



**HAL**  
open science

# Effet des procédés photo-oxydatifs sur les interactions entre les communautés microbiennes et l’huître creuse *Crassostrea gigas*

Cécile Blanchon

► **To cite this version:**

Cécile Blanchon. Effet des procédés photo-oxydatifs sur les interactions entre les communautés microbiennes et l’huître creuse *Crassostrea gigas*. Biologie animale. Université de Perpignan, 2023. Français. NNT : 2023PERP0047 . tel-04678765

**HAL Id: tel-04678765**

**<https://theses.hal.science/tel-04678765v1>**

Submitted on 27 Aug 2024

**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.

## THÈSE DE DOCTORAT

---

Effet des procédés photo-oxydatifs sur les interactions entre communautés microbiennes et l'huître creuse *Crassostrea gigas*

---

Présentée en vue de l'obtention du grade de docteur en **Biologie** de l'**Université de Perpignan Via Domitia**

*Ecole Doctorale n°305 – Énergie Environnement (ED305)*

Présentée par **Cécile BLANCHON**

Co-dirigée par **Christophe CALVAYRAC** et **Gaël PLANTARD**

Co-encadrée par **Eve TOULZA**

Soutenue publiquement **8 décembre 2023** devant le jury composé de

<b>Valérie KELLER</b> Directrice de Recherche, ICPEES	Rapportrice
<b>Guillermina HERNANDEZ-RAQUET</b> Directrice de Recherche, INRAE	Rapportrice
<b>Natalie WERY</b> Directrice de Recherche, INRAE	Examinatrice
<b>Julie MENDRET</b> Maître de Conférences HDR, Institut Européen des Membrane	Examinatrice
<b>Christophe STAVRAKAKIS</b> Ingénieur de Recherche, Ifremer	Examineur
<b>Lise BARTHELMEBS</b> Professeure des Universités, UPVD	Examinatrice
<b>Gaël PLANTARD</b> Professeur des Universités, UPVD	Co-directeur de thèse
<b>Christophe CALVAYRAC</b> Maître de Conférences HDR, UPVD	Co-directeur de thèse
<b>Eve TOULZA</b> Maître de Conférences, UPVD	Co-encadrante de thèse (Invitée)





## Remerciements

Je tiens tout d'abord à exprimer ma profonde gratitude envers Mme Valérie Keller et Mme Guillermina Hernandez-Raquet d'avoir accepté d'être les rapporteuses de ce travail, ainsi qu'envers Mme Natalie Wery, Mme Julie Mendret, M. Christophe Stavrakakis et Mme Lise Barthelmebs pour leur précieuse contribution en tant que membres de mon jury de thèse.

Je souhaite également adresser mes remerciements à l'Université de Perpignan pour le financement de cette thèse.

Un merci tout particulier à mes directeurs de thèse M. Gaël Plantard, Mme Eve Toulza et M. Christophe Calvayrac pour leur soutien, leur patience et leur écoute toute au long de cette thèse. Je remercie également Mme Dominique Patureau, M. Dominique Munaron, M. Christophe Stavrakakis et M. Vincent Goetz, membres de mon CSI, pour leurs contributions scientifiques et leur suivi attentif de mon travail.

De l'Observatoire Océanographique de Banyuls-sur-Mer, je remercie M. Pascal Roman et Mme Nancy Trouillard pour m'avoir fourni l'eau nécessaire à mes expérimentations. Je remercie également M. David Pequer et Mme Marie Line Escande pour leur aide à la mise en place des protocoles de microscopie. De même, je remercie M. Gaël Simon et Mme Elisabeth Faliex du CEFREM de m'avoir permis d'accéder à l'animalerie poisson de l'Université pour que je puisse expérimenter dans de bonnes conditions.

Du CREER de l'IMT Mines d'Alès, je remercie M. François Lestremau, M. Andrès Sauvetre et Mme Marine Bertrand pour leur collaboration précieuse dans le cadre de cette thèse. Merci de m'avoir accueillie pendant un mois dans leur équipe et formée sur l'utilisation des échantillonneurs passifs de la pose sur le terrain jusqu'à l'analyse des résultats en passant par la mise au point des méthodes de chromatographies.

Un grand merci à l'ensemble de mes collègues et doctorants de l'IHPE pour leur accueil chaleureux et les bons moments partagés lors des doctoriales et autres événements. Je tiens à remercier tout particulièrement Marie-Agnès, Jean-Michel et Arnaud pour avoir fourni les souches de pathogènes utilisées dans cette thèse, ainsi que pour leur temps et les échanges que nous avons eus. Je souhaite également exprimer ma reconnaissance envers toute l'équipe MIA, en particulier Caroline et Jérémie, pour leur précieuse aide dans la mise au point des infections expérimentales et l'analyse des données de barcoding. Enfin, un grand merci à Jean-François pour sa disponibilité et son soutien, ainsi qu'à David pour m'avoir accordé du temps pour la microscopie à fluorescence.

Je souhaite remercier chaleureusement tous mes collègues et doctorants de PROMES pour leur accueil toujours bienveillant, même en l'absence fréquente. Un grand merci à Amine, Kadar, Eliott, Romain et Antoine pour les soirées jeux de société et les moments de détente. Je tiens à remercier tout particulièrement Stanislawka pour avoir travaillé à mes côtés dans la bonne humeur, pour son soutien constant tout au long de ces trois années de thèse et tous ces moments partagés ensemble.

Mes remerciements vont également à l'ensemble de l'équipe du BAE, en espérant n'oublier personne, Gaëlle, Georges, Thierry, Carole, Lise, Lynn et Michel, merci pour la bonne ambiance générale, les discussions, les bons gâteaux et les repas crêpes. Merci à la team BAE, Aude, Claire, Guillaume, Hugo et Chloé, aucun Escape Game de Perpignan ne nous résiste.

Je tiens également à exprimer ma gratitude envers le personnel administratif des laboratoires PROMES, IHPE et BAE, Virginie, Romie, Sandrine, Camille, Diane et Anne, merci pour avoir grandement facilité le quotidien.

Enfin, mes derniers remerciements vont à ma famille, pour leur amour inconditionnel et leur patience infinie. Un merci particulier à mes parents, qui ont suscité mon intérêt pour les sciences et m'ont encouragé à persévérer malgré les difficultés. Je tiens à remercier mon frère pour sa présence constante et son aide précieuse pour résoudre mes problèmes informatiques. Et enfin, merci à Alexandre pour son soutien, ses encouragements et son aide lors des moments les plus difficiles de la rédaction de ce manuscrit.





