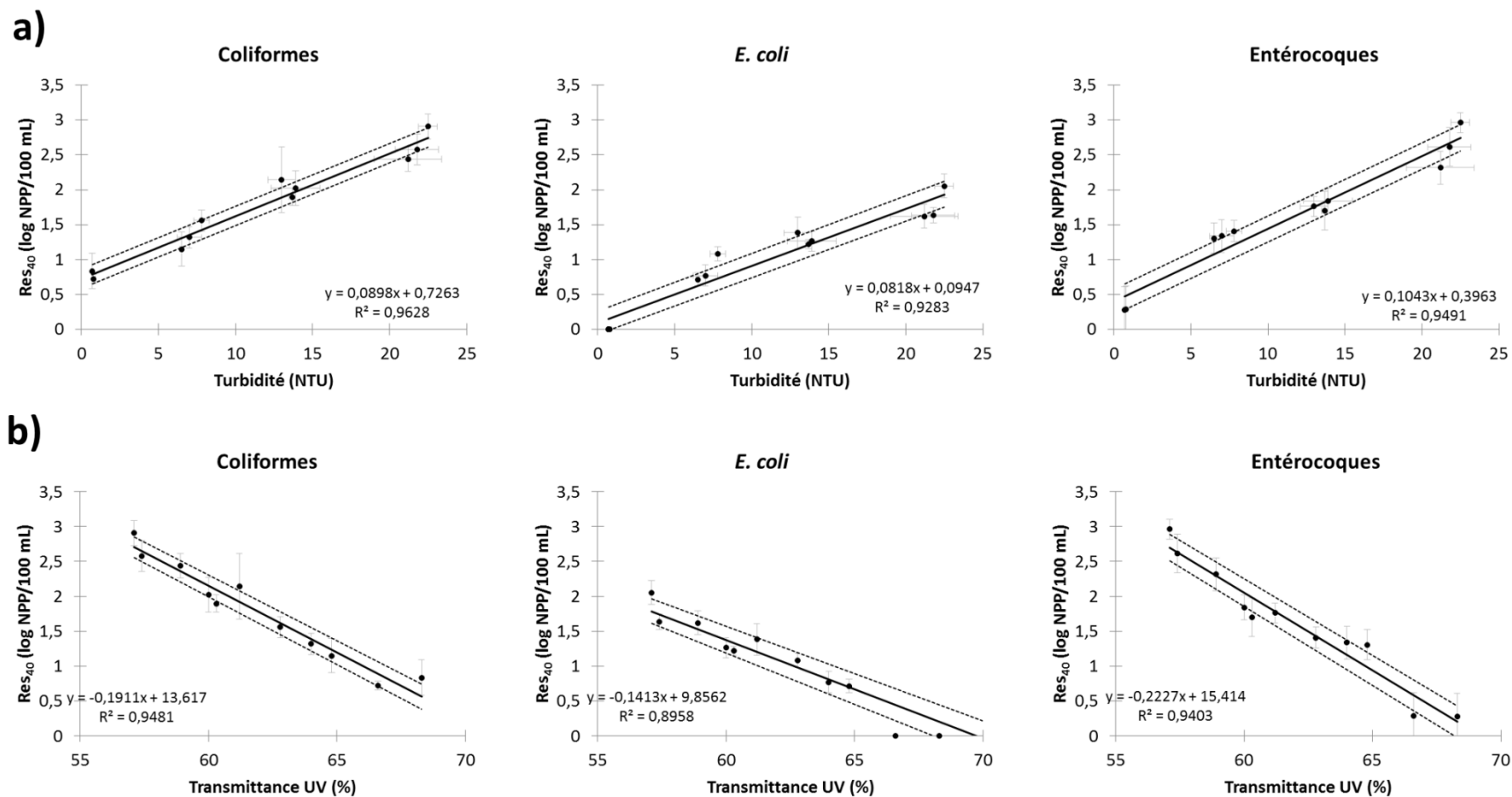
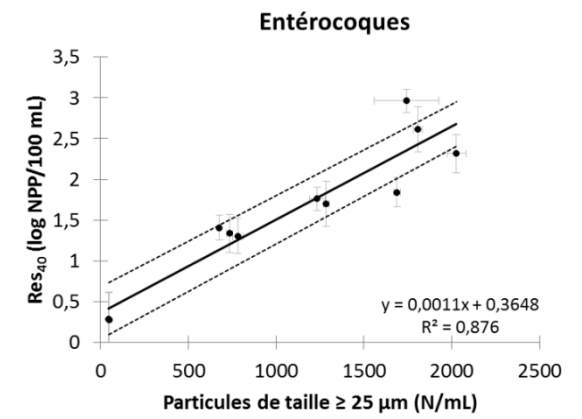
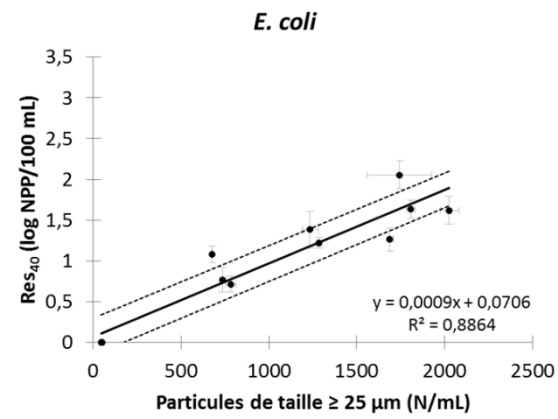
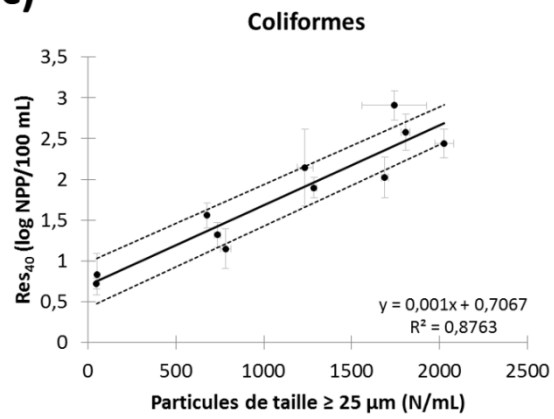


Figure 29 : Droites de régression (intervalle de confiance à 95% en traits pointillés) de Res₄₀, teneur résiduelle après 40 minutes d'exposition aux UV (soit environ 50 mJ/cm²) en fonction de a) la turbidité ; b) la transmittance UV à 254 nm ; c) la quantité de particules de taille supérieure ou égale à 25 μm et d) les MES. Les barres représentent les erreurs-types sur les paramètres (négligeable pour la transmittance UV)

c)



d)

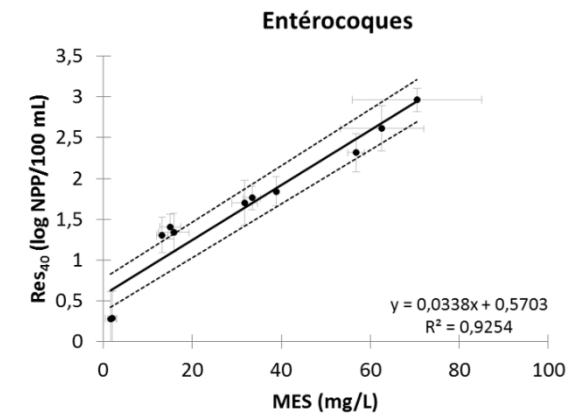
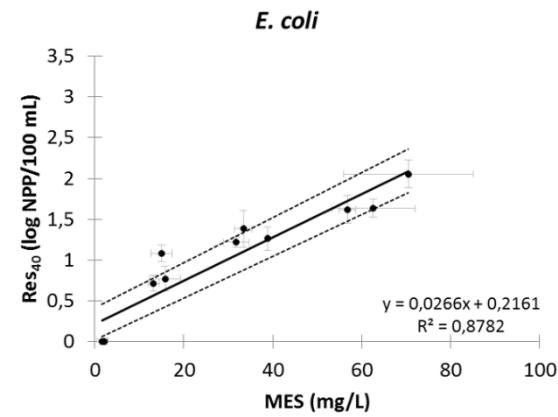
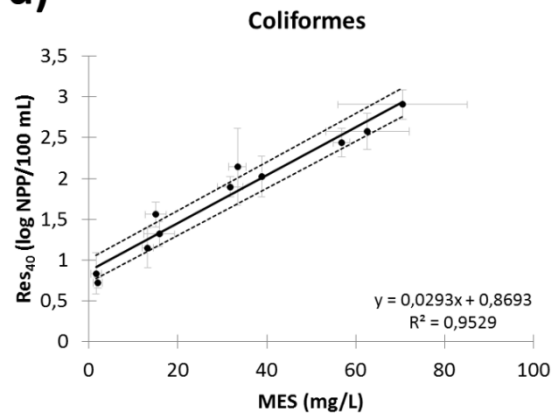


Figure 28 (suite)

Après 40 minutes d'exposition aux UV, la teneur résiduelle en *E. coli* dans l'effluent secondaire est négligeable (l'intervalle de confiance pour Res₄₀ comprend la valeur 0). Pour les coliformes et les entérocoques, un effet de traîne est mis en évidence même pour l'effluent secondaire (Figure 29). Cet effet de traîne n'est pas observé après filtration à 5 µm de l'effluent secondaire. Les coliformes et entérocoques responsables de l'effet de traîne dans l'effluent secondaire seraient donc situés dans des floccs de taille supérieure à 5 µm, dont la quantité représente 30 % des particules de l'effluent (les particules de taille supérieure à 25 µm représentent 3 % des particules de l'effluent) (Tableau 7). Plus précisément, ils seraient situés dans les noyaux compacts de ces floccs, ce qui les protège des UV (Figure 28). *E. coli* serait présent sous forme libre ou dans l'enveloppe externe de ces floccs, ce qui expliquerait l'absence d'effet de traîne pour cet indicateur dans l'effluent secondaire.

La Figure 30 présente la comparaison entre l'apport de biomasse par l'ajout de boue (comparaison avec l'effluent secondaire seul) et la teneur résiduelle après 40 minutes d'exposition aux UV pour les trois indicateurs étudiés. Pour *E. coli* et les entérocoques, la quantité de microorganismes responsables de l'effet de traîne correspond globalement à l'ajout de biomasse sauf pour l'effluent le plus chargé pour lequel la teneur résiduelle est significativement plus importante que l'ajout de biomasse. Pour les coliformes, l'effet de traîne est systématiquement plus important que l'ajout de biomasse (Figure 30). Il faut noter qu'il existe une incertitude dans le dénombrement par culture étant donné le risque de sous-estimation pour les effluents chargés. Cela explique pourquoi la mesure de la biomasse ajoutée n'augmente pas de façon significative avec le volume de boue, alors que l'augmentation est estimée à plus d'un log pour l'effluent le plus chargé par la méthode qPCR (voir 2^{ème} partie). Néanmoins, on peut considérer que le risque de sous-estimation est comparable pour la mesure de l'ajout de biomasse et pour la mesure de la teneur résiduelle étant donné que les microorganismes sont agrégés dans les deux cas.

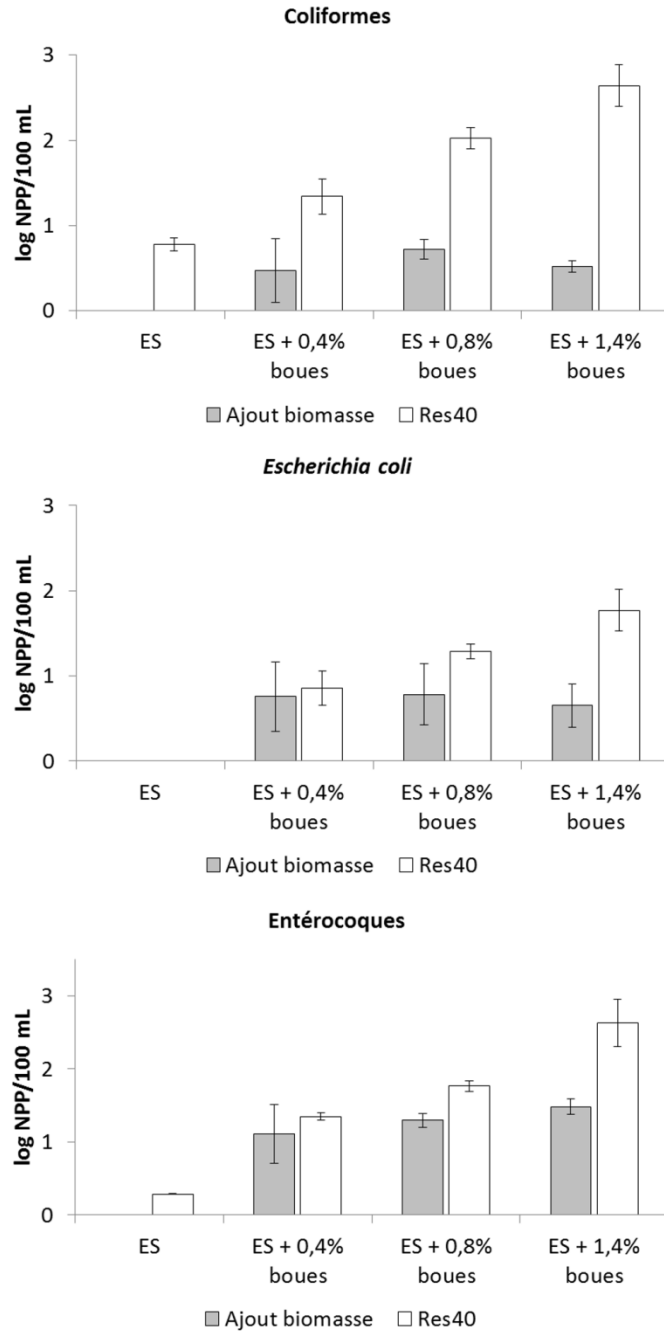


Figure 30 : Comparaison entre la quantité de microorganismes liée à l'apport en boue dans l'effluent secondaire et Res₄₀, teneur résiduelle après 40 minutes d'exposition aux UV (soit environ 50 mJ/cm²)

Les travaux de Azimi (2013) ont été réalisés en prenant en compte un seul indicateur, les coliformes fécaux. Or il a été montré dans la 2^{ème} partie de ce mémoire que les entérocoques et *E. coli* ne présentent pas la même tendance à l'agrégation : les entérocoques se fixent plus facilement aux floes que les coliformes et *E. coli* qui sont mobiles. L'ajout de boue dans l'effluent secondaire constitue un apport en entérocoques

majoritairement associés à des particules de taille supérieure ou égale à 25 µm et en *E. coli* sous forme libre ou en petits agrégats. Ces deux types d'agrégation induisent une résistance au rayonnement UV et donc un effet de traîne. De plus, certains microorganismes de l'effluent secondaire sont protégés par l'augmentation de la densité cellulaire et particulaire, ce qui explique pourquoi la teneur résiduelle après exposition à une forte dose est supérieure à l'ajout de biomasse. Si la résistance aux UV est liée à l'intégration dans un floc compact (Azimi, 2013), cela signifie que les microorganismes présents dans l'effluent secondaire auraient la capacité de mettre en place des liaisons stables avec le noyau compact des floccs apportés par la boue. Pour les entérocoques et *E. coli*, ce phénomène est observé seulement pour l'effluent le plus chargé en boue (Figure 30), probablement car la probabilité de rencontre avec un floc est alors plus importante. Pour les coliformes, ce phénomène est observé dès l'ajout de boue dans l'effluent secondaire. Cela peut être expliqué par 1) la densité plus importante des coliformes dans l'effluent secondaire (5 log NPP/100 mL contre 3 à 4 log NPP/100 mL pour *E. coli* et les entérocoques), ce qui augmente également la probabilité de rencontre avec un floc et/ou 2) la nature des coliformes qui auraient la capacité de se déplacer et de s'agréger en réponse au stress induit par les UV. Cette hypothèse est appuyée par les travaux de Kollu & Örmeci (2015) qui ont montré la capacité d'auto-agrégation d'*E. coli* pendant l'exposition aux UV dans le cas d'une densité cellulaire élevée (10⁹ UFC/100 mL). Cette capacité d'auto-agrégation a également été démontrée pour les virus (modèle : phage MS2) qui pourraient même fusionner de façon irréversible (Mattle & Kohn, 2012).

Pour l'effluent le plus chargé en boue, les teneurs résiduelles des échantillons filtrés à 5 µm après 40 minutes d'exposition aux UV (soit une dose d'environ 50 mJ/cm²) sont comprises entre 0 et 1,2 log NPP/100 mL pour les coliformes, entre 0 et 0,5 log NPP/100 mL pour *E. coli* et entre 0 et 0,8 log NPP/100 mL pour les entérocoques (3 réplicats). Pour les effluents moins chargés, aucun organisme viable n'est détecté après filtration pour cette dose et pour les trois indicateurs étudiés. Etant donné que les teneurs résiduelles pour cette dose sont beaucoup plus importantes pour les échantillons non filtrés (Figure 30), l'effet de traîne serait donc majoritairement lié à l'agrégation dans des floccs de taille supérieure à 5 µm. Ce résultat est cohérent avec les données de la littérature, qui indiquent que les bactéries peuvent s'associer avec des particules de taille supérieure ou égale à 10 µm (Emerick et al., 1999). De plus, la réponse au rayonnement UV des agrégats de bactéries de taille inférieure à 8 µm est considérée comme équivalente à celle des bactéries libres (Qualls et al., 1983). Les teneurs résiduelles mesurées après filtration à 5 µm des effluents soumis à une dose de 50 mJ/cm² pourraient donc être expliquées par les forces de cisaillement appliquées pendant la filtration qui conduiraient à la libération de bactéries initialement agrégées dans les floccs de taille supérieure à 5 µm.

C'est la turbidité qui permet de prédire l'effet de traîne avec la meilleure précision ($R^2 \geq 0,93$; Figure 29a). Il faut bien noter que la corrélation mise en évidence n'est valable que dans le cas d'une dégradation de qualité liée à un dysfonctionnement ou à un mauvais dimensionnement du traitement secondaire, et qui conduirait à un relargage de grosses particules. L'augmentation de la turbidité liée à des particules non associées à des microorganismes ne provoque pas d'effet de traîne, comme cela a été vérifié avec l'effluent secondaire mélangé à la fécule de maïs. Néanmoins, cette situation est peu susceptible d'être rencontrée en sortie d'un traitement secondaire. Un effet de traîne d'une ampleur supérieure à 10 NPP/100 mL est susceptible de se produire pour des valeurs de turbidité supérieures à 3 NTU (coliformes), 10 NTU (*E. coli*) ou 6 NTU (entérocoques) (Figure 29). Cela signifie qu'une teneur résiduelle supérieure à 1 log NPP/100 mL sera mesurée en sortie du réacteur de désinfection UV, quelle que soit l'importance de la dose appliquée. Même si l'ampleur de l'effet de traîne conduit à des teneurs inférieures aux niveaux de qualité recommandés, il y a un risque de multiplication de ces microorganismes non affectés par les UV. De plus, la présence de particules pourrait également diminuer le « niveau d'inactivation » des microorganismes et donc augmenter le potentiel de réactivation.

3. Évolution de la qualité biologique après la désinfection UV

a. Essais à l'échelle du laboratoire

Pour étudier l'évolution de la quantité de microorganismes cultivables après l'exposition aux UV, des essais de stockage à l'échelle du laboratoire (environ 500 mL), en présence ou en absence de lumière sont réalisés pour chaque type d'effluent étudié. Les échantillons pour le stockage sont prélevés après 10 à 20 min d'exposition aux UV, ce qui correspond à des DRE à 70 % TUV comprises entre 16 et 25 mJ/cm². La Figure 31 présente l'évolution des concentrations pour différents temps de stockage : T0 (début du stockage), T1 (2 à 3 heures de stockage), T2 (19 à 20 h de stockage).

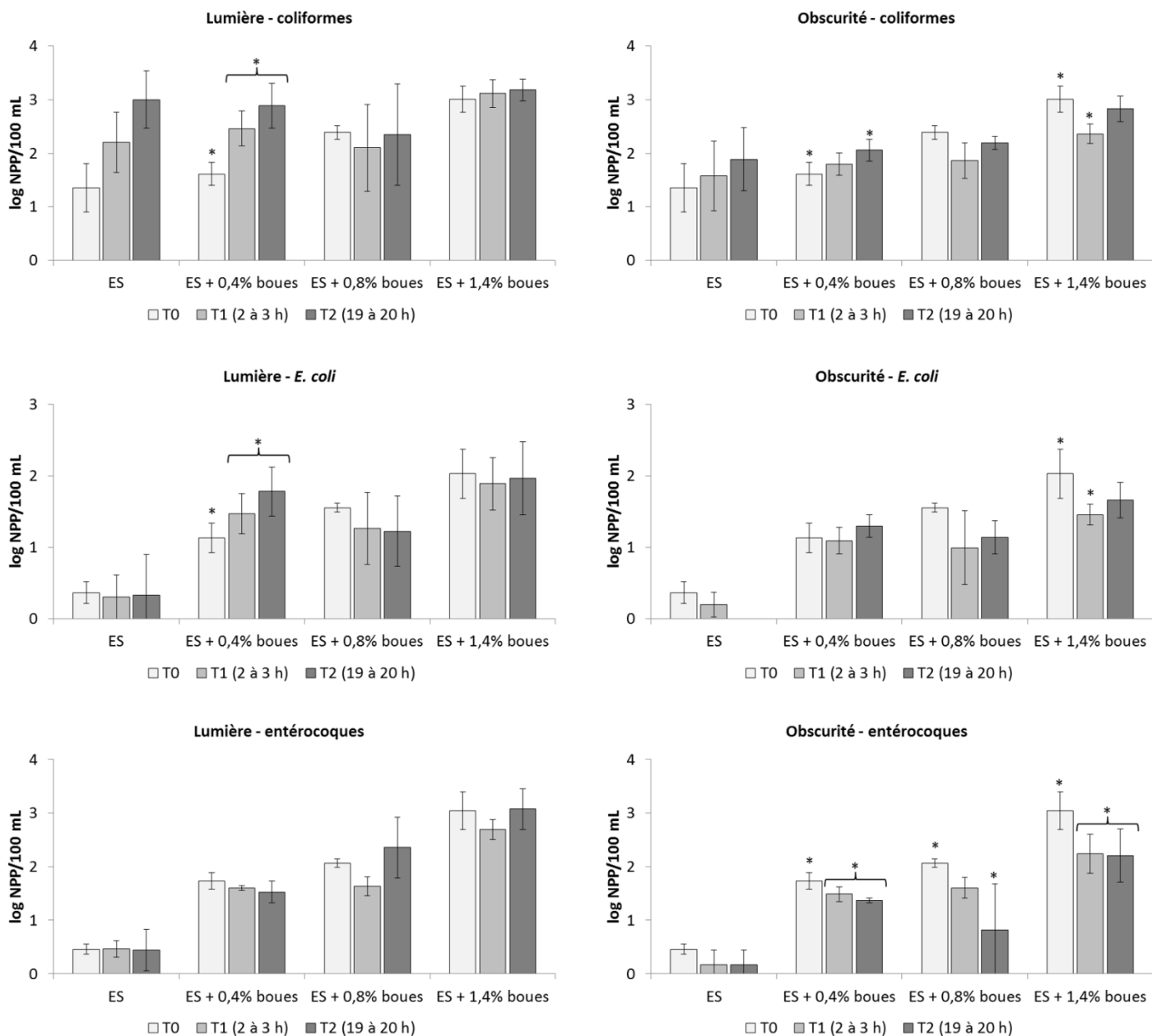


Figure 31 : Evolution des teneurs en coliformes, *E. coli* et entérocoques pendant le stockage à la lumière et à l'obscurité pour les effluents étudiés (ES : effluent secondaire). Les barres représentent les écarts-types (3 essais) et les astérisques (*) mettent en évidence les différences significatives (comparaisons par paires, échantillons appariés : test de Wilcoxon signé, $p < 0,05$)

Globalement, il n’y a pas d’indication nette pour mettre en évidence l’impact de l’ajout de boue sur la reviviscence pour l’effluent secondaire seul. Une augmentation significative de la concentration après 2 à 3 heures de stockage à la lumière est observée pour les coliformes dont *E. coli* et l’effluent mélangé à 0,4 % (v/v) de boue. Et le stockage à l’obscurité entraîne une réduction significative des concentrations en entérocoques (Figure 31).

Les phénomènes pouvant expliquer l’augmentation ou la diminution des populations cultivables pendant le stockage après la désinfection UV sont nombreux et variés (Tableau 10). Il est notamment difficile de distinguer la photoréactivation et la croissance des microorganismes non affectés par les UV pendant le stockage à la lumière. La reviviscence pendant le stockage à l’obscurité est majoritairement liée à la réparation de l’ADN à l’obscurité et à la présence de nutriments. L’ajout de boue dans l’effluent secondaire constitue un apport en azote, en phosphore et en carbone, mais ce dernier est peu oxydable, donc peu utilisable par les bactéries. La réparation à l’obscurité, qui demande beaucoup d’énergie, peut donc être considérée comme négligeable (Guo et al., 2013; Nebot Sanz et al., 2007). Comme les populations de coliformes et d’*E. coli* restent stables au cours du temps à l’obscurité, on peut considérer également que le phénomène de prédation est peu présent. Ces microorganismes peuvent ainsi se maintenir plusieurs jours dans ces conditions « hostiles » (Asano et al., 2007). La diminution de la quantité d’entérocoques cultivables pendant le stockage à l’obscurité pourrait être expliquée par la sédimentation et l’agrégation susceptible de se produire pour ces microorganismes non mobiles. Ainsi, même si l’effluent est homogénéisé avant le prélèvement, le risque de sous-estimation pendant le dénombrement par culture serait plus important.

Tableau 10 : Principaux facteurs positifs ou négatifs pour la croissance des populations de microorganismes pathogènes pendant le stockage après désinfection UV (☼ : facteurs spécifiques au stockage à la lumière) (d’après Eme & Molle, 2013; Madigan et al., 2012; Xu et al., 2002)

Facteurs négatifs	Facteurs positifs
☼ Oxydation et inactivation par le rayonnement solaire	☼ Photoréactivation
● Manque de nutriments et d’oxygène	● Réparation à l’obscurité (dark repair)
● Prédation	● Présence de nutriments et d’oxygène
● Température < 10°C ou > 45°C	● Température entre 10 et 45°C

Les précédentes études sur la photoréactivation d’effluents secondaires montrent qu’après exposition à une dose UV comprise entre 20 et 30 mJ/cm², l’augmentation de la teneur en coliformes pendant le stockage est de l’ordre de 1,4 log pour atteindre une concentration d’environ 3 log NPP ou UFC/100 mL (Beltran & Jiménez, 2008; Guo et

al., 2013). Ces résultats sont cohérents avec ceux obtenus dans cette étude pour le stockage à la lumière des effluents les moins chargés en boue : les teneurs en coliformes augmentent de 1,7 log pour l'effluent secondaire seul et de 1,3 log pour l'effluent secondaire + 0,4 % (v/v) de boue (Figure 31). Concernant le ratio maximal de survie, le modèle qui correspond le mieux aux données de cette étude est celui proposé par Nebot Sanz et al. (2007) pour les coliformes et entérocoques et celui proposé par Guo et al. (2013) pour *E. coli* (Tableau 11).

Tableau 11 : Ratios maximum de survie (%) modélisés (dose comprise entre 15 et 25 mJ/cm²) et calculés pour les effluents étudiés (après 20 h de stockage) (voir équations (9) et (10) (écarts-types entre parenthèses)

Effluent	Coliformes	<i>E. coli</i>	Entérocoques
ES (Nebot Sanz et al., 2007)	1,6 – 2,0	1,1 – 1,5	0,5 – 0,6
ES (Guo et al., 2013)	14,3 – 22,7	0,0 – 0,1	/
ES	3,0 (2,3)	0,2 (0,3)	0,4 (0,3)
ES + 0,4 % boue	0,9 (1,1)	0,3 (0,4)	0,4 (0,4)
ES + 0,8 % boue	0,4 (0,6)	0,1 (0,1)	1,9 (2,1)
ES + 1,4 % boue	1,0 (0,5)	0,6 (0,7)	5,6 (4,8)

Les données issues des essais de stockage à la lumière et la comparaison avec le stockage à l'obscurité permettent donc de mettre en évidence un phénomène de photoréactivation de faible ampleur et cohérente avec les modèles proposés dans la littérature pour les effluents secondaires les moins chargés en boue (Figure 31 et Tableau 11). Le fait que la photoréactivation semble moins efficace pour les effluents plus chargés en boue (Figure 31) pourrait s'expliquer par l'absorption/diffusion de la lumière par les particules, ce qui diminue sa disponibilité pour l'activation des enzymes de réparation. Les particules pourraient également accentuer la sédimentation des bactéries.

b. Essais à l'échelle du pilote industriel

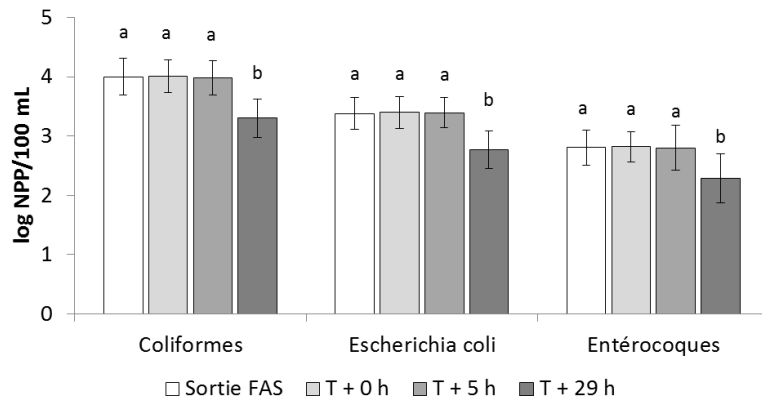
L'étude du stockage dans un grand volume (6 m³) permet d'appréhender de façon plus globale les effets de la température et de l'absence de nutriments. La photoréactivation n'est pas étudiée, car le stockage est effectué en cuve fermée opaque. La Figure 32 présente l'évolution des concentrations en microorganismes dans les effluents secondaires filtrés pendant le remplissage de la cuve et pendant le stockage avec ou sans allumage des lampes UV. Pour le stockage sans système de désinfection UV, il n'y a pas d'évolution de la qualité biologique de l'effluent entre 0 et 5 h de

stockage. Par contre, un abattement significatif est observé pour les trois indicateurs étudiés entre 5 et 29 h de stockage, de faible ampleur en moyenne (0,5 log).

Le système de lampes UV installé dans la cuve permet un abattement significatif, mais de faible ampleur pour les coliformes et *E. coli* ($0,5 \pm 0,1$ log), et pour les entérocoques ($0,2 \pm 0,1$ log) (Figure 32). Comme le système UV est fixé sur des flotteurs, la dose reçue par les microorganismes est uniforme pendant le remplissage de la cuve mais ensuite seuls les microorganismes présents dans la partie haute de la cuve sont exposés aux UV. En l'absence d'un système d'homogénéisation, il y a également une sédimentation des microorganismes (Eme & Molle, 2013). Le prélèvement étant effectué en bas de la cuve de stockage, il est donc représentatif de l'exposition aux UV la moins importante. Si la température à l'intérieur de la cuve est élevée, l'homogénéisation par convection pourrait améliorer l'efficacité d'un tel système. Un abattement significatif est également observé entre 0 et 29 h de stockage (Figure 32). Cet abattement n'est pas significativement différent de celui observé avec les lampes UV éteintes (test de Mann-Whitney, $p > 0,05$). Ainsi, la réactivation par réparation spontanée de l'ADN semble négligeable par rapport à l'abattement naturel pendant le stockage en cuve fermée.

Si les abattements observés entre 0 et 29 h de stockage sont faibles en moyenne, une grande disparité est observée entre les essais puisque les abattements peuvent varier entre 0,2 et 1,4 log (Tableau 12). Il a été montré précédemment que la survie des microorganismes dépend de la présence de nutriments, mais également de la température (Tableau 10). La présence de particules en suspension est également susceptible de fournir abri et nutriments aux microorganismes. Les effluents étudiés présentent une faible contamination particulaire : MES entre 1 et 5 mg/L, turbidité entre 0,3 et 2 NTU et transmittance UV à 254 nm entre 76 et 80 %. La DCO, qui mesure la présence de carbone (sous forme organique ou inorganique) est plus variable : entre 10 et 23 mg O₂/L (Tableau 12). Les températures mesurées dans la cuve sont comprises entre 9 et 17°C. Il apparaît qu'une simple lecture de ce tableau ne permet pas de dégager des tendances en faveur d'une corrélation entre ces paramètres et les abattements observés. Des analyses multivariées (ACP et CAH) sont donc réalisées pour mettre en évidence un éventuel lien entre la composition de l'effluent et l'abattement spontané dans la cuve de stockage.

a) Lampes UV éteintes



b) Lampes UV allumées

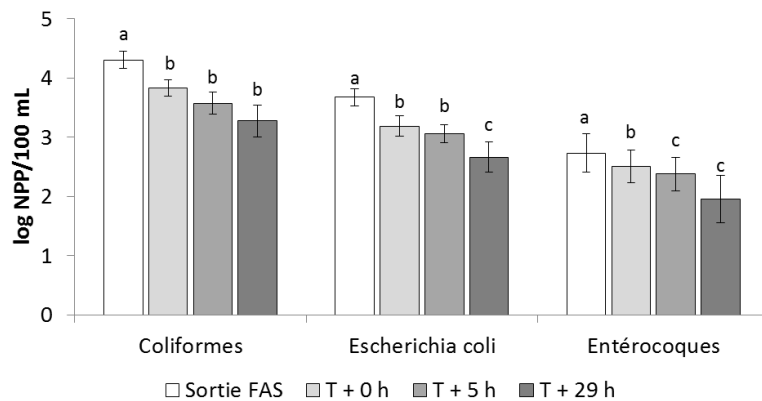


Figure 32 : Evolution de la qualité biologique d'un effluent secondaire filtré (FAS : filtre à sable) pendant le stockage en cuve fermée avec ou sans dispositif de lampes UV. Les moyennes sont calculés à partir de trois essais constitués chacun de trois réplicats. Les échantillons marqués par un exposant différent (a-c) pour un indicateur donné sont significativement différents les uns des autres (échantillons appariés, test de Wilcoxon signé, $p < 0,05$)

Tableau 12 : Abattements (moyennes sur 3 réplicats) obtenus pour les trois indicateurs étudiés (COL : coliformes ; ECOL : *E. coli* ; ENT : entérocoques) entre 0 et 29 h de stockage avec ou sans allumage des lampes UV. Les températures (minimales, maximales et médianes) sont mesurées dans la cuve et les autres paramètres sont mesurés en sortie du filtre à sable pendant le remplissage

Paramètre	AbCOL	Ab _E COL	Ab _{ENT}	Turb	TUV	DCO	MES	T_min	T_max	T_med
Unité	log	log	log	NTU	%	mg/L	mg/L	°C	°C	°C
Lampes allumées	0,79	0,72	0,81	1,51	76,1	22,5	0,57	13,4	14,7	14,15
	0,18	0,17	0,61	2,04	77,8	19,6	5,18	12,9	16,3	15,8
	0,24	0,33	0,17	1,66	78	13,7	1,54	13,5	16,2	15,6
Lampes éteintes	0,58	0,52	0,78	0,33	80,9	15,7	0,99	9,8	12	11,3
	1,38	1,38	0,34	1,38	77,7	17,8	1,9	16,4	19	17,4
	0,17	0,17	/	0,84	79,3	10,2	1,6	15,8	18,9	17

Les résultats de l'analyse en composantes principales (ACP) réalisée à partir des données du Tableau 12 indiquent que les deux premières composantes permettent d'expliquer 74 % de la variance totale du jeu de données. La Figure 33 présente le cercle des corrélations pour le plan défini par les axes F1 et F2. Deux tendances peuvent être dégagées de cette représentation :

- l'axe F1 oppose la température dans la cuve d'une part, et les abattements en entérocoques d'autre part. Cependant ce dernier paramètre est moyennement représenté sur cet axe (coefficient de corrélation égal à -0,6)
- l'axe F2 oppose la teneur en MES et la turbidité d'une part, et les abattements en coliformes et *E. coli* d'autre part. Ces paramètres sont bien représentés sur l'axe (coefficients supérieurs ou égaux à 0,75). Cependant l'axe F2 ne représente que 23 % de la variance du jeu de données

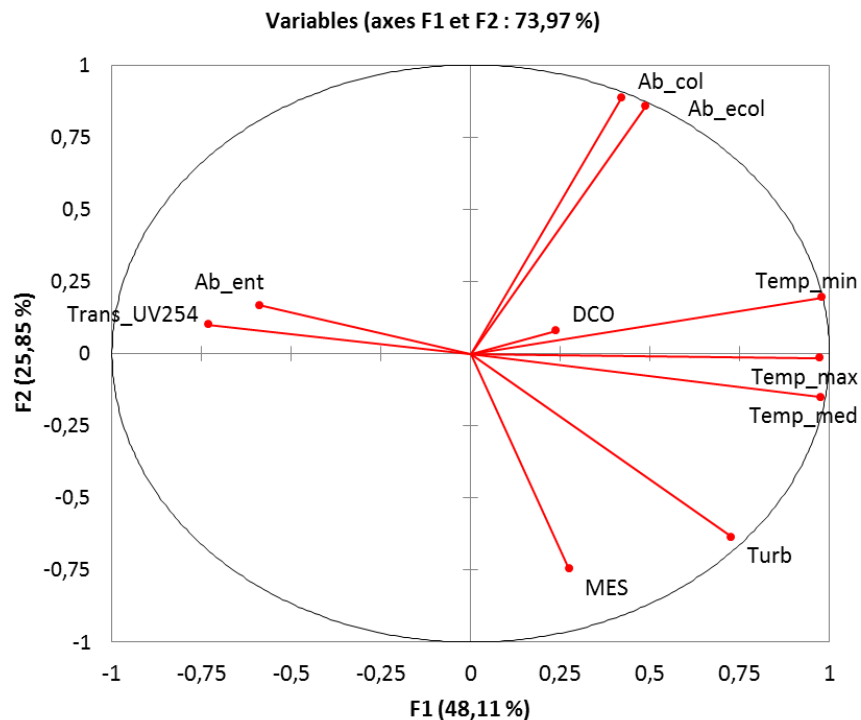


Figure 33 : Résultats de l'ACP issue des données du Tableau 12 : cercle des corrélations selon les axes F1 et F2 (les pourcentages représentent la part de variance expliquée)

Une classification ascendante hiérarchique (CAH) est réalisée en complément de l'ACP pour regrouper les variables selon leur niveau de corrélation. Pour faciliter, l'interprétation des résultats, un signe négatif est attribué aux variables « Températures », « Turbidité », « DCO » et « MES ». Ainsi, si les variables « MES » et « Abattement coliformes » sont proches, cela signifie qu'un abattement important en coliformes est lié à une faible teneur en MES. Pour mesurer la distance entre les individus, le calcul de la distance euclidienne est utilisé et la méthode de Ward permet

d'effectuer une coupure entre les classes (Figure 34). Le dendrogramme permet d'identifier trois classes : la première associe des valeurs élevées d'abatement en coliformes et *E. coli* à des valeurs faibles de MES. Le deuxième groupe de variables associe des valeurs élevées d'abatement en entérocoques à des valeurs de température faibles. Enfin le troisième groupe associe des valeurs élevées de transmittance UV à 254 nm à des valeurs faibles de turbidité et DCO (Figure 34).

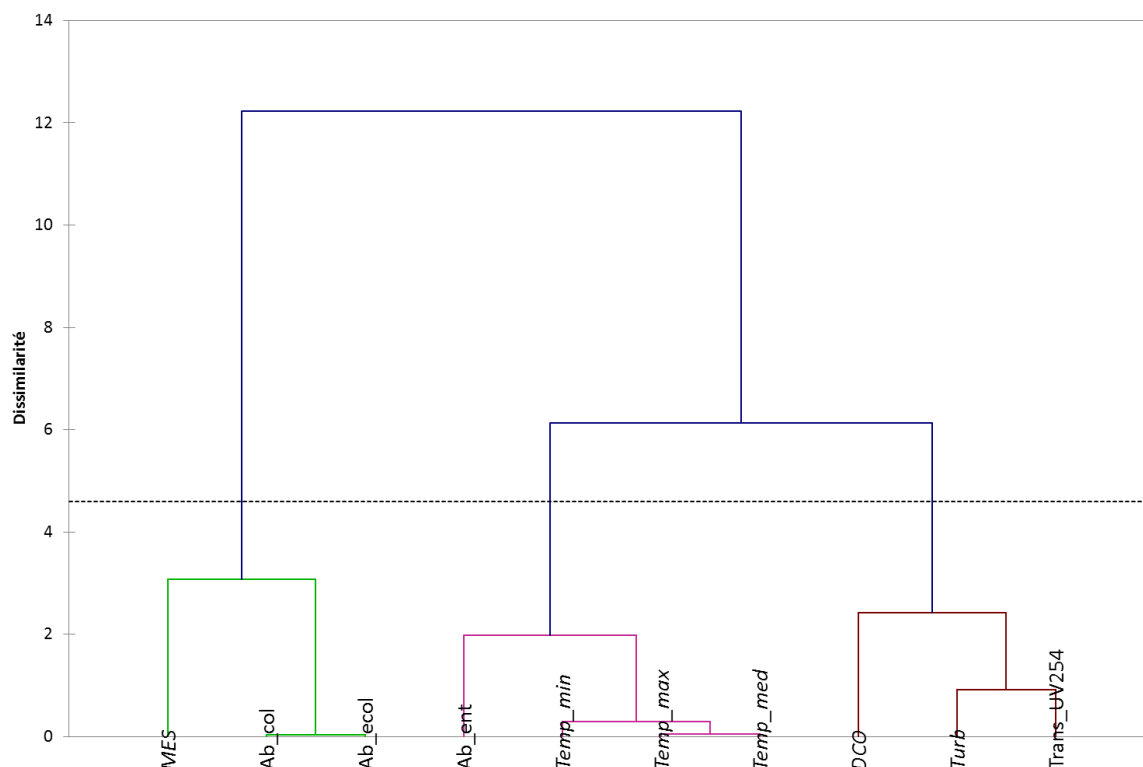


Figure 34 : Résultat de la CAH à partir des données du Tableau 12 : dendrogramme des corrélations entre les variables (distance euclidienne, méthode de coupure de Ward). Un signe négatif a été attribué aux variables représentées en italique (DCO, turbidité, MES, température)

En conclusion l'ACP permet de mettre en évidence les tendances suivantes, qui sont confirmées par la CAH :

- les abattements en coliformes et *E. coli* seraient négativement corrélés à la teneur en MES. Le lien avec la turbidité est moins important
- les abattements en entérocoques seraient négativement corrélés à la température de l'effluent. Cependant cette deuxième tendance est moins affirmée que la précédente, du fait d'un coefficient de corrélation plus faible
- la DCO ne semble pas corrélée aux abattements, probablement car il s'agit de DCO « réfractaire » peu biodégradable et donc peu assimilable par les microorganismes

Pour confirmer ces tendances, il faudrait répéter ce type d'essais, en augmentant la variabilité dans la composition des effluents. L'effet de la sédimentation doit également être mieux documenté, car il pourrait expliquer les différences observées entre les coliformes et les entérocoques. Les données de la littérature montrent que des températures plus élevées (de l'ordre de 30°C) affectent significativement la survie des bactéries (Pachepsky et al., 2014), d'où la nécessité d'étaler ce type d'essais sur plusieurs saisons. De façon plus globale, les résultats de cette étude montrent que la maîtrise de la contamination particulière de l'effluent a un impact sur la maîtrise de la qualité biologique pendant le stockage après la désinfection UV.

V. Conclusion

La désinfection par ultraviolet est un procédé adapté au traitement des effluents secondaires en vue de la réutilisation car il permet de traiter efficacement et à un coût compétitif la quasi-totalité des microorganismes pathogènes tout en garantissant l'absence d'impact pour les végétaux dans le cadre d'une réutilisation en irrigation. Pour déterminer les doses UV appliquées dans un réacteur, l'utilisation d'un microorganisme indicateur dont la réponse aux UV est connue (biosimétrie) est la méthode la plus répandue. La plupart des recherches sont conduites à l'échelle du laboratoire avec de faibles volumes traités pour contrôler précisément la dose appliquée. Le choix a été fait dans cette étude de travailler avec un réacteur à l'échelle semi-industrielle pour être plus représentatif des conditions de mélange dans les réacteurs réels. L'estimation des doses correspondant aux différents temps d'exposition aux UV a été réalisée par biosimétrie avec une souche calibrée d'*E. coli*. Il a été montré que les résultats obtenus dans ce type de réacteur à faible intensité UV et long temps de contact sont comparables aux résultats dans un réacteur calibré à lumière collimatée, dans lequel le temps de contact est plus court et l'intensité UV appliquée plus élevée.

La présence de particules en suspension dans l'effluent à traiter a un impact sur l'efficacité de la désinfection UV à deux niveaux :

- diminution de la constante d'inactivation des microorganismes exposés aux UV, ce qui entraîne la nécessité d'augmenter la dose appliquée (et donc la consommation électrique associée) pour atteindre le niveau d'inactivation souhaité
- augmentation de l'effet de traîne, c'est-à-dire la quantité de microorganismes protégés des UV, quelle que soit la dose appliquée

Dans cette étude, plusieurs niveaux de dégradation de la qualité de l'effluent secondaire ont été simulés par ajout de boue du bassin d'aération dans l'effluent à traiter. Cette dégradation consiste en un apport en particules organiques de grande taille (supérieure à 25 μm). Une corrélation linéaire a pu être mise en évidence dans ce cadre entre les indicateurs globaux de contamination particulaire et la baisse de la constante d'inactivation de la fraction des microorganismes exposés aux UV. L'indicateur le plus pertinent pour mettre en évidence cet impact serait la transmittance UV, qui prend en compte à la fois la taille des particules, mais aussi la présence sur ces particules de composés organiques absorbant le rayonnement UV. Une baisse de la transmittance de 65 à 60 % entraîne une diminution des constantes d'inactivation de 20 à 30% (selon l'indicateur pris en compte) et donc la nécessité

d'augmenter la dose appliquée au moins du même ordre de grandeur. En-dessous du seuil de transmittance UV de 60 %, la surconsommation électrique nécessaire pour compenser la baisse de transmittance peut être considérée comme trop importante.

Une corrélation linéaire a également été mise en évidence entre dégradation de la qualité de l'effluent secondaire et ampleur de l'effet de traîne. La protection des microorganismes contre le rayonnement UV est liée à leur capacité à s'intégrer dans des floes compacts. L'apport en particules en provenance du traitement secondaire a donc pour effet :

- d'apporter des microorganismes protégés des UV car associés aux particules : c'est surtout le cas pour les entérocoques
- d'augmenter la probabilité d'agrégation des microorganismes non protégés des UV sur ces particules : c'est surtout le cas pour les coliformes dont *E. coli*

C'est la turbidité qui permet de prédire l'effet de traîne avec la meilleure précision. Ainsi, indépendamment de la dose UV appliquée, des teneurs résiduelles supérieures à 10 NPP/100 mL d'organismes cultivables peuvent être mesurées après la désinfection pour des valeurs de turbidité supérieures à 3 NTU (coliformes), 10 NTU (*E. coli*) ou 6 NTU (entérocoques). D'autres indicateurs comme les spores ou les virus pourraient présenter un potentiel d'effet de traîne plus important face à la dégradation de qualité de l'effluent. Le seuil de 3 NTU devrait donc être pris en compte pour éviter ou limiter l'amplitude de l'effet de traîne pour la plupart des microorganismes pathogènes.

Si l'effluent est pauvre en nutriments, le risque de prolifération de cette quantité résiduelle et/ou de réactivation des microorganismes exposés aux UV est faible pendant le stockage à l'obscurité. Le potentiel de photoréactivation pendant le stockage en milieu ouvert est plus important, mais d'autres facteurs (comme la prédation ou la formation de radicaux libres) pourraient contrebalancer ce phénomène. Paradoxalement, il semblerait que l'augmentation de la turbidité de l'effluent limite la photoréactivation.

Ces résultats obtenus à l'échelle semi-industrielle dans un réacteur à long temps de contact sont reproductibles dans un réacteur à lumière collimatée à faible temps de contact, servant lui-même de modèle aux configurations en canal ouvert ou en réacteur fermé à l'échelle industrielle. Pour garantir l'efficacité de la désinfection UV et la viabilité économique de ce traitement (Figure 35), il est donc nécessaire de garantir une contamination particulaire minimale de l'effluent à traiter. Dans ce but, la mise en place d'un prétraitement s'avère indispensable.

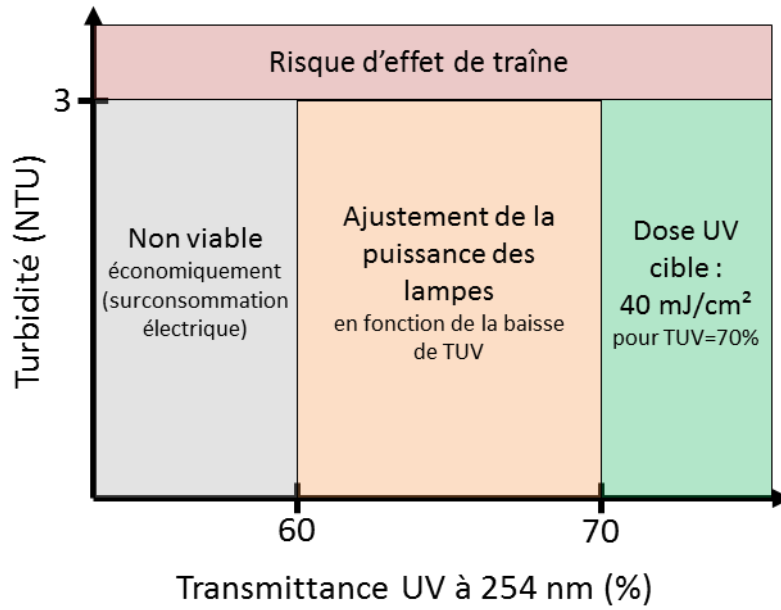


Figure 35 : Propriétés physico-chimiques d'un effluent secondaire pour garantir l'efficacité maximale de la désinfection UV

Quatrième partie

Filière de traitement tertiaire pour
garantir la fiabilité de la qualité biologique
des eaux usées traitées

I. Introduction

Les résultats présentés dans les précédentes parties de ce mémoire montrent que la maîtrise de la pollution particulaire de l'effluent à traiter est essentielle pour garantir l'efficacité de la désinfection UV, mais aussi pour s'assurer de la fiabilité des méthodes de dénombrement par culture des microorganismes indicateurs. Dans le cas de l'utilisation des eaux usées traitées en irrigation par goutte à goutte, la présence de particules pourrait également favoriser le colmatage (ISO, 2015b).

Plusieurs procédés peuvent être utilisés pour éliminer les particules en suspension en aval d'un traitement secondaire. Les plus répandus sont basés sur le principe de la filtration, qui consiste à séparer la phase solide (particules) de la phase liquide. Il existe deux types de filtration : la filtration sur support et la filtration en profondeur. La flottation peut aussi être employée : il s'agit d'injecter des bulles de gaz qui s'attachent aux particules ; la densité de ces agglomérats étant plus faible que celle de l'eau, ils remontent vers la surface et sont éliminés par raclage. Cette technique est peu employée pour la REUT, car le coût énergétique est important (Asano et al., 2007).

Dans le cas de la filtration sur support (ou filtration en surface), la suspension est mise en contact d'un matériau sur lequel les particules se déposent et forment un gâteau d'épaisseur croissante (Leclerc & Baluais, 1997). Selon la porosité du matériau, on parle de microfiltration (pores de taille 0,5 μm environ), d'ultrafiltration (pores de taille 0,01 μm environ), de nanofiltration (pores de taille inférieure à 0,001 μm) ou d'osmose inverse (pores de taille inférieure à 0,0001 μm) (Berland & Juery, 2002). Plus la taille des pores est faible, plus la pression à appliquer est importante. Les membranes de microfiltration et d'ultrafiltration ont montré leur efficacité pour traiter les effluents secondaires, en allant même jusqu'à l'élimination d'une partie des microorganismes pathogènes (De Koning et al., 2008; Filloux et al., 2014; Gómez et al., 2006; Illueca-Muñoz et al., 2008). De plus, les membranes peuvent être intégrées directement au traitement secondaire (BRM), ce qui diminue les coûts de fonctionnement par rapport au schéma « boues activées \rightarrow clarification \rightarrow filtration membranaire » (De Koning et al., 2008; Grasmick et al., 2007).

Un des inconvénients liés aux procédés membranaires est leur sensibilité au colmatage (surtout pour l'ultrafiltration), ce qui implique une très grande maîtrise de la qualité de l'effluent secondaire (Illueca-Muñoz et al., 2008). Cependant, le développement de nouveaux matériaux et de nouvelles configurations préfigure l'accroissement du marché de la filtration membranaire pour la REUT dans les prochaines années (Casado Caneque et al., 2015). Il faut toutefois noter que ce marché

est surtout propre aux pays développés. En effet, les aspects techniques (main d'œuvre qualifiée) et économiques freinent l'implantation dans les pays en développement ou dans les petites installations des pays développés. De fait, les coûts d'investissement et de fonctionnement sont plus élevés par rapport aux procédés de filtration en profondeur (Bailey, 2012; Boutin & Helmer, 2009; Gómez et al., 2007; Iglesias et al., 2010; Illueca-Muñoz et al., 2008).

La filtration en profondeur consiste à faire passer la suspension à traiter à travers une masse poreuse composée d'une ou plusieurs couches de matériaux (sable, anthracite...). Les pores entre les grains sont généralement de taille supérieure à la taille des particules, mais ces dernières se déposent entre les anfractuosités ou se collent à la surface des grains (Leclerc & Baluais, 1997). Les conditions opératoires (débit de passage, type de média filtrant, coagulation en amont...) peuvent avoir un impact important sur la qualité de l'effluent en sortie de filtration. La filtration en profondeur est largement utilisée dans les filières de traitement tertiaire en vue de la réutilisation : soit comme prétraitement avant une filtration membranaire, soit pour éliminer la pollution particulaire avant la désinfection (Boutin & Helmer, 2009; De Koning et al., 2006; Gómez et al., 2006; Illueca-Muñoz et al., 2008).

L'objectif général de cette partie est de proposer une filière complète de traitement tertiaire (en sortie d'un traitement secondaire de type « boues activées » ou équivalent) en vue de la réutilisation des EUT pour l'irrigation de tout type de culture. Les limites établies pour la désinfection UV conduisent à mettre en œuvre un prétraitement par filtration. La filtration en profondeur sur média granulaire est préférée à la filtration sur support car ce procédé est plus adapté au contexte du bassin méditerranéen. Dans la suite du manuscrit, la filtration en profondeur est définie comme une filtration rapide (vitesses de l'ordre du $\text{m}^3/\text{m}^2/\text{h}$). La filtration lente (vitesses de l'ordre du $\text{L}/\text{m}^2/\text{h}$) est utilisée dans les traitements extensifs de type lagunage et n'est pas développée dans ces travaux. Les conditions opératoires de la filtration sont tout d'abord optimisées pour le traitement d'un effluent secondaire. Ensuite, la faisabilité de la mise en œuvre d'un système de contrôle en temps réel de la qualité des effluents est vérifiée. Enfin, une analyse des risques est réalisée pour définir les points de contrôles critiques sur la filière.

II. Optimisation du prétraitement par filtration en profondeur

1. État de l'art

a. Mécanismes de la filtration en profondeur

La capture est le principal mécanisme responsable de l'élimination des plus grosses particules (Tchobanoglous & Eliassen, 1970). Si les particules ont une taille supérieure à la taille des pores du média filtrant, elles sont retenues à la surface du filtre : ce phénomène est appelé le tamisage mécanique (Degrémont, 2005). Si les particules ont une taille proche de celles des pores, elles commencent à pénétrer dans le massif filtrant et se déposent dans les interstices de façon aléatoire (Degrémont, 2005; Tchobanoglous & Eliassen, 1970) (Figure 1). D'autres mécanismes peuvent également entrer en jeu, bien que leurs effets soient moins importants et souvent masqués par la capture (Asano et al., 2007) (Figure 1) :

- sédimentation : les particules les plus denses se déposent sur le média par pesanteur
- interception : les particules qui suivent les lignes de courant sont stoppées lorsqu'elles rentrent en contact avec la surface du média filtrant
- adhésion : agglomération des particules entre elles au sein du média filtrant

L'élimination des plus petites particules est assurée en deux étapes. Dans un premier temps, les particules sont transportées à travers le massif filtrant jusqu'à la surface de contact. Au niveau de cette surface, les particules s'adsorbent. Les liaisons particules – surface peuvent être chimiques ou physiques (forces de Van der Waals, forces électrostatiques...) et sont favorisées par de faibles vitesses d'écoulement. La fixation n'est pas irréversible, ce qui permet le détachement des particules lors du lavage (Asano et al., 2007; Degrémont, 2005).

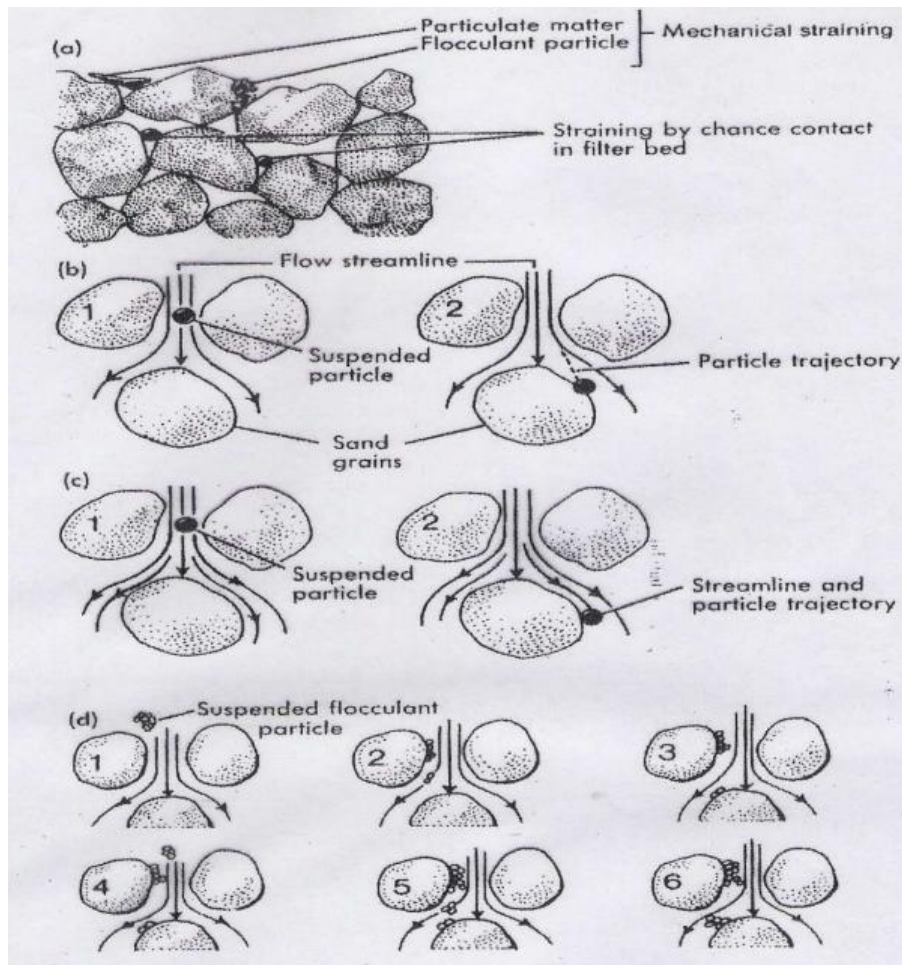


Figure 1 : Mécanismes impliqués dans l'élimination des particules par filtration en profondeur : a) capture ; b) sédimentation ; c) interception ; d) adhésion (Tchobanoglous & Schroeder, 1985)

Les forces de frottements liées à la vitesse de filtration provoquent un décrochage des particules et leur enfoncement dans le massif filtrant. Après un certain temps de filtration, une partie des particules peut ainsi être relarguée en sortie du filtre, ce qui provoque un pic de turbidité. Ce phénomène est appelé crevaison du filtre.

b. Aspects théoriques

L'équation la plus simple pour décrire l'écoulement dans le massif filtrant est la loi de Darcy (Degrémont, 2005) :

$$\frac{\Delta P}{Z} = U \cdot \frac{\mu}{k} \quad (1)$$

Avec $\Delta P/Z$: perte de charge en fonction de la profondeur Z dans le massif filtrant (Pa/m)
 U : vitesse d'écoulement : rapport entre le débit de passage Q et la section du filtre S (m/s)
 μ : viscosité dynamique de l'effluent (Pa.s)
 k : perméabilité du massif filtrant (m^2)

Si la vitesse de passage est fixée, les pertes de charge dépendent des propriétés de l'effluent (viscosité) et des propriétés du massif filtrant (perméabilité). Si la température de l'effluent augmente, sa viscosité diminue, et la filtration est facilitée. La loi de Darcy est valable dans le cas d'un écoulement laminaire. Pour des vitesses de passage élevées (cas de la plupart des filtres à l'échelle industrielle), des turbulences apparaissent au sein du massif filtrant et provoquent des chutes de pression : la loi de Darcy n'est plus applicable. Bien que de nombreuses équations aient été proposées, il n'est pas possible de prévoir théoriquement l'accroissement de la chute de pression dans le filtre en lien avec l'augmentation de la rétention dans le média filtrant (Boller & Kavanaugh, 1995; Leclerc, 1998; Lopato et al., 2012). Le colmatage du filtre au cours du temps peut être suivi par le tracé des courbes de pression (Figure 2). Les épaulements traduisent des pertes de charge accrues liées au colmatage du filtre dans sa partie haute. Dans la partie basse, les pertes de charge redeviennent linéaires dans la partie non colmatée. Il est ainsi possible de suivre le front de filtration (Figure 2). Si les pertes de charge dans la partie colmatée deviennent trop importantes, des phénomènes de cavitation peuvent apparaître et déstructurer le massif filtrant (Degrémont, 2005; Leclerc, 1998).

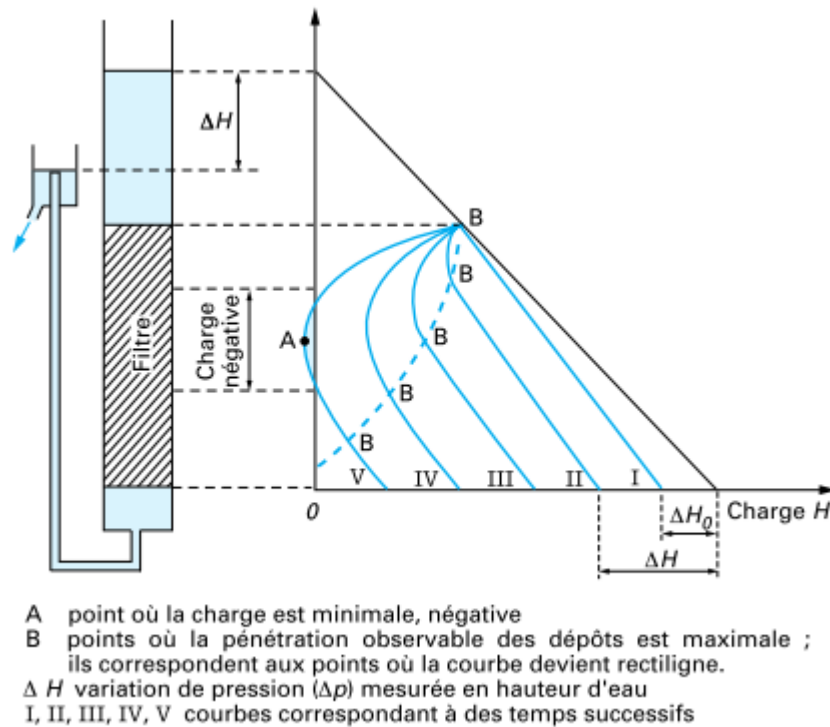


Figure 2 : Profils des pertes de charge en fonction du temps dans un filtre fonctionnant à vitesse constante. L'évolution du front de filtration est indiquée par la lettre B (Leclerc, 1998)

c. Caractéristiques du média filtrant

La taille et la forme des éléments constitutifs du milieu poreux déterminent en partie l'efficacité de capture des particules en suspension. Le volume occupé par le massif filtrant peut être divisé en deux fractions : la fraction « solide » occupée par les grains et la fraction de vide correspondant à l'espace interstitiel. La porosité des grains de forme sphérique est moins importante que la porosité des grains de forme irrégulière car les grains de ce type s'imbriquent moins facilement les uns dans les autres (Degrémont, 2005). Les matériaux les plus utilisés sont donc constitués de grains de forme régulière, comme le sable ou l'antracite (Asano et al., 2007). Plusieurs couches peuvent être assemblées. Dans ce cas, il est nécessaire que les caractéristiques des deux matériaux permettent leur mise en expansion simultanée pendant le lavage, puis leur reclassement différencié à la fin du lavage (Asano et al., 2007).

La taille des grains est la principale caractéristique du média filtrant qui impacte l'efficacité de la filtration. Ce paramètre influence non seulement les pertes de charge initiales (à l'eau claire), mais aussi la vitesse de colmatage pour un effluent donné. Si la taille des grains est trop faible, l'énergie nécessaire pour surmonter les forces de

friction dans le lit filtrant sera élevée, ce qui correspond à un gaspillage. Au contraire, si la taille des grains est trop élevée la majorité des particules de petite taille ne sera pas retenue par le filtre (Degrémont, 2005). La distribution granulométrique des grains a également son importance, car l'agencement des grains s'effectue selon un gradient de taille en fonction de la profondeur dans le massif filtrant (Figure 3). La porosité augmente donc avec la profondeur.

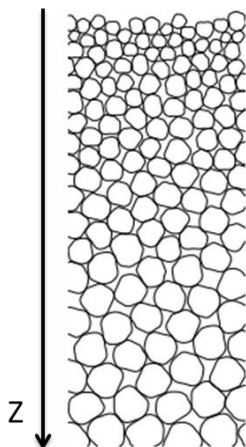


Figure 3 : Répartition des grains en fonction de leur taille dans le matériau filtrant (Asano et al., 2007)

Deux grandeurs sont généralement employées pour décrire la taille des grains d'un matériau filtrant : la taille effective nominale (TEN) et le coefficient d'uniformité (CU). Ces grandeurs sont déterminées par tamisage du matériau avec différentes mailles. La TEN est définie comme la maille laissant passer 10 % (en poids) du matériau. La TEN correspond donc à la taille minimale des grains représentant 90 % du poids du matériau. Le coefficient d'uniformité donne une indication quant à l'homogénéité granulométrique des particules de sable. Il est défini par le rapport entre la maille laissant passer 60 % (en poids) du matériau et la TEN (Asano et al., 2007; Degrémont, 2005).

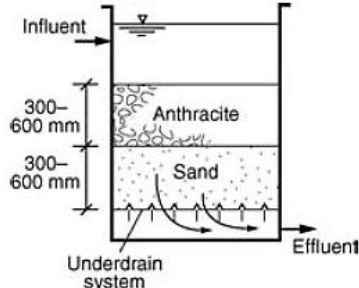
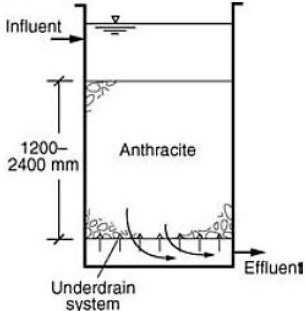
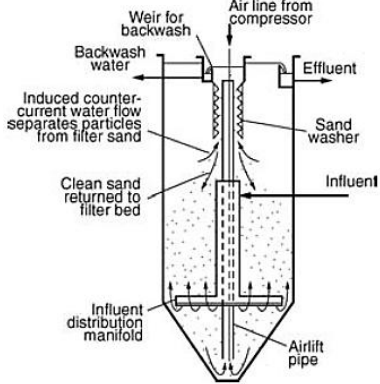
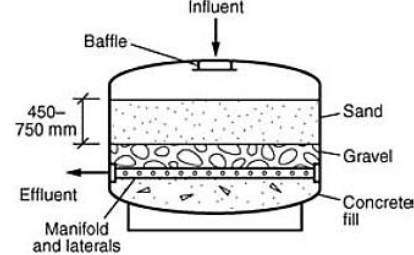
La littérature montre que les médias filtrants avec une granulométrie élevée provoquent une augmentation plus rapide des pertes de charge à cause de la densité plus faible des dépôts ayant lieu dans les pores de grande taille (Boller & Kavanaugh, 1995). Pour limiter les risques de crevaisson du filtre avec des médias de granulométrie élevée, il est conseillé d'augmenter la profondeur du lit filtrant. Un rapport de 1000 entre la profondeur et la TEN du média est généralement pris en compte pour le dimensionnement des filtres conventionnels (Lawler & Nason, 2006).

d. Technologies de filtration existantes

Les principaux types de configurations utilisées pour la filtration verticale en profondeur sont présentés dans le Tableau 1. Une distinction peut être réalisée entre la filtration semi-continue ou continue. Dans le premier cas, la filtration doit être arrêtée périodiquement pour réaliser un contre-lavage. Dans le deuxième cas, la filtration et le contre-lavage ont lieu simultanément. D'autres distinctions peuvent être définies, comme le type de média filtrant ou le type de flux (descendant ou ascendant). Il est également important de distinguer les filtres fonctionnant par gravité ou sous pression. Dans le dernier cas, la filtration est opérée dans une enceinte fermée, la pression étant fournie par le pompage à un débit fixé. Les filtres sous pression peuvent supporter des pertes de charge plus importantes, ce qui permet d'augmenter la durée des cycles de filtration et de diminuer la fréquence des lavages. À l'heure actuelle, ce type de filtres est réservé aux petites installations et/ou pour diminuer l'empreinte au sol (débit traité par surface de filtre) (Asano et al., 2007).

Plusieurs configurations sont mentionnées dans la littérature pour la filtration en profondeur d'effluents secondaires en vue de la réutilisation, sans que le choix d'une technologie ne soit explicitement justifié. Globalement, la filtration conventionnelle ou sous pression à une vitesse de 5 – 10 m/h et avec du sable de TEN 0,8 – 1,2 mm permet d'obtenir un abattement de MES de 40 à 80 % avec des valeurs mesurées sur les effluents filtrés comprises entre 1 et 10 mg/L (De Koning et al., 2008; Gómez et al., 2007; Illueca-Muñoz et al., 2008; Rose et al., 1996). Si les réglementations ou lignes directrices préconisent l'utilisation de la filtration en profondeur, elles ne détaillent pas le type de configuration à mettre en œuvre. Les autorités américaines préconisent l'utilisation d'un coagulant en amont de la filtration et indiquent que les paramètres opératoires peuvent être optimisés (US EPA, 2012).

Tableau 1 : Principales technologies de filtration existantes (d'après Asano et al., 2007; Degrémont, 2005)

Configuration	Description
Filtration conventionnelle à flux descendant	Plusieurs matériaux de filtration peuvent être utilisés, en mono ou multicouches. Les particules en suspension s'accumulent principalement à la surface du filtre et c'est l'augmentation du niveau d'eau à la surface du filtre qui déclenche le lavage.
	
Filtration dans la masse à flux descendant	La taille des grains du matériau (généralement l'antracite) et la profondeur du lit filtrant sont plus importantes, ce qui permet d'accumuler les particules dans l'ensemble du massif filtrant et donc d'augmenter la durée des cycles. Le dimensionnement doit cependant prendre en compte la capacité maximale du contre-lavage.
	
Filtration dans la masse à flux ascendant et à contre-lavage continu	L'effluent à traiter est distribué uniformément en bas du filtre, puis il remonte au travers du lit de sable fluidisé. Le filtrat est récupéré au niveau d'une goulotte en haut du filtre. Le mélange sable-particules est aspiré au centre du filtre et l'injection localisée d'air comprimé permet le nettoyage du sable. Les particules (moins denses) sont évacuées vers le haut tandis que le sable propre (plus dense) retourne dans le filtre.
	
Filtration sous pression	Même fonctionnement que les filtres à flux descendant avec mise sous pression dans une enceinte fermée par pompage.
	

e. Dimensionnement et paramètres opératoires

Pour dimensionner correctement un équipement de filtration en profondeur, il est nécessaire de bien connaître les caractéristiques de l'effluent à traiter et de définir le débit de l'installation. Le débit conditionne la section du filtre car des vitesses de filtration comprises entre 5 et 15 m/h sont préconisées selon le type de filtre (Degrémont, 2005) ($S = Q/U$). Le nombre d'installations à prévoir en parallèle dépend de la surface totale de filtration nécessaire. Si le mode de fonctionnement est semi-continu, deux installations en parallèle sont généralement prévues pour maintenir la production pendant le lavage de chaque filtre (en décalage).

La qualité de l'effluent et le type de média filtrant conditionnent la vitesse de colmatage du filtre. La profondeur de masse filtrante à prévoir dépend du type de filtration mise en œuvre (Tableau 1). Le colmatage est suivi soit par l'augmentation du niveau d'eau au-dessus du filtre dans le cas d'une filtration conventionnelle, soit par l'augmentation du paramètre ΔP (différence de pression entre l'entrée et la sortie du filtre) dans le cas d'une filtration sous pression. Le dépassement d'une valeur seuil déclenche le contre-lavage.

Plusieurs techniques peuvent être employées pour le contre-lavage (cas des configurations semi-continues). La première consiste à fluidiser le lit filtrant. Il faut que le débit soit suffisamment élevé pour brasser le lit et entraîner les particules mais le risque d'entraîner le matériau de filtration est important (Degrémont, 2005). Afin de limiter ce risque, un contre-lavage en deux étapes est généralement mis en œuvre (Degrémont, 2005) :

- décolmatage par injection simultanée d'air et d'eau : une faible vitesse d'eau est appliquée (5 à 20 m/h) pour ne pas mettre le matériau filtrant en expansion tout en détachant les particules par une vitesse d'air élevée (40 à 60 m/h)
- évacuation des eaux de lavage accumulées au-dessus du lit filtrant par contre lavage à l'eau seule et à vitesse moyenne (15 à 20 m/h)

f. Cationisation du filtre par des coagulants inorganiques ou des polymères organiques

Le principal objectif de la coagulation est de favoriser l'élimination des matières colloïdales en suspension dans l'effluent à traiter. Ces colloïdes sont constitués de différentes molécules (acides humiques, graisses...) et sont en suspension stable car elles sont chargées négativement. Leur regroupement sous forme de floes facilement

décantables ou filtrables est empêché par les forces de répulsion électrostatiques (mesurées par le potentiel zêta) qui l'emportent sur les forces d'attraction de Van der Waals (Figure 4). La coagulation consiste à ajouter à l'eau un électrolyte positif pour déstabiliser ces charges négatives et favoriser la formation de micro-flocs. Les coagulants les plus utilisés sont des sels métalliques comme le chlorure ferrique et le sulfate d'aluminium. Les taux de traitement usuels sont compris entre 3 et 10 mg/L (produit actif) pour le traitement des eaux en vue de la potabilisation (Mouchet, 2000). Le pH joue un rôle prépondérant dans la coagulation. Il existe un optimum de coagulation (proche du pH de solubilité minimale) pour les sels d'aluminium qui se situe entre 6 et 7,5. Pour les sels ferriques, la coagulation s'effectue dans des conditions satisfaisantes pour des pH supérieurs à 5,5 – 6, aucune re-dissolution de l'hydroxyde n'étant à craindre aux pH élevés (Degrémont, 2005; Mouchet, 2000).

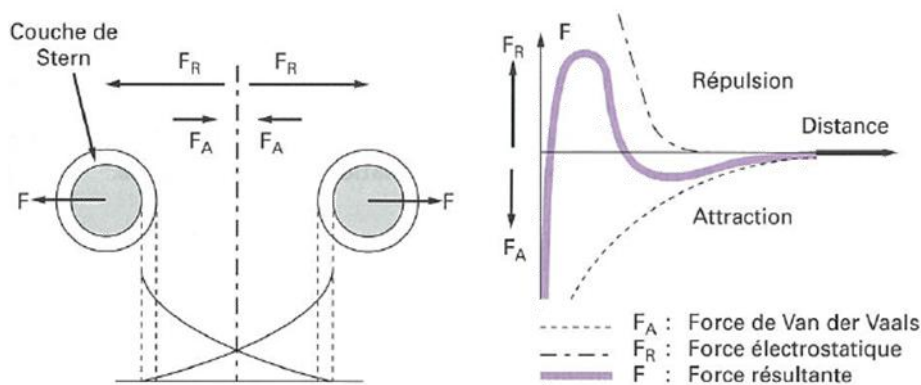


Figure 4 : Stabilité d'une suspension colloïdale (Degrémont, 2005)

La coagulation peut être mise en œuvre soit avant une étape de décantation en aval, puis filtration ; ou avant une filtration directe. Dans ce dernier cas, les flocs se déposent sur le massif filtrant (généralement en partie haute), ce qui diminue la porosité globale. Cela a pour conséquence l'augmentation des pertes de charge dans le filtre, mais aussi une meilleure performance pour la rétention des particules (Mouchet, 2000). Pour garantir l'efficacité du coagulant, un mélange efficace est indispensable. Dans le cas de la filtration directe après coagulation, la dispersion complète du coagulant après injection en ligne est assurée par un mélangeur statique mis en place à l'intérieur de la tuyauterie (système hélicoïdal par exemple) (Mouchet, 2000).

L'intérêt de l'adjonction de coagulants inorganiques pour améliorer l'élimination des particules en suspension dans le cadre de la filtration en profondeur d'effluents secondaire en vue de la réutilisation a été démontré par plusieurs études sur des pilotes à l'échelle industrielle (De Koning et al., 2008).

Des molécules organiques peuvent également être employées pour la coagulation. Les réactifs à la base de ces coagulants sont des polymères de synthèse chargés positivement, la charge cationique étant apportée par une fonction ammonium quaternaire. Contrairement aux polymères utilisés pour la floculation (agrégation des micro-flocs issus de la coagulation), ces polymères sont de faible masse moléculaire. Les deux principales familles de coagulants organiques utilisées et autorisées en France pour le traitement des eaux destinées à la consommation humaine sont les suivantes (Baudin et al., 2004) :

- les polyamines, $C_5H_{12}ONCl$, synthétisées par polycondensation de diméthylamine et épichlorhydrine (Figure 5a)
- les polyDADMAC (ou PolyDiAllylDiméthylAmmoniumChlorure), $C_8H_{16}NCl$, synthétisés par copolymérisation du monomère DADMAC (Figure 5b)

Le principal avantage de ces polymères est qu'ils possèdent de nombreuses charges positives à leur surface, ce qui conduit théoriquement à un meilleur degré d'agrégation pour une dose de coagulant plus faible. Ces molécules étant constituées d'une distribution de chaînes de longueurs différentes, leur masse moléculaire moyenne est définie comme la moyenne des masses moléculaires des chaînes dont elles sont constituées. Les polyamines sont moins ramifiées et présentent une distribution des masses moléculaires plus large que les polyDADMAC (Figure 5). Cela les rend plus adaptées à une large gamme de particules de petite taille et aux colloïdes. Les polyDADMAC sont quant à eux plus adaptés pour traiter des eaux turbides, avec une masse moléculaire moyenne plus élevée, donc une vitesse de sédimentation plus importante (Baudin et al., 2004). Les autres avantages et inconvénients des coagulants organiques sont présentés dans le Tableau 2.

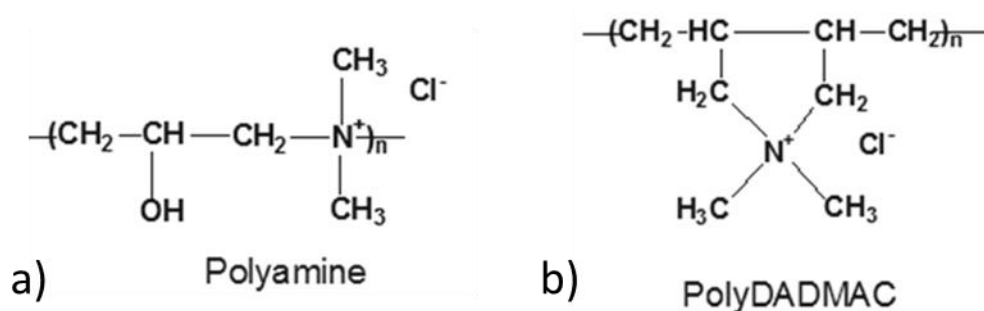


Figure 5 : Structure chimique des monomères de polyamine (a) et de polyDADMAC (b) (d'après Baudin et al., 2004)

Si l'utilisation de coagulants organiques est assez répandue dans les traitements de potabilisation des eaux (Baudin et al., 2005), leur usage pour le traitement d'effluents secondaires en vue de la réutilisation est très peu documenté dans la littérature. Les

polyamines ont montré leur efficacité pour le traitement des eaux usées des industries textiles riches en colorants en amont d'une filtration membranaire, même si un colmatage accéléré des membranes d'ultrafiltration est constaté (Choo et al., 2007; Kim et al., 2014a). Deux études traitant des eaux usées municipales portent respectivement sur les eaux « noires » (eaux usées des toilettes) séparées à la source et sur des effluents secondaires d'une station de type « boues activées » en Israël. Dans les deux cas, l'utilisation de polymères organiques seuls ou en combinaison avec un coagulant inorganique permet d'améliorer l'abattement des matières en suspension pendant la filtration (Cikurel et al., 1996; Kozminykh et al., 2016). L'augmentation des pertes de charge dans le filtre est proportionnelle aux doses appliquées (5 à 10 mg/L de solution commerciale) pour une durée de filtration équivalente (Cikurel et al., 1996).