## Table des matières

<b>Introduction générale.....</b>	<b>1</b>
<b>Chapitre 1 : Contexte Scientifique.....</b>	<b>5</b>
<b>I. Présentation du modèle d'étude : l'huître creuse <i>Crassostrea gigas</i>.....</b>	<b>7</b>
<b>II. Les maladies de l'huître .....</b>	<b>9</b>
A. Focus sur <i>Vibrio harveyi</i> .....	9
B. Focus sur le POMS, une maladie polymicrobienne et multifactorielle.....	10
<b>III. Effet des contaminants chimiques de l'eau de mer sur les huîtres .....</b>	<b>14</b>
A. Effet des contaminants chimiques sur les huîtres .....	14
B. Prévalence dans l'environnement : exemple d'un lieu de production ostréicole local , la lagune de Salses-Leucate .....	15
<b>IV. Un procédé de traitement de l'eau : la photocatalyse hétérogène.....</b>	<b>17</b>
A. Présentation générale du procédé .....	17
B. Principe de l'inactivation microbienne et potentielles applications pour le traitement de l'eau de mer : Article 1 – Next Sustainability .....	22
<b>Objectifs de la thèse .....</b>	<b>37</b>
<b>Chapitre 2 : Inactivation de pathogènes d'huître et effet du traitement de photocatalyse</b>	<b>41</b>
<b>I. Introduction.....</b>	<b>43</b>
<b>II. Étude préliminaire : Effet du catalyseur sur les huîtres.....</b>	<b>44</b>
A. Matériels et Méthodes .....	44
Résultats.....	47
<b>III. Effets des traitements photo-oxidatifs sur les pathogènes d'huîtres cibles et le microbiote de l'eau de mer .....</b>	<b>52</b>
Article 2: "Inactivation of two oyster pathogens by photo-oxidation and monitoring of changes in the microbiota of seawater: a case study on <i>Ostreid Herpes Virus 1 µVar</i> and <i>Vibrio harveyi</i> " .....	53
<b>Chapitre 3 : Étude de l'inactivation de <i>Vibrio harveyi</i> par photocatalyse hétérogène .....</b>	<b>87</b>
<b>I. Introduction.....</b>	<b>89</b>
<b>II. Étude préliminaire : inactivation par photocatalyse et caractérisation de la souche de <i>Vibrio harveyi</i> utilisée .....</b>	<b>90</b>
A. Caractérisation de la souche de <i>Vibrio harveyi</i> .....	90
B. Inactivation de la souche de <i>Vibrio harveyi</i> par photocatalyse .....	93
III. Prédiction de l'efficacité du traitement photocatalytique pour l'aquaculture .....	102
Article 3 : "Trials and in silico simulations to predict daily photo-oxidative capacity under solar conditions: A case study on the inactivation of oyster pathogenic bacteria, <i>Vibrio harveyi</i> ." .....	103
<b>IV. Résultats complémentaires : passage en réacteur continu et saturation du catalyseur .</b>	<b>142</b>
A. Inactivation par photocatalyse hétérogène, passage à une alimentation continue du photo-réacteur	142
B. Saturation de la surface du dioxyde de titane par les bactéries et/ou débris cellulaires.....	143
C. Recouvrement du dioxyde de titane par les sels.....	146
<b>V. Conclusions et perspectives .....</b>	<b>147</b>

<b>Conclusion générale et perspectives .....</b>	<b>149</b>
<b>Annexes .....</b>	<b>155</b>
<b>Annexe N°1 : Analyse de la contamination chimique de la lagune de Salses-Leucate .....</b>	<b>157</b>
<b>Annexe N°2 : Supplementary file de l'article N°1 .....</b>	<b>184</b>
<b>Annexe N°3 : Analyse de la méthode de traitement adéquate pour les résultats de metabarcoding : choix ASV / OTU FROGS.....</b>	<b>186</b>
<b>Annexe N°4 : Supplementary file de l'article N°2 .....</b>	<b>190</b>
<b>Annexe N°5 : Typage biochimique de la souche de <i>Vibrio harveyi</i> .....</b>	<b>193</b>
<b>Annexe N°6 : Code matlab utilisé pour la simulation Chapitre 3, article N°3.....</b>	<b>193</b>
<b>Référence : .....</b>	<b>194</b>

## Sommaire des illustrations

### Liste des figures

Figure 1 : Évolution de la production d’huître par espèce en France (FAO, 2022) .....	7
Figure 2 : (a) Anatomie de l’huître creuse avec les principaux organes (France Naissain, 2022) (b) Cycle de vie de l’huître creuse adapté de King et al., 2019a .....	8
Figure 3 : Changement morphologique et intégrité de <i>Vibrio harveyi</i> incubé à +30°C dans de l’eau de mer. Images obtenues par Microscopie Electronique à Balayage pour des cellules de l’inoculum initial (control) ainsi que celles incubées à +30°C respectivement pendant 3, 6 et 21 jours (Montánchez et al., 2019).....	9
Figure 4 : Processus de développement du POMS (Petton et al., 2021) .....	12
Figure 5 : Effet de la nutrition sur le POMS (Petton et al., 2021).....	14
Figure 6 : Effet inhibiteurs et promoteurs des différents AOP (adapté de Lado Ribeiro et al., 2019).....	18
Figure 7 : Effet d’une exposition ponctuelle au dioxyde de titane sur la survie des huîtres, courbe de survie (Kaplan-Meyer) obtenue pour des huîtres injectées avec du dioxyde de titane micrométrique au début du suivi (0 h) .....	47
Figure 8 : Effet d’une exposition ponctuelle au dioxyde de titane sur le microbiote des huîtres, représentation en PCoA de la dissimilarité de Bray-Curtis (•) huîtres de références, non exposées au TiO <sub>2</sub> mais ayant été injectées avec de l’eau de mer filtrée, et (●) huîtres 24 h après exposition au TiO <sub>2</sub> par une injection directement dans le muscle adducteur. ....	48
Figure 9 : Effet d’une exposition prolongée au dioxyde de titane sur le microbiote des huîtres (a) représentation en PCoA de la dissimilarité de Bray-Curtis (•) huîtres de références 24 h après la mise en eau, non exposées au TiO <sub>2</sub> , (●) huîtres après 24 h d’expositions au TiO <sub>2</sub> , (●) huîtres de références 10 jours après la mise en eau, non exposées au TiO <sub>2</sub> , et (●) huîtres après 10 jours d’exposition au TiO <sub>2</sub> , (b) genres bactériens significativement modifiés par l’exposition au TiO <sub>2</sub> , log <sub>2</sub> fold change (avec une p-value ajustée < 0.05) animaux exposés 24 h comparé au non exposés, et (c) genres bactériens significativement modifiés par l’exposition au TiO <sub>2</sub> , log <sub>2</sub> fold change (avec une p-value ajustée < 0.05) animaux exposés 10 jours comparé au non exposés. ....	51
Figure 10: protocole de dépôt pour le dénombrement des <i>Vibrio harveyi</i> vivants.....	91
Figure 11 : caractérisation de la souche de <i>Vibrio harveyi</i> exprimant le plasmide pFD086 (GFP, TrimR) : (a) cinétique de croissance en milieu Zobell/triméthoprime pour la souche modifiée avec le plasmide (x) ou en milieu Zobell pour la souche sauvage (x), et (b) corrélation DO / UFC pour la souche modifiée avec le plasmide. Chaque point expérimental représente la valeur moyenne de 3 expérimentations indépendantes avec un coefficient de variation inférieur à 35%. ....	92
Figure 12 : cinétique de croissance en eau de mer naturelle pour la souche de <i>Vibrio harveyi</i> avec le plasmide pFD086 (GFP, TrimR). Chaque point expérimental représente la valeur moyenne de 3 expérimentations indépendantes avec un coefficient de variation inférieur à 35%. ....	93
Figure 13 : (a) protocole de préparation de l’aeroperl utilisé pour les expériences de photocatalyse, et (b) distribution de taille en% volumique d’aeroperl (o) avant et (•) après le protocole de préparation (Dezani, 2021).....	94
Figure 14 : adhérence de <i>Vibrio harveyi</i> (a) à différentes salinités (pour un pH de 8), et (b) à différents pH (pour une salinité de 35 PSU). Les expérimentations d’adhérence ont duré 5 h et ont été réalisées en eau de Lewis agitée et placée à l’abri de toutes sources d’UV. Chaque	