Tableau 2 : Principaux avantages et inconvénients des coagulants organiques (d'après Baudin et al., 2004)

Avantages	Inconvénients
<ul style="list-style-type: none"> • Dosage en faibles concentrations • Efficacité sur une large gamme de pH • Meilleur contrôle de l'encrassement des filtres qu'avec les sels métalliques • Meilleurs abattements en particules en suspension et en microorganismes 	<ul style="list-style-type: none"> • Réticence des exploitants car meilleure maîtrise de l'utilisation des sels métalliques • Risque de surdosage qui entraîne une dégradation de la qualité de l'eau traitée • Formation de sous-produits nocifs, notamment en cas de post-chloration • Coût indexé sur le prix du pétrole

2. Matériel et méthodes

a. Présentation du site d'étude

Le pilote de filtration sur sable étudié est celui installé dans le cadre du projet NOWMMA. Les eaux usées traitées sont issues de la station d'épuration d'une capacité de 24 000 EH (voir 1^{ère} partie, paragraphe VI.3). Pour mesurer les performances de la station, les données de l'autocontrôle de l'exploitant ont été récupérées sur la période janvier 2013 – juin 2015. Il s'agit des valeurs en entrée et en sortie de la station pour des paramètres physicochimiques mesurés de façon mensuelle (azote global NGL, azote de l'ion ammonium N-NH₄, phosphore total Pt) ou bimensuelle (DBO₅, DCO, MES). Les abattements entre l'entrée et la sortie de la STEP sont exprimés en pourcentage et calculés de la façon suivante (les concentrations sont notées C) :

$$\text{Abattement (\%)} = \frac{C_{\text{entrée}} - C_{\text{sortie}}}{C_{\text{entrée}}} \times 100 \text{ avec } C \text{ en mg/L} \quad (2)$$

Pour estimer la charge microbiologique, dix prélèvements ponctuels ont été réalisés entre octobre 2014 et juillet 2015. Les paramètres indiqués dans le Tableau 3 ont été analysés par un laboratoire agréé (Inovalys, France). Les abattements entre l'entrée et la sortie de la STEP sont exprimés en \log_{10} et calculés de la façon suivante (les teneurs en microorganisme sont notées C) :

$$\text{Abattement} (\log_{10}) = C_{\text{entrée}} - C_{\text{sortie}} \text{ avec } C \text{ en } \log_{10} \text{ UFC} \quad (3)$$

Tableau 3 : Méthodes utilisées par le laboratoire agréé pour les indicateurs microbiologiques étudiés

Indicateur	Unité	Méthode laboratoire agréé
Coliformes	NPP/100 mL UFC/100 mL	NF EN ISO 9308-1
<i>E. coli</i>	NPP/100 mL	NF EN ISO 9308-3
Entérocoques	NPP/100 mL	NF EN ISO 7899-1
Spores de BASR	UFC/100 mL	NF ISO 26461-2
Phages ARN-F spécifiques	PPF/mL	ISO 10705-1
Oocystes de <i>Cryptosporidium</i>	nombre par L	NF T90-455 (sur 15 L)
Kystes de <i>Giardia</i>	nombre par L	
Œufs d'helminthes	nombre par L	Comptage microscope (sur 5 L)

NPP : Nombre le Plus Probable

UFC : Unités Formant une Colonie

PPF : Particules Formant des Plages de lyse

b. Description du pilote de filtration sur sable

Les effluents sont prétraités par un tamis à 2500 μm et stockés dans une cuve en PEHD de 8 m^3 avant d'être envoyés vers le filtre à sable. Le pilote de filtration sur sable est représentatif d'un équipement sous pression pouvant être mis en œuvre à l'échelle industrielle. Il est constitué d'un corps de filtre en fibre de verre qui contient le massif filtrant d'une hauteur d'un mètre pour une surface de 1,05 m^2 (Calplas, Espagne) (Figure 6). Les principaux équipements mécaniques du pilote sont une pompe centrifuge d'alimentation (Grundfos CRE 15-3, Allemagne), une pompe de lavage (Grundfos CRE 20-3, Allemagne) et une soufflante pour l'injection d'air à contre-courant (Elmo Rietschle G-BH1510, France). Les principaux équipements de mesure sont deux débitmètres pour les eaux brutes et les eaux traitées (Burkert W49MA, Allemagne) et un capteur de pression différentielle pour asservir le lavage du filtre

(Fischer DS31, Allemagne). Plusieurs points de prélèvement sont également installés : en amont du point d'injection (entrée), en sortie du filtre et à différentes profondeurs dans la masse filtrante (0,1 ; 0,3 ; 0,5 et 0,7 m). Un schéma du filtre est présenté en Figure 6.

L'injection de coagulant est réalisée à l'aide d'une pompe péristaltique (ProMinent Concept Plus, Allemagne). Le point d'injection est situé juste en amont de la pompe d'alimentation. Le mélange est donc assuré par le passage dans la pompe, et par un mélangeur statique hélicoïdal en aval.

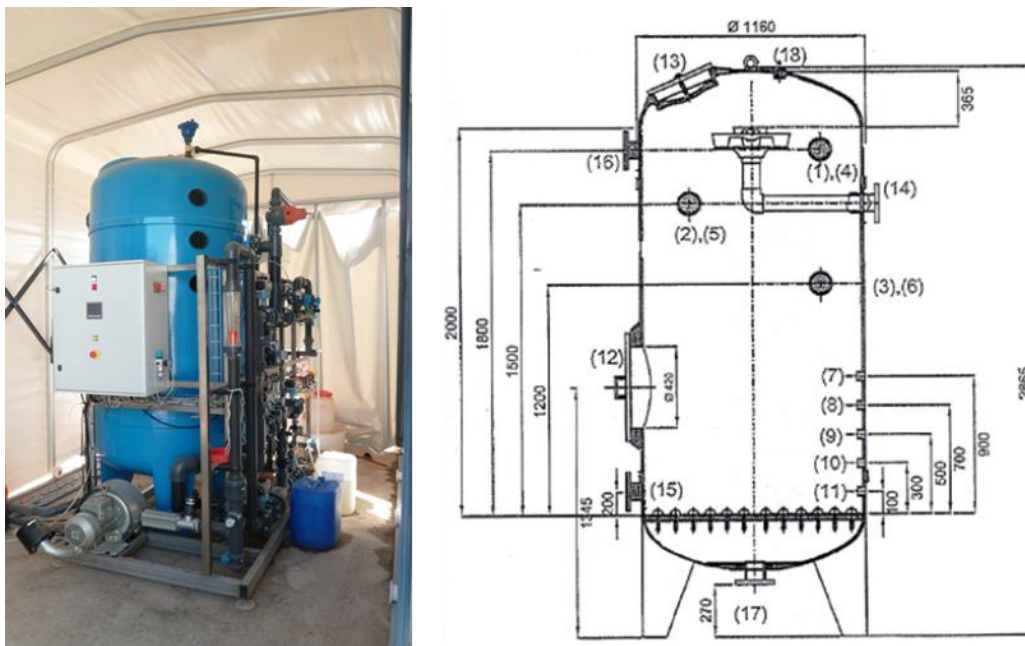


Figure 6 : Pilote de filtration sur sable sous pression (photo et schéma en coupe)

Le fonctionnement du pilote est géré par un automate intégré. Pendant la phase de production du filtre, le débit d'alimentation est fixé à 10 m³/h, soit une vitesse de 9,5 m/h. La durée d'un cycle est asservie soit à la consigne, soit à la différence de pression entre l'amont et l'aval du filtre, qui ne doit pas dépasser 0,3 bar. Le lavage du filtre consomme environ 6,8 m³ d'eau et se déroule selon les étapes présentées dans le Tableau 4.

Tableau 4 : Déroulement du lavage du filtre à sable et volumes d'eau consommés

	1. Abaissement du plan d'eau	2. Décolmatage	3. Contre-lavage	4. Repos et rejet des premières eaux
Durée (min)	4	7	10	12
Consommation eau brute	oui - 1,1 m ³	non	non	oui - 1,7 m ³
Consommation eau filtrée	non	oui - 0,7 m ³	oui - 3,3 m ³	non
Injection d'air	non	oui	non	non

c. Configurations testées

L'état de l'art permet de sélectionner trois éléments variables qui sont combinés pour définir les différentes configurations testées : le type de sable, la durée d'un cycle de filtration, et l'injection de coagulant. La durée d'un cycle est fixée à 24 ou 42 heures, sauf si la perte de charge amont-aval dépasse la valeur seuil de 0,3 bar. Deux types de sables (Sibelco, France) sont testés (les fiches techniques détaillées sont fournies en Annexe D) :

- sable grossier : TEN 1,4 mm ; coefficient d'uniformité : 1,4 ; généralement utilisé pour l'affinage d'effluents secondaires
- sable fin : TEN 0,99 mm ; coefficient d'uniformité : 1,4 ; généralement utilisé en traitement des eaux destinées à la consommation humaine

Les coagulants testés sont le chlorure ferrique (FeCl₃), un coagulant organique de type polyamine et deux coagulants organiques de type polyDADMAC. Le sulfate d'alumine n'a pas été testé, mais son action est équivalente à celle du chlorure ferrique. La solution utilisée pour l'injection de chlorure ferrique est une solution à 40 % de composé actif, de qualité eau potable (Quaron, France, détails en Annexe D). Une dilution a été effectuée pour correspondre à la plage de débits de la pompe d'injection. Les taux de traitement sont habituellement exprimés en ppm (partie par million), ce qui traduit un rapport massique. Si on considère que l'effluent à traiter a une densité proche de 1, un taux de traitement de 1 ppm correspond à 1 g/m³ ou 1 mg/L. Pour le chlorure ferrique, le taux de traitement peut être exprimé de trois façons différentes :

- en ppm de solution commerciale de FeCl₃
- en ppm de FeCl₃ pur (le plus courant) : taux précédent multiplié par le pourcentage de composé actif dans la solution (généralement autour de 40 %)
- en ppm de Fe pur : taux précédent multiplié par le ratio de la masse molaire du fer sur la masse molaire de FeCl₃ ($56 / 162,5 = 34,5 \%$)

Les taux de chlorure ferrique habituellement rencontrés pour la coagulation directe sur filtre pour la potabilisation sont compris entre 1,5 et 4 ppm de FeCl₃ pur (Mouchet, 2000). Le choix a été fait pour cette étude de travailler avec des taux de traitement plus faibles, compris entre 0,4 et 1,4 ppm (Tableau 5).

Tableau 5 : Taux de traitement choisis pour les coagulants étudiés

Taux de traitement (ppm)			
Coagulant	Composé actif	Solution commerciale	Fe pur
Chlorure ferrique	0,4	1,0	0,1
	0,8	2,0	0,3
	1,4	3,0	0,4
Floquat 31 (polyamine)	1,0	2,0	/
	2,0	4,0	/
Floquat 40 (polyDADMAC)	0,5	1,25	/
Floquat 50 (polyDADMAC)	0,5	1,0	/

Le coagulant organique de type polyamine testé est le produit Floquat 31 (FLOQUAT 31, SNF-Floerger, France). Il contient 50 % de matières volatiles sèches (MVS), indice calculé en soustrayant du poids à sec après un séchage à 105 °C le poids cuit après calcination à 550 °C. Son poids moléculaire moyen est relativement faible, ce qui assure une bonne répartition des charges positives autour des particules à traiter. Les deux coagulants de type polyDADMAC testés sont les produits Floquat 40 (FL4440) et Floquat 50 (FL4450). Leur poids moléculaire moyen est identique et supérieur à celui du produit Floquat 31, ce qui permet de traiter des eaux chargées en particules de grande taille. La différence entre ces deux produits est leur pourcentage de MVS, qui sont respectivement de 40 % et 50 %. Les fiches techniques détaillées des coagulants testés sont fournies en Annexe D.

De la même façon que pour le chlorure ferrique, les taux de traitement peuvent être exprimés en ppm de solution commerciale ou en ppm de composé actif. On considère que le pourcentage de composé actif est égal au pourcentage de MVS. Les taux de traitement habituellement rencontrés dans la littérature sont exprimés en ppm de solution commerciale et compris entre 4 et 15 (Degrémont, 2013; Mouchet, 2000) pour la potabilisation des eaux. Les travaux de Baudin et al. (2005) dans ce même domaine et avec une filtration directe ont mis en œuvre des polymères cationiques à hauteur de 0,25 ppm de composé actif, mais en combinaison avec un coagulant minéral. Dans cette étude, le choix a été fait de travailler avec les polymères cationiques seuls à des taux

compris entre 0,5 et 2 ppm de composé actif selon le type de coagulant (Tableau 5). Une dilution a également été effectuée pour correspondre à la plage de débits de la pompe d'injection. Dans le reste du manuscrit, les taux de traitement pour tous les coagulants sont exprimés en ppm de composé actif, sauf mention contraire.

Les différentes configurations testées entre octobre 2014 et juillet 2015 sont présentées dans le Tableau 6. Chaque configuration a été mise en œuvre sur le pilote industriel pendant une durée variable en fonction des variations de qualité de l'effluent secondaire. En effet, des difficultés ont été rencontrées sur le traitement secondaire, ce qui a conduit à des périodes de fonctionnement avec un effluent secondaire de qualité dégradée. Les résultats du suivi de la filtration pendant ces périodes sont différenciés du fonctionnement normal de la STEP (Tableau 6). De plus, la durée de suivi de certaines configurations a été volontairement raccourcie pour favoriser des configurations présentant plus d'intérêt *a priori* par rapport à la durée allouée à l'étude. Globalement, trois cycles de filtration ont pu être suivis au minimum pour chaque configuration.

Tableau 6 : Description et durée des configurations testées (les taux d'injection en coagulant sont donnés en ppm de composé actif)

Configuration : Type de sable – durée cycle – coagulant	Durée (semaines)
Sable grossier – 42 h	4,1
Sable grossier – 42 h – 0,8 ppm FeCl ₃ *	0,7
Sable grossier – 42 h – 1,4 ppm FeCl ₃ *	0,6
Sable fin – 42 h	1,9
Sable fin – 42 h – 0,4 ppm FeCl ₃	1,4
Sable fin – 42 h – 0,8 ppm FeCl ₃	1,6
Sable fin – 24 h – 1,4 ppm FeCl ₃	1,1
Sable fin – 24 h – 1 ppm Floquat 31	1,6
Sable fin – 24 h – 2 ppm Floquat 31	2,6
<i>Sable fin – dégradé - 0,4 ppm FeCl₃</i>	<i>0,6</i>
<i>Sable fin – dégradé - 0,8 ppm FeCl₃</i>	<i>3,4</i>
<i>Sable fin – dégradé – 0,5 ppm Floquat 50</i>	<i>0,7</i>
<i>Sable fin – dégradé – 0,5 ppm Floquat 40</i>	<i>1,7</i>

**point de prélèvement en entrée en aval du point d'injection*

d. Indicateurs de suivi de la performance

Le suivi des configurations étudiées est réalisé de deux façons différentes : 1) par des prélèvements quotidiens pendant la durée d'étude de chaque configuration et 2) par le suivi complet d'au moins un cycle pour chaque configuration. Le suivi complet

implique des prélèvements réguliers sur toute la durée du cycle et également la réalisation de bilans matière lors du lavage.

Les indicateurs physicochimiques sont importants pour évaluer la performance de la filtration car il a été montré dans la 3^{ème} partie qu'ils sont déterminants pour prédire l'efficacité de la désinfection UV en aval. Les paramètres suivants sont mesurés : turbidité, MES, transmittance UV à 254 nm (avec ou sans filtration à 0,45 µm). Les protocoles pour ces paramètres sont détaillés dans la 2^{ème} partie, paragraphe III.2. La quantité de particules de taille supérieure ou égale à 10 µm a été mesurée pour toutes les configurations testées, selon le protocole présenté dans la 2^{ème} partie, paragraphe III.2d. Cependant, les contraintes pratiques n'ont pas permis de réaliser plus d'un essai par configuration.

Même si l'abattement des microorganismes n'est pas le but premier de la filtration en profondeur, les indicateurs microbiologiques suivants sont suivis : coliformes et *E. coli* (méthode Colilert-18, IDEXX), entérocoques (méthode Enterolert-E, IDEXX). Les principes et limites de ces méthodes sont présentés dans la 2^{ème} partie.

Enfin, des indicateurs de performance opérationnelle sont suivis : le rendement hydraulique (rapport entre le volume d'eau traité et le volume d'eau perdue lors des lavages) et la vitesse d'augmentation des pertes de charge pendant le cycle. Un bilan des matières retenues sur le filtre et évacuées lors du lavage est également réalisé pendant le suivi complet d'au moins un cycle par configuration. Les prélèvements réguliers au cours de la filtration permettent d'obtenir un échantillon « moyen » de l'eau brute et de l'eau traitée. Les prélèvements pendant le lavage permettent d'estimer la quantité de matières retenue sur le filtre pendant le cycle.

e. Traitement des données

La mise en forme et le traitement statistique des données sont réalisés sous Excel 2010 (Microsoft) et à l'aide du logiciel XLSTAT Base v18.07 (Addinsoft). Les différences entre l'entrée et la sortie du filtre pour chaque paramètre et chaque configuration étudiée sont évaluées avec le test non paramétrique de Wilcoxon signé. Les différences entre les configurations sont évaluées avec le test non paramétrique de Kruskal-Wallis et les différences par paires sont testées par la procédure de Conover-Iman avec la correction de Bonferroni. Dans tous les cas, l'hypothèse nulle H0 est l'égalité entre les distributions et le seuil de significativité retenu est 0,05. L'exploitation graphique des données de pression est réalisée à l'aide du logiciel Regressi v3.93 (association Evariste).

3. Résultats

a. Performances épuratoires de la station d'épuration

La composition des eaux brutes et des eaux traitées de la station d'épuration est donnée dans le Tableau 7. L'effluent est caractéristique d'un effluent urbain, aucune industrie de taille significative n'étant raccordée au réseau d'assainissement. Aucune variabilité saisonnière n'a été mise en évidence sur la période considérée. Le rapport DCO/DBO₅ égal à 3 indique une biodégradabilité de l'effluent bonne à moyenne. Concernant les indicateurs microbiologiques, la variabilité saisonnière est également faible, excepté pour les paramètres *Cryptosporidium* et *Giardia*. Sur les cinq prélèvements effectués, celui de mai 2015 présente la contamination la plus élevée en *Giardia* avec 522 oocystes par litre.

Tableau 7 : Composition moyenne des eaux brutes et des eaux traitées de la station d'épuration étudiée

Paramètre	Unité	Entrée STEP		Sortie STEP		Abattement moyen*
		Moyenne	Ecart-type	Moyenne	Ecart-type	
<i>Physico-chimie</i>						
DBO ₅	mg/L	298,2	119,6	2,5	5,0	99%
DCO	mg/L	775,2	215,9	21,3	18,1	97%
MES	mg/L	360,0	151,9	6,7	11,8	98%
NGL	mg/L	67,5	17,1	5,8	3,7	91%
Pt	mg/L	7,0	1,5	0,9	0,9	87%
<i>Microbiologie</i>						
Coliformes	log UFC/100 mL	7,6	0,4	5,0	0,8	2,8 log
<i>E. coli</i>	log UFC/100 mL	7,3	0,5	4,3	0,7	2,9 log
Entérocoques	log UFC/100 mL	6,5	0,6	3,1	0,8	3,2 log
Bactériophages ARN-F spécifiques	PFP/mL	5420	1901	0	1	3,7 log
Spores BASR	log UFC/100 mL	5,0	0,4	3,8	0,7	2,3 log
Flore totale revivifiable à 36°C	log UFC/100 mL	8,2	0,1	5,2	0,9	3,0 log
Flore totale revivifiable à 22°C	log UFC/100 mL	8,0	0,3	5,5	0,9	2,6 log
<i>Cryptosporidium</i>	oocystes/L	1,6	2,0	0,2	0,2	/
<i>Giardia</i>	oocystes/L	167	201	2,9	3,0	/
Œufs d'helminthes	nombre/L	Absence (5 analyses)		Absence (5 analyses)		/

Le choix de travailler avec des effluents secondaires réels implique d'être tributaire des éventuelles variations de qualité de ces effluents. Cela a été observé sur la durée de l'étude, comme l'illustre l'évolution du paramètre MES (Figure 7). Les différentes configurations étudiées sont positionnées sur cette figure. Les configurations exploitées lors d'un fonctionnement en mode dégradé de la station d'épuration sont analysées séparément, comme indiqué dans le Tableau 6. Néanmoins une légère dégradation de qualité des effluents secondaires est tout de même à prendre en compte pour les configurations testées à partir du jour 125.

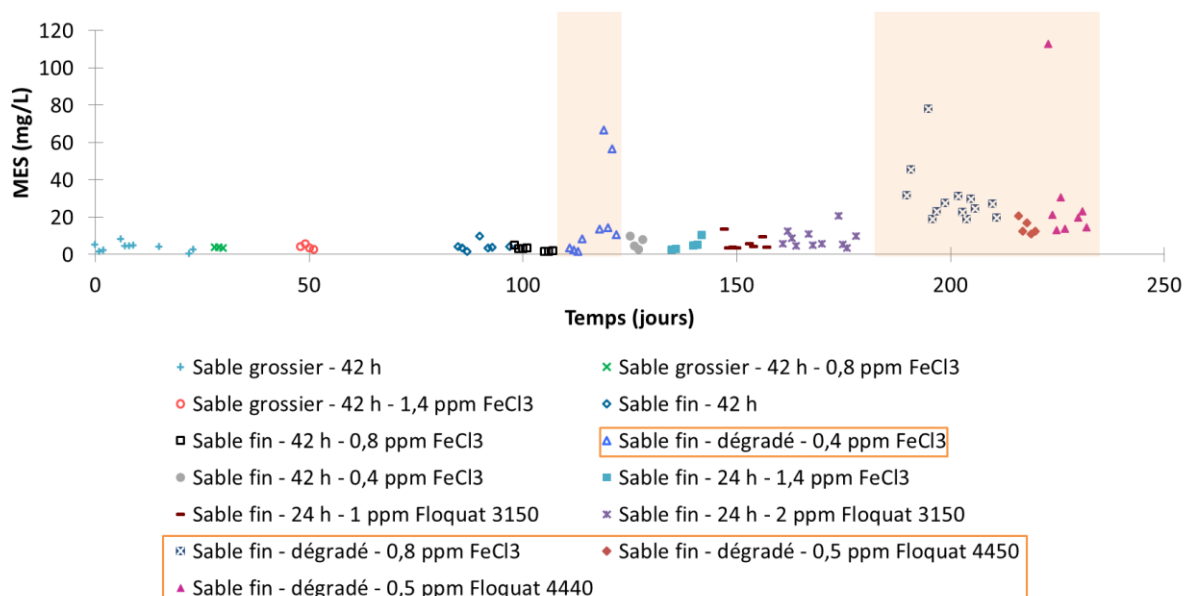


Figure 7 : Positionnement des configurations étudiées par rapport à l'évolution de la qualité de l'effluent secondaire (mesurée par les MES). Les configurations exploitées lors d'un fonctionnement en mode dégradé de la STEP sont indiquées en orange

b. Indicateurs physicochimiques

L'efficacité de la filtration en profondeur se mesure essentiellement par les paramètres turbidité, MES et transmittance UV en analysant à la fois le niveau de qualité atteint en sortie de filtration et l'abattement entre l'entrée et la sortie du filtre. Les résultats pour les configurations étudiées (hors fonctionnement dégradé) sont présentés dans la Figure 8. Pour toutes les configurations, la température moyenne de l'effluent secondaire est égale à $19,8 \pm 4,3$ °C et le pH moyen est égal à $7,6 \pm 0,2$. Concernant la turbidité, toutes les configurations permettent un abattement significatif pendant la filtration et les valeurs mesurées en sortie de filtre sont systématiquement inférieures à 3 NTU (Figure 8a). Les configurations avec le sable

grossier permettent un abattement de 80 % de la turbidité avec des valeurs en sortie de filtre inférieures à 0,5 NTU. Le changement pour un sable plus fin (TEN 0,99 mm) n'a pas d'impact significatif sur les performances du filtre, que ce soit au niveau de l'abattement ou de la valeur mesurée après filtration (comparaison par paires de Conover-Iman avec correction de Bonferroni, $p > 0,05$). L'augmentation de turbidité des effluents secondaires est répercutée sur les effluents filtrés, mais les abattements sont comparables (Figure 8a).

L'ajout de chlorure ferrique n'a pas d'impact significatif pour les configurations avec le sable grossier (TEN 1,4 mm) ni avec le sable fin, quelle que soit la dose mise en œuvre (0,4 à 1,4 ppm de produit actif). L'injection de coagulant organique FLOQUAT 31 n'a pas d'impact significatif sur les abattements entre l'entrée et la sortie du filtre pour le paramètre turbidité.

Concernant les matières en suspension (MES), la quasi-totalité des configurations permettent un abattement significatif pendant la filtration, avec un abattement par rapport à l'effluent secondaire compris entre 50 et 70 % et des valeurs comprises entre 1 et 4 mg/L pour les effluents filtrés (Figure 8b). Aucune différence significative n'est mise en évidence entre les configurations, que ce soit au niveau des abattements ou des teneurs en MES des effluents filtrés (test de Kruskal-Wallis, $p > 0,05$).

Concernant la transmittance UV à 254 nm, la quasi-totalité des configurations permettent un gain significatif de transmittance pendant la filtration, avec des valeurs supérieures à 70 % pour les effluents filtrés (Figure 8c). Le changement de granulométrie du sable n'a pas d'impact significatif sur la performance de la filtration pour ce paramètre. L'injection de chlorure ferrique à une dose de 1,4 ppm de produit actif permet d'améliorer significativement le gain de transmittance avec le sable grossier. Ce phénomène n'est pas observé avec le sable fin quelle que soit la dose mise en œuvre. Il faut toutefois noter une baisse de la transmittance de l'effluent secondaire dans la période pendant laquelle les configurations avec le sable fin ont été étudiées. L'injection du coagulant organique FLOQUAT 31 permet quant à elle une augmentation significative du gain de transmittance, de l'ordre de 5 points pour une dose de 1 ppm de produit actif (Figure 8c). Le doublement de cette dose permet de quasiment doubler ce gain. De plus, seule l'injection de ce coagulant de type polyamine permet d'améliorer significativement la transmittance UV après filtration à 0,45 μm (Figure 8d).

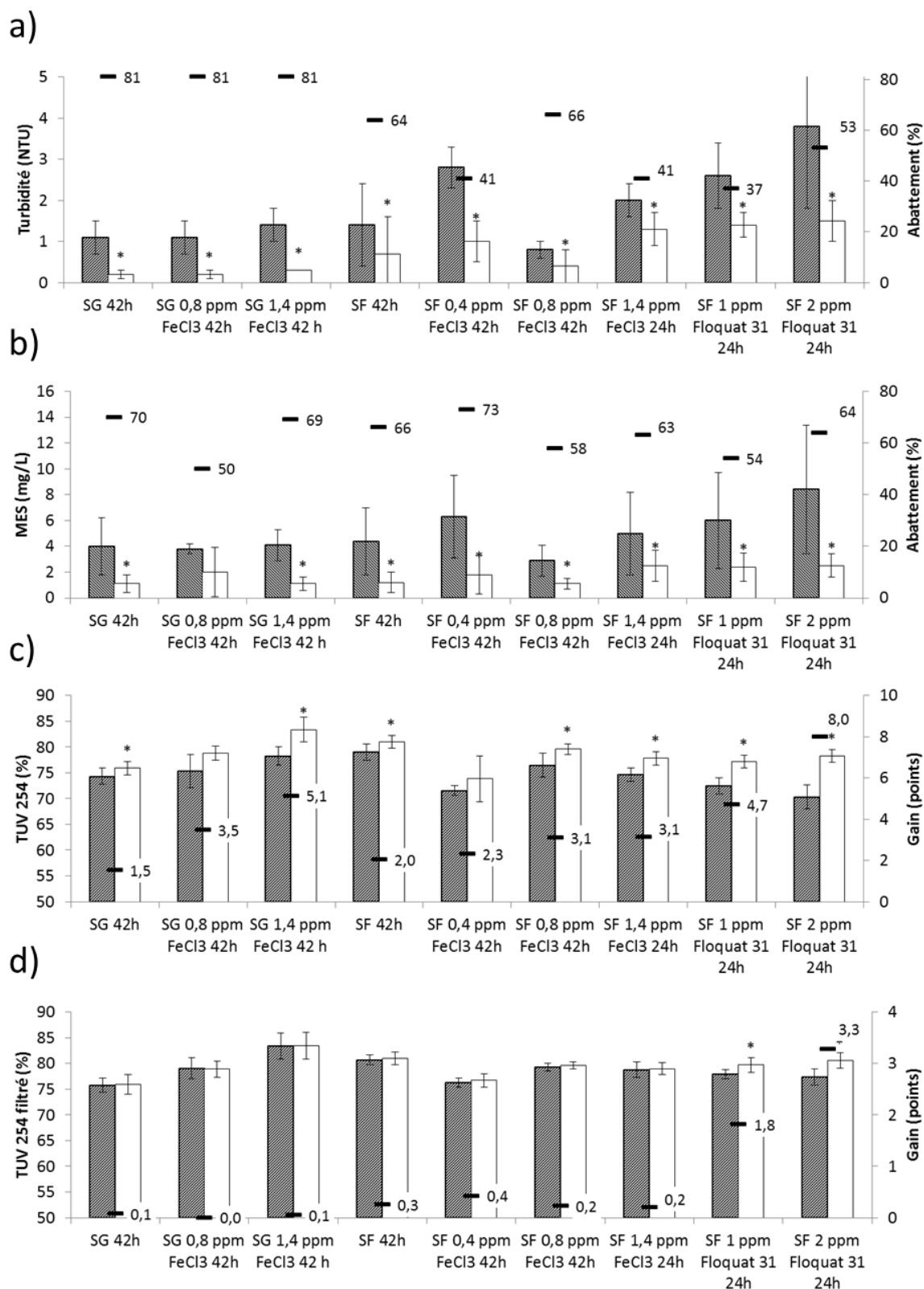


Figure 8 : Comparaison des valeurs moyennes mesurées en entrée (grisé) et en sortie (blanc) de filtration pour chaque configuration étudiée et pour les paramètres : turbidité (a), MES (b) et transmittance UV à 254 nm des effluents non filtrés (c) ou filtrés à 0,45 μm (d). Les barres représentent les écarts-types. Les valeurs et les traits correspondent aux abattements (ou gains) moyens. Les astérisques indiquent une différence significative entre l'entrée et la sortie du filtre pour chaque configuration (test de Wilcoxon signé, $p < 0,05$) (SG : sable grossier ; SF : sable fin)

Les résultats pour la quantité de particules de taille supérieure ou égale à 10 µm doivent être analysés avec précaution car un seul essai a pu être réalisé pour chaque configuration. Néanmoins, les tendances suivantes sont observées (Figure 9) :

- pas d'abattement des particules de cette taille pour les configurations avec le sable grossier seul ou avec l'injection d'une dose de 0,8 ppm de chlorure ferrique
- abattement important (supérieur à 70 %) pour les configurations avec le coagulant organique de type polyamine
- abattement variable (entre 20 et 60 %) pour les autres configurations

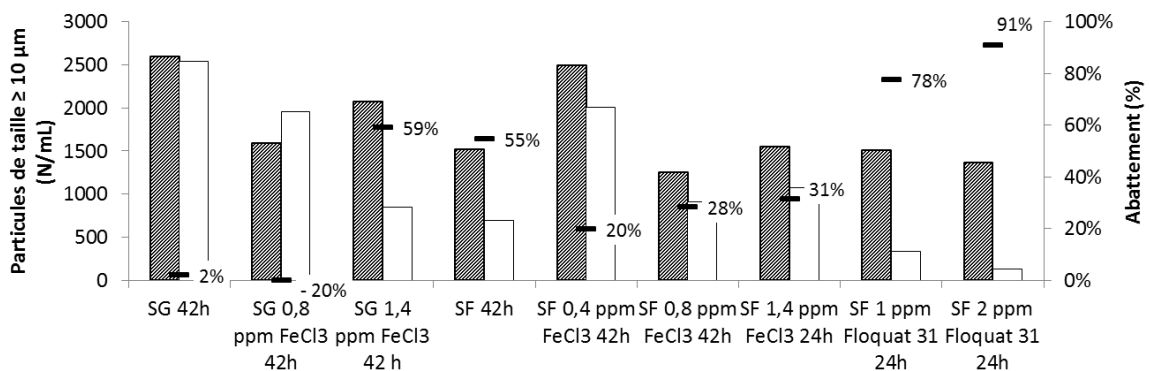


Figure 9 : Comparaison des quantités de particules de taille supérieure ou égale à 10 µm mesurées en entrée (grisé) et en sortie (blanc) de filtration pour chaque configuration étudiée. Les valeurs et les traits correspondent aux abattements moyens (SG : sable grossier ; SF : sable fin)

c. Indicateurs microbiologiques

Les résultats pour les trois indicateurs étudiés sont présentés dans la Figure 10. Seule la configuration avec le sable fin et l'injection du coagulant FLOQUAT 31 à une dose de 2 ppm permet un abattement significatif sur les trois indicateurs (test de Wilcoxon signé, $p < 0,05$) : 0,8 log pour *E. coli* ; 0,9 log pour les coliformes et 3,6 log en moyenne pour les entérocoques. Pour ce dernier indicateur, les concentrations mesurées en sortie de filtration sont inférieures ou égales à 10 NPP/100 mL pour les cinq mesures effectuées. En ce qui concerne les autres configurations, les abattements observés sont du même ordre de grandeur que l'incertitude sur la méthode de comptage : 0,2 à 0,6 log.

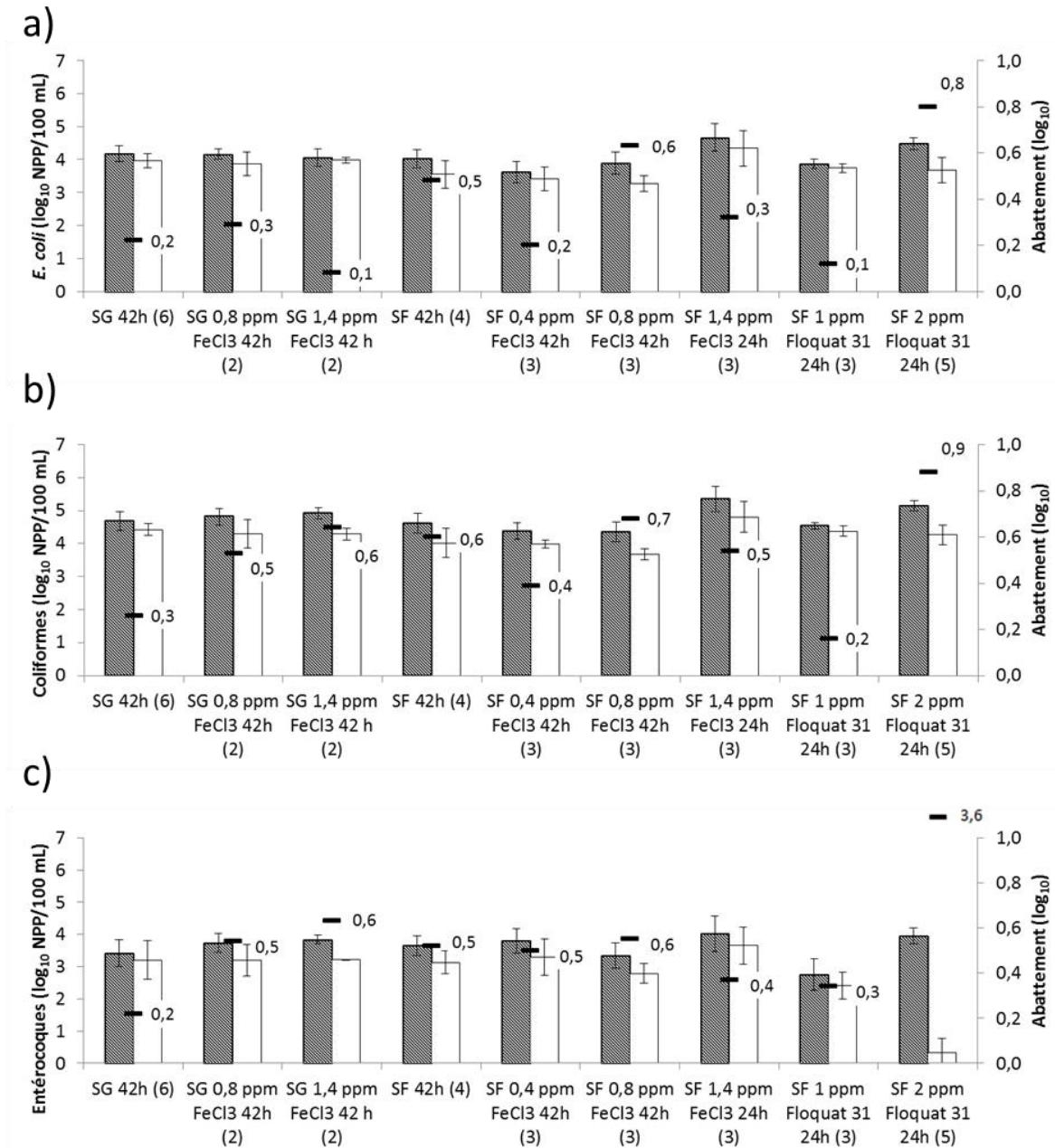


Figure 10 : Comparaison des concentrations moyennes mesurées en entrée (grisé) et en sortie (blanc) de filtration pour chaque configuration étudiée et pour les indicateurs *E. coli* (a), coliformes (b) et entérocoques (c). Les barres représentent les écarts-types. Les valeurs et les traits correspondent aux abattements moyens (SG : sable grossier ; SF : sable fin)

d. Performance opérationnelle

L'évaluation des performances du filtre à sable est effectuée par la vérification de l'efficacité des lavages et par la vitesse d'augmentation de ΔP (perte de charge entre l'entrée et la sortie du filtre) qui détermine la durée maximale de filtration. La phase de lavage est efficace si elle permet d'éliminer la quasi-totalité des matières retenues pendant la filtration. Un des moyens de vérifier cette efficacité est de suivre la turbidité des eaux de lavage pendant les phases de contre-lavage et de rejet des premières eaux (Tableau 4). Si le lavage est efficace, la turbidité décroît progressivement pour atteindre une valeur attendue en sortie de filtration. Un exemple de suivi est présenté en Figure 11. Globalement, le retour à une valeur attendue de turbidité est observé dès la fin de la phase de contre-lavage, et ce pour toutes les configurations étudiées.

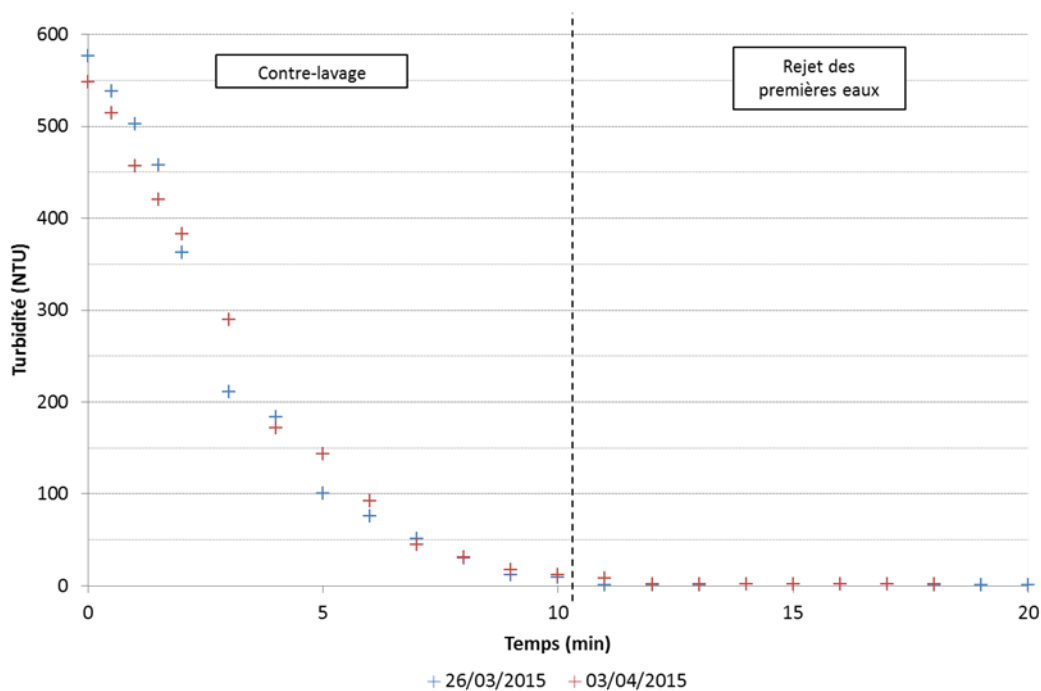


Figure 11 : Exemple de suivi de turbidité réalisé lors du lavage (pour la configuration « sable fin - 24h - 0,4 ppm FeCl_3 »)

L'efficacité du lavage peut également être évaluée en comparant la quantité de matière retenue pendant le cycle de filtration à la quantité de matière évacuée lors du lavage. Pour déterminer ces quantités, un échantillon représentatif de chaque phase est constitué par des prélèvements à une fréquence définie. Pour la filtration, cet échantillon est réalisé en entrée et en sortie du filtre. La différence permet d'estimer la quantité de MES retenues en g/m^3 d'eau traitée. Cette quantité est ramenée au volume

total filtré pendant le cycle, et divisée ensuite par la durée du cycle de filtration et par la surface du massif filtrant (1,05 m²). Pour les configurations avec le sable grossier, le prélèvement est réalisé en aval du point d'injection de coagulant (Tableau 6), la quantité de matière apportée par l'injection de coagulant est donc de fait prise en compte. Pour les configurations avec le sable fin, le prélèvement en entrée est situé en amont du point d'injection. La quantité de matière liée au coagulant et à ajouter au bilan est calculée en tenant compte de la densité de la solution commerciale, du facteur de dilution appliqué, et du débit d'injection défini (Tableau 8). Pour le lavage, la quantité de MES évacuée en g/m³ d'eau rejetée est estimée par un échantillonnage représentatif sur les eaux de rejet. Cette quantité est ramenée au volume total d'eau filtrée pendant le cycle et divisée par la durée du cycle de filtration et par la surface du massif filtrant pour pouvoir comparer les données. Ces mesures permettent de confirmer l'efficacité du lavage pour l'ensemble des configurations, avec une quantité de matières retenues proche de la quantité de matières évacuées (Tableau 8). Les bilans de matière détaillés pendant le lavage permettent de déterminer que la phase de décolmatage représente 40 % des matières évacuées, contre environ 60 % pour la phase de contre-lavage (tendance vérifiée pour toutes les configurations).

Tableau 8 : Comparaison des matières retenues pendant la filtration et évacuées lors du lavage pour les différentes configurations étudiées (SG : sable grossier ; SF : sable fin)

Configuration	Matières en suspension (g/h/m ²)			Ratio (E/R)
	Retenues (R)	dont coagulant	Évacuées (E)	
SG 42 h	12	0	18	1,5
SG 0,8 pm FeCl ₃ 42 h	32	20	32	1,0
SG 1,4 ppm FeCl ₃ 42 h	37	30	40	1,1
SF 42 h	25	0	16	0,7
SF 0,4 ppm FeCl ₃ 42 h	25	10	29	1,1
SF 0,8 ppm FeCl ₃ 42 h	41	20	38	0,9
SF 1,4 ppm FeCl ₃ 24 h	52	31	46	0,9
SF 1 ppm Floquat 31 24 h	43	20	49	1,1
SF 2 ppm Floquat 31 24 h	78	50	71	0,9

L'augmentation de la différence de pression entre l'entrée et la sortie du filtre permet d'évaluer le colmatage progressif au cours d'un cycle de filtration. Les capteurs de pression en ligne donnent l'évolution du paramètre ΔP en continu. L'exploitation graphique des courbes conduit à l'estimation de ΔP_0 (début du cycle de filtration) et de la vitesse d'augmentation de ΔP (Figure 12). La Figure 13 présente les vitesses d'augmentation de ΔP pour les différentes configurations étudiées. Les données n'ont pas pu être récupérées pour la configuration « sable grossier 1,4 ppm FeCl₃ 42 h ». Pour la plupart des configurations, l'augmentation de ΔP est proche de 5 mbar/h. Les

configurations avec le sable fin et 0,4 ppm de FeCl_3 ou 2 ppm de coagulant organique présentent une vitesse de colmatage plus importante.

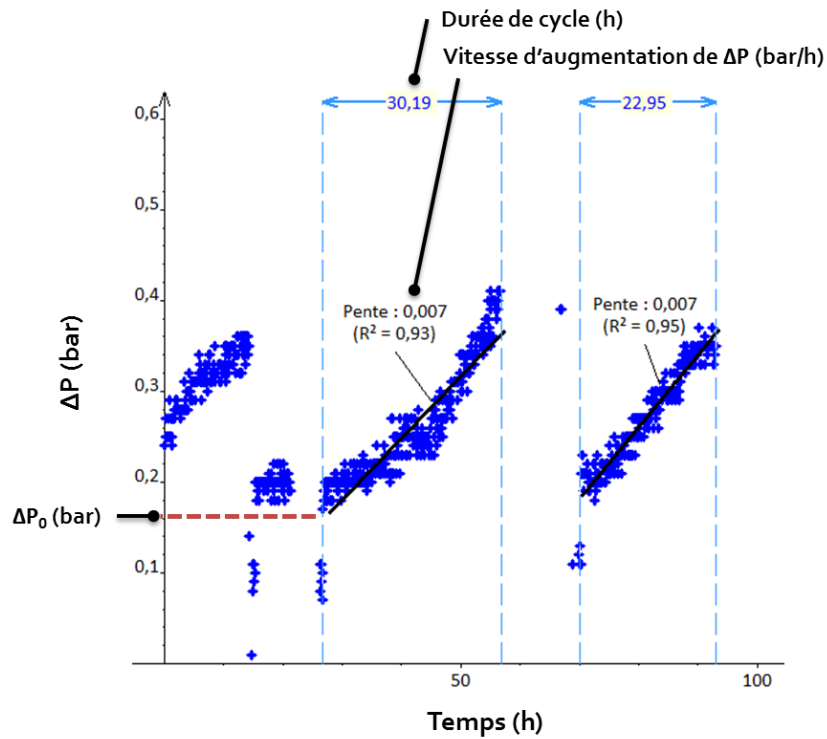


Figure 12 : Exemple d'exploitation des courbes de ΔP (perte de charge entre l'entrée et la sortie du filtre à sable)

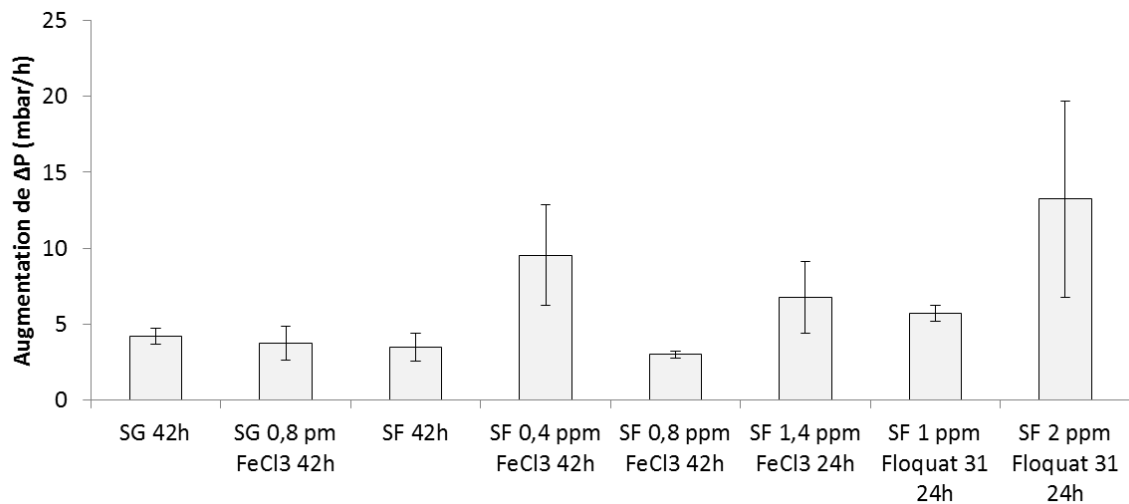


Figure 13 : Vitesses moyennes de colmatage (mesurées par l'augmentation des pertes de charge ΔP) pour les différentes configurations étudiées. Les barres représentent les écarts-types

Les différences observées entre les configurations peuvent être liées à des différences de qualité de l'effluent secondaire et/ou aux conditions opératoires. Une dégradation de qualité de l'effluent secondaire pendant la durée de l'étude a été mise en évidence. Une corrélation linéaire ($R^2 = 0,9$) peut être observée entre cette dégradation, mesurée par l'augmentation de turbidité, et l'augmentation de la vitesse moyenne de colmatage (Figure 14). La durée des cycles de filtration est directement liée à la vitesse de colmatage. En effet, elle est asservie à la consigne (24 ou 42 h) mais en premier lieu au dépassement du seuil critique de ΔP égal à 0,3 bar. La durée du cycle dépend donc aussi de la valeur de ΔP au début du cycle de filtration. L'augmentation de ΔP_0 au cours des cycles de filtration indique que le lavage ne permet pas d'évacuer la totalité des matières accumulées pendant la filtration. Ce phénomène n'a pas été observé pour l'ensemble des configurations étudiées et la perte de charge initiale est égale à $0,22 \pm 0,04$ bar en moyenne. La durée d'un cycle de filtration peut ainsi être prédite selon la formule :

$$\text{Durée de cycle} = \frac{\Delta P_c - \Delta P_0}{v} \quad (4)$$

Avec Durée de cycle en h

ΔP_c : seuil de perte de charge déclenchant le lavage (ici égal à 0,3 bar)

ΔP_0 : perte de charge mesurée au début du cycle de filtration (0,2 bar en moyenne)

v : vitesse de colmatage du filtre (bar/h)

Le colmatage est trop rapide si la durée du cycle est inférieure à la consigne. Globalement, une durée de filtration inférieure à 24 h est considérée comme non conforme par rapport aux objectifs de performance opérationnelle. En considérant la marge d'erreur du capteur de pression différentielle (20 %), cela correspond à une vitesse d'augmentation de ΔP supérieure à 6,7 mbar/h (Figure 14). Une dégradation de qualité ponctuelle de l'effluent à traiter peut conduire à diminuer ponctuellement la durée des cycles. Pour les cycles avec injection du coagulant de type polyamine FLOQUAT 31, la qualité des effluents secondaires est comparable (même si une grande variabilité est observée). Cependant, la totalité des cycles avec une dose de 1 ppm respecte la consigne de 24 h alors que la durée de la plupart des cycles avec une dose de 2 ppm est inférieure à 24 h (Figure 15).

La durée des cycles influence la fréquence de lavage, et donc les pertes en eau. Globalement, le rendement hydraulique observé est proche du rendement attendu pour toutes les configurations étudiées (Tableau 9).

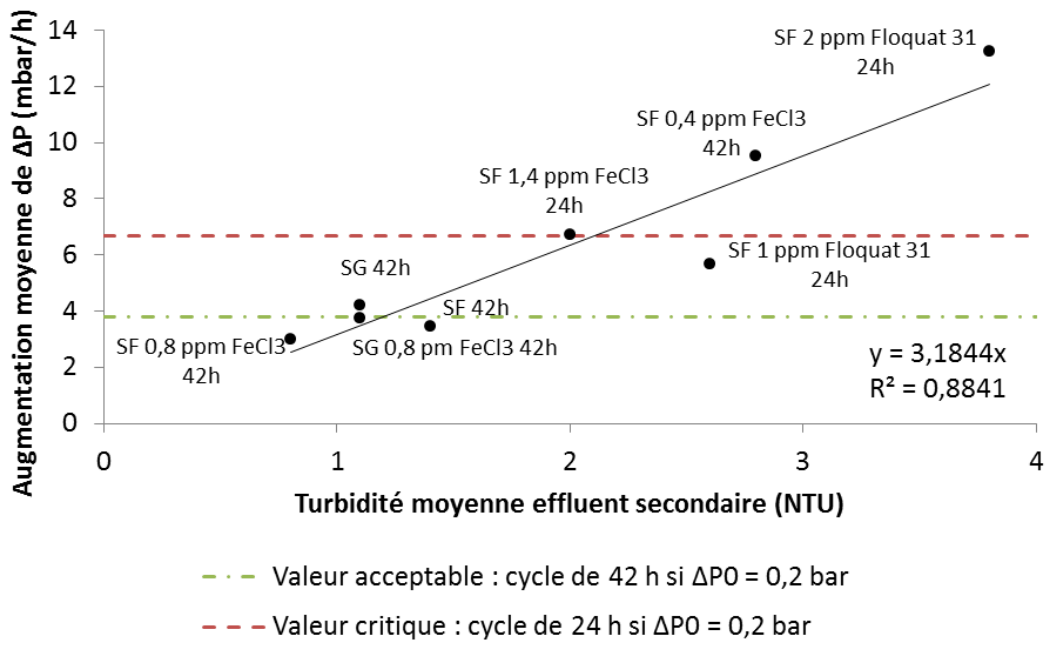


Figure 14 : Corrélation entre l'augmentation moyenne de ΔP et la turbidité moyenne de l'effluent secondaire pour les effluents étudiés

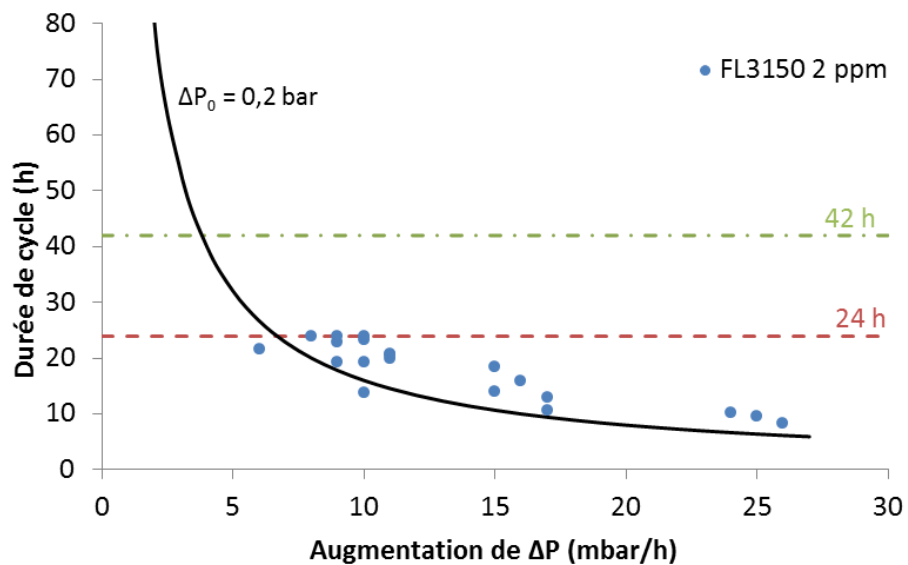


Figure 15 : Comparaison entre la durée du cycle de filtration et l'augmentation de ΔP pour la configuration « sable fin 2 ppm Floquat 31 24 h ». Le trait noir correspond à la durée de cycle calculée en fonction de l'augmentation de ΔP pour $\Delta P_0 = 0,2$ bar et $\Delta P_c = 0,3$ bar \pm 20 %

Tableau 9 : Rendements hydrauliques observés et attendus pour les configurations étudiées (SG : sable grossier ; SF : sable fin)

Configuration	Rendement hydraulique (%)	
	Observé	Attendu
SG 42 h	98,7	
SG 0,8 ppm FeCl ₃ 42 h	98,9	
SG 1,4 ppm FeCl ₃ 42 h	98,5	98,4
SF 42 h	98,6	
SF 0,4 ppm FeCl ₃ 42 h	97,7	
SF 0,8 ppm FeCl ₃ 42 h	98,2	
SF 1,4 ppm FeCl ₃ 24 h	97,1	
SF 1 ppm Floquat 31 24 h	97,0	97,1
SF 2 ppm Floquat 31 24 h	96,5	

e. Performances avec un effluent secondaire de qualité dégradée

Deux dysfonctionnements ponctuels sur la station d'épuration ont conduit à une dégradation de la qualité de l'effluent secondaire. Le premier dysfonctionnement a été une panne du système d'aération du bassin de boues activées. La durée de cette panne a été de trente heures environ. Cela a conduit à une perturbation importante du traitement, qui s'est traduite par une augmentation de la teneur en azote global et en ammonium de l'effluent secondaire à cause de l'absence de nitrification-dénitrification, ainsi qu'une augmentation de la teneur en phosphate. Globalement, la pollution carbonée était également moins bien traitée, ce qui s'est traduit par une augmentation de la DCO et de la teneur en MES, et une baisse de la transmittance UV à 254 nm (Figure 16). Après résolution du problème, le retour à la normale a été assez rapide.

La configuration de la filtration tertiaire en fonctionnement pendant cette panne était une filtration avec le sable fin et injection de chlorure ferrique à une dose de 0,4 ppm de produit actif. La dégradation soudaine de la qualité de l'effluent secondaire a été absorbée par le système de filtration. Le seuil de qualité A a été globalement respecté, même si un des prélèvements se trouve légèrement au-dessous de ce seuil de 15 mg/L de MES (en tenant compte de l'incertitude sur la mesure). Cependant, tous les indicateurs mettent en évidence un dysfonctionnement. Ainsi, la turbidité a augmenté jusqu'à 30 NTU sur l'effluent secondaire contre seulement 10 NTU sur l'effluent filtré ; et la transmittance UV a baissé jusqu'à 20 % sur l'effluent secondaire contre seulement 45 % sur l'effluent filtré (Figure 16). L'indicateur le plus caractéristique de la dégradation de l'effluent secondaire a été la durée des cycles de filtration, raccourcie jusqu'à 8 h pendant la période de dysfonctionnement au lieu de la consigne fixée à 42 h.

Le deuxième dysfonctionnement rencontré a été une interruption de l'extraction des boues au niveau du clarificateur pendant trois semaines environ. Cela a conduit à augmenter la recirculation des boues vers le bassin de boues activées et donc à augmenter le taux de matière sèche (MS) dans ce bassin. En temps normal, des valeurs entre 3 et 5 g/L de MS sont préconisées. Suite à cet incident, des valeurs jusqu'à 10 g/L de MS ont été observées. Pour maintenir l'efficacité du traitement avec cette charge, il a fallu augmenter l'aération, ce qui a de fait augmenté la consommation électrique : le temps de fonctionnement des surpresseurs a été multiplié par quatre entre mars et avril. Au niveau du clarificateur, des phénomènes de fermentation spontanée se sont produits, ce qui a augmenté la quantité de flottants et provoqué des départs de boues vers le rejet. Après l'interruption de l'extraction, une augmentation progressive des paramètres MES et DCO a été observée, traduisant l'augmentation de charge de la station (Figure 17). La reprise des extractions a permis un retour à des valeurs acceptables, mais la charge est restée élevée. Des pics de MES et de turbidité ont également été observés. Le paramètre azote total a été peu affecté par cet incident du fait de l'augmentation d'aération mise en place pour compenser la montée en charge. Le traitement du phosphore a quant à lui été perturbé avec plusieurs dépassements de la valeur seuil, même si les rendements d'épuration minimums fixés par l'arrêté ont été respectés. Contrairement au problème précédent, le retour à la normale a été beaucoup plus long après la reprise des extractions (Figure 17). En effet, la capacité journalière maximale d'extraction est dépendante de la capacité maximale de la filière de traitement et de valorisation des boues (épandage par exemple). Une solution pourrait être d'augmenter la capacité d'extraction de façon ponctuelle par des unités mobiles de traitement.

Trois configurations étaient étudiées pour la filtration pendant la durée du dysfonctionnement. Dans les trois configurations, le sable fin était utilisé et la consigne de durée de cycle était de 24 h. Trois types de coagulants étaient testés : le chlorure ferrique à une dose de 2 ppm, et deux coagulants organiques de type polyDADMAC : Floquat 50 et Floquat 40. La capacité du filtre à sable à maintenir un niveau de performance compatible avec la réutilisation a été vérifiée, quelle que soit la configuration, avec 90% des valeurs de turbidité inférieures à 5 NTU et 90 % des valeurs de transmittance UV supérieures à 70 % pour les effluents filtrés (Figure 17). Aucun dépassement du seuil de qualité visé pour la réutilisation (15 mg/L) n'a été observé pour les MES, malgré des valeurs mesurées sur l'effluent secondaire pouvant dépasser 80 mg/L (Figure 17). Les performances des trois configurations étudiées étaient comparables face à ces variations importantes de qualité de l'effluent secondaire. Dans tous les cas, la durée des cycles de filtration n'a pas dépassé 10 h avant déclenchement du lavage lié au dépassement du seuil critique de pression différentielle.

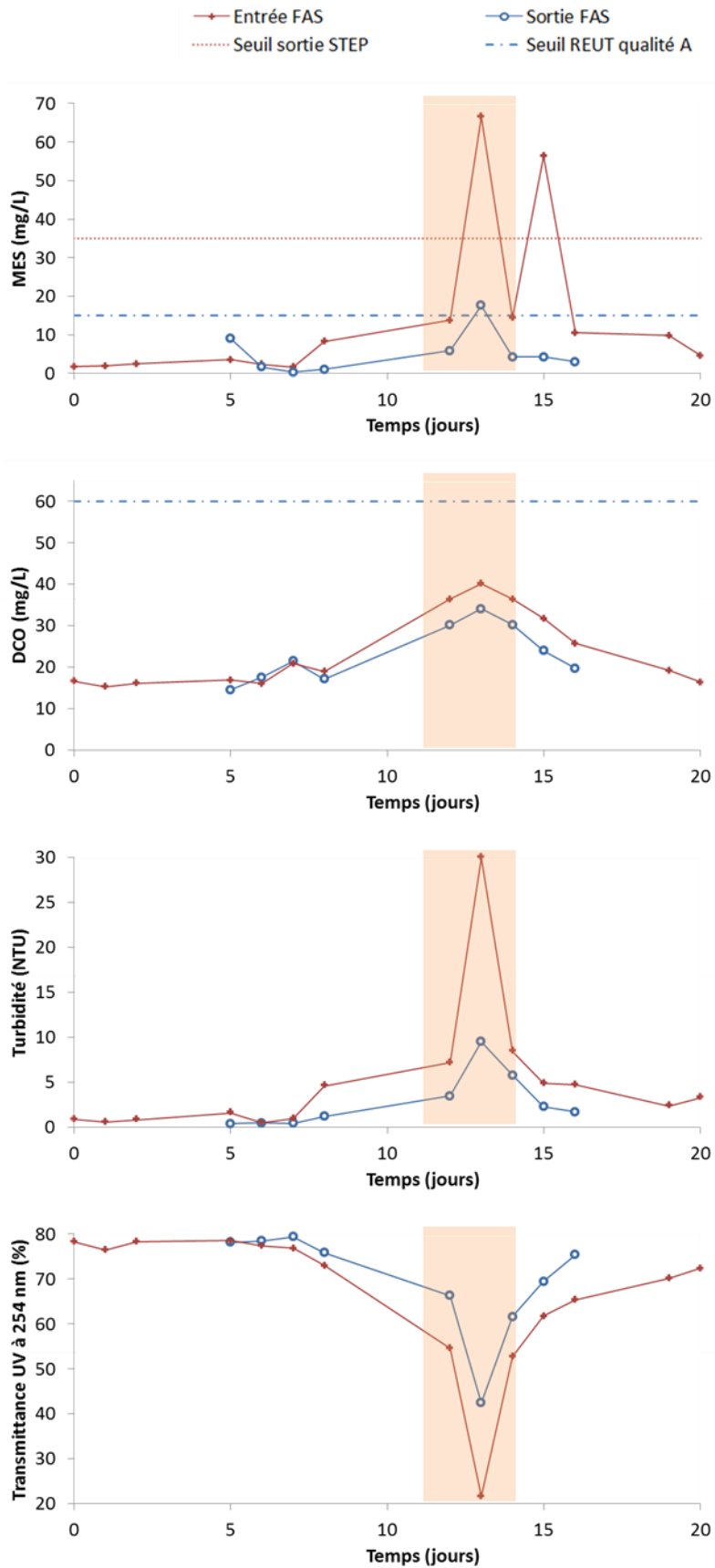


Figure 16 : Évolution de la qualité de l'effluent secondaire et de l'effluent filtré pendant le dysfonctionnement lié à une panne d'aération sur le bassin de boues activées (la durée de la panne est indiquée en orange). La configuration mise en œuvre sur le filtre est : « sable fin 0,4 ppm FeCl₃ 42 h »

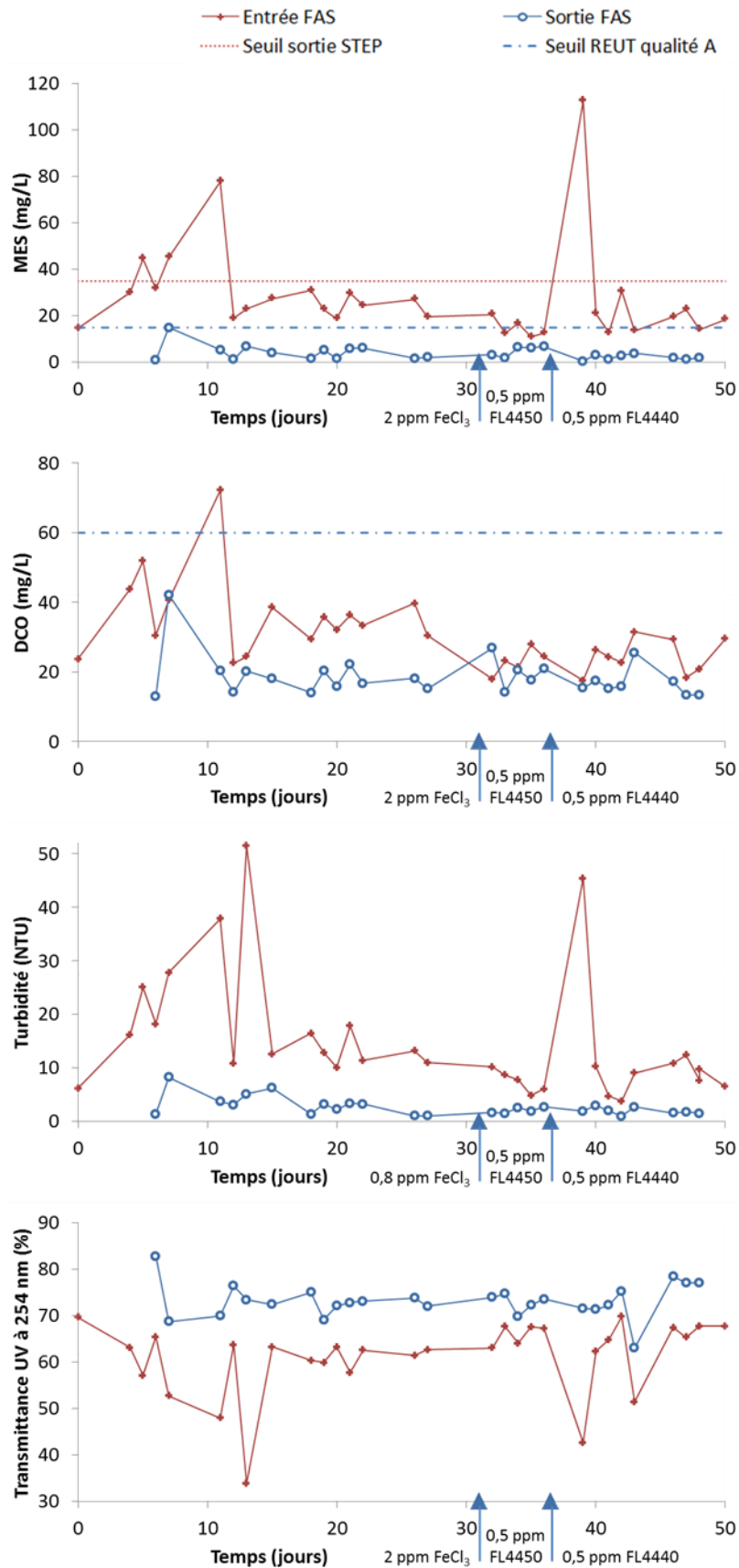


Figure 17 : Évolution de la qualité de l'effluent secondaire et de l'effluent filtré pendant le dysfonctionnement lié à une interruption de l'extraction des boues au niveau du clarificateur. Les configurations mises en œuvre sur le filtre sont indiquées sous chaque graphe

4. Discussion

Les performances du traitement secondaire de la station d'épuration sont conformes aux exigences réglementaires pour l'ensemble des indicateurs physico-chimiques. Ces exigences ne prennent pas en compte les indicateurs microbiologiques. Cependant, les performances de la station au regard de ces indicateurs sont conformes aux données de la littérature relatives au traitement secondaire par boues activées (ANSES, 2012) : 1 à 3 log d'abattement pour les bactéries et virus. La STEP permet une élimination quasi-totale des phages, pour des valeurs allant jusqu'à 8000 PFP/mL en eau brute. En ce qui concerne les parasites, *Cryptosporidium* est faiblement présent en sortie de STEP. *Giardia* est présent à un niveau un peu plus important. La variabilité saisonnière observée pour ce paramètre pourrait s'expliquer par le fait que la présence de ce type de parasite est liée aux élevages bovins et ovins, qui sont plutôt confinés en hiver et en pâturage extensif au printemps. Les données de la littérature indiquent que ces protozoaires sont bien éliminés par les procédés de filtration (ANSES, 2012; De Lima Isaac et al., 2014).

Les configurations de filtration tertiaire étudiées permettent de réduire la pollution particulaire de l'effluent secondaire. Toutes les configurations testées permettent d'obtenir un effluent peu chargé en particules si la station d'épuration fonctionne normalement : turbidité inférieure à 3 NTU, teneur en MES inférieure à 4 mg/L et transmittance UV supérieure à 70 %. Gómez et al. (2007) ont utilisé une configuration proche de celles testées dans cette étude : filtre sous pression, vitesse de 5 m/h, sable de TEN 0,8 mm. Ils ont obtenu des effluents filtrés avec des valeurs de turbidité très faibles (inférieures à 0,5 NTU) et des teneurs en MES inférieures à 10 mg/L. Ces résultats sont comparables à ceux obtenus dans cette étude. Cependant, ils ont observé une forte variabilité sur les valeurs de transmittance UV, comprises entre 37 et 76 %. Dans notre étude, cette variabilité n'a pas été observée. Les auteurs ne donnent pas d'explication, ni de précision sur la nature de l'effluent secondaire utilisé. On peut faire l'hypothèse que des rejets ponctuels de composés absorbant dans l'UV, peut-être liés à des rejets industriels (phénols par exemple), provoquent ces baisses ponctuelles de transmittance.

La comparaison des configurations étudiées est compliquée par l'évolution de la qualité de l'effluent secondaire pendant la durée de l'étude. Ainsi, le changement de granulométrie du sable n'a pas eu d'impact significatif sur les performances de la filtration, même si une légère amélioration a pu être observée. De plus ce changement est concomitant d'une dégradation de la qualité de l'effluent secondaire, la relation entre performance de la filtration et granulométrie du sable n'a donc pas pu être isolée

dans l'analyse. Un sable de granulométrie plus faible retient généralement plus de matière, pour une durée de filtration équivalente (Asano et al., 2007).

L'ajout de chlorure ferrique dans les conditions mises en œuvre dans cette étude n'a globalement pas eu d'impact significatif sur les performances de la filtration. Seule une dose de 1,4 ppm a permis d'améliorer la transmittance UV de l'effluent filtré pour les configurations avec le sable grossier. L'injection de chlorure ferrique permet de former des floes de plus grande densité qui occupent moins d'espace dans les pores de grande taille. Dans le cas du sable fin, le phénomène serait moins marqué, d'où l'absence d'impact de la coagulation (Boller & Kavanaugh, 1995). Dans les autres configurations présentées dans la littérature pour la REUT, une étape de sédimentation est ajoutée entre la coagulation et la filtration. Cela implique un dosage beaucoup plus important en coagulant. Illueca-Muñoz et al. (2008) présentent le traitement d'un effluent secondaire par une étape de coagulation au chlorure ferrique (dose de 60 ppm), suivie par des étapes de floculation et sédimentation avant filtration sur 1 m de média filtrant constitué de sable TEN 1 mm. Ils obtiennent des valeurs moyennes pour les effluents filtrés de 2 mg/L MES et de 2,5 NTU de turbidité, contre 5 mg/L MES et 7 NTU de turbidité sans les étapes de coagulation / floculation / sédimentation. Les valeurs obtenues avec les configurations mises en œuvre dans la présente étude sont comparables aux valeurs obtenues par Illueca-Muñoz et al. (2008) avec coagulation.

L'ajout d'un coagulant organique de type polyamine a un impact significatif sur la transmittance UV pour une dose supérieure ou égale à 1 ppm de produit actif. Le gain de transmittance global correspond au gain de transmittance sur les échantillons filtrés à 0,45 μm . Cela signifie que les doses mises en œuvre pour ce coagulant permettent la coagulation et la rétention des colloïdes sur le filtre, contrairement à toutes les autres configurations testées. Il aurait été probablement possible d'obtenir un résultat similaire avec le chlorure ferrique en testant des doses plus élevées, entre 2 et 10 ppm (Mouchet, 2000). L'utilisation du polymère cationique FLOQUAT 31 à une dose élevée (2 ppm) permet aussi un abattement significatif des microorganismes. Les entérocoques, de par leur taille et leur métabolisme ont naturellement tendance à se regrouper (voir 2^{ème} partie). Le polymère permet d'augmenter suffisamment la taille de ces floes pour qu'ils soient piégés dans le massif filtrant, ce qui conduit à un abattement important pour cet indicateur. La grande ramification du coagulant organique et la dose utilisée permettent ce phénomène, qui n'est pas observé lors de la mise en œuvre d'un coagulant inorganique, même à une dose élevée (De Lima Isaac et al., 2014).

Malgré ces avantages indéniables, l'emploi du coagulant organique semble également diminuer la performance opérationnelle de la filtration, surtout dans le cas

de l'application de la dose 2 ppm. Pour cette dose élevée, la vitesse d'augmentation des pertes de charge dans le filtre est plus importante que pour les autres configurations, ce qui diminue le temps de filtration avant d'atteindre le seuil critique de pression différentielle. Ce phénomène doit être confirmé car il coïncide avec une dégradation de qualité de l'effluent secondaire dans notre étude, ce qui explique également l'augmentation de la vitesse de colmatage. Néanmoins, le risque d'augmentation des pertes de charge pour des doses supérieures à 0,3 ppm est décrit dans la littérature pour la même famille de coagulants (Boller & Kavanaugh, 1995).

Les performances opérationnelles du filtre à sable sont très dépendantes de la qualité de l'effluent secondaire. Ainsi, une augmentation de la turbidité de 1 à 4 NTU provoque une accélération de la vitesse de colmatage et donc une diminution de la durée du cycle de filtration. L'ajout du coagulant organique à une dose de 1 ppm semble limiter cette accélération par un meilleur contrôle du colmatage. Il serait intéressant de tester si des doses de chlorure ferrique plus élevées que celles mises en œuvre dans cette étude peuvent conduire au même résultat. D'un point de vue économique, le remplacement d'un coagulant inorganique par un coagulant organique est intéressant si la dose utilisée est au moins vingt fois moins importante pour le même résultat, car c'est le rapport de coût entre ces deux types de coagulant (Baudin et al., 2005).

La maîtrise du traitement secondaire est une condition *sine qua non* de la maîtrise de la filtration et donc de la désinfection en aval en vue de la réutilisation. La transmittance UV de l'effluent secondaire est un paramètre intéressant d'aide à la décision, et peut permettre de proposer des recommandations suite au retour d'expérience de cette étude. Si la transmittance UV de l'effluent secondaire est supérieure à 70 %, les configurations mises en œuvre sans coagulant permettent un affinage de l'effluent secondaire qui garantit l'efficacité de la désinfection UV pour les indicateurs étudiés (pas d'effet de traîne). Pour des valeurs de transmittance UV entre 60 et 70 %, la qualité de l'effluent filtré est maintenue. L'injection de coagulant pourrait améliorer la filtration, même si les doses appliquées doivent être mieux définies. Si la transmittance de l'effluent secondaire est inférieure à 60 %, il y a un risque élevé d'augmentation de la fréquence des cycles de lavage par rapport à la consigne fixée. De façon générale, si la dégradation de la qualité de l'effluent secondaire est trop importante (et notamment en cas de dépassement des concentrations maximales de rejet définies pour la STEP), le traitement tertiaire en vue de la réutilisation doit être interrompu.

La connaissance en temps réel de la qualité de l'effluent secondaire et de l'effluent filtré est donc un enjeu important pour maîtriser la qualité biologique de l'eau

distribuée. Les indicateurs couramment utilisés pour estimer cette qualité nécessitent pour la plupart de mettre en place des protocoles analytiques relativement complexes, ce qui limite la fréquence des analyses envisageable sans compromettre la viabilité économique de la filière. Le potentiel de méthodes alternatives faciles à mettre en œuvre et peu coûteuses pour estimer ces indicateurs est donc intéressant à explorer.

III. Estimation of water quality by UV/Vis spectrometry in the framework of treated wastewater reuse¹

Résumé

L'objectif de cette étude est d'évaluer le potentiel de la spectrométrie UV/Visible en tant que méthode complémentaire pour le suivi d'une filière de production d'EUT. La robustesse des modèles et leur applicabilité en fonction de leur sensibilité sont testées. Les indicateurs suivants sont étudiés : matières en suspension (MES), turbidité, demande chimique en oxygène (DCO) et nitrates. La régression partielle par les moindres carrés (PLSR) est utilisée pour trouver des corrélations linéaires entre les absorbances et les indicateurs sélectionnés. Des échantillons artificiels sont réalisés en simulant une fuite de boue en sortie du traitement secondaire et sont ajoutés au jeu de données, qui ensuite divisé en deux ensembles pour la calibration et pour la validation des modèles. Les modèles les plus robustes sont obtenus avec la PLSR pour la DCO ($R^2_{\text{pred}} = 0.80$), les MES ($R^2_{\text{pred}} = 0.86$) et la turbidité ($R^2_{\text{pred}} = 0.96$) ; et avec une simple régression linéaire à partir de l'absorbance à 208 nm pour la concentration en nitrates ($R^2_{\text{pred}} = 0.95$). L'ajout d'échantillons artificiels permet une amélioration significative des modèles. La sensibilité du système de surveillance par spectrométrie UV/Visible est compatible avec les exigences de qualité pour la REUT.

1. Introduction

Wastewater reuse is defined by European Commission as “the beneficial use of an appropriate quality of treated wastewater”. Thus the quality needed can differ according to the intended use of treated water: agriculture, urban (e.g. road cleaning), industrial, environmental (e.g. wetland preservation) or even direct use as potable water (Wintgens & Hochstrat, 2006).

¹NOTE : Cette partie est présentée sous forme d'un article publié dans *Water Science and Technology* (voir liste des publications). Les informations redondantes avec celles présentées dans les précédentes parties du présent manuscrit ont été supprimées. Un résumé en français est également proposé.

This issue is particularly of key importance in arid regions, where reclaimed water could be a reliable and ongoing resource. Importance and quality of the monitoring system should be adapted to the sanitary issues of intended use whilst minimising the cost for the user. Since the use of the provided water may have a direct impact on human health, a continuous monitoring of the production process reliability is crucial. The main indicator recommended is *Escherichia coli* and other pathogens, faecal indicator bacteria or pathogen surrogates, but the monitoring frequency is limited due to practical and economic constraints (ISO, 2015a). Monitoring of important physicochemical indicators such as TSS or COD is also limited to one or two measure per day, which can lead to the non-detection of short-period anomalies. In this context, ultraviolet/visible (UV/Vis) spectrometry could be a simple, fast, and relevant alternative technique to estimate these physicochemical indicators (Jung et al., 2014; Sánchez Rojas & Bosch Ojeda, 2009; Thomas & Burgess, 2007). The data may be use both to provide continuous information to the operator and to adjust in real time the production process.

The selection of indicators for treated wastewater quality in the framework of reuse varies by country. Concerning microbiological indicators, the most common are faecal and total coliform, and may also include *Escherichia coli*, faecal enterococci and helminth eggs. Concerning physicochemical indicators, the most common are pH, turbidity, TSS, biological and chemical oxygen demand (BOD and COD) (Sanz & Gawlik, 2014). In France the regulation defines four quality levels of treated wastewater depending on the intended use. The indicators chosen to define these levels are COD, TSS, *E. coli*, faecal enterococci, sulphate-reducing bacteria and RNA F-specific bacteriophages (JORF, 2014).

UV-Vis spectrometry has been successfully tested for urban and industrial wastewater to estimate parameters such as TSS, BOD, COD, total organic carbon, or nitrate (Jeong et al., 2007; Karlsson et al., 1995; Langergraber et al., 2004; Lepot et al., 2016; Platikanov et al., 2014; Qin et al., 2012; Salgado Brito et al., 2014). These effluents are usually characterised by high particulate and organic pollution (TSS above 50 mg/L, turbidity above 20 NTU and COD above 100 mg O₂/L). Concentration range for nitrate is mostly between 2-16 mg N-NO₃/L. Reclaimed water can be distinguished from these effluents by a lower amount of particulate and organic pollution. Indeed, effluent quality limits are generally between 10 and 35 mg/L for TSS, between 60 and 100 mg O₂/L for COD, and between 0.2 and 10 NTU for turbidity, depending on country and intended use (JORF, 2014; Sanz & Gawlik, 2014; State of California, 2001). Nitrate concentration is in the same range in reclaimed wastewater as in the effluents previously described. The work of Rieger et al. (2004) falls into our range of concentration of interest. However this study was conducted with a limited

number of samples (44 for TSS and 12 for COD). Because of this low amount of samples, the validation step of the calibration procedure was not included. Moreover, the procedure for selection of wavelengths used for the calibration is not clearly described. Similar problem has been highlighted for as for most publications about UV/Vis spectrophotometry models (Lepot et al., 2016).