point expérimental représente la valeur moyenne de 3 expérimentations indépendantes avec un coefficient de variation inférieur à 35%.....	96
Figure 15: présentation du réacteur utilisé (a) photo du montage expérimental, (b) schéma du réacteur, le circuit en orange correspond à un fonctionnement continu du réacteur, et (c) photo de la face avant du photo-réacteur.....	97
Figure 16 : caractéristiques du panneau de LED utilisé (Dezani, 2021), (a) spectre d'émission normalisé par rapport à la densité de flux incidente, et (b) courbe d'étalonnage obtenue pour une mesure effectuée avec un capteur UV situé au centre de la face incidente du photo-réacteur situé à 14 cm du panneau de LED .....	98
Figure 17 : cinétique d'inactivation par photolyse (irradiation UVA à 45 W.m <sup>-2</sup> ) en eau de mer naturelle pour la souche de <i>Vibrio harveyi</i> avec le plasmide pFD086 (GFP, TrimR) (x), ou sauvage (x). Chaque point expérimental représente la valeur moyenne de 3 expérimentations indépendantes avec un coefficient de variation inférieur à 35%. .....	100
Figure 18 : photocatalyse de <i>Vibrio harveyi</i> (a) à différentes densités de flux (10 W.m <sup>-2</sup> (x), 20 W.m <sup>-2</sup> (x), 35 W.m <sup>-2</sup> (x), et 45 W.m <sup>-2</sup> (x)), et (b) différente concentration bactérienne (à 35 W.m <sup>-2</sup> ). Les expériences de photocatalyse ont été réalisées en eau de mer naturelle (pH 8 et salinité de 35 PSU) avec une concentration de 4 g.L <sup>-1</sup> de dioxyde de titane aeroperl. Chaque point expérimental représente la valeur moyenne de 3 expérimentations indépendantes avec un coefficient de variation inférieur à 35%.....	102
Figure 19 : comparaison des résultats expérimentaux de photocatalyse en système continu avec les simulations pour l'inactivation d'une solution d'eau de mer contenant 10 <sup>4</sup> UFC.mL <sup>-1</sup> de <i>Vibrio harveyi</i> ainsi que 4 g.L <sup>-1</sup> de dioxyde de titane aeroperl. Chaque point expérimental représente la valeur moyenne de 3 expérimentations indépendantes avec un coefficient de variation inférieur à 35%.....	143
Figure 20 : Observation des <i>Vibrio harveyi</i> à la surface du catalyseur au cours d'une cinétique d'inactivation par photocatalyse en réacteur continu. (a) à (e) sont les images obtenues par microscopie électronique à balayage et (f) à (j) les images obtenues par microscopie inversé (grossissement x25 (oil)) avec la GFP des bactéries vivantes en vert, à l'instant initiale (a) et (f), après 20 min (b) et (g), après 40 min (c) et (h), après 2 h (d) et (i), et après 5h30 de photocatalyse (e) et (j).....	146
Figure 21 : comparaison des cinétiques d'inactivation de <i>Vibrio harveyi</i> en réacteur fermé avec réutilisation du catalyseur entre les expériences d'inactivation d'une solution d'eau de mer contenant 10 <sup>4</sup> UFC.mL <sup>-1</sup> de <i>Vibrio harveyi</i> ainsi que 4 g.L <sup>-1</sup> de dioxyde de titane aeroperl pour une irradiation de 45 W.m <sup>-2</sup> . (·) première, (·) deuxième, et (·) troisième utilisation du TiO <sub>2</sub> .....	147
Figure 22 : principe du modèle SIR avec un exemple d'équation utilisé en virologie (Luz et al., 2010).....	148

## Liste des tableaux

Tableau 1 : exemple de photo-catalyseurs supportés ou sous forme de particules en suspension .....	21
Tableau 2 : Effet d'une exposition ponctuelle au TiO <sub>2</sub> (Photosphère) sur la composition du core microbiome (détection du gène codant pour l'ARNr 16S sur 9 répliquas par Metabarcoding) de l'huître ( <i>Crassostrea gigas</i> ) 24 h après l'exposition. ....	49
Tableau 3 : conditions expérimentales de photocatalyse en réacteur fermé .....	101
Tableau 4: conditions expérimentales de photocatalyse en fonctionnement continu .....	142