The aim of this study was to investigate the potential of UV/Vis spectrometry as a complementary method for routine monitoring of wastewater treatment processes for reuse. Robustness of the models and compliance of their sensitivity with current quality limits were investigated. For this work, the selected indicators of reclaimed water quality were: TSS, turbidity, COD and nitrate. Among the physicochemical water quality indicators, only those detectable by UV/Vis spectrometry without pre-treatment were selected. Nitrite was not included in the models as it was present in a very low concentration in the effluents considered. UV/Vis spectrometry can also be used for particle characterization and thus as an indirect estimator of microbial contamination (Jung et al., 2014). In karst water resources, good correlations were found between pathogen contamination and spectral absorption coefficient (SAC) at 254 nm (Stadler et al., 2010). The SAC₂₅₄ was used to detect the presence of humic substances which indicate a possible contamination by surface water. However, in a complex matrix such as reclaimed water, pathogens can either be dispersed in suspension or attached to the particles and/or among themselves. Thus direct correlation between pathogen contamination and UV/Vis spectra has not been found to date, even if coupling with other techniques as granulometry seems promising (Jung et al., 2014). BOD was not selected either, because of the complexity of the standard method which limits the number of measurements. In the following sections, experimental procedure for data acquisition and the different methods used for spectra exploitation are explained. Then, results of the models obtained are discussed and their applicability for monitoring reclaimed water production processes is considered.

2. Methods

a. Experimental platform and data acquisition

An experimental platform was set up in a wastewater treatment plant (WWTP) in the South of France. This WWTP is based on a conventional biological process scheme and treats mainly domestic discharges. Preliminary treatment consists of grids and removal of grease and sand. Secondary treatment is performed by activated sludge, with advanced treatment of nitrogen (nitrification, denitrification) and phosphorus (chemical precipitation) removal. The experimental tertiary treatment process consists

of industrial pilots of sand filtration followed by UV disinfection. Almost 10% of the secondary effluent volume was treated. In this study, we focused on effluents at the inlet of the tertiary treatment (“secondary effluent”) and at the outlet of the deep bed sand filter (“filtered effluent”) (Figure 18).

Some precautions should be taken during the sampling campaign for the calibration procedure. First of all, changes of the influent composition should be investigated on a large representative period. In this study, data from the routine monitoring of the WWTP during a three-year period were studied. No significant change over time and no significant seasonal change were noted, except short time events such as heavy rainfalls. Hence, sample collection for the calibration should include the largest possible range of variability, in our case the campaign spanned from October 2014 to May 2015. Another approach to enlarge the range of variability of the samples was to simulate artificial events by loading secondary effluent samples with different volumes of mixed liquor from the aeration tank of the WWTP (Figure 18). This liquor had a total suspended solids content of 3.6 g/L with a standard deviation of 0.2 g/L (measured in triplicate). Ten samples were made, with a volume of sludge ranging from 0 to 1.6 % of the sample volume. Composition of these samples ranged from 3.6 to 71.4 mg/L TSS, from 2.8 to 55.8 NTU, and from 12.1 to 71.4 mg O₂/L COD. These values were assumed to be representative of anomalies previously observed on the WWTP.

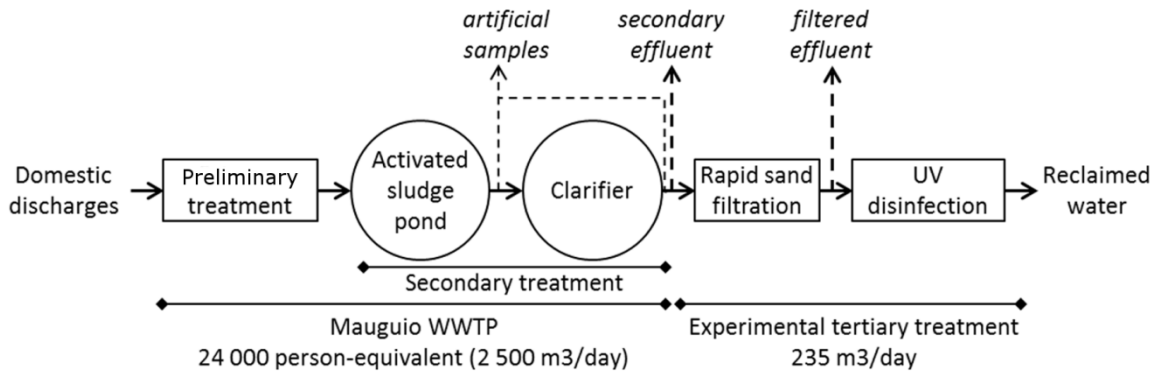


Figure 18 : Schematic description of the effluents used in this study. Dotted arrows indicate sampling points

For UV spectra acquisition, the UV/Vis spectrometer used was a DR6000 of Hach Lange (Germany) of 1 nm bandwidth (speed of 900 nm/min), with a quartz cell of 10 mm pathlength. The chosen scanning range was 200 – 400 nm (Thomas & Burgess, 2007). Samples were two-fold diluted before analysis. Aberrant data were not taken in account. The raw dataset was divided into two sets: calibration set and prediction set. The models were built on the calibration set, and then tested on the prediction set.

Samples were randomly allocated (random sampling without replacement) between each set.

b. Spectra exploitation with Partial Least Squares Regression (PLSR)

In order to find a correlation between an indicator value (dependant variable) and absorbances in the studied range of wavelengths (partially dependent variables or predictors), multiple linear regression presents two major drawbacks: 1) the number of samples to build the model must be superior to the number of predictors, and 2) predictor values can be very correlated (multi-collinearity) which lead to high variances and bias (Tenenhaus, 1998). Partial Least Squares Regression (PLSR) is a dimension reduction technique which may address this issue and it has been successfully used in the field of UV/Vis spectrophotometry (Lepot et al., 2016). It consists of finding “new” variables (also called components) which are estimates of the predictors x_p , and to find linear correlations between these components and the dependant variable y (Wold et al., 2001). The first component t_1 is constructed as below (after normalisation of the data):

$$t_1 = w_{11}x_1 + \dots + w_{1p}x_p \quad (5)$$

The PLS algorithm extracts the scores w that best describe the covariance between x_p and y (Jørgensen et al., 2004). Then a simple regression is made of y on t_1 :

$$y = c_1 t_1 + e \quad (6)$$

Then a new component can be constructed to explain the residual e and this iterative procedure can be repeated depending of the number of components chosen. The objective is to best explain y while minimizing the residual e (Tenenhaus, 1998). The choice of the number of components is of key importance for PLSR. The more components, the best the model fits the dataset used for its construction. However too many components leads to a model with bad predictions when confronted with new data. The most relevant number of components is determined by a cross-validation procedure using the criterion Q^2_{cum} . It measures the global contribution of the h first components to the predictive quality of the model. It involves the PRESS (prediction error sum of squares) statistic, and the RSS (residual sum of squares) statistic for a model with one less component ($h-1$). The choice of the number of components of the model is made by maximizing Q^2_{cum} (with $Q^2_{cum} \geq 0.5$) (Tenenhaus, 1998).

In order to reduce the number of dependant variables, a Pearson's matrix of correlation coefficients was used first to discriminate wavelengths which are the most correlated with the indicators of interest. Then, PLSR was applied on the selected range of wavelength for each indicator.

c. Spectra exploitation with Correlated Component Regression (PLS CCR)

The models built with PLSR were compared with a simple linear regression from the absorbance at one single predictor. To define this unique predictor, a Correlated Component Regression (PLS-CCR) was made for each indicator studied. Its principle is similar to PLSR, but an iterative step-down algorithm enables to remove least important predictors, to keep only one predictor at the end of the process (Magidson, 2011). The cross validation procedure implemented divides the calibration dataset into 6 folds with 100 repetitions.

d. Evaluation of the quality of the models (PLSR and PLS CCR)

Three criteria were then used to describe the quality of the models (Karlsson et al., 1995; Liu & Wang, 2015; Platikanov et al., 2014; Qin et al., 2012; Salgado Brito et al., 2014): the coefficient of determination of calibration (R^2_{cal}) and of prediction (R^2_{pred}) ; the Root Mean Square Error of calibration ($RMSE_{cal}$), and of prediction ($RMSE_{pred}$) ; and the Ratio of Prediction to Deviation (RPD). RMSE was calculated for calibration and prediction sets as follow:

$$RMSE = \sqrt{\frac{\sum (y_i - \hat{y}_i)^2}{n}} \quad (7)$$

where y_i represents observed values, \hat{y}_i represents predicted values and n is the number of values in the dataset. RPD is the ratio between the standard deviation of observed values of the prediction dataset and $RMSE_{pred}$. A RPD below 1.5 corresponds to unreliable results, while between 1.5 and 2.0 the model can only distinguish samples having high and low values. Between 2.0 and 2.5, the quantitative predictability is good. Above 3.0, the prediction model is very good.

For spectra exploitation with PLS and PLS-CCR, all the analysis were performed using Excel (Microsoft, USA) and XLStat (Addinsoft, France) softwares.

3. Results and discussion

a. Definition of wavelength ranges for each indicator

A Pearson's matrix of correlation between each couple of variables studied is built. A Pearson's correlation coefficient value above 0.8 can be considered as significant. Results are presented in Figure 19 for both datasets studied. Significant wavelengths are between 240 and 400 nm for COD and TSS, and between 243 and 400 nm for turbidity (Figure 19). Importance of wavelengths above 240 nm tends to indicate the predominance of supracolloidal and settleable matter in the suspended solids (Azema et al., 2002). COD also seems to be influenced by dissolved organic matter (254 nm), and possibly by phenols (270 and 276 nm) (Platikanov et al., 2014; Thomas & Burgess, 2007). Concerning nitrate concentration, significant wavelengths are between 200 and 233 nm. Absorptiometry around 210 nm is a well-known method to estimate nitrate concentration (Thomas & Burgess, 2007).

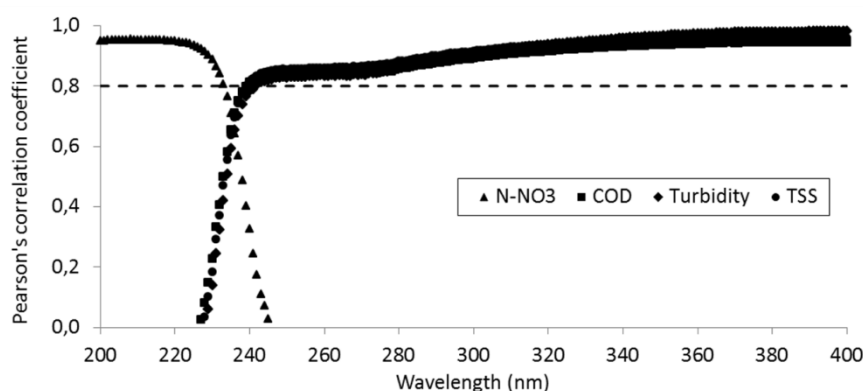


Figure 19 : Pearson's correlation coefficient between N-NO₃ (n = 41), COD (n = 180), turbidity (n = 180), TSS (n = 179) and absorbance at each wavelength studied

b. COD estimation

The PLSR model used for COD estimation is built from absorbance in the wavelength range 240 – 400 nm previously defined. The model has two components with good predictivity (Q^2_{cum} of 0.82). The coefficients of determination are around 0.80 for calibration and prediction datasets, which indicates a quite strong model (Tableau 10). RMSE are similar for calibration and prediction, and the RPD value is typical of a model having a good quantitative predictability. Artificial data stand for around 5.5% of the data for both datasets, but enable to improve RPD from 1.3 to 2.2 by increasing the amplitude of the data (Tableau 10).

The lower effluent quality limit for an unrestricted use of reclaimed water is 50 mg/L COD (Sanz & Gawlik, 2014). For this model, the 95% confidence interval around predicted values is close to 8 mg/L COD (Figure 20). Considering this confidence interval and typical values observed at the WWTP, a threshold of 35 mg/L COD can be considered as unusual if this parameter is estimated by UV/Vis spectrometry. Above this value, confirmation by normalized method should be performed.

The most relevant wavelength to estimate COD selected by the PLS-CCR step-down algorithm in the range 240 – 400 nm is 374 nm. The model built by simple linear regression from absorbance at this wavelength gives similar results to the PLSR model developed with the entire range (Tableau 10). Thus a simple measurement at a single-wavelength can be used to estimate COD with good predictivity for the effluents studied. A comparison between observed values and estimated values during 4 weeks is shown in Figure 21 for secondary and filtered effluents (part of the original dataset without artificial samples). The model allows the detection of a dysfunction during the second week, even if the COD peak is overestimated with the simple linear regression model (results are equivalent with the PLSR model).

c. TSS estimation

For TSS estimation, the PLSR model used from the same wavelength range has two components with good predictivity (Q^2_{cum} of 0.90). The coefficients of determination are around 0.90 for calibration and prediction datasets, which indicates a strong model (Tableau 10). RMSE are similar for calibration and prediction, and the RPD value is higher than for COD and typical of a quite robust model. The slope of the correlation line for the prediction dataset is close to 1, showing no tendency to under or overestimation (Figure 20). The input of artificial data is less decisive than for COD, because the amplitude of the TSS data for the secondary effluent is reasonable (Tableau 10).

The lower effluent quality limit for an unrestricted use of reclaimed water ranges between 5 and 15 mg/L for TSS (Sanz & Gawlik, 2014). Considering the 95% confidence interval of the PLSR model (around 7 mg/L TSS), UV/Vis spectrometry can be used for routine monitoring only for a target value of 15 mg/L TSS (Figure 20). In this case, an estimated value of 8 mg/L is relevant as an alert threshold.

The most relevant wavelength to estimate COD selected by the PLS-CCR iterative algorithm is also 374 nm. This wavelength may correspond to the physical response of particles with a diameter higher than 1 μm (Berho et al., 2004). The PLSR model with

absorbance between 240 – 400 nm and the simple linear regression model with the absorbance at 374 nm give similar results for the effluents studied (Tableau 10). This simple model is able to detect a dysfunction, even if the peak is overestimated for the filtered effluent (results are equivalent with the PLSR model) (Figure 21).

d. Turbidity estimation

The PLSR model built from absorbance in the wavelength range 243 – 400 nm to estimate turbidity has two components with good predictivity (Q^2_{cum} of 0.93). The coefficients of determination are around 0.96 for calibration and prediction datasets, which indicates a very strong model. RMSE are equivalent for calibration and for prediction and they are low, which conducts to a very robust model with a RPD of 5.1 (Tableau 10). Without artificial data, the model is significantly weaker (RPD of 3.4).

The effluent quality limit for an unrestricted use of reclaimed water is generally 2 NTU for turbidity (Sanz & Gawlik, 2014). This value is low and in the same order of magnitude that the 95% confidence interval of the PLSR model (Figure 20). Hence a threshold value of 2 NTU can be used if turbidity is estimated by UV/Vis spectrometry, but with a risk of non-detection of observed values just above this threshold.

The most relevant wavelength to estimate turbidity selected by the PLS-CCR algorithm is 373 nm, which is close to the selected wavelength for COD and TSS (374 nm). The PLSR model and the simple linear regression model give similar results (Tableau 10). In the example presented in Figure 21, turbidity estimation from absorbance at 373 nm is relevant to detect a dysfunction during the second week of monitoring (results are equivalent with the PLSR model).

e. Nitrate estimation

A simple linear regression using absorbance at 208 nm (wavelength selected by the PLS-CCR algorithm) allows a good estimation of nitrate concentration, even higher than with the PLSR model built with absorbance in the wavelength range 200 – 233 nm (Tableau 10), as it is highlighted by the RPD values of 4.0 for PLSR and 5.0 by PLS-CCR. The coefficient of determination is higher for prediction (0.86) than for calibration (0.96), but the number of observations in the prediction dataset is very low ($n = 9$). RMSE are low for both datasets and RPD value is representative of a very strong model which could be used for quantitative prediction (Tableau 10). Even with a low number of data available for calibration and prediction (which might question the relevance of the model), these results are comparable with those obtained by Karlsson

et al. (1995) or by Platikanov et al. (2014) in a similar range of nitrate concentration (0 – 10 mg/L) and wavelength (200 – 210 nm).

Tableau 10 : Description of the models used for COD, TSS, turbidity and nitrate estimation (N: number of observations, cal: calibration, pred: prediction, w/o AS: without artificial samples)

Indicator	N _{cal}	N _{pred}	Regression	Wavelength range (nm)	R ² _{cal}	R ² _{pred}	RMSE _{cal}	RMSE _{pred}	RPD	RPD (w/o AS)
COD	124	56	Linear - PLS	240 – 400	0.844	0.801	3.5	3.4	2.2	1.3
			Linear - PLS-CCR	374	0.846	0.789	3.5	3.5	2.1	/
TSS	123	56	Linear - PLS	240 – 400	0.925	0.863	3.0	3.5	2.7	3.1
			Linear - PLS-CCR	374	0.913	0.864	3.3	3.5	2.7	/
Turbidity	124	56	Linear - PLS	243 – 400	0.964	0.960	1.5	1.3	5.1	3.4
			Linear - PLS-CCR	373	0.946	0.950	1.9	1.5	4.5	/
N-NO ₃	32	9	Linear - PLS	200 – 233	0.893	0.946	0.5	0.7	4.0	/
			Linear - PLS-CCR	208	0.862	0.956	0.8	0.4	5.0	/

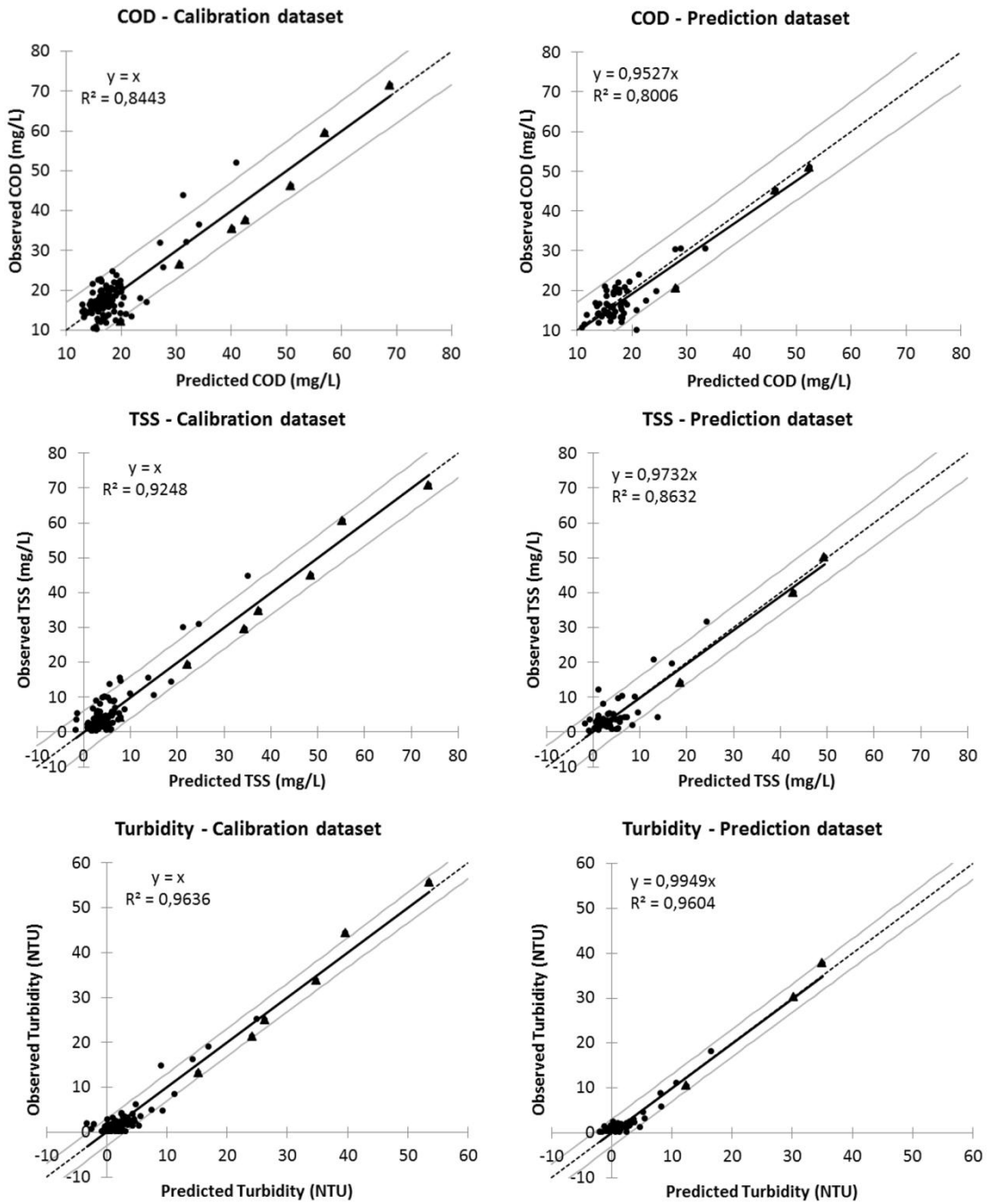


Figure 20 : Relationship between predicted and observed values for the calibration and prediction datasets. The results presented are related to PLSR models for COD, TSS and turbidity. The grey lines represent the 95% confidence interval of the calibration. Triangle dots represent artificial data added to the original dataset (secondary and filtered effluents)

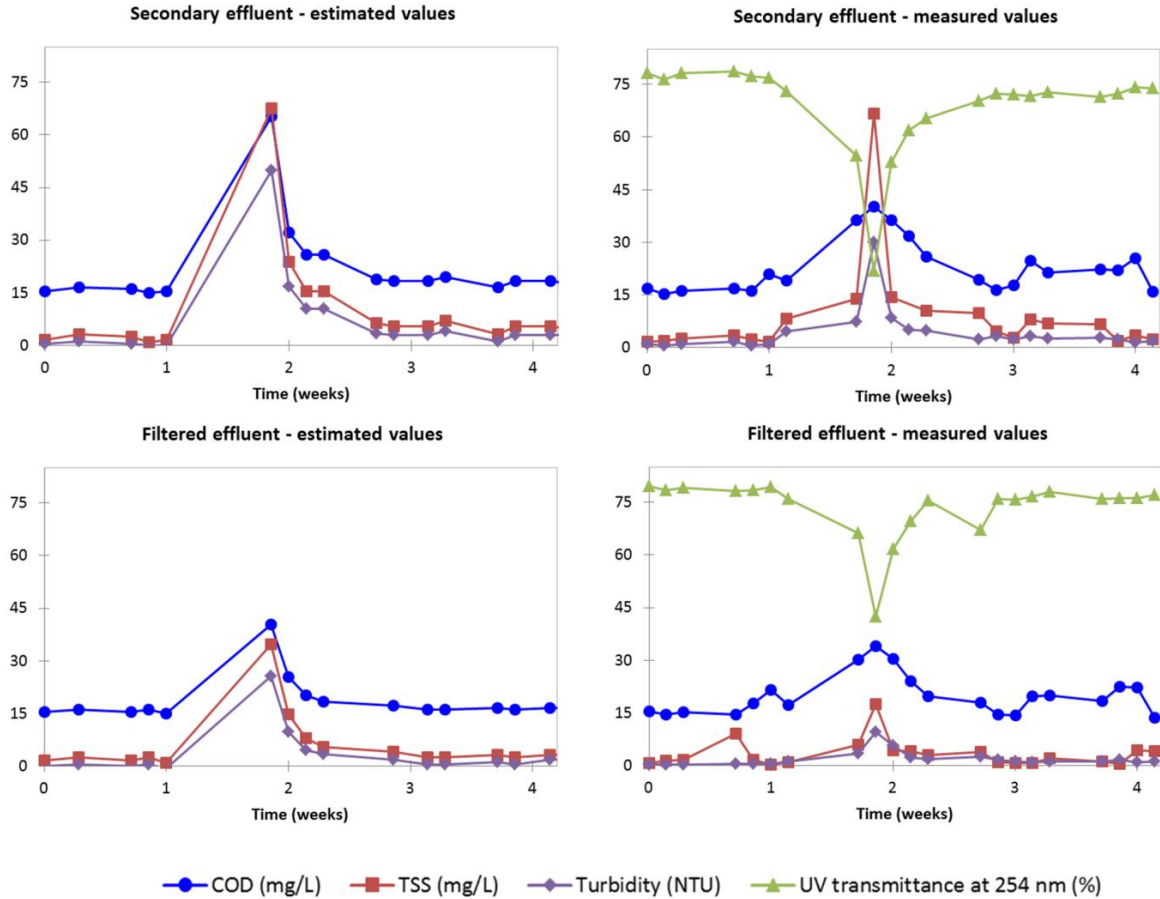


Figure 21 : Comparison between estimated values (PLSR and PLS-CCR models are equivalent) by UV/Vis spectrometry (samples two-fold diluted) and measured values for secondary and filtered effluents during a monitoring period of four weeks. Nitrate concentration did not vary in the period considered

4. Conclusions

In this study, we purposed a detailed procedure to model effluent quality which is applicable to routine monitoring of wastewater treatment processes for reuse. It may be possible to find on the market UV-Vis probes for the indicators and for the range of concentration of interest in this study, but the calibration methodology is kept confidential by the provider. With the calibration procedure developed in this work, data acquisition and calibration are differentiated, and the user may choose simple portable spectrophotometers or UV/Vis probes without calibration package.

The PLSR models developed from data on the WWTP studied were sufficiently robust and sensitive to be used on a reclaimed water production process for routine monitoring of COD and TSS. The confidence interval of the model for turbidity may be

inappropriate to detect values just above the 2 NTU threshold generally used for high quality reclaimed water. However, a dysfunction on the process is often characterised by a peak of turbidity (5 – 10 NTU) detectable by the UV/Vis spectrometry monitoring system. The methodology is easy to implement, site-specific, robust (with artificial samples addition), and accessible for non-specialists with any statistics software (including open source).

Artificial samples can be made by simulating a sludge leak on the WWTP: different volumes (0 – 1.6 % of the sample volume) of sludge from the aerated tank are added to the secondary effluent to increase COD, TSS and turbidity. Addition of these data to the amount of 5.5% of the original dataset enabled a significant increase of the robustness of the models.

The use of PLS-CCR enabled to test the opportunity of simplifying the PLSR models, built from absorbance in a wide range of wavelengths, to a simple linear regression model built from absorbance at one single wavelength. In the case of the WWTP studied, correlations were found between absorbance at 373 – 374 nm and COD, TSS, and turbidity. These correlations may not be found in other WWTP effluents depending on their composition: dissolved organic matter, humic acids, phenols, suspended solids... Another correlation was found between absorbance at 208 nm and nitrate concentration. This correlation has been previously described for other effluents.

Even if the models developed may not be applied directly to other effluents, the described procedure can be applied to build a monitoring system: calibration of PLSR models with a sufficient number of data and some artificial samples to increase the amplitude use of PLS-CCR to test the opportunity to simplify the models. The use of UV/Vis spectrometry as a routine monitoring tool for reclaimed water production enables 1) to reduce monitoring cost by limiting the use of normalized methods (requiring qualified staff and specific material); and 2) to significantly increase reactivity because of a radical change of the frequency of the measures (from a daily basis to a 10-minute basis for instance). By providing continuous information to the operator, constant quality control of the effluents is ensured, in a context of high public health concerns. A regulation loop could also be implemented on the production process, for instance by starting coagulant injection before the sand filter in case of the degradation of the secondary effluent quality.

IV. Identification et définition des points de contrôle sur la filière

1. Introduction

Les travaux décrits dans le présent manuscrit ont permis de mieux comprendre les conditions nécessaires pour garantir la fiabilité 1) du contrôle de la qualité biologique des effluents et 2) d'une filière de traitement tertiaire pour la réutilisation. Il a également été montré que des méthodes alternatives comme la spectrométrie UV/Visible peuvent permettre d'estimer plusieurs indicateurs réglementaires en continu. En se basant sur ces résultats, cette partie vise à identifier les points de contrôle critiques et les points d'attention sur la filière pour ne pas se mettre en situation de non-conformité par rapport aux objectifs de qualité définis pour l'eau distribuée.

La méthodologie mise en œuvre pour atteindre ce résultat est dérivée de la démarche HACCP (Hasard Analysis Critical Control Point). Cette méthode a été développée dans les années 60 par la NASA pour garantir la sécurité sanitaire des aliments dans le cadre de voyages spatiaux. Elle est aujourd'hui largement répandue dans l'industrie agroalimentaire et son adoption est fortement recommandée par la réglementation européenne (directive hygiène) et une norme internationale (ISO 22000) pour la maîtrise de la sécurité des denrées alimentaires (Dewettinck et al., 2001; Gran-Aymerich, 2007; Salgot & Huertas, 2006). Cette démarche est également utilisée comme méthode d'analyse des risques dans le cadre de la production et de la distribution des eaux destinées à la consommation humaine (Gran-Aymerich, 2007).

Dans le cadre de la réutilisation des eaux usées traitées, la démarche HACCP est surtout mise en œuvre pour des usages « de haute qualité » comme la production d'eau destinée à la consommation humaine, même si sa mise en œuvre est recommandée par plusieurs lignes directrices sur la REUT pour les autres types d'usages (EPA Victoria, 2003; Salgot & Huertas, 2006; US EPA, 2012). Dewettinck et al. (2001) ont utilisé cette méthodologie pour définir les points de contrôle et les actions correctives à mettre en œuvre en cas de non-conformité sur une filière de traitement tertiaire en vue de l'injection des eaux usées traitées dans une nappe souterraine utilisée comme ressource pour la production d'eau potable. Dans leur configuration, le traitement tertiaire est constitué de deux étapes de filtration : microfiltration puis osmose inverse. Pour maintenir la présence de minéraux dans l'eau traitée, un faible pourcentage du filtrat de microfiltration est mélangé au filtrat de l'osmose inverse après une étape de

désinfection UV (Dewettinck et al., 2001). Ces travaux ont montré que le suivi en continu des procédés de traitement par des indicateurs physicochimiques comme la turbidité permet de garantir la qualité biologique de l'effluent distribué.

La démarche HACCP est basée sur sept principes (Salgot & Huertas, 2006) : 1) analyse des dangers ; 2) déterminer les points critiques pour la maîtrise (CCP) ; 3) fixer les seuils critiques, 4) mettre en place un système de contrôle des CCP ; 5) définir les actions correctives à mettre en œuvre en cas de défaillance des CCP ; 6) appliquer des procédures de vérification du système HACCP ; 7) constituer un système de traçabilité des procédures. La présente étude se focalise sur les points 1 à 5.

2. Méthodologie

La filière de traitement tertiaire étudiée se place en aval d'une filière de traitement secondaire des eaux usées qui permet d'atteindre le niveau de qualité défini par la réglementation française pour les stations d'épuration devant traiter une charge de pollution organique supérieure ou égale à 120 kg/ j de DBO₅ en fonctionnement normal (Tableau 11).

Tableau 11 : Performances minimales des stations d'épuration des agglomérations devant traiter une charge de pollution organique supérieure ou égale à 120 kg/ j de DBO₅ (JORF, 2015)

Indicateur	Concentration maximale à respecter, moyenne journalière	Rendement minimum à atteindre, moyenne journalière
DBO ₅	25 mg O ₂ / L	80 %
DCO	125 mg O ₂ / L	75 %
MES	35 mg/L	90 %

Le niveau de qualité visé pour les eaux usées traitées correspond à un usage pour l'irrigation de tout type de culture. Pour la grande majorité des textes réglementaires en vigueur, cela correspond à une teneur en MES inférieure à 10 mg/L et à un seuil de qualité pour *E. coli* compris entre 100 et 1000 UFC/100 mL (voir 1^{ère} partie, paragraphe V.3). La filière de traitement définie à la suite de ces travaux permet d'atteindre ce niveau de qualité en fonctionnement normal. Elle est constituée des étapes suivantes (en aval d'un traitement secondaire) :

- filtration sur sable fin à flux descendant (conventionnelle ou sous pression)
- stockage intermédiaire en cuve fermée
- désinfection UV : dose appliquée de 40 mJ/cm² (pour TUV = 70 %), modulable en cas de diminution de la transmittance. Cette dose est suffisante pour l'élimination des coliformes et des entérocoques. Pour des microorganismes plus

résistants aux UV comme les spores, on choisira une dose de 50 mJ/cm² pour s'assurer d'un abattement minimal de 3 log dans le réacteur (Chang et al., 1985; Mamane-Gravetz & Linden, 2005; Sommer et al., 1997)

L'identification des points de contrôle critiques, des systèmes de contrôle et des actions correctives est réalisée en se basant sur les résultats des différentes études présentées dans ce manuscrit. Des points d'attention sont également définis : ils entraînent la mise en œuvre d'une action, mais sans avoir un impact critique sur l'efficacité du traitement.

3. Résultats et discussion

Le Tableau 12 présente l'identification des CCP sur la filière, ainsi que les stratégies de surveillance et les actions correctrices associées aux non-conformités. Un des objectifs principaux de la démarche HACCP est la détection précoce des dysfonctionnements. Plus le problème est pris en compte en amont, moins l'impact sera important sur la filière en aval. Les résultats des travaux sur la filtration sur sable montrent que l'efficacité de cette dernière est compromise en cas d'une dégradation importante et durable de la qualité de l'effluent secondaire. En conséquence, la surveillance de la qualité des effluents secondaires est considérée comme un point de contrôle critique (CCP), contrairement à l'étude de Dewettinck et al. (2001), qui considèrent la surveillance de ce point importante, mais pas assez critique pour en faire un CCP.

Le non-respect des seuils de rejets (exprimés en concentration maximale) pour les indicateurs MES et DCO est défini comme critique pour garantir l'efficacité du traitement tertiaire en aval en vue de la réutilisation. L'utilisation de la spectrométrie UV/Visible pour estimer ces indicateurs en continu permet non seulement de diminuer le coût des analyses mais aussi d'améliorer la réactivité du système. Le choix de Dewettinck et al. (2001) de classer le contrôle de qualité des effluents secondaires comme simple point d'attention est d'ailleurs en partie lié au fait que le seul paramètre pouvant être suivi en continu est le pH. Or il a été montré que cet indicateur est peu représentatif des variations de qualité observées.

La transmittance UV à 254 nm peut également être mesurée par spectrométrie UV/Visible. Une transmittance inférieure à 60 % est considérée comme un seuil critique car les cycles de lavage deviennent trop fréquents, augmentant le coût d'exploitation et réduisant la quantité d'eau fournie. Dans ce cas, le pompage vers la filière tertiaire est stoppé. Une transmittance supérieure à 70 % permet le

fonctionnement optimal de la filtration. Entre 60 et 70 %, la transmittance est surveillée avec attention et peut conduire à l'injection ponctuelle de coagulant pour améliorer la filtration (Tableau 12). Le positionnement et la maintenance de la sonde UV/Visible sont importants pour assurer la fiabilité de la mesure car le risque d'encrassement est potentiellement élevé avec ce type d'effluent. Cependant, la plupart des sondes UV/Vis sur le marché sont équipées d'un système de nettoyage en place.

En sortie de filtration, la qualité de l'effluent doit permettre une efficacité optimale de la désinfection UV. Les résultats issus des travaux présentés dans la 3^{ème} partie montrent que l'apparition d'un effet de traîne (proportion d'organismes non atteints par les UV) est possible pour des valeurs de turbidité en entrée du réacteur UV supérieures à 3 NTU pour l'indicateur coliformes. Cette valeur peut être définie comme un seuil critique pour éviter ou limiter l'amplitude de l'effet de traîne après la désinfection UV pour la plupart des microorganismes pathogènes (Tableau 12). La spectrométrie UV/Vis ne semble pas suffisamment précise pour estimer cet indicateur pour des valeurs inférieures à 3 NTU. La mise en place d'un turbidimètre en ligne est donc préconisée, en prenant soin de respecter les instructions du fournisseur pour l'installation et l'étalonnage du dispositif. La fréquence des mesures ainsi que la temporisation de l'alarme doivent être définies de façon à confirmer le dépassement du seuil par plusieurs mesures : par exemple, déclenchement de l'alarme si dépassement du seuil de 3 NTU en moyenne sur 10 minutes avec une mesure par minute. En cas de dépassement avéré du seuil, les effluents filtrés seront dirigés vers un poste de collecte pour renvoi des eaux vers le traitement secondaire.

Le suivi des performances opérationnelles du filtre est important pour détecter une éventuelle baisse de l'efficacité des lavages et donc un colmatage profond du massif filtrant. Comme l'efficacité de la filtration n'est pas affectée *a priori*, ce point n'est pas classé comme CCP, mais comme simple point d'attention (Tableau 12). Les paramètres de surveillance les plus pertinents sont la durée des cycles de filtration (respect de la consigne) et le suivi des pertes de charge (augmentation de la valeur de ΔP_0 au cours des cycles de filtration). Si la baisse d'efficacité des lavages est avérée, un lavage approfondi au chlore peut être envisagé, voire le changement du sable (normalement effectué tous les cinq à dix ans).

Plusieurs points de contrôle sont nécessaires pour assurer l'efficacité de la désinfection UV. Les aspects compromettant le bon fonctionnement du traitement sont classés en CCP (Tableau 12) :

- dégradation de la qualité de l'effluent pendant le stockage : mesurée en sortie du stockage pour des valeurs de transmittance UV inférieures à 60 %. Dans ce cas, les effluents sont renvoyés vers le traitement secondaire
- casse ou défaut de fonctionnement d'au moins une lampe : mesuré par une chute importante de l'intensité UV (capteur associé au système de désinfection) et par le défaut du témoin de marche associé à la lampe. Dans ce cas, le traitement est arrêté en attente de la réparation

L'efficacité de la désinfection UV peut aussi être affectée progressivement par plusieurs facteurs classés comme points d'attention (Tableau 12). Ainsi des mesures de transmittance comprises entre 60 et 70 % en sortie du stockage entraîneront l'ajustement de la dose UV appliquée en augmentant la puissance des lampes. La diminution progressive de l'intensité UV mesurée par le capteur situé dans le réacteur non corrélée avec une baisse de la transmittance de l'effluent peut être un indice de l'encrassement du capteur et/ou des lampes. Enfin, le vieillissement des lampes doit être anticipé en mesurant le temps de fonctionnement et en respectant la durée de vie préconisée par le fournisseur. Globalement, la définition des CCP et des points d'attention correspond aux préconisations de l'institut américain de recherche sur l'eau relatives à l'utilisation de la désinfection UV pour la réutilisation des eaux usées traitées (NWRI, 2012).

Tableau 12 : Danger, stratégie de surveillance et actions correctives pour les points de contrôle critiques (CCP) et les points d'attention (PA) identifiés

	Danger	Positionnement	Seuil(s)	Contrôle	Action(s) corrective(s)
CCP 1	Dégradation importante de la qualité de l'effluent secondaire	Point de pompage des effluents secondaires	<ul style="list-style-type: none"> • Non-respect des concentrations maximales de rejet de la STEP • UVT < 60 % 	Spectrométrie UV/Visible : mesures en continu des paramètres DCO, MES et UVT	Arrêt du pompage vers la filière tertiaire
CCP 2	Qualité de l'effluent filtré non compatible avec la désinfection UV (effet de traîne)	Sortie de la filtration	Turbidité > 3 NTU	Turbidimètre en ligne : mesures en continu	Renvoi des effluents vers le traitement secondaire
CCP 3	Dégradation de l'effluent pendant le stockage	Sortie du stockage	UVT < 60 %	Sonde UV (254 nm) : mesures en continu	Renvoi des effluents vers le traitement secondaire
CCP 4	Casse ou panne d'une lampe UV	Réacteur UV	<ul style="list-style-type: none"> • Chute brutale de l'intensité UV • Défaut d'un témoin de marche 	<ul style="list-style-type: none"> • Capteur d'intensité UV • Automate du réacteur 	Arrêt du traitement
PA 1	Dégradation ponctuelle et graduelle de la qualité de l'effluent secondaire	Point de pompage des effluents secondaires	60 % < UVT < 70 %	Spectrométrie UV/Visible	Adaptation de la filtration (durée des cycles, injection de coagulant)
PA 2	Baisse de l'efficacité des lavages sur la filtration	Équipement de filtration	<ul style="list-style-type: none"> • Durée des cycles inférieure à la consigne • Augmentation de ΔP_0 	<ul style="list-style-type: none"> • Automate • Capteur de pression différentielle 	<ul style="list-style-type: none"> • Lavage approfondi • Changement du média filtrant
PA 3	Baisse de l'efficacité de la désinfection UV	Sortie du stockage	60 % < UVT < 70 %	Sonde UV (254 nm)	Augmentation de la dose UV transmise
PA 4	Encrassement des lampes UV ou du capteur d'intensité	Réacteur UV	Diminution progressive de l'intensité UV pour une valeur d'UVT stable	Capteur d'intensité UV	<ul style="list-style-type: none"> • Nettoyage du capteur • Contrôle visuel des lampes
PA 5	Vieillessement des lampes UV	Réacteur UV	Dépassement de la durée de vie préconisée	Durée de fonctionnement des lampes	Changement des lampes

Conclusion générale

La réutilisation des eaux usées traitées (REUT) connaît un essor important depuis les années 1990, mais la question plus globale de la perception des eaux usées a fait l'objet de profondes évolutions depuis 150 ans. Au 19^{ème} siècle, les eaux usées sont perçues comme une ressource riche en nutriments pour la terre. Ainsi, Victor Hugo défendait l'utilisation des eaux usées de Paris dans *Les Misérables* : « Tout l'engrais animal et humain que le monde perd, rendu à la terre au lieu d'être jeté à l'eau, suffirait à nourrir le monde ». Ce point de vue évolue avec la découverte du lien entre eaux usées et épidémies avec les travaux de John Snow sur l'épidémie de choléra à Londres en 1854 (Goldstein, 2012), puis avec la découverte des microorganismes pathogènes par Pasteur et Koch dans les années 1880. C'est le développement du mouvement hygiéniste : les eaux usées sont désormais perçues comme une menace pour la santé publique. La nécessité d'une réutilisation directe des eaux usées est réapparue au cours du 20^{ème} siècle pour faire face à l'augmentation des pressions sur la ressource en eau pour différents usages (agricoles, industriels, urbains, récréatifs...).

Les réglementations mises en place par certains pays industrialisés (notamment les États-Unis) découlent en partie de ce mouvement hygiéniste, et imposent la mise en place de traitements drastiques. Ce modèle ne peut être reproduit dans les pays à faible revenu (Drechsel et al., 2011). Les lignes directrices de l'OMS en 2006 ont proposé des normes de qualité biologique plus réalistes, en tentant d'améliorer l'estimation du risque lié à l'exposition aux agents pathogènes. Si ces lignes directrices sont à la base des réglementations existantes dans le bassin méditerranéen, certains pays (dont la France) ont choisi de mettre en place des normes plus strictes et contraignantes, considérant que les études d'estimation du risque biologique utilisées par l'OMS n'étaient pas assez étayées. L'utilisation des eaux usées en irrigation (usage le plus répandu) est donc sujette à un double paradoxe : dans les pays à faible revenu, cette ressource est cruciale et les normes sont moins restrictives mais le peu d'installations de traitement et d'acheminement rend difficile leur application. Dans les pays industrialisés, les normes sont restrictives et l'utilisation des eaux usées traitées pour l'irrigation agricole peut être en concurrence avec d'autres ressources (comme les eaux de surface) pour lesquelles le niveau de qualité exigé pour cet usage est plus faible. Le stress hydrique n'est donc pas le seul moteur influençant le développement de la REUT dans ces pays. Les enjeux environnementaux ou l'existence d'usages sensibles (baignade par exemple) en aval de la station d'épuration sont aussi pris en considération.

Pour répondre à ces réglementations, les indicateurs mesurés sur les filières de traitement ont deux objectifs : vérifier l'efficacité du traitement et vérifier la maîtrise du risque sanitaire de l'eau distribuée par rapport aux usages définis. L'indicateur biologique le plus utilisé est *E. coli*, mais il n'est pas considéré comme représentatif de

l'ensemble des microorganismes (dont les pathogènes). La réglementation française impose le suivi de trois autres indicateurs : les entérocoques, les spores de BASR et les virus bactériophages ARN-F spécifiques pour estimer le risque biologique en vue de la REUT. Durant ce travail de thèse, nous avons choisi de travailler avec les indicateurs *E. coli*, coliformes et entérocoques. La combinaison de ces trois indicateurs est considérée comme robuste pour estimer la qualité biologique d'un effluent et surtout pour vérifier l'efficacité des traitements. Ils présentent l'avantage d'être mesurables par des méthodes par culture simples et pouvant être déployées sur le terrain. La prise en compte des spores de BASR et des bactériophages permettrait d'être plus exhaustif, mais la mesure de ces indicateurs est trop complexe et coûteuse à mettre en œuvre pour un suivi en routine.

La fiabilité de ces méthodes de dénombrement par culture peut être affectée par l'agrégation des microorganismes entre eux et/ou sur les particules en suspension. Un des objectifs de cette thèse était de déterminer les caractéristiques de l'effluent pour lesquelles la fiabilité des méthodes par culture pourrait être compromise. Les résultats montrent que les trois indicateurs étudiés ne présentent pas la même tendance à l'agrégation. Les entérocoques, de petite taille et non mobiles, se fixent facilement entre eux et avec les particules. Les coliformes, et en particulier *E. coli*, sont de plus grande taille et mobiles : ils sont peu associés aux grosses particules. Les résultats obtenus montrent que le risque de sous-estimation par les méthodes par culture est faible pour un effluent secondaire classique (MES < 30 mg/L) et très faible pour un effluent secondaire traité en vue de la réutilisation pour l'irrigation de tout type de cultures (MES < 15 mg/L). Le risque de biais est par contre élevé en cas de dysfonctionnement du traitement secondaire (par exemple une fuite de boues sur le clarificateur : MES > 40 mg/L) et très élevé pour les analyses en entrée de station d'épuration (MES > 300 mg/L). Or ces analyses sont demandées par la réglementation française pour calculer les abattements entre l'entrée et la sortie du traitement pour les indicateurs entérocoques, spores de BASR et phages ARN-F spécifiques. Les mesures effectuées sur les effluents les plus chargés en MES (65 mg/L) dans le cadre de cette étude montrent que le dénombrement peut être sous-estimé d'un facteur 100 sur un tel effluent, ce qui conduit également à sous-estimer l'abattement. La pertinence de l'utilisation des abattements pour définir les niveaux de qualité des eaux usées traitées pourrait donc être remise en cause.

La désinfection UV est un procédé adapté au traitement des effluents en vue de la réutilisation car il permet d'inactiver la quasi-totalité des microorganismes pathogènes tout en garantissant l'absence d'impact sur les végétaux pour l'usage en irrigation. Cela a été vérifié dans cette étude : l'application d'une dose classique de 40 mJ/cm² permet l'inactivation de la quasi-totalité des coliformes et entérocoques présents dans

un effluent secondaire de très bonne qualité. Cependant, la présence de particules en suspension affecte l'efficacité de la désinfection UV à deux niveaux :

- nécessaire augmentation de la dose appliquée (définie pour une transmittance UV donnée) pour atteindre un abattement donné : la réponse des trois microorganismes étudiés est similaire et l'indicateur de pollution particulaire le mieux corrélé à ce phénomène est la transmittance UV à 254 nm. Le seuil critique est défini à 60 %
- apparition d'un effet de traîne, c'est-à-dire une proportion de microorganismes protégés par les UV quelle que soit la dose appliquée : les entérocoques sont plus sujets à ce phénomène que les coliformes, du fait de leur propension à l'agrégation. L'indicateur le mieux corrélé à ce phénomène est la turbidité et le seuil critique est défini à 3 NTU

En cas de stockage après la désinfection UV, le risque de croissance importante des bactéries (par multiplication des organismes non affectés par les UV et/ou par réparation des dommages liés aux UV) est faible si l'effluent est pauvre en nutriments. Pour les effluents plus riches, la température et la durée de stockage sont à prendre en compte.

La mise en place d'un prétraitement s'avère indispensable pour assurer une concentration en particules minimale avant la désinfection UV. La filtration en profondeur est considérée comme le meilleur compromis entre performances attendues et robustesse (coût et technicité de la maintenance minimum). Plusieurs configurations ont été étudiées en aval d'un traitement secondaire en fonctionnement normal et suite à une dégradation de l'effluent secondaire. Toutes les configurations ont permis d'atteindre un niveau de qualité compatible avec la désinfection UV en aval. En cas d'une dégradation de qualité de l'effluent secondaire, la qualité de l'effluent filtré est maintenue. Cependant, la fréquence des lavages est plus importante, ce qui augmente le coût d'exploitation. Si l'amplitude ou la durée de la dégradation de qualité de l'effluent secondaire sont trop importantes, la filière tertiaire doit être temporairement stoppée.

La surveillance en continu de la qualité des effluents est une composante majeure pour garantir la fiabilité d'une filière de REUT. Les travaux présentés dans ce manuscrit ont montré qu'il est possible d'estimer les indicateurs de pollution particulaire (MES, DCO, turbidité) par spectrométrie UV/Visible. La sensibilité de la méthode est compatible avec sa mise en place pour le contrôle de l'effluent secondaire. Cela peut permettre un ajustement en continu de la filière, et notamment une détection précoce des dysfonctionnements. La démarche HACCP a été utilisée pour identifier les points de contrôle sur la filière et définir les actions correctives à mettre

en œuvre en cas de non-conformité. La Figure 1 présente un exemple de filière de traitement tertiaire qui synthétise tous les apports des travaux présentés dans ce manuscrit pour fournir une eau compatible avec une utilisation compatible avec l'irrigation de tout type de cultures. Les points d'attention et les points de contrôle critiques permettent de vérifier l'efficacité du traitement. Ils ne doivent pas être confondus avec les points de contrôle réglementaires à mettre en œuvre selon les préconisations (ici exemple de la réglementation française). Les futures recherches pourront permettre de compléter ce type de filière dans une démarche d'amélioration continue.

La filière présentée en Figure 1 répond à l'objectif fixé d'adaptation au contexte du bassin méditerranéen. Il s'agit d'une filière robuste et sécurisée, capable de s'adapter aux variations de qualité de l'effluent secondaire. Les méthodes de surveillance de la filière sont simples d'utilisation et ne demandent pas un niveau de technicité important. Cette filière peut correspondre également aux petites collectivités des pays du nord du bassin méditerranéen qui ont peu de moyens techniques et financiers à disposition pour l'exploitation. La mise en place de boucles de régulation à partir des capteurs permet en effet un fonctionnement en autonomie du traitement, même si un entretien périodique reste nécessaire.

Les perspectives de ces travaux peuvent être envisagées sous plusieurs angles. Tout d'abord, la représentativité des indicateurs biologiques choisis pourrait être confirmée avec d'autres indicateurs. Les analyses réalisées sur les filières conduisent à s'intéresser en priorité au paramètre "spores de BASR" car ces microorganismes semblent présenter une forte tendance à l'agrégation et ils sont relativement résistants à la désinfection UV. Les phénomènes de croissance et/ou de réactivation en aval des UV méritent également d'être étudiés de façon plus approfondie afin de mieux caractériser le risque pendant le stockage. De façon plus générale, la méthodologie adoptée dans ces travaux (identification et résolution des questionnements scientifiques) pourrait être transposée à d'autres filières pour la REUT, comme par exemple les filières avec filtration membranaire.

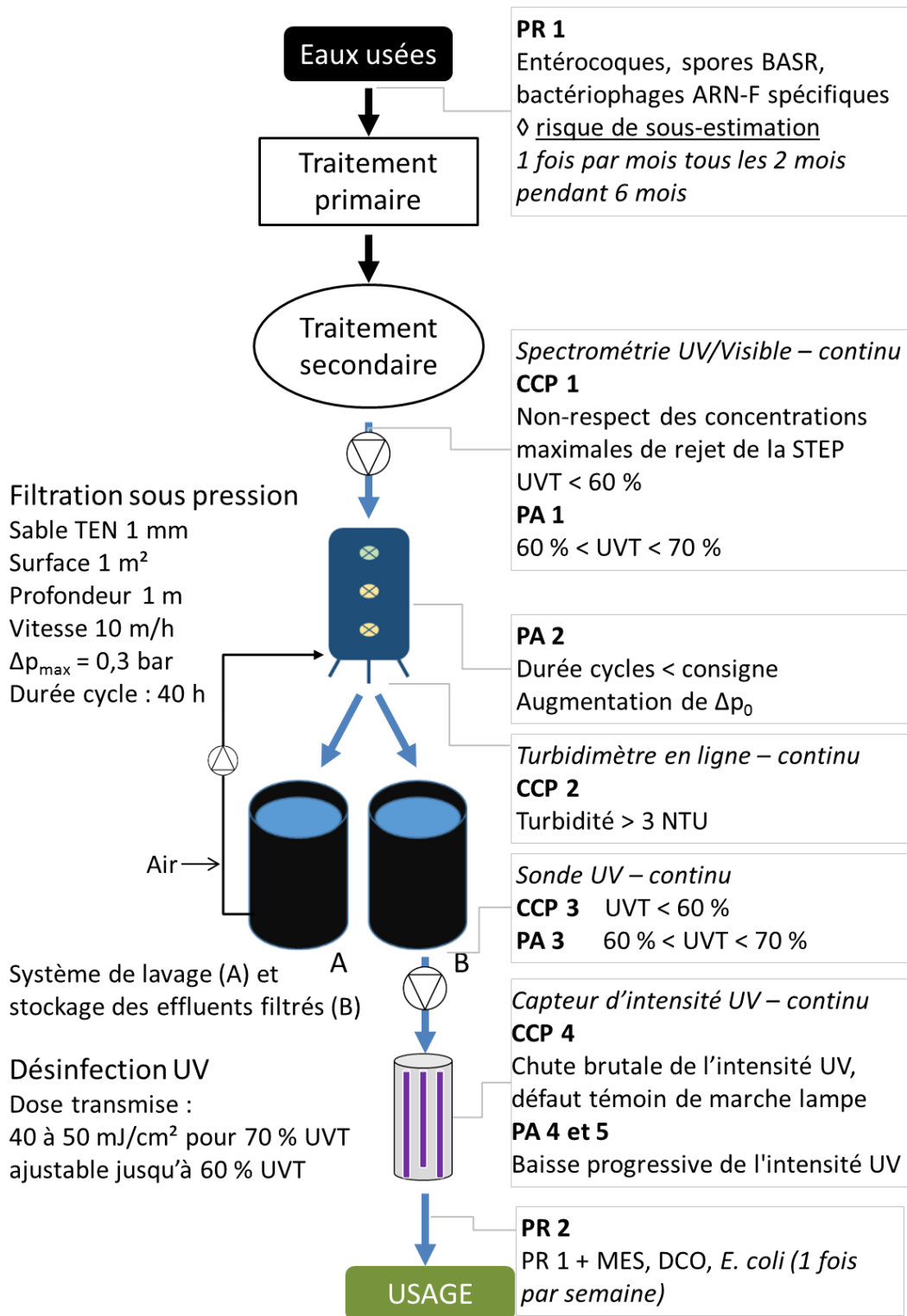


Figure 1 : Exemple de filière tertiaire pour la réutilisation des eaux usées traitées compatible avec l'irrigation de tout type de cultures : identification des points de contrôle réglementaires (France : JORF, 2014) (PR), des points de contrôle critiques (CCP) et des points d'attention (PA). Les modes de surveillance et la fréquence sont indiqués en italique.

Références bibliographiques

- Achilli, A., Cath, T. Y., Marchand, E. A., Childress, A. E. (2009). The forward osmosis membrane bioreactor: A low fouling alternative to MBR processes. *Desalination*, 239(1–3), 10–21.
- AFNOR. (2000a). Qualité de l'eau - détermination de la turbidité. NF EN ISO 7027, Paris (FR): Association Française de Normalisation.
- AFNOR. (2000b). Système de management de la qualité - indicateurs et tableaux de bord. FD X50-171, Paris (FR): Association Française de Normalisation.
- AFNOR. (2005). Qualité de l'eau - Dosage des matières en suspension - Méthode par filtration sur filtre en fibres de verre. NF EN 872, Paris (FR): Association Française de Normalisation.
- AFNOR. (2014). Qualité de l'eau - Protocole d'estimation de l'incertitude de mesure associée à un résultat d'analyse pour les méthodes de dénombrement microbiologiques - Partie 1 : Références, définitions et généralités. FD T 90-465-1, Paris (FR): Association Française de Normalisation.
- AFSSA. (2008). Réutilisation des eaux usées traitées pour l'arrosage ou l'irrigation. Agence française de sécurité sanitaire des aliments, saisine n°2001-SA-0075.
- AFSSA. (2010). Avis de l'agence française de sécurité sanitaire des aliments relatif à l'évaluation des risques sur les effluents issus des établissements de transformation de sous-produits animaux de catégories 1, 2 ou 3 à des fins de réutilisation pour l'irrigation de. Agence française de sécurité sanitaire des aliments, saisine n°2009-SA-0288.
- Agence de l'eau Rhône Méditerranée Corse. (2015). Appel à projets : réutiliser les eaux usées traitées. Consulté le 18/01/2016 sur <http://www.eaurmc.fr/reut.html>
- Amoah, K., Craik, S., Smith, D. W., Belosevic, M. (2005). Inactivation of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts by ultraviolet light in the presence of natural particulate matter. *Journal of Water Supply : Research and Technology*, 54(3), 165–178.
- ANSES. (2012). Réutilisation des eaux usées traitées pour l'irrigation des cultures, l'arrosage des espaces verts par aspersion et le lavage des voiries : avis de l'Anses, rapport d'expertise collective. Agence nationale de sécurité sanitaire alimentation, environnement, travail, saisine n°2009-SA-0329.
- Asano, T., Burton, F., Leverenz, H., Tsuchihashi, R., Tchobanoglous, G. (2007). *Water reuse : issues, technologies, and applications*. New York (US): Metcalf & Eddy.
- ASTM. (2016). Standard Test Method for Iron in Trace Quantities Using the FerroZine Method. ASTM E1615-16, West Conshohocken (ALL): ASTM International.
- Azema, N., Pouet, M.-F., Berho, C., Thomas, O. (2002). Wastewater suspended solids study by optical methods. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 204(1–3), 131–140.
- Azimi, Y. (2013). The Effect of Physicochemical Properties of Secondary Treated Wastewater Floccs on UV Disinfection. Thesis of chemical engineering and applied chemistry, Toronto (US): University of Toronto.

- Azimi, Y., Allen, D. G., Farnood, R. R. (2012). Kinetics of UV inactivation of wastewater bioflocs. *Water Research*, 46(12), 3827–3836.
- Bahri, A. (2008). Water reuse in Middle Eastern and North African Countries. In Jiménez-Cisneros, B. & Asano T. (Eds.), *Water reuse : An international survey of current practice, issues, and needs* (pp. 27–47). London(UK) : IWA Publishing.
- Bailey, J. R. (2012). Investigating the impacts of conventional and advanced treatment technologies on energy consumption at satellite water reuse plants. University of Nevada.
- Bain, R., Bartram, J., Elliott, M., Matthews, R., McMahan, L., Tung, R., Chuang, P., Gundry, S. (2012). A summary catalogue of microbial drinking water tests for low and medium resource settings. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 9(5), 1609–25.
- Barcina, I., González, J. M., Iriberry, J., Egea, L. (1989). Effect of visible light on progressive dormancy of *Escherichia coli* cells during the survival process in natural fresh water. *Applied and Environmental Microbiology*, 55(1), 246–51.
- Baudin, I., Rodrigues, J., Do-Quang, Z. (2004). Use of alternative polymers for enhanced coagulation and direct filtration. In American Water Works Association (Ed.), *WQTC Conference*. San Antonio: November 2004.
- Baudin, I., Rodrigues, J., Huet, S. (2005). Optimisation du procédé de clarification Utilisation des Polymères Cationiques : bilan de la phase 3 (2004 - 2005). Suez Environnement, Agence de l'Eau Seine Normandie.
- Bej, A. K., Steffan, R. J., DiCesare, J., Haff, L., Atlas, R. M. (1990). Detection of coliform bacteria in water by polymerase chain reaction and gene probes. *Applied and Environmental Microbiology*, 56(2), 307–14.
- Beltran, N., Jiménez, B. (2008). Faecal coliforms, faecal enterococci, *Salmonella typhi* and *Acanthamoeba* spp. UV inactivation in three different biological effluents. *Water SA*, 34(2), 261–270.
- Berho, C., Pouet, M.-F., Bayle, S., Azema, N., Thomas, O. (2004). Study of UV–vis responses of mineral suspensions in water. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 248(1–3), 9–16.
- Berland, J.-M., Juery, C. (2002). Les procédés membranaires pour le traitement de l'eau. Fonds National pour le Développement des Adductions d'Eau, document technique n°14.
- Bichai, F., Lèveillé, S., Barbeau, B. (2011). Comparison of the role of attachment, aggregation and internalisation of microorganisms in UVC and UVA (solar) disinfection. *Water Science & Technology*, 63(9), 1823–1831.
- Biernat, M. A., Eker, A. P. M., Van Oers, M. M., Vlak, J. M., Van der Horst, G. T. J., Chaves, I. (2012). A Baculovirus Photolyase with DNA Repair Activity and Circadian Clock Regulatory Function. *Journal of Biological Rhythms*, 27(1), 3–11.

- Bischoff, A. (2012). Choosing the most appropriate technique for wastewater disinfection – parallel investigation of four disinfection systems with different preceding treatment processes. *Water Practice & Technology*, 7(3), 1–8.
- BOE. (2007). Real decreto 1620/2007, de 7 de diciembre, por el que establece el régimen jurídico de la reutilización de las aguas depuradas. *Boletín Oficial Del Estado*, 294(8 diciembre 2007), 50639–50661.
- Bogosian, G., Bourneuf, E. V. (2001). A matter of bacterial life and death. *EMBO Reports*, 2(9), 770–4. Consultable sur <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1084037&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Bohrerova, Z., Shemer, H., Lantis, R., Impellitteri, C. A., Linden, K. G. (2008). Comparative disinfection efficiency of pulsed and continuous-wave UV irradiation technologies. *Water Research*, 42(12), 2975–2982.
- Boller, M. A., Kavanaugh, M. C. (1995). Particle characteristics and headloss increase in granular media filtration. *Water Research*, 29(4), 1139–1149.
- Bolton, J. R., Linden, K. G., Asce, M. (2003). Standardization of methods for fluence (UV dose) determination in bench-scale UV experiments. *Journal of Environmental Engineering*, 2003(March), 209–215.
- Bolton, J. R., Stefan, M. I., Cushing, R. S., Mackey, E. (2001). The Importance of Water Absorbance/Transmittance on the Efficiency of Ultraviolet Disinfection Reactors. In International Ozone Association (Ed.), *First International Congress on Ultraviolet Technologies*. Washington DC, June 2001.
- Borst, M., Selvakumar, A. (2003). Particle-associated microorganisms in stormwater runoff. *Water Research*, 37(1), 215–223.
- Boutilier, L., Jamieson, R., Gordon, R., Lake, C., Hart, W. (2009). Adsorption, sedimentation, and inactivation of *E. coli* within wastewater treatment wetlands. *Water Research*, 43(17), 4370–4380.
- Boutin, C., Helmer, J. (2009). Technologies d'épuration en vue d'une réutilisation des eaux usées traitées (REUT): Rapport final. Convention de partenariat ONEMA-Cemagref 2008.
- Braunstein, J. L., Loge, F. J., Tchobanoglous, G., Darby, J. L. (1996). Ultraviolet disinfection of filtered activated sludge effluent for reuse applications. *Water Environment Research*, 68(2), 152–161.
- Brissaud, F. (2008). Low technology treatment systems for water reuse in small municipalities. *Sustainable Water Management*, 2008(1), 3–8.
- BRL Ingénierie. (2011). Réutilisation des eaux usées traitées - perspectives opérationnelles et recommandations pour l'action. Agence Française pour le Développement.
- Budnick, G., Howard, R., Mayo, D. (1996). Evaluation of Enterolert for enumeration of enterococci in recreational waters. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(10), 3881–3884.

- Bukh, A. (2011). Chemiluminescence- and qPCR-based detection of public health-related bacteria in water. Thesis of Biotechnology, Chemistry and Environmental Engineering. Aalborg (DEN): Aalborg University.
- Bukh, A. S., & Roslev, P. (2010). Characterization and validation of a chemiluminescent assay based on 1,2-dioxetanes for rapid detection of viable *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 86(6), 1947–57.
- Bustin, S. (2004). *A-Z of Quantitative PCR*. La Jolla (USA): International University Line.
- Butler, R. C., Lund, V., Carlson, D. A. (1987). Susceptibility of *Campylobacter jejuni* and *Yersinia enterocolitica* to UV radiation. *Applied and Environmental Microbiology*, 53(2), 375–378.
- Byappanahalli, M. N., Nevers, M. B., Korajkic, A., Staley, Z. R., Harwood, V. J. (2012). Enterococci in the Environment. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 76(4), 685–706.
- Cabral, J. P. S. (2010). Water Microbiology. Bacterial Pathogens and Water. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 7(10), 3657–3703.
- Camper, A. K., LeChevallier, M. W., Broadaway, S. C., McFeters, G. A. (1985). Evaluation of procedures to desorb bacteria from granular activated carbon. *Journal of Microbiological Methods*, 3, 187–198.
- Cantwell, R. E., & Hofmann, R. (2008). Inactivation of indigenous coliform bacteria in unfiltered surface water by ultraviolet light. *Water Research*, 42(10–11), 2729–2735.
- Caron, E., Chevrefils, G., Barbeau, B., Payment, P., Prévost, M. (2007). Impact of microparticles on UV disinfection of indigenous aerobic spores. *Water Research*, 41(19), 4546–56.
- Casado Caneque, F., Smith, D., Jochaud, P. (2015). Market Analysis of Key Water Reuse Technologies. DEMOWARE European project.
- CGDD. (2011). Bilan de présence des micropolluants dans les milieux aquatiques continentaux. Commissariat Général au Développement Durable. Consultable sur [http://www.developpement-durable.gouv.fr/IMG/bilan pres_mico .pdf](http://www.developpement-durable.gouv.fr/IMG/bilan_pres_mico.pdf)
- Chahal, C., van den Akker, B., Young, F., Franco, C., Blackbeard, J., Monis, P. (2016). Pathogen and Particle Associations in Wastewater: Significance and Implications for Treatment and Disinfection Processes. *Advances in Applied Microbiology*, 97, 63–119.
- Chang, J. C. H., Ossoff, S. F., Lobe, D. C., Dorfman, M. H., Dumais, C. M., Qualls, R. G., & Johnson, J. D. (1985). UV inactivation of pathogenic and indicator microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology*, 49(6), 1361–1365.
- Characklis, G. W., Dilts, M. J., Simmons, O. D., Likirdopulos, C. A., Krometis, L.-A. H., Sobsey, M. D. (2005). Microbial partitioning to settleable particles in stormwater. *Water Research*, 39(9), 1773–82.

- Chatterley, C., Linden, K. (2010). Demonstration and evaluation of germicidal UV-LEDs for point-of-use water disinfection. *Journal of Water and Health*, 8(3), 479–486.
- Chevremont, A.-C., Farnet, A.-M., Coulomb, B., Boudenne, J.-L. (2012). Effect of coupled UV-A and UV-C LEDs on both microbiological and chemical pollution of urban wastewaters. *Science of the Total Environment*, 426, 304–10.
- Chick, H. (1908). An Investigation of the Laws of Disinfection. *The Journal of Hygiene*, 8(1), 92–158.
- Cho, M., Yoon, J. (2007). The application of bioluminescence assay with culturing for evaluating quantitative disinfection performance. *Water Research*, 41(4), 741–6.
- Choo, K.-H., Choi, S.-J., Hwang, E.-D. (2007). Effect of coagulant types on textile wastewater reclamation in a combined coagulation/ultrafiltration system. *Desalination*, 202(1–3), 262–270.
- Christensen, J., Linden, K. (2003). How particles affect UV light in the UV disinfection of unfiltered drinking water. *Journal-American Water Works Association*, 95(4), 179–189.
- Cikurel, H., Rebhun, M., Amirtharajah, A., Adin, A. (1996). Wastewater effluent reuse by in-line flocculation filtration process. *Water Science and Technology*, 33(10–11), 203–211.
- Commissariat général au développement durable. (2014). La réutilisation des eaux usées pour l'irrigation : une solution locale pour des situations critiques à l'avenir. *Le Point Sur*, (191). Consultable sur <http://www.developpement-durable.gouv.fr/IMG/pdf/LPS191.pdf>
- Corsin, P., & Le Strat, P. (2007). Les effluents des stations d'épuration : comment les rendre aptes à une seconde vie. *L'eau, l'industrie, les Nuisances*, 299, 35–40.
- Courtois, S., Do-Quang, Z., Bergeron, P., Massé, P. (2009). Reducing the health risk by using rapid quantification methods for the monitoring of *E. coli* and Enterococci in bathing waters. *Water Practice and Technology*, 4(4).
- Craig, D. L., Fallowfield, H. J., Cromar, N. J. (2002). Enumeration of faecal coliforms from recreational coastal sites: evaluation of techniques for the separation of bacteria from sediments. *Journal of Applied Microbiology*, 93(4), 557–565.
- Darby, J. L., Snider, K., Tchobanoglous, G. (1993). Ultraviolet disinfection for wastewater reclamation and reuse subject to restrictive standards. *Water Environment Research*, 65(2).
- Davies, P. S. (2005). *The biological basis of wastewater treatment*. Glasgow (UK): Strathkelvin Instruments Ltd.
- De Koning, J., Bixio, D., Karabelas, A., Salgot, M., Schäfer, A. (2008). Characterisation and assessment of water treatment technologies for reuse. *Desalination*, 218(1–3), 92–104.
- De Koning, J., Miska, V., Ravazini, A. (2006). Water treatment options in reuse systems. In AQUAREC (Ed.), *Integrated concepts for reuse of upgraded wastewater*. Projet Européen AQUAREC (EVK1-CT-2002-00130), work package 2, deliverable D17.

- De Lima Isaac, R., Dos Santos, L. U., Tosetto, M. S., Franco, R. M. B., Guimarães, J. R. (2014). Urban water reuse: Microbial pathogens control by direct filtration and ultraviolet disinfection. *Journal of Water and Health*, 12(3), 465–473.
- Degrémont. (2005). *Mémento technique de l'eau vol.1*. Rueil-Malmaison (FR): Lavoisier.
- Degrémont. (2013). Brevet FR2984874 (A1): Procédé de traitement d'eaux usées industrielles ou urbaines pour une réutilisation, et installation pour mettre en œuvre ce procédé.
- DEMOWARE. (2015). Demonstration for a Competitive and Innovative European Water Reuse Sector. Consulté le 31/03/2015 sur <http://demoware.eu/>
- Deshmukh, R. A., Joshi, K., Bhand, S., Roy, U. (2016). Recent developments in detection and enumeration of waterborne bacteria: a retrospective minireview. *MicrobiologyOpen*, 5(6), 901–922.
- Dewettinck, T., Houtte, E. Van, Geenens, D., Van Hege, K., Verstraete, W. (2001). HACCP (Hazard Analysis and Critical Control Points) to guarantee safe water reuse and drinking water production – a case study. *Water Science and Technology*, 43(12), 31–38.
- DGS. (1987). Circulaire DGS/PGE no 52 du 19 janvier 1987 relative à la désinfection des eaux destinées à la consommation humaine par les rayons ultraviolets. Ministère des affaires sociales et de l'emploi, direction générale de la santé.
- DGS. (2016). Instruction interministérielle n°DGS/EA4/DEB/DGPE/2016/135 du 26 avril 2016 relative à la réutilisation des eaux usées traitées pour l'irrigation de cultures ou d'espaces verts. Ministère de l'environnement, de l'énergie et de la mer - Ministère des affaires sociales et de la santé - Ministère de l'agriculture, de l'agroalimentaire et de la forêt.
- Dichter, G. (2015). Testing Waste Water for Fecal Coliforms and/or *E.coli* using Colilert® and Colilert®-18 & Quanti-Tray®.
- DNA Vision. (2016). TaqMan assays. Consulté le 12/01/2016 sur <http://www.dnavision.com/taqman-genotyping-assays.php>
- Drechsel, P., Scott, C. A., Raschid-Sally, L., Redwood, M., Bahri, A. (2011). L'irrigation avec des eaux usées et la santé. Québec (CA): Presses de l'Université du Québec.
- DRIAS. (2015). Les futurs du climat. Consulté le 30/03/2015 sur <http://www.drias-climat.fr/>
- Dutertre, F. (2015). Réutilisation des eaux usées traitées pour l'irrigation d'un golf selon l'arrêté du 2 août 2010 : cas de la station d'épuration de Dax. In Polytech Montpellier (Ed.), 14^{ème} Séminaire Eau, Montpellier : mars 2015.
- Eckner, K. F. (1998). Comparison of membrane filtration and multiple-tube fermentation by the Colilert and Enterolert methods for detection of waterborne coliform Bacteria, *Escherichia coli*, and enterococci used in drinking and bathing water quality monitoring in Southern Sweden. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(8), 3079–3083.

- Ecomesure (2011). Nouveau compteur de particules CPC : UF - CPC PALAS : comptage des particules entre 0,005 et 10 μm . Consultable sur <http://www.actu-environnement.com/in/ecomesure/ufcpc.pdf>
- El Haïte, H. (2010). Traitement des eaux usées par les réservoirs opérationnels et réutilisation pour l'irrigation. Thèse de sciences et génie de l'environnement. Saint-Etienne : Ecole Nationale Supérieure des Mines de Saint-Etienne.
- Eme, C., Molle, P. (2013). Stockage des Eaux Usées Traitées en vue de leur réutilisation : état de l'art. EPNAC ONEMA IRSTEA.
- Emerick, R. W., Loge, F. J., Ginn, T., Darby, J. L. (2000). Modeling the Inactivation of Particle-Associated Coliform of Particle Bacteria. *Water Environment Research*, 72(4), 432–438.
- Emerick, R. W., Loge, F. J., Thompson, D., Darby, J. L. (1999). Factors Influencing Ultraviolet Disinfection Performance Part II: Association of Coliform Bacteria with Wastewater Particles. *Water Environment Research*, 71(6), 1178–1187.
- EPA Victoria (2003). Guidelines for environmental management : use of reclaimed water. Australia State of Victoria Environmental Protection Agency. Consultable sur http://www.epa.vic.gov.au/~media/Publications/464_2.pdf
- Eriksson, L., Steen, I., Tendaj, M. (1992). Evaluation of Sludge Properties at an Activated Sludge Plant. *Water Science and Technology*, 25(6), 251–265.
- European Commission. (2016). Guidelines on integrating water reuse into water planning and management in the context of the WFD. Common implementation strategy for the water framework directive and the floods directive. Consultable sur http://ec.europa.eu/environment/water/pdf/Guidelines_on_water_reuse.pdf
- Farnood, R. (2014). New Insights into the Ultraviolet Disinfection of Wastewater. In D. Santoro (Ed.), *ECI Symposium Series: Wastewater and Biosolids Treatment and Reuse: Bridging Modeling and Experimental Studies*. Otranto, Italie : Juin 2014.
- Feachem, R., Bradley, D., Garelick, H., Mara, D. (Eds.). (1983). *Entamoeba histolytica* and Amebiasis. In *Sanitation and disease: health aspects of excreta and wastewater management*. New York (US): John Wiley & Sons, Inc.
- Ferguson, D. M., Griffith, J. F., McGee, C. D., Weisberg, S. B., Hagedorn, C. (2013). Comparison of Enterococcus species diversity in marine water and wastewater using Enterolert and EPA Method 1600. *Journal of Environmental and Public Health*.
- Fiksdal, L., Pommepuy, M., Caprais, M. P., Midttun, I. (1994). Monitoring of fecal pollution in coastal waters by use of rapid enzymatic techniques. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(5), 1581–4.
- Filloux, E., Teychene, B., Tazi-Pain, A., Croue, J. P. (2014). Ultrafiltration of biologically treated domestic wastewater: How membrane properties influence performance. *Separation and Purification Technology*, 134, 178–186.

- Fleisher, J. M. (1990). The effects of measurement error on previously reported mathematical relationships between indicator organism density and swimming-associated illness: A quantitative estimate of the resulting bias. *International Journal of Epidemiology*, 19(4), 1100–1106.
- Floriot, M. (2008). Application de l'ATPmétrie à l'épuration par voie biologique. *L'eau, L'industrie, Les Nuisances*, 309, 78–81.
- Frahm, E., Obst, U. (2003). Application of the fluorogenic probe technique (TaqMan PCR) to the detection of *Enterococcus spp.* and *Escherichia coli* in water samples. *Journal of Microbiological Methods*, 52(1), 123–131.
- Fricker, E. J., Fricker, C. R. (1994). Application of the polymerase chain reaction to the identification of *Escherichia coli* and coliforms in water. *Letters in Applied Microbiology*, 19(1), 44–46.
- Friedberg, E. C. (2003). DNA damage and repair. *Nature*, 421(6921), 436–440.
- Garcia-Armisen, T., Servais, P. (2004). Enumeration of viable *E. coli* in rivers and wastewaters by fluorescent in situ hybridization. *Journal of Microbiological Methods*, 58(2), 269–79.
- Garcia-Armisen, T., Servais, P. (2009). Partitioning and Fate of Particle-Associated *E. coli* in River Waters. *Water Environment Research*, 81(1), 21–28.
- Ge, Z., Ping, Q., Xiao, L., He, Z. (2013). Reducing effluent discharge and recovering bioenergy in an osmotic microbial fuel cell treating domestic wastewater. *Desalination*, 312, 52–59.
- George, I., Petit, M., Servais, P. (2000). Use of enzymatic methods for rapid enumeration of coliforms in freshwaters. *Journal of Applied Microbiology*, 88, 404–413.
- Girones, R., Ferrús, M. A., Alonso, J. L., Rodriguez-Manzano, J., Calgua, B., Corrêa, A. D. A., Hundesa, A., Carratala, A., Bofill-Mas, S. (2010). Molecular detection of pathogens in water--the pros and cons of molecular techniques. *Water Research*, 44(15), 4325–39.
- Goldstein, B. D. (2012). John Snow, the Broad Street pump and the precautionary principle. *Environmental Development*, 1(1), 3–9.
- Gómez, M., de la Rúa, A., Garralón, G., Plaza, F., Hontoria, E., Gómez, M. A. (2006). Urban wastewater disinfection by filtration technologies. *Desalination*, 190(1–3), 16–28.
- Gómez, M., Plaza, F., Garralón, G., Pérez, J., Gómez, M. A. (2007). A comparative study of tertiary wastewater treatment by physico-chemical-UV process and macrofiltration–ultrafiltration technologies. *Desalination*, 202(1–3), 369–376.
- Gran-Aymerich, L. (2007). Mise en oeuvre d'un outil d'évaluation du risque microbiologique pour les petites unités de production et de distribution d'eau en France. Mémoire de fin d'étude, ENSP. Consultable sur http://fulltext.bdsp.ehesp.fr/Ensp/memoires/2007/igs/gran_aymerich.pdf

- Grasmick, A., Cabassud, C., Sperandio, M., Wisniewski, C. (2007). Bioréacteurs à membranes et traitement des eaux usées. *Techniques de l'ingénieur*, w4140.
- Gray, N. F. (2004). *Biology of Wastewater Treatment*. London (UK): Imperial College Press.
- GU. (2006). Norme tecniche per il riutilizzo delle acque reflue, ai sensi dell'articolo 99, comma 1, del decreto legislativo 3 aprile 2006, n. 152. *Gazzetta Ufficiale*, 108(11 Maggio 2006), 69–75.
- Guo, M., Hu, H., Bolton, J. R., El-Din, M. G. (2009). Comparison of low- and medium-pressure ultraviolet lamps: Photoreactivation of *Escherichia coli* and total coliforms in secondary effluents of municipal wastewater treatment plants. *Water Research*, 43(3), 815–821.
- Guo, M. T., Huang, J. J., Hu, H. Y., Liu, W. J., & Yang, J. (2013). Quantitative characterization and prediction modeling of photoreactivation of coliforms after ultraviolet disinfection of reclaimed municipal wastewater. *Water, Air, and Soil Pollution*, 224(11).
- GW. (2013). *Global water market 2014*. Global Water Intelligence.
- Haaken, D., Dittmar, T., Schmalz, V., Worch, E. (2014). Disinfection of biologically treated wastewater and prevention of biofouling by UV/electrolysis hybrid technology: influence factors and limits for domestic wastewater reuse. *Water Research*, 52, 20–28.
- Haas, C., Rose, J., Gerba, C. (1999). *Quantitative Microbial Risk Assessment*. 1st. Ed. New York (US): John Wiley & Sons, Inc.
- Hammes, F., Berney, M., Egli, T. (2011). Cultivation-independent Assessment of Bacterial Viability. In Muller, S. & Bley, T. (Eds.), *High Resolution Microbial Single Cell Analytics* (pp. 123–150). Berlin: Springer.
- Hammes, F., Berney, M., Wang, Y., Vital, M., Köster, O., Egli, T. (2008). Flow-cytometric total bacterial cell counts as a descriptive microbiological parameter for drinking water treatment processes. *Water Research*, 42(1–2), 269–77.
- Hammes, F., Goldschmidt, F., Vital, M., Wang, Y., Egli, T. (2010). Measurement and interpretation of microbial adenosine tri-phosphate (ATP) in aquatic environments. *Water Research*, 44(13), 3915–23.
- Harm, W. (1980). *Biological Effects of Ultraviolet Radiation*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Harris, G. D., Adams, V. D., Sorensen, D. L., Curtis, M. S. (1987). Ultraviolet inactivation of selected bacteria and viruses with photoreactivation of the bacteria. *Water Research*, 21(6), 687–692.
- Harrison, T., Latime, B. (2008). ISO 21501 – A standard methodology to optical particle counter calibration and what it means to cleanroom owners. Hach Ultra Analytics, Inc. Consultable sur <http://www.hach.com/asset-get.download-en.jsa?code=61802>

- Hartfelder, J. (2002). Ultraviolet light processes: model evaluation. In Rocky Mountain Water Environment Association (Ed.), 2002 RMWEA Joint Annual Conference. Steamboat Springs, Colorado, USA.
- Harwood, V. J., Levine, A. D., Scott, T. M., Chivukula, V., Lukasik, J., Farrah, S. R., Rose, J. B. (2005). Validity of the indicator organism paradigm for pathogen reduction in reclaimed water and public health protection. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(6), 3163.
- Haugland, R. A., Siefiring, S. C., Wymer, L. J., Brenner, K. P., Dufour, A. P. (2005). Comparison of *Enterococcus* measurements in freshwater at two recreational beaches by quantitative polymerase chain reaction and membrane filter culture analysis. *Water Research*, 39(4), 559–68.
- He, Y.-Y., Hader, D.-P. (2002). Reactive oxygen species and UV-B: effect on cyanobacteria. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 1(10), 729–736.
- Henry, A. (2013). Surveillance de la qualité des eaux de baignade : Quelle méthode pour quelle application? In ASTEE (Ed.), Journée technique profils de baignade, conchyliculture & pêche à pied des bivalves. Saint-Aubin de Terregatte : Janvier 2013. Consultable sur http://www.eau-seine-normandie.fr/fileadmin/mediatheque/Eau-et-sante/journee_astee/P26ASTEENorm20130117AHenry.pdf
- Henry, A., Monier, L., Scherpereel, G. (2013). Intérêts et limites des analyses rapides enzymatiques sans culture - Comparaison avec d'autres méthodes pour le suivi de la qualité des eaux de baignade. *Techniques Sciences Méthodes*, (4), 26–37.
- Hijnen, W. A. M., Beerendonk, E. F., Medema, G. J. (2006). Inactivation credit of UV radiation for viruses, bacteria and protozoan (oo)cysts in water: a review. *Water Research*, 40(1), 3–22.
- Hipsey, M. R., Brookes, J. D., Regel, R. H., Antenucci, J. P., Burch, M. D. (2006). In situ evidence for the association of total coliforms and *Escherichia coli* with suspended inorganic particles in an Australian reservoir. *Water, Air, and Soil Pollution*, 170(1–4), 191–209.
- Hoyer, O. (1998). Testing performance and monitoring of UV systems for drinking water disinfection. *Water Supply*, 16(1–2), 424–429.
- Hoyer, O., Clasen, J. (2002). The application of new technologies in the water treatment process of a modern waterworks. *Water Supply*, 2(63–69), 6.
- Humeau, P., Hourlier, F., Bulteau, G., Massé, A., Jaouen, P., Gérente, C., Faur, C., Le Cloirec, P. (2011). Estimated costs of implementation of membrane processes for on-site greywater recycling. *Water Science & Technology*, 63(12), 2949.
- Husnain, T., Liu, Y., Riffat, R., Mi, B. (2015). Integration of Forward Osmosis and Membrane Distillation for Sustainable Wastewater Reuse. *Separation and Purification Technology*, 156, 424–431.