# Introduction générale



Au cours de la dernière décennie, les changements globaux ont eu un impact fort sur les maladies marines, causant des pertes économiques significatives, notamment pour les mollusques. Un exemple marquant de maladie causant des mortalités dévastatrices pour la production mondiale d'huîtres *Crassostrea gigas* est le "Pacific Oyster Mortality Syndrome" (POMS) qui peut causer des pertes de production pouvant aller jusqu'à 80%. Ce syndrome est une maladie complexe et polymicrobienne impliquant une infection virale par l'*Ostreid Herpes Virus 1* (*OsHV-1  $\mu$ Var*) et de multiples infections bactériennes, principalement par des *Vibrio* (De Lorgeril et al., 2018; King et al., 2019a). Cette maladie touche régulièrement les huîtres juvéniles depuis 2008 et son développement peut être favorisé par de multiples facteurs abiotiques (Petton et al., 2021). Aujourd'hui, les installations aquacoles appliquent essentiellement des méthodes de désinfection utilisant les UVC (Aguilar et al., 2018; Sharrer et al., 2005) ou la filtration (Cordier et al., 2020; Whittington et al., 2021). A ce jour, aucun procédé de traitement utilisé ne permet d'éliminer à la fois les pathogènes et les contaminants abiotiques qui pourraient avoir un impact sur le développement des huîtres. Le développement et la mise en place de procédés de traitement permettant d'agir sur ces deux compartiments semblent plus que pertinents car ils pourraient représenter un intérêt pour les professionnels du monde aquacole.

Le procédé que nous nous proposons d'étudier dans le cadre de ma thèse de doctorat est un procédé d'oxydation avancée appelé photocatalyse hétérogène. Contrairement aux UVC qui ont besoin d'être générés artificiellement, le procédé de photocatalyse hétérogène présente l'avantage de pouvoir utiliser la ressource solaire pour générer des espèces réactives de l'oxygène (ROS) responsables de la désinfection de l'eau à partir d'un catalyseur solide (Herrmann, 1999; Malato et al., 2009; Minero, 1999) ce qui en fait un procédé durable et peu coûteux en énergie. Ce procédé permet également d'agir sur tout le compartiment organique de l'eau sans faire de distinction entre contaminants biotiques et abiotiques. Depuis une décennie, de nombreux efforts de recherche ont été entrepris pour étudier ce procédé en eau douce et définir les capacités photo-oxydatives des photo-réacteurs aussi bien pour la désinfection (appliqué aux contaminants biotiques) (Kacem, 2015; Malato et al., 2009) que la décontamination (appliquée aux contaminants abiotiques). Toutefois, à ce jour, la photocatalyse hétérogène reste mal caractérisé en eau de mer et peu étudié pour l'inactivation de cibles microbiennes pathogènes ostréicoles telles que *Vibrio harveyi* ou l'*Ostreid Herpes Virus 1*, agents biologiques impliqués dans le développement du POMS.

Dans ce contexte, la problématique de mon sujet de thèse vise à la compréhension du procédé de photocatalyse hétérogène destiné à l'inactivation de pathogènes d'intérêts aquacoles. L'ensemble des résultats obtenus durant ce travail de thèse mettent en évidence l'avantage d'un tel procédé qui pourrait être appliqué pour la biosécurisation en aquaculture. Dans une première partie, cette thèse met en lumière l'efficacité du procédé de photocatalyse pour la désinfection bactérienne et virale en eau de mer. L'accent a également été mis, via une approche d'écologie microbienne, sur les changements globaux induits par le traitement sur la communauté microbienne de l'eau traitée. Dans une deuxième partie, des travaux de modélisation et de simulations permettent de démontrer la faisabilité d'un traitement photocatalytique durable basé sur l'utilisation de la ressource solaire en tant qu'outil alternatif aux traitements actuels. L'objectif étant de pouvoir prédire les conditions opératoires

d'inactivation bactérienne à appliquer dans le cadre d'installations aquacoles à grande échelle, en particulier pour gérer les discontinuités de la ressource solaire.

# Chapitre 1: Contexte Scientifique



## I. Présentation du modèle d'étude : l'huître creuse *Crassostrea gigas*

En France, la production conchylicole est l'une des plus importantes au niveau européen, c'est le premier producteur et exportateur d'huîtres en Europe (CNC, n.d.; Ministère de l'Agriculture et de la souveraineté alimentaire, 2022). L'ostréiculture représentait en 2013 la principale source de revenus de la filière conchylicole française avec 72% du chiffre d'affaires et plus de 50% des quantités globales produites (Ministère de l'Agriculture et de l'Alimentation, 2019). Le secteur de la conchyliculture emploie environ 20 000 personnes dans 2 872 établissements (CNC, n.d.), mais il s'agit d'un secteur fragile, car dépendant de la qualité de l'eau.

À la suite nombreuses épizooties dans les parcs à huîtres français entraînant des effondrements des productions d'huîtres plates *Ostrea edulis* en 1920 puis des huîtres portugaises *Crassostrea angulata*, en 1970 (France Naissain, 2023), une nouvelle espèce l'huître creuse du Pacifique *Crassostrea gigas* a été introduite depuis l'Asie. Aujourd'hui, l'ostréiculture française comme dans de nombreux autres pays repose largement sur cette espèce d'huîtres, représentant plus de 98% de la production. Or, depuis quelques années, *C.gigas* souffre également de mortalités récurrentes et ces épisodes de mortalités s'intensifient depuis 2008 (Figure 1).

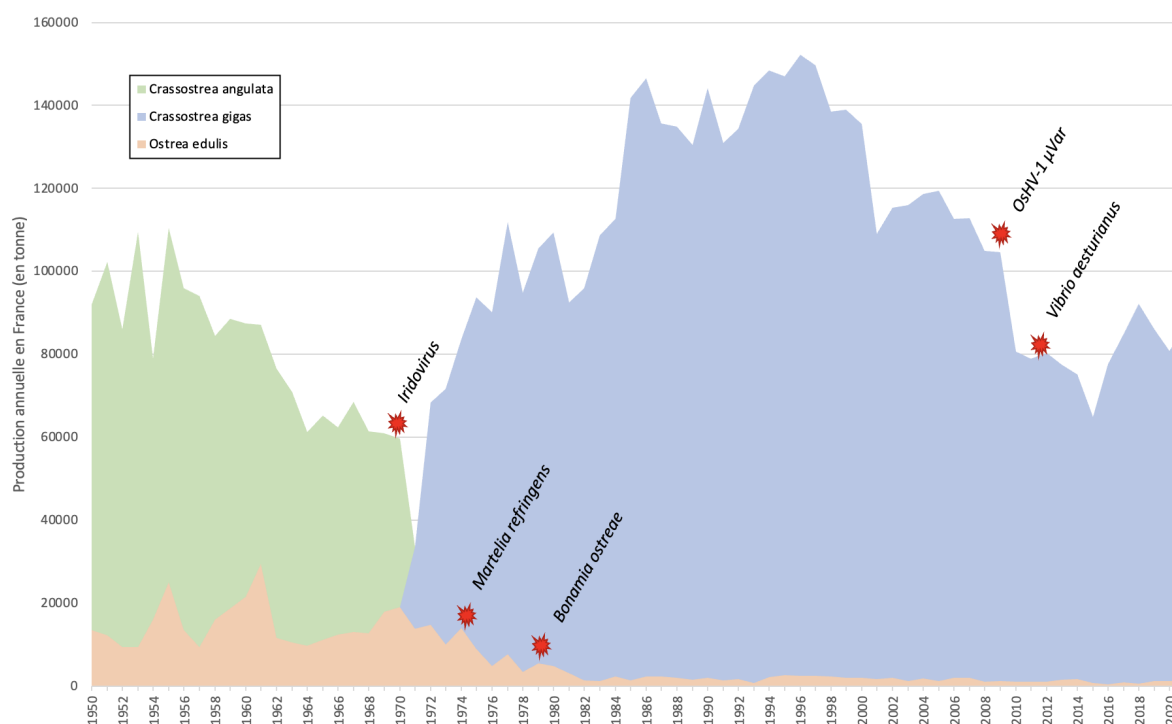


Figure 1 : Évolution de la production d'huître par espèce en France (FAO, 2022)

Les huîtres creuses sont des mollusques bivalves de la famille des *Ostreidae* au sein des Lophotrochozoaires. Aussi appelée huître japonaise ou huître du Pacifique, l'huître creuse appartient à l'espèce *Crassostrea gigas*.

Les fonctions vitales de l'huître creuse telles que la nutrition, la reproduction et la protection contre les attaques sont assurées par divers organes (Figure 2a). L'huître se compose d'un corps mou, protégé par une coquille de carbonate de calcium composée de deux valves reliées entre elles par un ligament élastique ainsi que par le muscle adducteur.



Cette coquille est produite par le manteau, fine couche de tissu conjonctif, de muscle et de nerf recouvert par une couche unicellulaire, avec qui elle est en contact. Le muscle adducteur permet d'ouvrir et de fermer la coquille de l'huître permettant ainsi l'entrée de l'eau et des éléments extérieurs vers les branchies qui filtrent l'eau pour en extraire les nutriments. L'hémolymphe représente le système circulatoire de l'huître et assure le transport de l'oxygène et des nutriments, mais joue aussi un rôle dans l'immunité grâce à la circulation de cellules immunocompétentes appelées hémocytes. Le système circulatoire de l'huître est dit semi-ouvert, c'est-à-dire que l'hémolymphe ou "sang de l'huître" n'est pas confinée dans des vaisseaux mais peut s'infiltrer dans les tissus. Les tissus de l'huître sont maintenus ensemble par un tissu conjonctif, appelé tissu de Leydig, formé de cellules et de matrices extracellulaires. C'est un lieu de stockage des réserves de glycogène qui permet de maintenir la structure du corps de l'huître (Galtsoff, 1964).

L'huître est un animal ectotherme (Galtsoff, 1964), autrement dit, un organisme dont la température corporelle varie avec celle du milieu extérieur. La température conditionne donc les fonctions physiologiques de l'animal (Le Moullac et al., 2007) et influence notamment le système immunitaire (Crandall et al., 2022; Li et al., 2023; Malham et al., 2009) et la croissance (Crandall et al., 2022; Kheder et al., 2010). Par ailleurs, c'est également un organisme hermaphrodite successif protandre, mâle la première année puis femelle, l'huître changeant de sexe à chaque saison (Guo et al., 1998). La production des gamètes est assurée par la gonade et est dépendante des saisons (le cycle de gamétogenèse est mis en place au printemps lorsque la température de l'eau augmente, entre +18°C et +22°C) et du cycle de reproduction. La fécondation des gamètes (mâles et femelles) produites a lieu dans l'eau environnante, c'est une fécondation externe qui produit des larves planctoniques. Ces larves se métamorphosent au bout de 2 à 3 semaines (Figure 2b), après avoir trouvé un substrat sur lequel se fixer pour devenir un naissain puis une huître adulte. Cette phase s'appelle phase benthique et suit la phase pélagique totalement larvaire. Une fois le stade larvaire passé, les huîtres sont considérées comme des juvéniles avant de devenir adultes avec une taille commerciale après 12 à 40 mois de croissance.

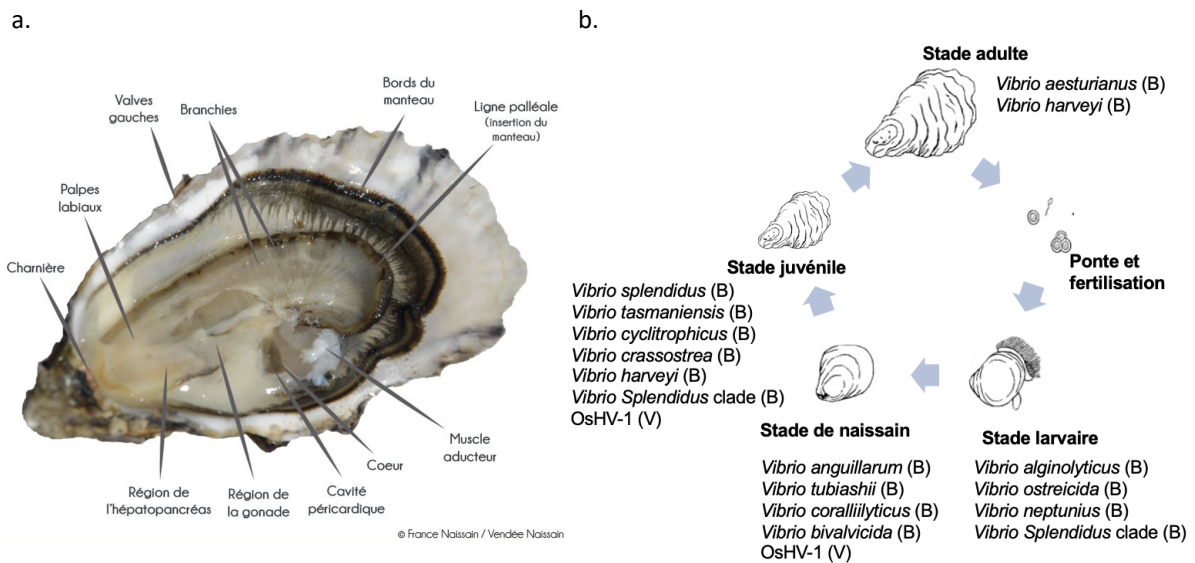


Figure 2 : (a) Anatomie de l'huître creuse avec les principaux organes (France Naissain, 2022) (b) Cycle de vie de l'huître creuse adapté de King et al., 2019a