- Iglesias, R., Ortega, E., Batanero, G., Quintas, L. (2010). Water reuse in Spain: Data overview and costs estimation of suitable treatment trains. *Desalination*, 263(1–3), 1–10.
- Illueca-Muñoz, J., Mendoza-Roca, J., Iborra-Clar, A., Bes-Piá, A., Fajardo-Montañana, V., Martínez-Francisco, F. J., Bernácer-Bonora, I. (2008). Study of different alternatives of tertiary treatments for wastewater reclamation to optimize the water quality for irrigation reuse. *Desalination*, 222(1–3), 222–229.
- INNORPI. (1989). Protection de l'environnement - utilisation des eaux usées traitées à des fins agricoles - spécification physico-chimiques et biologiques. NT 106-03, Tunis (TUN): Institut National de la Normalisation et de la Propriété Industrielle.
- International Water-Guard Industries. (2005). IWG - UV Disinfection. Consulté le 05/09/2014 sur <http://www.water.aero/disinfection.html>
- IPL. (2009). Validation de la méthode XplOrer64 (Vol. 33). Institut Pasteur de Lille.
- ISO. (1999). Qualité de l'eau - recherche et dénombrement des entérocoques intestinaux dans les eaux de surface et résiduaires - Partie 1 : méthode miniaturisée (nombre le plus probable) par ensemencement en milieu liquide. ISO 7899:1, Genève (SUD): International Standards Organization.
- ISO. (2000a). Qualité de l'eau - Dénombrement des *Escherichia coli* et des bactéries coliformes - Partie 1 : méthode par filtration sur membrane. ISO 9308-1, Genève (SUD): International Standards Organization.
- ISO. (2000b). Qualité de l'eau - recherche et dénombrement des entérocoques intestinaux - Partie 2 : méthode par filtration sur membrane. ISO 7899-2, Genève: International Standards Organization.
- ISO. (2001). Qualité de l'eau : lignes directrices pour la validation des méthodes microbiologiques. FD ENV ISO 13843-10:2001, Genève (SUD): International Standards Organization.
- ISO. (2007). Determination of particle size distribution - single particle light interaction methods - Part 3: Light extinction liquid-borne particle counter. ISO 21501-3:2007, Genève (SUD): International Standards Organization.
- ISO. (2014). Qualité de l'eau - Dénombrement des *Escherichia coli* et des bactéries coliformes - Partie 2 : méthode du nombre le plus probable. ISO 9308-2, Genève (SUD): International Standards Organization.
- ISO. (2015a). Lignes directrices pour l'utilisation des eaux usées traitées en irrigation - Partie 1 : les bases d'un projet de réutilisation en irrigation. ISO 16075-1:2015, Genève (SUD): International Standards Organization.
- ISO. (2015b). Lignes directrices pour l'utilisation des eaux usées traitées en irrigation - Partie 2 : développement du projet. ISO 16075-2:2015, Genève (SUI): International Standards Organization.

- ISO. (2015c). Lignes directrices pour l'utilisation des eaux usées traitées en irrigation - Partie 3 : éléments d'un projet de réutilisation en irrigation. ISO 16075-3:2015, Genève (SUD): International Standards Organization.
- ISO. (2015d). Lignes directrices pour l'utilisation des eaux usées traitées pour l'irrigation - Partie 4 : Surveillance. ISO 16075-4:2015, Genève (SUD): International Standards Organization.
- ISO. (2016). ISO/TC 282 : Recyclage des eaux. Consulté le 06/01/2016 sur http://www.iso.org/iso/fr/home/standards_development/list_of_iso_technical_committees/iso_technical_committee.htm?commid=4856734
- IWA. (2014). Specialist group on water reuse : newsletter august 2014. International Water Association. Consultable sur http://www.iwawaterwiki.org/xwiki/bin/view/WorkGroup_Water+Reuse+Specialist+Group/Newsletter
- Jacob, M., Guigui, C., Cabassud, C., Darras, H., Lavison, G., Moulin, L. (2010). Performances of RO and NF processes for wastewater reuse: Tertiary treatment after a conventional activated sludge or a membrane bioreactor. *Desalination*, 250(2), 833–839.
- Jagger, J. H. (1967). Introduction to research in ultra-violet photobiology. Englewood Cliffs (US): Prentice-Hall.
- Jeong, H. S., Lee, S. H., Shin, H. S. (2007). Feasibility of on-line measurement of sewage components using the UV absorbance and the neural network. *Environmental Monitoring and Assessment*, 133(1–3), 15–24.
- Jiménez-Cisneros, B. (2014). Water Reuse and Recycling. In Satinder A. (Ed.), *Comprehensive Water Quality and Purification* (pp. 296–323). Amsterdam (Pays-Bas): Elsevier.
- Jiménez-Cisneros, B., Asano, T. (2008). Water reclamation and reuse around the world. In Jiménez-Cisneros B. & Asano T. (Eds.), *Water reuse : An international survey of current practice, issues, and needs* (pp. 16–23). London (UK) : IWA Pub.
- JOCE. (1991). Directive 91/271/CEE du 21 mai 1991, relative au traitement des eaux urbaines résiduaires. *Journal Officiel de La Communauté Européenne*, L 135(21 mai 1991), 40–52.
- Jonasz, M., Fournier, G. (2011). *Light scattering by particles in water: theoretical and experimental foundations*. Academic Press.
- JORF. (1992). Loi n°92-3 du 3 janvier 1992 sur l'eau. *Journal Officiel de La République Française*, 3(4 janvier 1992), 187.
- JORF. (2012). Arrêté du 22 juin 2012 relatif aux conditions de mise sur le marché et de mise en œuvre des modules de filtration membranaire utilisés pour le traitement d'eau destinée à la consommation humaine pris en application de l'article R. 1321-50 (I et II) du cod. *Journal Officiel de La République Française*, 151(30 juin 2012), 10663.

- JORF. (2014). Arrêté du 25 juin 2014 modifiant l'arrêté du 2 août 2010 relatif à l'utilisation d'eaux issues du traitement d'épuration des eaux résiduaires urbaines pour l'irrigation de cultures ou d'espaces verts. *Journal Officiel de La République Française*, 153(4 juillet 2014), 11059–11069.
- JORF. (2015). Arrêté du 21 juillet 2015 relatif aux systèmes d'assainissement collectif et aux installations d'assainissement non collectif, à l'exception des installations d'assainissement non collectif recevant une charge brute de pollution organique inférieure ou égale à 1,2 kg DBO₅ / jour. *Journal Officiel de La République Française*, 190(19 juillet 2015), 14457.
- Jørgensen, K., Segtnan, V., Thyholt, K., Næs, T. (2004). A comparison of methods for analysing regression models with both spectral and designed variables. *Journal of Chemometrics*, 18(10), 451–464.
- JOUE. (2013). Directive n° 2013/39/UE du 12/08/13 modifiant les directives 2000/60/CE et 2008/105/CE en ce qui concerne les substances prioritaires pour la politique dans le domaine de l'eau. *Journal Officiel de l'Union Européenne*, L 226(24 août 2013), 1–17.
- Joyeux, M. (2012). Résidus médicamenteux : comment passer de l'analyse à l'évaluation du risque sanitaire. In CSEB (Ed.), *Contamination des eaux par les résidus médicamenteux : de l'analyse dans les eaux à l'évaluation du risque sanitaire*. Rennes : janvier 2012. Consultable sur <http://www.cseb-bretagne.fr/index.php/conferences/residus-medicamenteux-dans-l-eau-2012.html>
- Jung, A.-V., Le Cann, P., Roig, B., Thomas, O., Baurès, E., Thomas, M.-F. (2014). Microbial contamination detection in water resources: interest of current optical methods, trends and needs in the context of climate change. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 11(4), 4292–310.
- Kalavrouziotis, I. K., Kokkinos, P., Oron, G., Fatone, F., Bolzonella, D., Vatyliotou, M., Fatta-Kassinos, D., Koukoulakis, P. H., Varnavas, S. P. (2015). Current status in wastewater treatment, reuse and research in some mediterranean countries. *Desalination and Water Treatment*, 53(8), 2015–2030.
- Karlsson, M., Karlberg, B., Olsson, R. J. O. (1995). Determination of nitrate in municipal waste water by UV spectroscopy. *Analytica Chimica Acta*, 312(1), 107–113.
- Kavanaugh, M., Tate, C., Trussel, A., Trussel, R., Treweek, G. (1980). Use of particle size distribution measurements for selection and control of solid/liquid separation processes. in *particulates in water* (pp. 305–328). Washington (USA): American Chemical Society.
- Kay, D., Crowther, J., Stapleton, C. M., Wyer, M. D., Fewtrell, L., Edwards, A., Francis, C. A., McDonald, A. T., Watkins, J., Wilkinson, J. (2008). Faecal indicator organism concentrations in sewage and treated effluents. *Water Research*, 42(1–2), 442–454.
- Kell, D. B., Kaprelyants, A. S., Weichart, D. H., Harwood, C. R., Barer, M. R. (1998). Viability and activity in readily culturable bacteria: a review and discussion of the practical issues. *Antonie van Leeuwenhoek*, 73(2), 169–187.

- Keraita, B., Jiménez-Cisneros, B., Drechsel, P. (2008). Extent and implications of agricultural reuse of untreated, partly treated and diluted wastewater in developing countries. *CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources*, 3(58).
- Khaengraeng, R., Reed, R. H. (2005). Oxygen and photoinactivation of *Escherichia coli* in UVA and sunlight. *Journal of Applied Microbiology*, 99(1), 39–50.
- Kieleczawa, J. (2006). *DNA Sequencing II: Optimizing Preparation and Cleanup*. Sudbury, USA: Jones and Bartlett Publishers.
- Kim, H.-C., Shang, X., Huang, J.-H., Dempsey, B. A. (2014a). Treating laundry waste water: Cationic polymers for removal of contaminants and decreased fouling in microfiltration. *Journal of Membrane Science*, 456, 167–174.
- Kim, I. S., Vigneswaran, S., Jang, N. (2008). Current practices of water reuse in industry. In Jiménez-Cisneros B., Asano T. (Eds.), *Water reuse: An international survey of current practice, issues, and needs* (pp. 250–259). London (UK): IWA Pub.
- Kim, M., Lee, H., Kang, D., Kim, D., Kim, Y., Lee, S. (2014b). Wastewater retreatment and reuse system for agricultural irrigation in rural villages. *Water Science and Technology*, 70(12), 1961–8.
- Kollu, K., Örmeci, B. (2015). UV-induced self-aggregation of *E. coli* after low and medium pressure ultraviolet irradiation. *Journal of Photochemistry and Photobiology. B, Biology*, 148, 310–21.
- Korhonen, L. K., Martikainen, P. J. (1991). Survival of *Escherichia coli* and *Campylobacter jejuni* in untreated and filtered lake water. *Journal of Applied Bacteriology*, 71(4), 379–382.
- Korzeniewska, E., Filipkowska, Z., Gotkowska-Płachta, A., Janczukowicz, W., Dixon, B., Czulowska, M. (2009). Determination of emitted airborne microorganisms from a BIO-PAK wastewater treatment plant. *Water Research*, 43(11), 2841–51.
- Kozak, J., Lordi, D. T., Abedin, Z., O'Connor, C., Granato, T., Kollias, L. (2010). The effect of ferric chloride addition for phosphorus removal on ultraviolet radiation disinfection of wastewater. *Environmental Practice*, 12, 275–284.
- Kozminykh, P., Heistad, A., Ratnaweera, H. C., Todt, D. (2016). Impact of organic polyelectrolytes on coagulation of source-separated black water. *Environmental Technology*, 37(14), 1723–1732.
- Krometis, L. A., Noble, R. T., Characklis, G. W., Blackwood, A. D., Sobsey, M. D. (2013). Assessment of *E. coli* partitioning behavior via both culture-based and qPCR methods. *Water Science and Technology*, 68(6), 1359–1369.
- Kutz, S. M., Gerba, C. P. (1988). Comparison of Virus Survival in Freshwater Sources. *Water Science and Technology*, 20(11–12), 467–471.

- Langergraber, G., Gupta, J. K., Hofstaedter, F., Lettl, W., Weingartner, Fleischmann, N. (2004). On-line monitoring for control of a pilot-scale sequencing batch reactor using a submersible UV/VIS spectrometer. *Water Science and Technology*, 50, 73–80.
- Lavender, J. S., Kinzelman, J. L. (2009). A cross comparison of QPCR to agar-based or defined substrate test methods for the determination of *Escherichia coli* and enterococci in municipal water quality monitoring programs. *Water Research*, 43(19), 4967–4979.
- Lawler, D. F., & Nason, J. A. (2006). Granular media filtration: Old process, new thoughts. *Water Science and Technology*, 53(7), 1–7.
- Lazarova, V. (2013a). Global milestones in water reuse: keys to success and trends in development. *Water*, 21, 12–22.
- Lazarova, V. (2013b). Les éléments réglementaires pour la réutilisation des eaux usées épurées: retours d'expérience en France et à l'international. In ASTEE Sud-Ouest (Ed.), *Le changement climatique et la ressource en eau: comment s'adapter*. Agen: avril 2013.
- Lazarova, V., Liechti, P., Savoye, P., Hausler, R. (2013c). Ozone disinfection: main parameters for process design in wastewater treatment and reuse. *Journal of Water Reuse and Desalination*, 3(4), 337–345.
- Lazarova, V., Brissaud, F. (2007). Intérêt, bénéfices et contraintes de la réutilisation des eaux usées en France. *L'eau, L'industrie, Les Nuisances*, 299, 43–53.
- Lazarova, V., Savoye, P., Janex, M. L., Blatchey III, E. R., & Pommepeuy, M. (1999). Advanced wastewater disinfection technologies: state of the art and perspectives. *Water Science and Technology*, 40(4–5), 203–213.
- Lebaron, P., Henry, A., Lepeuple, A.-S., Pena, G., Servais, P. (2005). An operational method for the real-time monitoring of *E. coli* numbers in bathing waters. *Marine Pollution Bulletin*, 50(6), 652–9.
- Leclerc, D. (1998). Filtration en profondeur - Aspects théoriques. *Techniques de l'Ingénieur*, J3503, 1–8.
- Leclerc, D., & Baluais, G. (1997). Filtration - Aspects généraux. *Techniques de l'Ingénieur*, J3499.
- Lee, D.-Y., Shannon, K., Beaudette, L. A. (2006). Detection of bacterial pathogens in municipal wastewater using an oligonucleotide microarray and real-time quantitative PCR. *Journal of Microbiological Methods*, 65(3), 453–467.
- Lee, J., Deininger, R. A. (2004). Detection of *E. coli* in beach water within 1 hour using immunomagnetic separation and ATP bioluminescence. *Luminescence: The Journal of Biological and Chemical Luminescence*, 19(1), 31–6.
- Legendre, P., Legendre, L. (1988). *Numerical Ecology*, second English edition. *Developments in Environmental Modelling*, 20, 870 pp.
- Lepot, M., Torres, A., Hofer, T., Caradot, N., Gruber, G., Aubin, J.-B., Bertrand-Krajewski, J.-L. (2016). Calibration of UV/Vis spectrophotometers: A review and comparison of

different methods to estimate TSS and total and dissolved COD concentrations in sewers, WWTPs and rivers. *Water Research*, 101, 519–534.

- Leverenz, H. L., Tchobanoglous, G., Asano, T. (2011). Direct potable reuse: a future imperative. *Journal of Water Reuse and Desalination*, 1(1), 2.
- Levine, A. D., Tchobanoglous, G., Asano, T. (1991). Size distributions of particulate contaminants in wastewater and their impact on treatability. *Water Research*, 25(8), 911–922.
- Li, M., Wilkinson, D., Patchigolla, K. (2005). Comparison of Particle Size Distributions Measured Using Different Techniques. *Particulate Science and Technology*, 23(3), 265–284.
- Linden, K. G., Hull, N. M., Rodriguez, R. A. (2015). Comment on “UV Disinfection Induces a VBNC State in *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* .” *Environmental Science & Technology*, 49(17), 10750–10751.
- Linden, K. G., Rosenfeldt, E. J. (2011). Ultraviolet light processes. In Edzwald J., American Water Works Association (Eds.), *Water quality & treatment: a handbook on drinking water* (p. 18.1-18.45). New York: McGraw Hill.
- Liu, X., Wang, L. (2015). Use of multivariate calibration models based on UV-Vis spectra for seawater quality monitoring in Tianjin Bohai Bay, China. *Water Science and Technology*, 71(10), 1444–50.
- Livingston, E. (2008). Village of Cloudcroft, NM PURE Water project. In US EPA (Ed.), *Water Smart Innovations Conference and Exposition*. Las Vegas (US): October 2008.
- Loge, F. J., Emerick, R. W., Ginn, T. R., Darby, J. L. (2002). Association of coliform bacteria with wastewater particles: impact of operational parameters of the activated sludge process. *Water Research*, 36(1), 41–48.
- Loge, F. J., Emerick, R. W., Heath, M., Jacangelo, J., Tchobanoglous, G., Darby, J. L. (1996). Ultraviolet disinfection of secondary wastewater effluents: Prediction of performance and design. *Water Environment Research*, 68(5), 900–916.
- Lopato, L., Binning, P. J., Arvin, E. (2012). Review of diagnostic tools to investigate the physical state of rapid granular filters. *Journal of Water Supply*, 61(3), 123–141.
- Lopez-Roldan, R., Tusell, P., Cortina, J. L., Courtois, S. (2013). On-line bacteriological detection in water. *Trends in Analytical Chemistry*, 44, 46–57.
- Loubier, S., Declercq, R. (2014). Analyses coûts-bénéfices sur la mise en œuvre de projets de réutilisation des eaux usées traitées (REUSE). ONEMA, Ecofilae.
- Madge, B. A., Jensen, J. N. (2001). Discussion of: “Modeling the Inactivation of Particle-Associated Coliform Bacteria”. *Water Environment Research*, 73(4), 504–505.
- Madge, B. A., Jensen, J. N. (2006). Ultraviolet disinfection of fecal coliform in municipal wastewater: Effects of particle size. *Water Environment Research*, 78(3), 294–304.

- Madigan, M., Martinko, J., Stahl, D., Clark, D. (2012). Brock Biology of microorganisms (13th edition). San Francisco (US): Pearson Education.
- Magidson, J. (2011). Correlated Component Regression: A Sparse Alternative to PLS Regression. In ESSEC-SUPELEC (Ed.), 5th ESSEC-SUPELEC Statistical Workshop on PLS (Partial Least Squares) Developments. Paris (FR): May 2011.
- Maheux, A. F., Picard, F. J., Boissinot, M., Huppé, V., Bissonnette, L., Bernier, J.-L. T., Cantin, P., Huletsky, A., Bergeron, M. G. (2009). Analytical limits of three beta-glucosidase-based commercial culture methods used in environmental microbiology, to detect enterococci. *Water Science and Technology*, 60(4), 943–55.
- Malinen, E., Kassinen, A., Rinttilä, T., Palva, A. (2003). Comparison of real-time PCR with SYBR green I or 5'-nuclease assays and dot-blot hybridization with rDNA-targeted oligonucleotide probes in quantification of selected faecal bacteria. *Microbiology*, 149(1), 269–277.
- Mamane-Gravetz, H., Linden, K. G. (2005). Relationship between physicochemical properties, aggregation and UV inactivation of isolated indigenous spores in water. *Journal of Applied Microbiology*, 98(2), 351–363.
- Mamane, H. (2008). Impact of particles on UV disinfection of water and wastewater: a review. *Reviews in Chemical Engineering*, 24(2–3), 67–157.
- Mara, D., Kramer, A. (2008). The 2006 WHO guidelines for wastewater and greywater use in agriculture: a practical interpretation. In: Al Baz I., Otterpohl I., Wendland C. (Eds.), *Efficient management of wastewater: its treatment and reuse in water scarce countries* (pp. 1–17). Heidelberg (ALL): Springer.
- Marti, E., Monclús, H., Jofre, J., Rodriguez-Roda, I., Comas, J., Balcázar, J. L. (2011). Removal of microbial indicators from municipal wastewater by a membrane bioreactor (MBR). *Bioresource Technology*, 102(8), 5004–5009.
- Mattle, M. J., Kohn, T. (2012). Inactivation and tailing during UV254 disinfection of viruses: Contributions of viral aggregation, light shielding within viral aggregates, and recombination. *Environmental Science and Technology*, 46(18), 10022–10030.
- Maya, C., Beltran, N., Jimenez, B., Bonilla, P. (2003). Evaluation of the UV disinfection process in bacteria and amphizoic amoebae inactivation. In: Angelakis K., Paranychianakis A.N., Tsagarakis N.V. (Eds.), *Water recycling in the Mediterranean region Vol. 3*, pp. 285–291. London (UK): IWA Publishing.
- Maybank, R., Roe, J., Guest, I., Laidlaw, B., Hatton, D. (2012). Delivering London 2012 utilities. Institution of Civil Engineers. Consultable sur <http://www.icevirtuallibrary.com/doi/pdf/10.1680/cien.2011.164.6.17>
- McFeters, G.A., Terzieva, S.I. (1991). Survival of *Escherichia coli* and *Yersinia enterocolitica* in stream water: Comparison of field and laboratory exposure. *Microbial Ecology*, 22(1), 65–74.

- McGuigan, K. G., Conroy, R. M., Mosler, H. J., du Preez, M., Ubomba-Jaswa, E., Fernandez-Ibañez, P. (2012). Solar water disinfection (SODIS): A review from bench-top to roof-top. *Journal of Hazardous Materials*, 235, 29–46.
- McKinney, C. W., Pruden, A. (2012). Ultraviolet disinfection of antibiotic resistant bacteria and their antibiotic resistance genes in water and wastewater. *Environmental Science & Technology*, 46(24), 13393–400.
- MEDWWRWG. (2007a). Mediterranean wastewater reuse report. Mediterranean wastewater reuse working group. Consultable sur <http://www.emwis.net/topics/wastewater>
- MEDWWRWG. (2007b). Mediterranean wastewater reuse report annex B : case studies. Mediterranean wastewater reuse working group. Consultable sur <http://www.emwis.net/topics/wastewater>
- MERAP. (2010). Guidelines for using reclaimed wastewater in agriculture. Middle East Regional Agricultural Program, Regional Co-ordination Office, Ramallah, Palestine.
- Ministry of health of Israel. (1999). Irrigation with effluents : standards. R. Halperin (Ed.).
- Moles, J. (2007). Eaux de Distribution - désinfection. *Techniques de l'ingénieur*, W5500.
- Molina, F., López-Acedo, E., Tabla, R., Roa, I., Gómez, A., Rebollo, J. E. (2015). Improved detection of *Escherichia coli* and coliform bacteria by multiplex PCR. *BMC Biotechnology*, 15, 48.
- Monchalain, G., Aviron-Violet, J. (2000). Réutilisation des eaux usées après traitement. Syndicat National de l'Assainissement Autonome et Semi Collectif. Retrieved from <http://www.snaasco.com/document1.pdf>
- Mouchet, P. (2000). Traitement des eaux avant utilisation. *Matières particulières. Techniques de l'Ingénieur*, G1170.
- Moxley, R., Stewart, G. (2013). *Veterinary microbiology*. Hoboken (UK): Wiley-Blackwell.
- Nagourney, A., Healy, J., Schwartz, N. (2015). California drought tests history of endless growth. *The New York Times*, April 4 2015.
- Nakache, F. (2002). Note d'information sur le risque "Cryptosporidium." SAUR, document interne.
- Nauleau, F., Perot, J., Jauzein, V., Clerc, J. M. (2013). La réutilisation des eaux urbaines épurées : perspectives au travers de quelques exemples en France et à l'étranger. In : *Chambres de commerce et d'industrie de Nîmes - Languedoc Roussillon - pays d'Arles et Vaucluse (Ed.)*, Salon Orizon. Nîmes : Octobre 2013.
- Nebot Sanz, E., Salcedo Dávila, I., Andrade Balao, J. A., Quiroga Alonso, J. M. (2007). Modelling of reactivation after UV disinfection: effect of UV-C dose on subsequent photoreactivation and dark repair. *Water Research*, 41(14), 3141–51.

- Nissui. (2009). Compact Dry “Nissui” EC for Coliform and *E. coli*. Nissui pharmaceutical co., LTD. Consultable sur http://www.nissui-pharm.co.jp/english/industry/pdf/CompactDry_EC_E.pdf
- Noble, R. T., Blackwood, A. D., Griffith, J. F., McGee, C. D., Weisberg, S. B. (2010). Comparison of rapid quantitative PCR-Based and conventional culture-based methods for enumeration of *Enterococcus spp.* and *Escherichia coli* in recreational waters. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(22), 7437–7443.
- Noble, R. T., Weisberg, S. B. (2005). A review of technologies for rapid detection of bacteria in recreational waters. *Journal of Water and Health*, 3(4), 381–92.
- NRC. (2004). Indicators for waterborne pathogens. US National Research Council.
- NRMCC, EPHC, NHMRC. (2009). Australian guidelines for water recycling: stormwater harvesting and reuse. Natural Resource Management Ministerial Council, Environment Protection and Heritage Council, National Health and Medical Research Council.
- NWQMS. (2006). Australian guidelines for water recycling: managing health and environmental risks (phase 1). Australian National Water Quality Management Strategy.
- NWRI. (2012). Ultraviolet disinfection: guidelines for drinking water and water reuse 3rd edition. US National Water Research Institute. Consultable sur <http://nwri-usa.org/documents/UVGuidelines3rdEdition2012.pdf>
- Oana, K., Okimura, Y., Kawakami, Y., Hayashida, N., Shimosaka, M., Okazaki, M., Hayashi, T., Ohnishi, M. (2002). Physical and genetic map of *Enterococcus faecium* ATCC19434 and demonstration of intra- and interspecific genomic diversity in enterococci. *FEMS Microbiology Letters*, 207(2), 133–139.
- Oguma, K., Katayama, H., Mitani, H., Morita, S., Hirata, T., Ohgaki, S. (2001). Determination of pyrimidine dimers in *Escherichia coli* and *Cryptosporidium parvum* during UV light inactivation, photoreactivation, and dark repair. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(10), 4630–7.
- Oguma, K., Katayama, H., Ohgaki, S. (2002). Photoreactivation of *Escherichia coli* after low- or medium-pressure UV disinfection determined by an endonuclease sensitive site assay. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(12), 6029–6035.
- Oguma, K., Katayama, H., Ohgaki, S. (2004). Photoreactivation of *Legionella pneumophila* after inactivation by low- or medium-pressure ultraviolet lamp. *Water Research*, 38(11), 2757–2763.
- Oki, T., Kanae, S. (2006). Global hydrological cycles and world water resources. *Science*, 313(5790), 1068–72.
- Oliver, B. G., Cosgrove, E. G. (1975). The disinfection of sewage treatment plant effluents using ultraviolet light. *The Canadian Journal of Chemical Engineering*, 53(2), 170–174.
- Oliver, J. D. (2005). The viable but nonculturable state in bacteria. *Journal of Microbiology*, 43, 93–100.

- Oliver, J. D. (2016). The viable but nonculturable state for bacteria: status update. *Microbe*, 11, 159–164.
- OMS. (2014). OMS | Les effets connus des UV sur la santé. Consulté le 04/09/2014 sur <http://www.who.int/uv/faq/uvhealthfac/fr/index1.html>
- OMS. (2016). Eau : principaux faits. Consulté le 04/09/2014 sur <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs391/fr/>
- ONU. (2017). Wastewater: The untapped resource. United Nations World Water Development Report 2017.
- Ormeçi, B., Linden, K. G. (2008). Development of a fluorescence in situ hybridization protocol for the identification of micro-organisms associated with wastewater particles and flocs. *Journal of Environmental Science and Health. Part A, Toxic/hazardous Substances & Environmental Engineering*, 43(13), 1484–1488.
- Örmeçi, B., Linden, K. G. (2005). Comparison of physical and chemical methods for extraction of coliform from wastewater particles and flocs. *Environmental Engineering Science*, 22(4), 459–471.
- Oster, J. D. (1994). Irrigation with poor quality water. *Agricultural Water Management*, 25(3), 271–297.
- Pachepsky, Y. A., Blaustein, R. A., Whelan, G., Shelton, D. R. (2014). Comparing temperature effects on *Escherichia coli*, Salmonella, and Enterococcus survival in surface waters. *Letters in Applied Microbiology*, 59(3), 278–83.
- Paerl, H. W. (1975). Microbial attachment to particles in marine and freshwater ecosystems. *Microbial Ecology*, 2(1), 73–83.
- Parker, J., Darby, J. (1995). Particle-associated coliform in secondary effluents: shielding from ultraviolet light disinfection. *Water Environment Research*, 67(7), 1065–1075.
- Particle Measuring Systems. (2011). Basic Guide to Particle Counters and Particle Counting. Consultable sur http://www.pmeasuring.com/wrap/filesApp/BasicGuide/file_1/ver_1317144880/basicguide.pdf
- Perdek, J., Borst, M. (2000). Particle association effect on microbial indicator concentrations for CSO disinfection. In: American Society of Civil Engineers (Ed.), ASCE's 2000 Joint Conference on Water Resources Engineering and Water Resources Planning and Management. Minneapolis (US): July/August 2000.
- Pescod, M. B. (1992). Wastewater treatment and use in agriculture. FAO Irrigation and Drainage Paper (Vol. 47). Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Plancherel, Y., Cowen, J. P. (2007). Towards measuring particle-associated fecal indicator bacteria in tropical streams. *Water Research*, 41(7), 1501–15.

- Platikanov, S., Rodriguez-Mozaz, S., Huerta, B., Barceló, D., Cros, J., Batle, M., Poch, G., Tauler, R. (2014). Chemometrics quality assessment of wastewater treatment plant effluents using physicochemical parameters and UV absorption measurements. *Journal of Environmental Management*, 140, 33–44.
- PNUE. (2004). L'eau des méditerranéens : situation et perspectives. MAP Technical Report Series n°158. Programme des Nations Unies pour l'Environnement ; Plan d'Action pour la Méditerranée. Consultable sur <http://planbleu.org/sites/default/files/publications/mts158.pdf>
- PNUE. (2005a). Lignes directrices pour l'utilisation des eaux usées municipales dans la région méditerranéenne. Programme des Nations Unies pour l'Environnement, Plan d'action pour la Méditerranée. Consultable sur http://195.97.36.231/dbases/acrobatfiles/05WG264_9_fre.pdf
- PNUE. (2005b). Water and wastewater reuse: an environmentally sound approach for sustainable urban water management. Programme des Nations Unies pour l'Environnement. Consultable sur http://www.unep.or.jp/Ietc/Publications/Water_Sanitation/wastewater_reuse/Booklet-Wastewater_Reuse.pdf
- PNUE. (2008). Municipal wastewater treatment plants in Mediterranean coastal cities: inventory of treatment plants in cities of between 2,000 and 10,000 inhabitants. MAP Technical Report Series n°169. Programme des Nations Unies pour l'Environnement ; Plan d'Action pour la Méditerranée. Consultable sur <http://195.97.36.231/acrobatfiles/MTS Acrobatfiles/mts169.pdf>
- PNUE. (2010). Un droit de l'eau plus vert: gérer les ressources en eau douce pour les hommes et l'environnement. Programme des Nations Unies pour l'Environnement. Consultable sur <https://wedocs.unep.org/rest/bitstreams/35064/retrieve>
- Pôle Eau. (2013). Ressource en eau alternative de quantité et qualité maîtrisée pour l'irrigation de la vigne. Consulté le 14/04/2015 sur <http://www.pole-eau.com/Les-Projets/Projets-finances/IrriAlt-Eau>
- Pompey, M., Butin, M., Derrien, A., Gourmelon, M., Colwell, R. R., Cormier, M. (1996). Retention of enteropathogenicity by viable but nonculturable *Escherichia coli* exposed to seawater and sunlight. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(12), 4621–6.
- Pramanik, A., Humphries, R., Bustamante, H. (2012). Resource recovery – Challenges and opportunities for the water industry. In: Australian Water Association (Ed.), Resource recovery from wastewater. Clayton (AUS) : May 2012.
- Qin, X., Gao, F., Chen, G. (2012). Wastewater quality monitoring system using sensor fusion and machine learning techniques. *Water Research*, 46(4), 1133–44.
- Qualls, R., Flynn, M., Johnson, D. (1983). The role of suspended particles in ultraviolet disinfection. *Journal of the Water Pollution Control Federation*, 55(10), 1280–1285.
- Quek, P. H., Hu, J. (2008). Indicators for photoreactivation and dark repair studies following ultraviolet disinfection. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 35(6), 533–541.

- R3WATER. (2015). Reuse of water, Recovery of valuables and Resource efficiency in urban wastewater treatment. Consulté le 14/04/2015 sur <http://r3water.eu/>
- Reinoso, R., Torres, L. A., Bécares, E. (2008). Efficiency of natural systems for removal of bacteria and pathogenic parasites from wastewater. *Science of The Total Environment*, 395(2–3), 80–86.
- Rieger, L., Langergraber, G., Thomann, M., Fleischmann, N., Siegrist, H. (2004). Spectral in-situ analysis of NO₂, NO₃, COD, DOC and TSS in the effluent of a WWTP. *Water Science and Technology*, 50(11), 143–152.
- Rinttilä, T., Kassinen, A., Malinen, E., Krogius, L., Palva, A. (2004). Development of an extensive set of 16S rDNA-targeted primers for quantification of pathogenic and indigenous bacteria in faecal samples by real-time PCR. *Journal of Applied Microbiology*, 97(6), 1166–77.
- Rodier, J., Legube, B., Merlet, N. (2016). *L'analyse de l'eau - 10e édition*. Malakoff (FR) : Dunod.
- Rodriguez, C., Van Buynder, P., Lugg, R., Blair, P., Devine, B., Cook, A., Weinstein, P. (2009). Indirect potable reuse: a sustainable water supply alternative. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 6(3), 1174–209.
- Rompré, A., Servais, P., Baudart, J., De-Roubin, M.-R., Laurent, P. (2002). Detection and enumeration of coliforms in drinking water: current methods and emerging approaches. *Journal of Microbiological Methods*, 49(1), 31–54.
- Rose, J., Dickson, L., Farrah, S., Carnahan, R. (1996). Removal of pathogenic and indicator microorganisms by a full-scale water reclamation facility. *Water Research*, 30(11), 2785–2797.
- Roustan, M., Pharamond, J., Line, A., Roy, D. M. (2015). *Agitation . Mélange - Concepts théoriques de base*. *Techniques de l'ingénieur*, J3800.
- Salgado Brito, R., Pinheiro, H. M., Ferreira, F., Saldanha Matos, J., Lourenço, N. D. (2014). In situ UV-Vis spectroscopy to estimate COD and TSS in wastewater drainage systems. *Urban Water Journal*, 11(February), 261–273.
- Salgot, M., Huertas, E. (2006). Guideline for quality standards for water reuse in Europe. In AQUAREC (Ed.), *Integrated concepts for reuse of upgraded wastewater*. Projet Européen AQUAREC (EVK1-CT-2002-00130), work package 2, deliverable D15.
- Sancar, A. (2016). Mechanisms of DNA Repair by Photolyase and Excision Nuclease (Nobel Lecture). *Angewandte Chemie - International Edition*, 55(30), 8502–8527.
- Sánchez Rojas, F., Bosch Ojeda, C. (2009). Recent development in derivative ultraviolet/visible absorption spectrophotometry: 2004–2008. *Analytica Chimica Acta*, 635(1), 22–44.

- Sandhya, S., Chen, W., & Mulchandani, A. (2008). Molecular beacons: a real-time polymerase chain reaction assay for detecting *Escherichia coli* from fresh produce and water. *Analytica Chimica Acta*, 614(2), 208–12.
- Sanz, L. A., Gawlik, B. M. (2014). Water Reuse in Europe: Relevant guidelines , needs for and barriers to innovation. European Commission, Joint Research Centre, Institute for Environment and Sustainability.
- Sarathy, S., Mohseni, M. (2010). Effects of UV/H₂O₂ advanced oxidation on chemical characteristics and chlorine reactivity of surface water natural organic matter. *Water Research*, 44(14), 4087–4096.
- Scheible, O. K. (1987). Development of a rationally based design protocol for the ultraviolet light disinfection process. *Journal of the Water Pollution Control Federation*, 59(1), 25–31.
- Schmidlein, F., Lübken, M., Grote, I., Orth, H., Wichern, M. (2015). Photoreactivation and subsequent solar disinfection of *Escherichia coli* in UV-disinfected municipal wastewater under natural conditions. *Water Science & Technology*, 71(2), 220.
- Servais, P., Billen, G., Garcia-Armisen, T., George, I., Goncalves, A., Thibert, S. (2009). La contamination microbienne du bassin de la Seine. Programme PIREN-Seine, AESN. Consultable sur http://www.sisyphe.upmc.fr/piren/?q=webfm_send/823
- Shannon, K.E., Lee, D.Y., Trevors, J.T., Beaudette, L.A. (2007). Application of real-time quantitative PCR for the detection of selected bacterial pathogens during municipal wastewater treatment. *Science of the Total Environment*, 382(1), 121–129.
- Sheng, G.-P., Yu, H.-Q., Li, X.-Y. (2006). Stability of sludge flocs under shear conditions: Roles of extracellular polymeric substances (EPS). *Biotechnology and Bioengineering*, 93(6), 1095–1102.
- Silkie, S. S., Tolcher, M. P., Nelson, K. L. (2008). Reagent decontamination to eliminate false-positives in *Escherichia coli* qPCR. *Journal of Microbiological Methods*, 72(3), 275–82.
- Singh, S. (2010). Water reuse market is all set for dramatic expansion. Consulté le 02/03/2015 sur <http://www.globalwaterintel.com/watrer-reuse-market-all-set-dramatic-expansion/>
- Sloan, D. (2011). Potable reuse in the Permian Basin. In: Water Environment Association of Texas (Ed.), TAWWA/WEAT San Antonio Summer Seminar. San Antonio (US): July 2011.
- Smit, J., Nasr, J. (1992). Urban agriculture for sustainable cities: using wastes and idle land and water bodies as resources. *Environment and Urbanization*, 4(2), 141–152.
- Smith, C. L., Econome, J. G., Schutt, A., Klco, S., Cantor, C. R. (1987). A physical map of the *Escherichia coli* K 12 genome. *Science*, 236(4807), 1448–1453.