## II. Les maladies de l'huître

Tout au long de sa vie, l'huître, incapable de se mouvoir une fois fixée, est soumise à de nombreux épisodes de mortalités (Figures 1 et 2b). Les facteurs environnementaux (biotiques ou abiotiques) de l'huître influençant la pathogénèse sont ici détaillés en s'attardant principalement sur le cas du "Pacific Oyster Mortality Syndrome" (POMS), maladie plus répandue affectant les huîtres juvéniles, et de l'une des bactéries fréquemment retrouvée associée à cette maladie, la bactérie *Vibrio harveyi*.

### A. Focus sur *Vibrio harveyi*

Les bactéries du genre *Vibrio* sont des bactéries Gram négatif d'un diamètre de 0,5 à 1 µm et d'une longueur de 1,2 à 3,5 µm. Ces bactéries sont très abondantes dans les milieux aquatiques (mers, océans, estuaires...), souvent mobiles grâce à leurs flagelles, elles peuvent se présenter sous différentes formes et en particulier, planctonique libre, biofilm, ou associées à des organismes hôtes (Thompson et al., 2004). Les *vibrios* sont des bactéries qui ne produisent pas de spores, elles sont aérobies/anaérobies, facultatives, halophiles, et ont un métabolisme fermentaire facultatif (Thompson et al., 2004). Le genre des *vibrios* comprend 147 espèces identifiées en 2022 (Sampaio et al., 2022) et appartient à la famille des *Vibrionaceae* et à la classe des *Gamma proteobacteria*.

Initialement, *V.harveyi* était identifié comme *Achromobacter harveyi* en honneur au pionnier de l'étude des bactéries bioluminescentes, Edmund Newton Harvey (Johnson and Shunk, 1936), et appartenait au genre *Lucibacterium* (Hendrie et al., 1970) pour ensuite être associé à celui *Beneckeia* (Reichelt and Baumann, 1973) pour enfin finir par être inclus dans celui des *Vibrio* et plus particulièrement dans le clade Harveyi (Urbanczyk et al., 2013). C'est une bactérie connue pour ses propriétés hyper-mutagènes et sa capacité à développer des résistances aux antibiotiques. Parmi l'ensemble des souches de *Vibrios harveyi* certaines sont bioluminescentes et utilisent cette bioluminescence dans le quorum sensing (Montánchez and Kaberdin, 2020). Les changements morphologiques et métaboliques ont également lieu lorsque les bactéries sont soumises à des stress thermiques ou un manque de nutriments dans le milieu (figure 3). *V.harveyi* peut ainsi former des biofilms et/ou augmenter l'expression de facteur de virulence en cas de stress (Montánchez et al., 2019; Montánchez and Kaberdin, 2020).

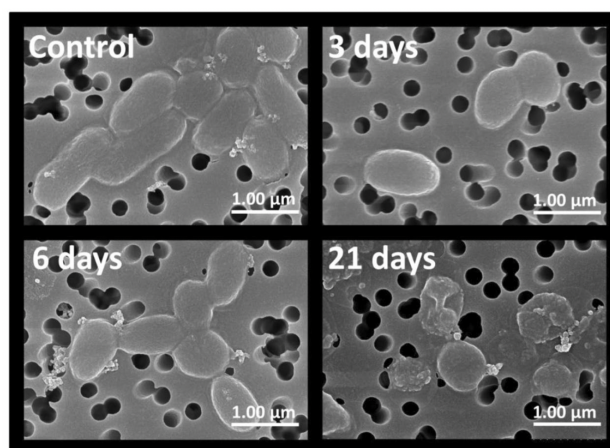


Figure 3 : Changement morphologique et intégrité de *Vibrio harveyi* incubé à +30°C dans de l'eau de mer. Images obtenues par Microscopie Electronique à Balayage pour des cellules de l'inoculum initial (control) ainsi que celles incubées à +30°C respectivement pendant 3, 6 et 21 jours (Montánchez et al., 2019)

Le génome de *Vibrio harveyi* a été obtenu en 2015 pour la première fois par Wang et al. (Wang et al., 2015). Aujourd'hui, il existe plusieurs autres génomes de *V.harveyi* séquencés et annotés et dont la longueur varie entre 5.88 et 6.18 Mb. Comme pour les autres *vibrios*, le génome de *Vibrio harveyi* est composé de deux chromosomes circulaires de tailles différentes. Le chromosome 1, d'une taille de 3.56 à 3.72 Mb, contient les gènes de la fonction cellulaire (réplication, transcription, traduction...), ainsi que des gènes de virulence. Le chromosome 2, d'une taille de 2.22 à 2.32 Mb, contient essentiellement des gènes codant pour des protéines hypothétiques, ainsi qu'une région variable appelée "super intégrons" (Grimes et al., 2009). Les séquençages de génome de diverses souches et de diverses espèces de *Vibrio* ont permis de montrer la présence de deux "génomes". Un génome composé de gènes communs à toutes les souches d'une même espèce appelé "core" génome et un génome variable comprenant des gènes acquis par transferts horizontaux.

Certaines souches de *Vibrio harveyi* sont connues comme étant des pathogènes associées à des maladies de nombreux organismes marins vertébrés et invertébrés dont notamment l'huître creuse *Crassostrea gigas* (Go et al., 2017; King et al., 2019b; Oyanedel et al., 2023; Saulnier et al., 2010; Wang et al., 2021). En effet, entre 2003 et 2007 presque une trentaine de souches de *Vibrio harveyi* ont été identifiées lors d'épisodes de mortalité en France (soit 23% des bactéries identifiées lors de ces épisodes de mortalités) dont plus de la moitié s'avèrent être virulentes lors d'infection expérimentale chez l'huître juvénile. Cette virulence est très rapide puisque le pic de mortalité chez les huîtres infectées avec *Vibrio harveyi* apparaît dans les 20 h contre quelques jours pour *Vibrio aesturianus* (une bactérie pathogène d'huître largement étudiée) (Saulnier et al., 2010). Certaines souches de *V.harveyi* induisent également des mortalités chez les huîtres adultes, notamment associées à une atrophie du muscle adducteur, (Go et al., 2017; King et al., 2019b; Wang et al., 2021) ou peuvent être associées à d'autres *Vibrios* ou virus lors d'épisodes de mortalité comme cela sera décrit par la suite dans le cadre du POMS (King et al., 2019b; Oyanedel et al., 2023).

### B. Focus sur le POMS, une maladie polymicrobienne et multifactorielle

Depuis 2008 la production d'huître creuse *Crassostrea gigas* fait face à des pertes importantes causées par un fort taux de mortalité chez les juvéniles. Ces mortalités peuvent atteindre des taux allant jusqu'à 80% et en France, le POMS peut décimer plus de 35% de la production chaque année (ECOSCOPA, 2020) ce qui engendre des pertes financières estimées à plusieurs millions d'euros par an. Les mortalités dues à ce syndrome sont fortement liées à l'identification d'un variant de l'*Ostreid herpes virus 1* comme cela sera présenté par la suite (Pernet et al., 2012; Segarra et al., 2014). De même, la maladie du POMS est une maladie complexe car en plus de l'infection par le virus, elle met en jeu de nombreux paramètres tant biotiques qu'abiotiques parmi lesquels les plus notables sont la présence de bactéries du genre *vibrio*, la température (Petton et al., 2013) ainsi que les caractéristiques propres aux naissains (génétique, microbiote...) (Barbosa Solomieu et al., 2015). Ce syndrome est donc une maladie à la fois polymicrobienne (décrit en B.1) et multifactorielle (décrit en B.2). L'élevage intensif des huîtres ainsi que le transfert d'animaux à travers le monde ont permis au POMS de largement se répandre pour devenir panzootique (Barbosa Solomieu et al., 2015).

## 1. Une maladie polymicrobienne

### a. Une infection primaire par le virus *OshV-1* $\mu$ Var

Parmi les pathogènes de l'huître associés aux épisodes de mortalités, l'*Ostreid herpes virus 1* (*OshV-1*) est systématiquement détecté depuis 1991 (Renault et al., 1994). L'*Ostreid herpes virus 1* est un virus de type Herpes de la famille des *Malacoherpesviridae* appartenant au genre *Ostreavirus*, il est capable d'infecter diverses espèces telles que *Ostrea edulis*, *Ruditapes decussatus* et *Crassostrea gigas*. L'*Ostreid herpes virus* est composé d'ADN double brin (dsDNA) encapsulé dans une capsidie de forme icosaédrique enveloppée (diamètre voisin de 116 nm) (Adamson, 2006; Davison et al., 2005).

Le séquençage complet de ce virus est disponible depuis 2005 suite à sa purification à partir de larves de *C.gigas* infectées (Davison et al., 2005; Le Deuff and Renault, 1999). Il comporte 124 ORFs (Open Reading Frames) au total pour un ADN double brin de 207 439 paires de bases. Depuis 2008, l'augmentation de la mortalité des huîtres coïncide avec la détection d'un nouveau variant de *OshV-1*, le variant  $\mu$ Var. En 2009, chez 96% des *C.gigas* issus d'épisodes de mortalités en France, le variant  $\mu$ Var d'*OshV-1* a été détecté (Martenot, 2013). Ce variant présente la suppression de trois ORF (l'ORF36, l'ORF37 et d'une partie de l'ORF38) et deux délétions (l'adénosine en amont de l'ORF34 et de 12 nucléotides dans le locus microsatellite H10) par rapport à l'*OshV-1*. Le virus *OshV-1*  $\mu$ Var semble viser les cellules circulantes de l'hémolymphe, les hémocytes, en effet, des protéines virales et de la capsidie du virus ont été détectées au sein des hémocytes par immunomarquage (Martenot et al., 2017). Par ailleurs, il a été montré que l'immunité antivirale des huîtres peut être stimulée par injection d'un ARN double brin synthétique (poly I:C) (Green and Montagnani, 2013).

Si le virus *OshV-1*  $\mu$ Var est nécessaire à l'induction de la maladie du POMS chez des huîtres juvéniles, un filtrat de virus dépourvu de bactéries ne permet pas d'induire de mortalité. De même, alors que les *vibrios* sont les principales bactéries pathogènes à avoir été isolées pendant les épisodes de mortalités, elles ne sont pas capables d'induire des mortalités seules par balnéation (Bruto et al., 2017).

Lorsque les huîtres sont infectées par *OshV-1*  $\mu$ Var, celui-ci provoque une immunosuppression de l'huître (De Lorgeril et al., 2018). En effet, ce virus se réplique dans les hémocytes avec une répllication maximale 24 à 48 h post-infection. Cette infection virale induit aussi un enrichissement de la fonction de régulation négative de la mort cellulaire. Les *C.gigas* infectées sont alors immunosupprimées, ce qui déstabilise leur microbiote interne et favorise l'apparition de septicémies issues d'un développement microbien composé de bactéries opportunistes telles que les bactéries du genre *Vibrio*. Ces bactéries vont ensuite proliférer induisant une lyse des hémocytes et pour finir vont pouvoir coloniser les tissus de l'huître induisant la mort de cette dernière (Figure 4).

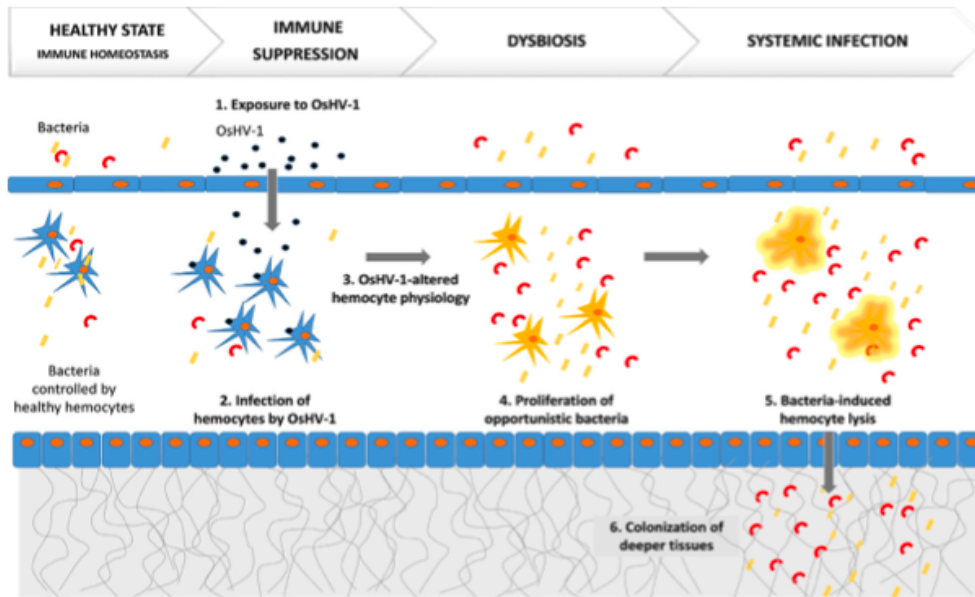


Figure 4 : Processus de développement du POMS (Petton et al., 2021)