- SOFRES. (2006). Sondage sur la réutilisation des eaux usées traitées mené les 6 et 7 sept. 2006 auprès d'un échantillon de 1.000 personnes représentatif de la population française.
- Sommer, R. (2001). Inactivation of bacteriophages in water by means of non-ionizing (uv-253.7nm) and ionizing (gamma) radiation: a comparative approach. *Water Research*, 35(13), 3109–3116.
- Sommer, R., Haider, T., Cabaj, A., Heidenreich, E., Kundi, M. (1996). Increased inactivation of *Saccharomyces cerevisiae* by protraction of UV irradiation. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(6), 1977–1983.
- Sommer, R., Lhotsky, M., Haider, T., Cabaj, A. (2000). UV inactivation, liquid-holding recovery, and photoreactivation of *Escherichia coli* O157 and other pathogenic *Escherichia coli* strains in water. *Journal of Food Protection*, 63(8), 1015–1020.
- Sommer, R., Weber, G., Cabaj, A., Wekerle, J., Keck, G., Schauburger, G. (1989). [UV-inactivation of microorganisms in water]. *Zentralblatt Fur Hygiene Und Umweltmedizin = International Journal of Hygiene and Environmental Medicine*, 189(3), 214–24.
- Soupir, M. L., Mostaghimi, S., Love, N. G. (2008). Method to partition between attached and unattached *E. coli* in runoff from agricultural lands. *Journal of the American Water Resources Association*, 44(6).
- Stadler, H., Klock, E., Skritek, P., Mach, R. L., Zerobin, W., Farnleitner, A. H. (2010). The spectral absorption coefficient at 254nm as a real-time early warning proxy for detecting faecal pollution events at alpine karst water resources. *Water Science and Technology*, 62(8), 1898–1906.
- State of California. (2001). California Code of Regulations, Title 22, Division 4, Chapter 3 : Water recycling criteria (sections 60301-60357). Office of Administrative Law.
- Stevik, T. K., Aa, K., Ausland, G., Hanssen, J. F. (2004). Retention and removal of pathogenic bacteria in wastewater percolating through porous media: A review. *Water Research*, 38(6), 1355–1367.
- Straub, T. M., Chandler, D. P. (2003). Towards a unified system for detecting waterborne pathogens. *Journal of Microbiological Methods*, 53(2), 185–197.
- Sutton, S. (2011). Accuracy of Plate Counts. *Journal of Validation Technology*, 17(3), 42–46.
- Synteau. (2012a). Réutilisation des eaux usées : où en est-on en France ? In *Pollutec*. Lyon : novembre 2012: Syndicat national des entreprises du traitement de l'eau.
- Synteau. (2012b). Réutilisation des eaux usées traitées : REUSE. Les Fiches Synteau, Eaux usées.
- Tare, V. (2011). Review of Wastewater Reuse Projects Worldwide. Indian Institute of Technology of Kanpur. Consultable sur http://gangapedia.iitk.ac.in/sites/default/files/Second Set of Report/012_EQP_Reuse.pdf

- Tchobanoglous, G., Eliassen, R. (1970). Filtration of Treated Sewage Effluent. *Journal of the Sanitary Engineering Division*, 96(2), 243–265.
- Tchobanoglous, G., Leverenz, H., Nellor, M. H., Crook, J. (2011). *Direct Potable Reuse : a Path Forward*. WateReuse Research Foundation.
- Tchobanoglous, G., Schroeder, E. D. (1985). *Water Quality: Characteristics, Modeling, Modification*. Michigan (US): Addison-Wesley.
- Templeton, M. R., Andrews, R. C., Hofmann, R. (2005). Inactivation of particle-associated viral surrogates by ultraviolet light. *Water Research*, 39(15), 3487–500.
- Tenenhaus, M. (1998). *La régression PLS: théorie et pratique*. Paris (FR): Editions Technip.
- Thermo Scientific. (2008). 260/280 and 260/230 Ratios. Thermo Scientific Technical Bulletin. Consultable sur http://www.nanodrop.com/Library/T009-NanoDrop_1000-&-NanoDrop_8000-Nucleic-Acid-Purity-Ratios.pdf
- Thomas, H. A. (1942). Bacterial densities from fermentation tube tests. *Journal of American Water Works Association*, 34, 572–576.
- Thomas, O., & Burgess, C. (Eds.). (2007). *UV-visible spectrophotometry of water and wastewater*. Amsterdam (NL): Elsevier B.V.
- Thomas, O., & Theraulaz, F. (2007). Aggregate organic constituents. In O. Thomas & C. Burgess (Eds.), *UV-visible spectrophotometry of water and wastewater*. Amsterdam (NL): Elsevier B.V.
- US EPA. (1998). *Water recycling and reuse: the environmental benefits*. United States Environmental Protection Agency. Consultable sur <http://www.epa.gov/region9/water/recycling/brochure.pdf>
- US EPA. (2006). *Ultraviolet disinfection guidance manual for the final long term 2 enhanced surface water treatment rule*. United States Environmental Protection Agency, Office of Water, EPA 815-R-06-007. Consultable sur http://www.epa.gov/ogwdw000/disinfection/lt2/pdfs/guide_lt2_uvguidance.pdf
- US EPA. (2012). *2012 Guidelines for Water Reuse*. United States Environmental Protection Agency.
- Uslu, G., Demirci, A., Regan, J. M. (2015). Efficacy of Pulsed UV-Light Treatment on Wastewater Effluent Disinfection and Suspended Solid Reduction. *Journal of Environmental Engineering*, 141(6), 401–409.
- Uyttendaele, M., Jaykus, L.-A., Amoah, P., Chiodini, A., Cunliffe, D., Jacxsens, L., Holvoet, K., Korsten, L., Lau, M., McClure, P., Medema, G., Sampers, I., Rao Jasti, P. (2015). Microbial Hazards in Irrigation Water: Standards, Norms, and Testing to Manage Use of Water in Fresh Produce Primary Production. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 14(4), 336–356.

- Vaillant, S., Pouet, M. F., Thomas, O. (2002). Basic handling of UV spectra for urban water quality monitoring. *Urban Water*, 4(3), 273–281.
- Verbyla, M. E., Iriarte, M. M., Mercado Guzmán, A., Coronado, O., Almanza, M., Mihelcic, J. R. (2016). Pathogens and fecal indicators in waste stabilization pond systems with direct reuse for irrigation: Fate and transport in water, soil and crops. *Science of The Total Environment*, 551–552, 429–437.
- Walters, E., Graml, M., Behle, C., Müller, E., Horn, H. (2013). Influence of Particle Association and Suspended Solids on UV Inactivation of Fecal Indicator Bacteria in an Urban River. *Water, Air, & Soil Pollution*, 225(1), 1822.
- Watson, H.E. (1908). A Note on the Variation of the Rate of Disinfection with Change in the Concentration of the Disinfectant. *The Journal of Hygiene*, 8(4), 536–42.
- Wéry, N., Lhoutellier, C., Ducray, F., Delgenès, J.P., Godon, J.J. (2008). Behaviour of pathogenic and indicator bacteria during urban wastewater treatment and sludge composting, as revealed by quantitative PCR. *Water Research*, 42(1–2), 53–62.
- WHO. (2006). Guidelines for the safe use of wastewater, excreta and greywater. World Health Organization.
- Wintgens, T., Hochstrat, R. (2006). Report on integrated water reuse concepts. In: *AQUAREC* (Ed.), *Integrated concepts for reuse of upgraded wastewater*. European project AQUAREC (EVK1-CT-2002-00130), work package 2, deliverable D19.
- Winward, G. P., Avery, L. M., Stephenson, T., Jefferson, B. (2008). Ultraviolet (UV) disinfection of grey water: particle size effects. *Environmental Technology*, 29(2), 235–244.
- Wold, S., Sjöström, M., Eriksson, L. (2001). PLS-regression: a basic tool of chemometrics. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 58(2), 109–130.
- Wright, H., Gandhi, V., Salveson, A., Wicklein, E. (2014). CFD-based UV dose prediction tool for wastewater reuse applications. *Proceedings of the Water Environment Federation*, 2014(8), 6645–6656.
- Wu, J., Jiang, X., Wheatley, A. (2009). Characterizing activated sludge process effluent by particle size distribution, respirometry and modelling. *Desalination*, 249(3), 969–975.
- Xu, P., Brissaud, F., Fazio, A. (2002). Non-steady-state modelling of faecal coliform removal in deep tertiary lagoons. *Water Research*, 36(12), 3074–3082.
- Xu, P., Widmer, G., Wang, Y., Ozaki, L. S., Alves, J. M., Serrano, M. G., Puiu, D., Manque, P., Akiyoshi, D., Mackey, A. J., Pearson, W. R., Dear, P. H., Bankier, A. T., Peterson, D. L., Abrahamsen, M. S., Kapur, V., Tzipori, S., Buck, G. A. (2004). The genome of *Cryptosporidium hominis*. *Nature*, 431(7012), 1107–1112.
- Zahid, W. M., El-Shafai, S. A. (2011). Use of cloth-media filter for membrane bioreactor treating municipal wastewater. *Bioresource Technology*, 102(3), 2193–8.

- Zhang, H., Chon, C. H., Pan, X., Li, D. (2009). Methods for counting particles in microfluidic applications. *Microfluidics and Nanofluidics*, 7(6), 739–749.
- Zhang, S., Ye, C., Lin, H., Lv, L., Yu, X. (2015). UV disinfection induces a VBNC state in *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Environmental Science and Technology*, 49(3), 1721–1728.
- Zimmer, J. L., Slawson, R. M., Huck, P. M. (2003). Inactivation and potential repair of *Cryptosporidium parvum* following low- and medium-pressure ultraviolet irradiation. *Water Research*, 37(14), 3517–3523.

Annexe A

Protocole d'extraction de l'ADN pour la qPCR

Protocole Qiagen QIAamp DNAMicro avec procédure supplémentaire pour bactéries Gram+

D1. Pellet bacteria by centrifugation for 10 min at 5000 x g (7500 rpm). filtration 20 mL

D2. Suspend bacterial pellet in 180 µl of the appropriate enzyme solution (20 mg/ml lysozyme or 200 µg/ml lysostaphin; 20 mM Tris-HCl, pH 8.0; 2 mM EDTA; 1.2% Triton). 500 µL } Protocole bactéries Gram +

D3. Incubate for at least 30 min at 37°C.

D4. Add 20 µl proteinase K and 200 µl Buffer AL. Mix by vortexing. 50 µL 500 µL

D5. Incubate at 56°C for 30 min and then for a further 15 min at 95°C.

Note: Extended incubation at 95°C can lead to some DNA degradation.

D6. Centrifuge for a few seconds.

7. Add 50 µl ethanol (96–100%), close the lid, and mix thoroughly by pulse-vortexing for 15 s. Incubate for 3 min at room temperature. 200 µL

Note: If room temperature exceeds 25°C, cool the ethanol on ice before adding to the tube.

8. Briefly centrifuge the 1.5 ml tube to remove drops from inside the lid.

9. Carefully transfer the entire lysate from step 8 to the QIAamp MinElute column (in a 2 ml collection tube) without wetting the rim. Close the lid, and centrifuge at 6000 x g (8000 rpm) for 1 min. Place the QIAamp MinElute column in a clean 2 ml collection tube, and discard the collection tube containing the flow-through. 2 x 600 µL

If the lysate has not completely passed through the membrane after centrifugation, centrifuge again at a higher speed until the QIAamp MinElute column is empty.

10. Carefully open the QIAamp MinElute column and add 500 µl Buffer AW1 without wetting the rim. Close the lid, and centrifuge at 6000 x g (8000 rpm) for 1 min. Place the QIAamp MinElute column in a clean 2 ml collection tube, and discard the collection tube containing the flow-through.

11. Carefully open the QIAamp MinElute column and add 500 µl Buffer AW2 without wetting the rim. Close the lid, and centrifuge at 6000 x g (8000 rpm) for 1 min. Place the QIAamp MinElute column in a clean 2 ml collection tube, and discard the collection tube containing the flow-through.

Contact between the QIAamp MinElute column and the flow-through should be avoided. Some centrifuge rotors may vibrate upon deceleration, resulting in the flow-through, which contains ethanol, coming into contact with the QIAamp MinElute column. Take care when removing the QIAamp MinElute column and collection tube from the rotor, so that flow-through does not come into contact with the QIAamp MinElute column.

12. Centrifuge at full speed (20,000 x g; 14,000 rpm) for 3 min to dry the membrane completely.

This step is necessary, since ethanol carryover into the eluate may interfere with some downstream applications.

13. Place the QIAamp MinElute column in a clean 1.5 ml microcentrifuge tube (not provided) and discard the collection tube containing the flow-through. Carefully open the lid of the QIAamp MinElute column and apply 20–100 µl Buffer AE or distilled water to the center of the membrane.

If high pH or EDTA affects sensitive downstream applications, use water for elution (see page 12).

Important: Ensure that Buffer AE or distilled water is equilibrated to room temperature (15–25°C). If using small elution volumes (<50 µl), dispense Buffer AE or distilled water onto the center of the membrane to ensure complete elution of bound DNA.

QIAamp MinElute columns provide flexibility in the choice of elution volume. Choose a volume according to the requirements of the downstream application. Remember that the volume of eluate will be up to 5 µl less than the volume of elution solution applied to the column.

14. Close the lid and incubate at room temperature (15–25°C) for 1 min. Centrifuge at full speed (20,000 x g; 14,000 rpm) for 1 min.

Incubating the QIAamp MinElute column loaded with Buffer AE or water for 5 min at room temperature before centrifugation generally increases DNA yield.

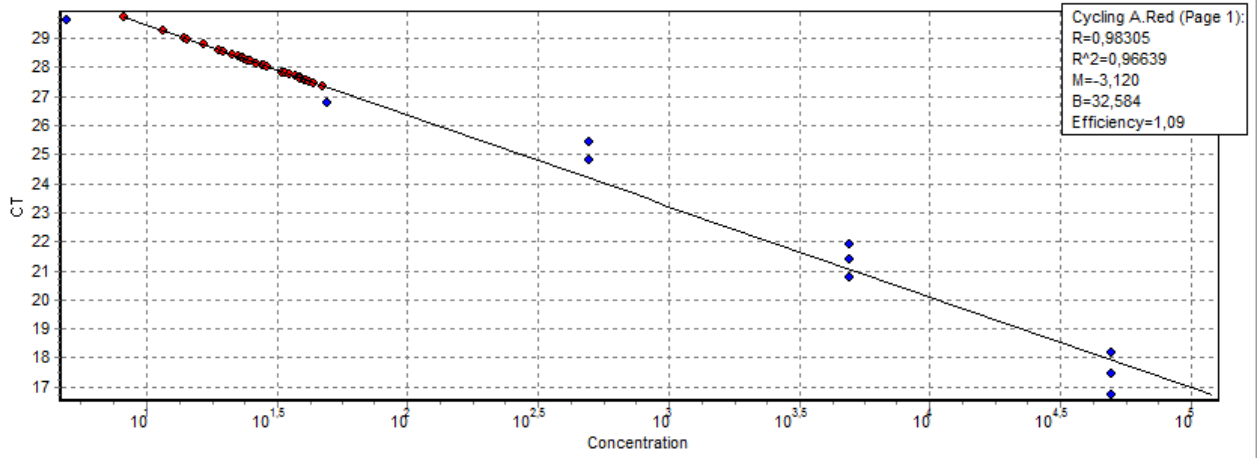
30 µL
← Elution avec 20 – 100 µL
contre 200 µl avec DNAMini

Annexe B

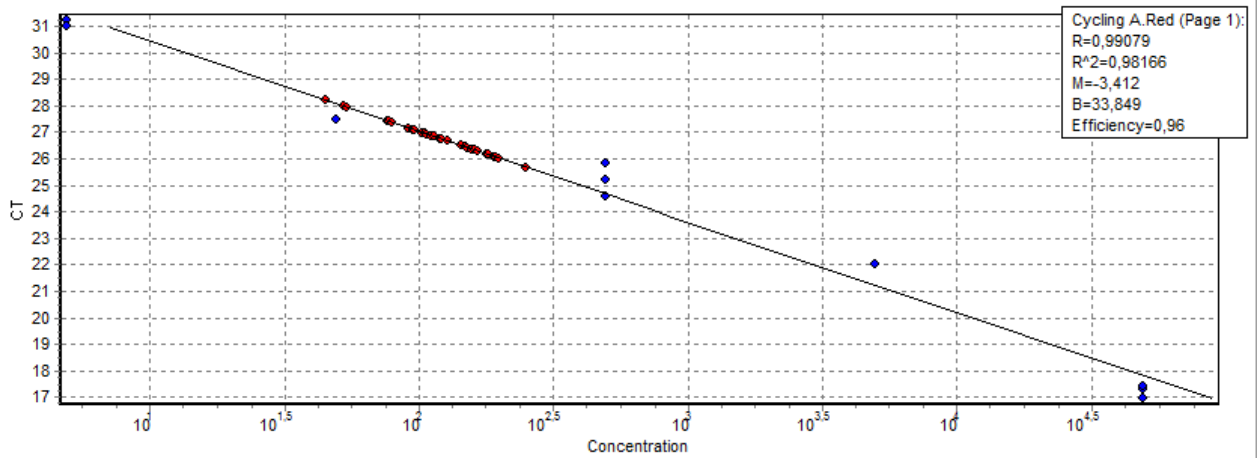
Gammes d'étalonnage pour la qPCR

Les points de gamme sont en bleu et les échantillons en rouge.

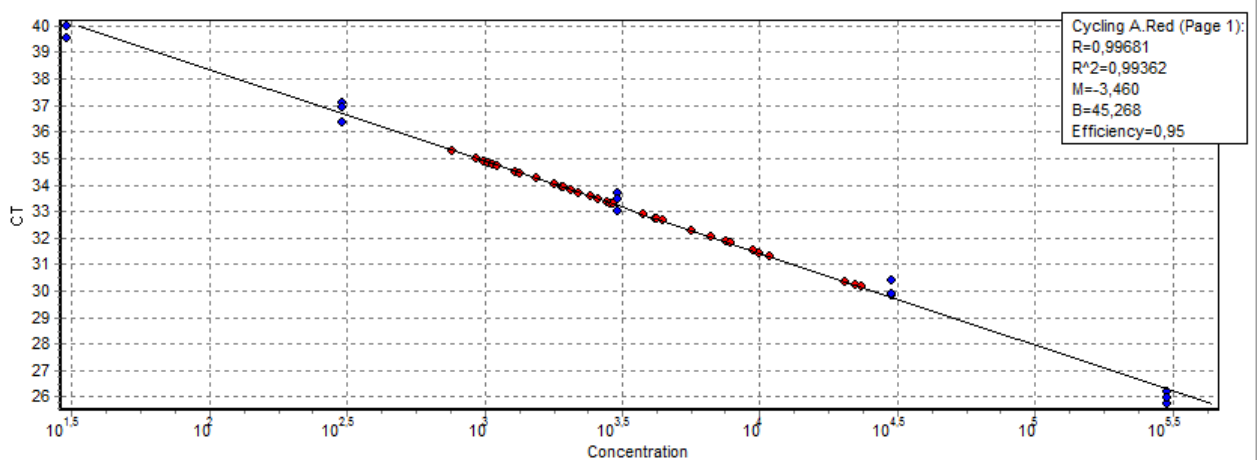
E. coli – expérience A



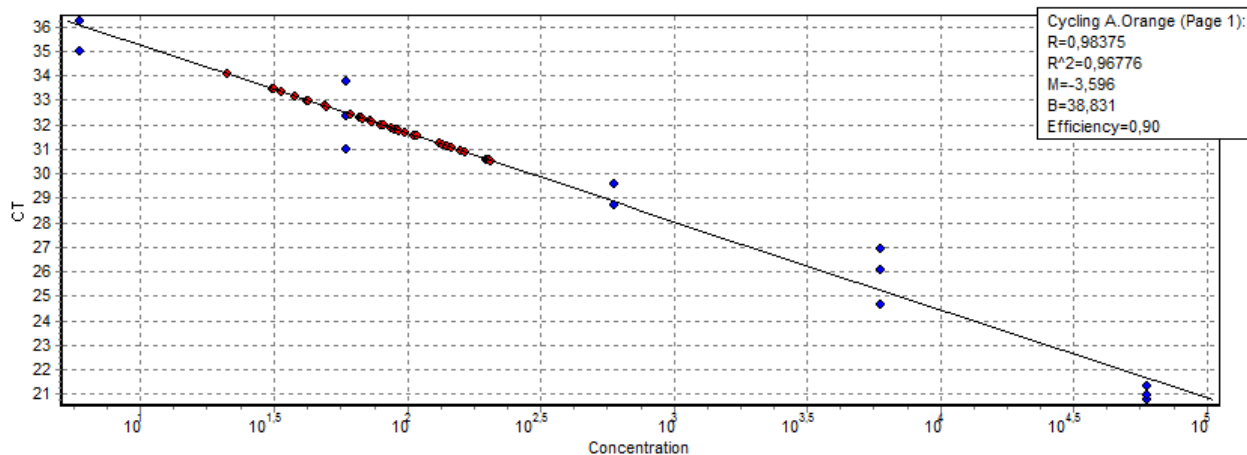
E. coli – expérience B



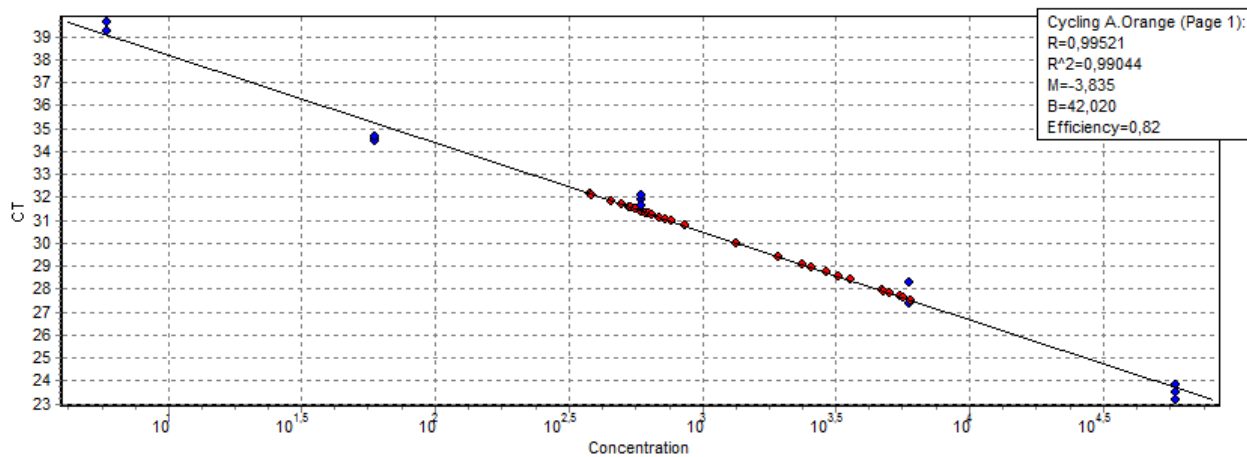
E. coli – expérience C



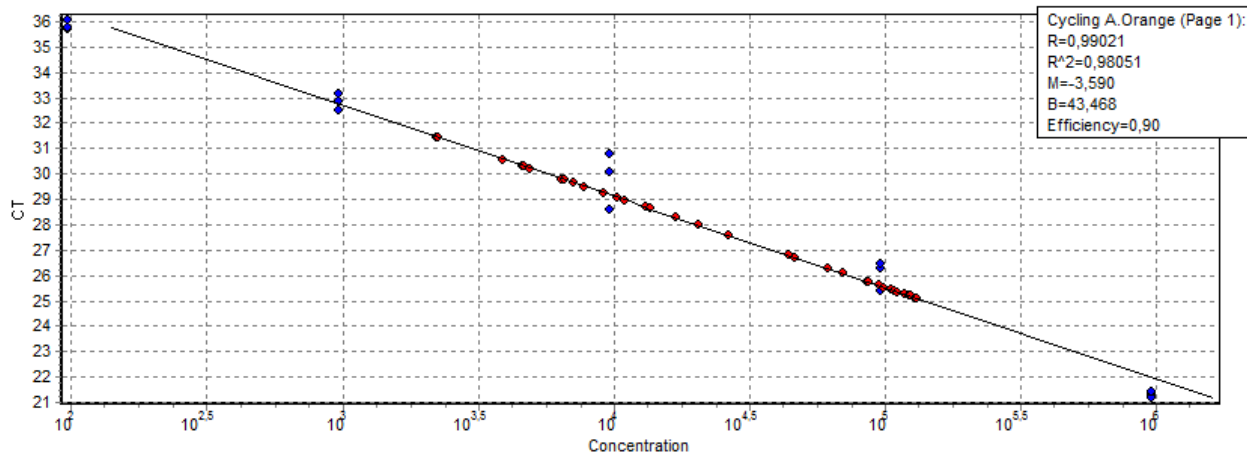
Entérocoques – expérience A



Entérocoques – expérience B



Entérocoques – expérience C



Annexe C

Constantes avec erreurs-type des modèles pour
l'inactivation des microorganismes exposés aux UV
et des microorganismes protégés des UV

Constantes (avec erreurs-type et coefficients de détermination des droites de régression) des modèles pour l'inactivation des microorganismes exposés aux UV (Inactivation = - k1.t) et des microorganismes protégés des UV (Inactivation = - k2.t + IL). Les valeurs en italique ne sont pas prises en compte dans les résultats

COLIFORMES

	ES			ES + 0,4 % boue			ES + 0,8 % boue			ES + 1,4 % boue		
	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C
Constantes k1 (min⁻¹)												
k1	<i>0,329</i>	0,380	0,371	<i>0,257</i>	0,298	0,281	<i>0,272</i>	0,269	0,256	0,213	0,185	0,182
erreur-type	<i>0,066</i>	0,057	0,065	<i>0,056</i>	0,012	0,019	0,009	0,040	0,026	0,020	0,003	0,005
R ²	<i>0,93</i>	0,96	0,94	<i>0,91</i>	1,00	0,99	1,00	0,96	0,98	0,98	1,00	1,00
Constantes k2 (min⁻¹)												
k2	<i>0,010</i>	0,018	0,008	0,008	0,016	0,011	0,018	0,016	0,017	0,016	0,018	0,016
erreur-type	<i>0,003</i>	0,004	0,001	0,004	0,003	0,003	0,008	0,004	0,002	0,003	0,004	0,003
R ²	<i>0,792</i>	0,955	0,985	0,666	0,947	0,887	0,725	0,879	0,971	0,933	0,918	0,931
IL												
Ord k2	<i>-2,8</i>	-3,2	-3,5	<i>-3,3</i>	-3,2	-3,6	<i>-2,7</i>	-2,7	-2,8	-2,2	-1,9	-1,6
erreur-type	<i>0,2</i>	0,3	0,1	0,2	0,2	0,2	0,5	0,3	0,1	0,2	0,2	0,2

E. COLI

	ES			ES + 0,4 % boue			ES + 0,8 % boue			ES + 1,4 % boue		
	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C
Constantes k1 (min⁻¹)												
k1	0,381	0,373	0,273	0,317	0,312	<i>0,315</i>	0,292	0,268	0,260	0,234	0,185	0,143
erreur-type	0,052	0,050	0,032	0,048	0,012	<i>0,009</i>	0,012	0,034	0,035	0,031	0,016	0,016
R ²	0,96	0,97	0,97	0,96	1,00	<i>1,00</i>	1,00	0,97	0,97	0,97	0,98	0,98
Constantes k2 (min⁻¹)												
k2	0,000	0,000	0,000	0,007	0,017	0,011	0,009	0,016	0,012	0,009	0,009	0,017
erreur-type	0,000	0,000	0,000	0,002	0,003	0,002	0,004	0,002	0,001	0,003	0,002	0,003
R ²	1,00	1,00	1,00	0,91	0,95	0,95	0,73	0,96	0,98	0,84	0,93	0,94
IL												
Ord k2	<i>-3,9</i>	-3,9	-3,3	<i>-3,2</i>	-3,0	-3,2	<i>-3,0</i>	-2,5	-2,6	-2,5	-2,4	-1,5
erreur-type	0,0	0,0	0,0	0,1	0,2	0,1	0,2	0,1	0,1	0,2	0,1	0,2

ENTÉROCOQUES

	ES			ES + 0,4 % boue			ES + 0,8 % boue			ES + 1,4 % boue		
	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C
Constantes k1 (min⁻¹)												
k1	<i>0,272</i>	0,210	0,207	0,163	0,177	0,202	0,123	0,179	0,150	0,113	0,100	0,083
erreur-type	<i>0,010</i>	0,018	0,023	0,005	0,012	0,005	0,014	0,011	0,012	0,003	0,012	0,021
R ²	<i>1,00</i>	0,98	0,98	1,00	0,99	1,00	0,97	0,99	0,99	1,00	0,97	0,89
Constantes k2 (min⁻¹)												
k2	<i>0,002</i>	0,008	0,009	0,014	0,012	0,022	0,012	0,014	0,014	0,016	0,023	0,018
erreur-type	<i>0,005</i>	0,006	0,006	0,004	0,004	0,003	0,002	0,003	0,005	0,004	0,005	0,002
R ²	<i>0,07</i>	0,53	0,53	0,87	0,82	0,97	0,92	0,91	0,82	0,89	0,92	0,96
IL												
Ord k2	<i>-2,8</i>	-2,2	-2,3	<i>-1,9</i>	-2,2	-2,2	-2,0	-1,9	-2,0	-1,6	-1,0	-0,7
erreur-type	<i>0,3</i>	0,3	0,3	0,2	0,2	0,2	0,1	0,2	0,3	0,2	0,3	0,1

Annexe D

Fiches techniques des medias filtrants et des
coagulants utilisés pour l'optimisation de la filtration

BB 1/2,5

sable extra-siliceux sec

Composition chimique type

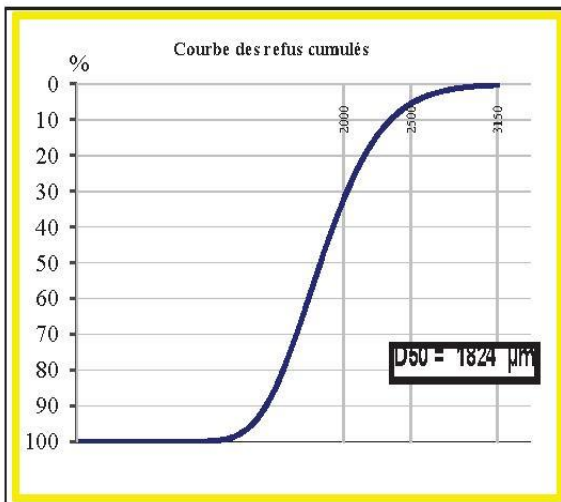
SiO ₂	99,01 %
Fe ₂ O ₃	0,025 %
Al ₂ O ₃	0,700 %
TiO ₂	0,025 %
CaO	0,010 %
K ₂ O	0,200 %

Caractéristiques physiques types

densité réelle (Pycnomètre)	2,65
dureté (Mohs)	7
pH	# 7
densité apparente sable sec	1,6
perte au feu (à 1000°C)	Maxi 0,20%
résistance pyroscopique (SFC ISO R528)	1750 °C
T.E.N.	1,42 mm
C.U.	1,4

GRANULOMETRIE MOYENNE STATISTIQUE

(% en masse - Valeurs indicatives)

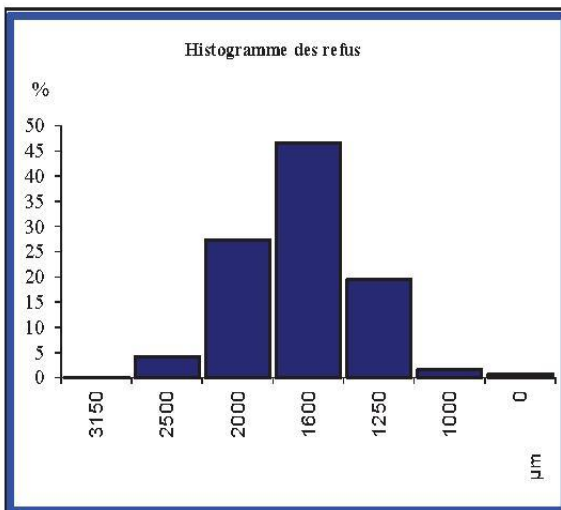


TAMISAGE AFNOR X.11-507

ouverture des mailles µm	refus cumulés %
> 3150 µm	0
> 2500 µm	4,2
> 2000 µm	31,6
> 1600 µm	78,0
> 1250 µm	97,6
> 1000 µm	99,3
> 0 µm	100

TAMISAGE AFNOR X.11-507

Classe µm	refus par tamis %
> 3150 µm	0
3150-2500 µm	4,2
2500-2000 µm	27,3
2000-1600 µm	46,5
1600-1250 µm	19,6
1250-1000 µm	1,7
Passant	0,7



SIBELCO
EUROPE

BB 0,8/1,8

sable extra-siliceux sec

Fiche Technique Type

Composition chimique type

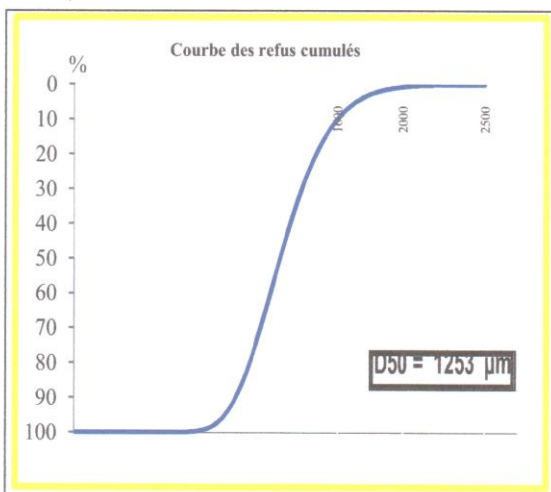
SiO ₂	99,70 %
Fe ₂ O ₃	0,025 %
Al ₂ O ₃	0,700 %
TiO ₂	0,025 %
CaO	0,010 %
K ₂ O	0,200 %

Caractéristiques physiques types

densité réelle (Pycnomètre)	2,65
dureté (Mohs)	7
pH	# 7
densité apparente sable sec	1,6
perte au feu (à 1000°C)	Maxi 0,20%
résistance pyroscopique (SFC ISO R528)	1750 °C
T.E.N.	0,985 mm
C.U.	1,35

GRANULOMETRIE MOYENNE STATISTIQUE

(% en masse - Valeurs indicatives)

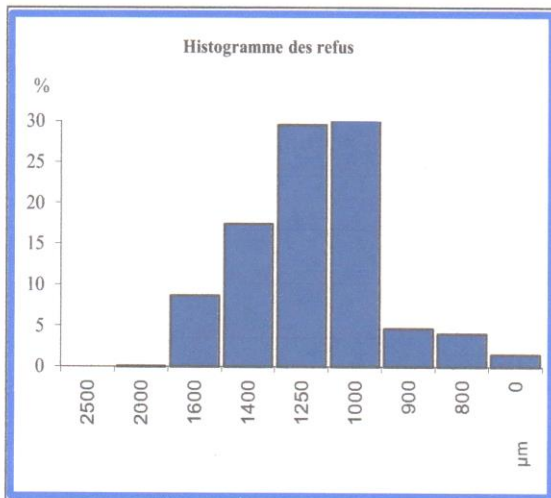


TAMISAGE AFNOR X.11-507

ouverture des mailles µm	refus cumulés %
> 2500 µm	0
> 2000 µm	0,1
> 1600 µm	8,7
> 1400 µm	26,2
> 1250 µm	55,7
> 1000 µm	89,8
> 900 µm	94,5
> 800 µm	98,5
> 0 µm	100

TAMISAGE AFNOR X.11-507

Classe µm	refus par tamis %
> 2500 µm	0
2500-2000 µm	0,1
2000-1600 µm	8,6
1600-1400 µm	17,5
1400-1250 µm	29,5
1250-1000 µm	34,1
1000-900 µm	4,7
900-800 µm	4,0
Passant	1,5



Chlorure ferrique



FICHE DE SPECIFICATIONS

Nom du produit : **CHLORURE FERRIQUE 40% EN888**

Code produit : **1500**

Fe Cl₃

MM : 162,2

CARACTERISTIQUES	METHODES	UNITES	SPECIFICATIONS	VALEUR TYPE
Aspect			Liquide brun foncé	
Densité à 20° C			1,424 ± 0,025	
Fe Cl ₃		%	40 ± 1	
Acidité		g/l		569 ± 20
Fe ²⁺		g/l		7
Mn		%	< 0,3	
Pb		mg/kg Fe ³⁺	< 3000	
Ni		mg/kg Fe ³⁺	< 100	
Cr		mg/kg Fe ³⁺	< 350	
Cd		mg/kg Fe ³⁺	< 350	
Sb		mg/kg Fe ³⁺	< 25	
As		mg/kg Fe ³⁺	< 20	
Hg		mg/kg Fe ³⁺	< 5	
Se		mg/kg Fe ³⁺	< 20	
Température de début de cristallisation		° C		- 13
Viscosité à 20° C		cPo		13

Ce produit répond aux critères de pureté de la norme EN 888, niveau 1, type 2 (produit de traitement de l'eau destinée à la consommation humaine)

Emis par : Service Qualité

le 2005-05-26

IR :13

Vérfié et approuvé par : QHSE

Adresse de contact :

B.P. 89152 - 35091 RENNES Cedex 9 - FRANCE

Tel. : +33 (0) 2 99 29 46 00 Fax : +33 (0) 2 99 30 52 12

web : www.quaron.com

« le contenu de cette documentation relatif aux applications, n'engage en rien notre responsabilité. Tous les renseignements sont donnés à titre indicatif et les conditions d'emploi doivent être adaptées à chaque cas particulier par l'utilisateur. »

Coagulants organiques

Polyamine

PolyDADMAC



FLOQUAT	FL 3150	FL 4440	FL 4450
Charge density <i>Densité de charge</i>	Very High <i>Très Forte</i>	Very High <i>Très Forte</i>	Very High <i>Très Forte</i>
Specific Gravity <i>Densité</i>	1.14	1.08	1.10
Approximate Brookfield viscosity (cps) * <i>Viscosité Brookfield approximative (cps)</i>	5000	2000	10 000
pH <i>pH</i>	5.0	6.0	6.0
Non volatile solids (%) <i>Solides non volatiles (%)</i>	50	40	50
Shelf life (months) # <i>Stabilité (mois)</i>	24	24	24
Storage temperature (°C) <i>Température de stockage (°C)</i>	0-35	0-35	0-35
Freezing point (°C) <i>Point de congélation (°C)</i>	< -3	< -3	< -3

NNT : 2017LYSEM018

Erwan CARRÉ

BIOLOGICAL QUALITY OF TREATED WASTEWATER WITH THE AIM OF RECLAMATION

Speciality: Environmental Science

Keywords: wastewater reclamation, indicator microorganisms enumeration, UV disinfection, sand filtration, UV/Visible spectrometry

Abstract:

Wastewater reclamation is an ongoing and promising alternative resource in a context of water stress. In particular, this is a major issue in the Mediterranean region, and its effects tend to be intensified by global warming. The main objective of this PhD thesis is to define the conditions for ensuring the reliability of a tertiary treatment chain for wastewater reclamation. The first part deals with the limits of the methods used in routine for the enumeration of indicator microorganisms, in relation with particulate contamination. The results indicate that there is a risk of underestimation by these methods for high loads of suspended matter.

Ultraviolet (UV) disinfection has been used for years to ensure the biological safety of reclaimed water. The second part of this work aims to understand the mechanisms which may affect the efficiency of UV disinfection. A linear relationship has been observed between the particulate contamination of the effluents to be treated and the disinfection efficiency loss, featured on one hand by the decrease of the inactivation constant of the microorganisms and on the other hand by the risk of tailing (UV-resistant fraction among the microorganisms).

The implementation of a pre-filtration is thus necessary before UV disinfection. The third part of this work enabled to identify the filtration parameters suited for the effluents to be treated. Finally, quality control on the whole chain is considered, in particular with the demonstration of feasibility of a continuous control system based on UV/Visible spectrometry.

NNT : 2017LYSEM018

Erwan CARRÉ

QUALITÉ BIOLOGIQUE DES EAUX USÉES TRAITÉES EN VUE DE LA RÉUTILISATION

Spécialité : Sciences et Génie de l'Environnement

Mots clefs : réutilisation des eaux usées traitées, dénombrement des microorganismes indicateurs, désinfection UV, filtration sur sable, spectrométrie UV/Visible

Résumé :

La réutilisation des eaux usées traitées (REUT) constitue une ressource alternative pérenne et à fort potentiel notamment pour les régions soumises à un stress hydrique. Le bassin méditerranéen est particulièrement concerné par cette problématique, accentuée par le réchauffement climatique. L'objectif général de cette thèse est de définir les conditions nécessaires pour garantir la fiabilité d'une filière de traitement tertiaire pour la réutilisation. La première partie s'intéresse aux limites des méthodes de dénombrement des microorganismes indicateurs couramment employées, notamment en lien avec la contamination particulière des effluents. Les résultats indiquent qu'il existe un risque de sous-estimation par ces méthodes pour de fortes charges en matières en suspension.

La désinfection par rayonnement ultraviolet (UV) est souvent employée pour garantir la qualité sanitaire de l'eau distribuée. La deuxième partie de cette thèse vise à comprendre les mécanismes pouvant affecter l'efficacité des UV. Une corrélation linéaire a pu être mise en évidence entre la contamination particulière des effluents à traiter et la baisse d'efficacité de la désinfection UV, caractérisée d'une part par la diminution de la constante d'inactivation des microorganismes exposés aux UV et d'autre part par le risque d'apparition d'un effet de traîne (fraction de microorganismes insensibles aux UV).

La mise en place d'un prétraitement par filtration s'avère donc nécessaire en amont de la désinfection UV. La troisième partie de cette thèse a permis de définir les paramètres opératoires les plus adaptés à l'effluent. Enfin, le contrôle de la qualité sur l'ensemble de la filière est envisagé, avec notamment la démonstration de faisabilité d'un système de surveillance en continu basé sur la spectrométrie UV/Visible.