b. Prolifération de bactéries opportunistes

Actuellement, les bactéries du genre *Vibrio* restent les bactéries les plus largement étudiées comme agent étiologique du POMS même si d'autres bactéries telles que *Arcobacter*, *Marinobacterium*, *Marinomonas*, *Pseudoaltermonas* et *Shewanella* sont également connues comme étant associées aux mortalités (Clerissi et al., 2022; De Lorgeril et al., 2018; Lasa et al., 2019; Petton et al., 2021). Au niveau du genre *Vibrio*, les bactéries du clade *Splendidus* sont les plus largement représentées chez les huîtres juvéniles malades et sont systématiquement isolées chez les huîtres. Ces bactéries sont présentes dans les animaux sains, mais expriment un potentiel pathogène faible ou modéré, alors qu'elles deviennent prépondérantes dans les animaux malades lors d'épisodes de mortalités (Bruto et al., 2017; Oyanedel et al., 2023; Petton et al., 2021; Saulnier et al., 2010). Parmi les bactéries du clade *Vibrio Splendidus* retrouvé associé au POMS, *V.tasmaniensis*, *V.splendidus*, *V.cyclotrophicus*, *V.harveyi*, *V.aesturianus* et *V.crassostreae* peuvent notamment être citées.

2. Une maladie multifactorielle

a. Facteurs biotiques

La génétique de l'huître

Les pressions de sélections dues à l'exposition récurrente des populations d'huîtres au POMS dans les zones conchylicoles favorisent l'apparition de populations plus résistantes. Il a été montré une part significative de la composante génétique des huîtres sur leur résistance au POMS notamment pendant l'infection par *OsHV-1* (Azéma et al., 2017; Camara et al., 2017; Dégremont et al., 2015; Divilov et al., 2019). L'étude transcriptomique d'huîtres (issues de familles biparentales) avec des susceptibilités différentes au POMS a mis en évidence l'induction précoce de gènes impliqués dans la réponse antivirale chez les familles d'huîtres résistantes (De Lorgeril et al., 2018; Gutierrez, 2018). Cette réponse antivirale précoce empêche la réplication virale permettant de conserver les fonctions hémocytaires et donc de limiter la colonisation par des bactéries opportunistes. En effet, les familles d'huîtres résistantes au POMS présentent une expression accrue des gènes impliqués dans les fonctions de réponses immunitaires et antivirales ainsi que de réponses aux stress, ce qui permet une



réponse précoce lors d'exposition au POMS. De même, les gènes impliqués dans les fonctions de maintenances et réparations de l'ADN se trouvent surexprimés chez les familles résistantes (De Lorgeril et al., 2020).

### Le microbiote de l'huître

Le POMS étant une maladie polymicrobienne dans laquelle une infection par des bactéries opportunistes a lieu, le microbiote de l'animal joue un rôle important dans sa sensibilité à la maladie. La présence de bactéries du genre *Vibrio* dans le microbiote des huîtres joue notamment un rôle important dans la résistance de l'animal à la maladie (King et al., 2019c). Lors du développement de la maladie, les espèces de *Vibrio* pathogènes ou opportunistes déjà présentes vont remplacer le *vibrio* non pathogènes (De Lorgeril et al., 2018; King et al., 2019b; Lemire et al., 2015). De même, la présence de bactéries du genre *Photobacterium*, *Aliivibrio*, *Streptococcus* et *Roseovarius* sont également corrélés positivement avec la sensibilité au POMS alors que les bactéries du genre *Cupriavidus*, *Psychrilyobacter* et *Tenacibaculum* sont eux associés au microbiote d'huîtres résistantes au POMS (King et al., 2019c). Il a été montré que l'exposition lors du stade larvaire à des bactéries non pathogènes peut améliorer la résistance de l'animal et des générations suivantes au POMS (Fallet et al., 2022). En effet, après exposition de larves, issues d'une famille sensible, aux bactéries de l'environnement (non pathogènes) des changements dans le microbiote des huîtres juvéniles est observé notamment avec la présence de *Neptunomonas*, *Cobetia*, et *Sphingoaaurantiacus*. Ces changements du microbiote sont également corrélés à une augmentation de la résistance au POMS. En plus des modifications du microbiote des animaux, l'exposition à des bactéries lors des stades de vie précoce impacte l'expression des gènes et la transcription des protéines, induisant des changements dans les réponses immunitaires (Fallet et al., 2022). L'exposition lors du stade larvaire à des bactéries non pathogènes modifie le microbiote des huîtres permettant de rendre les juvéniles plus résistantes au POMS. Cette modification du microbiote se trouve conservée sur tout le stade de vie de l'huître et est également transmise à la génération suivante (Fallet, 2019; Fallet et al., 2022).

#### b. Facteurs abiotiques

##### Température de l'eau de mer

Suite à l'augmentation des mortalités chez les huîtres juvéniles à partir de 2008, il a été mis en évidence que la température jouait un rôle de déclencheur dans le développement de la maladie du POMS et l'apparition des mortalités (Pernet et al., 2012). En effet, la transmission du virus *OsHV-1* est effective seulement entre +16°C et +24°C (Petton et al., 2013) ce qui signifie qu'à ces températures et en présence de virus dans l'eau, les naissains d'huîtres peuvent être infectés, immunosupprimés puis une septicémie peut apparaître. Une fois les huîtres infectées, le virus persiste à basse température (+10°C à +13°C) dans l'hôte jusqu'à une réactivation après une augmentation de la température à +16°C. De plus, l'augmentation de la température de +21°C à +29°C réduit la permissivité du POMS en jouant sur deux niveaux, (i) la pénétration du virus au sein de l'huître et (ii) l'efficacité du système immunitaire pour combattre le virus. En effet, à +29°C une diminution de l'abondance de certaines protéines transmembranaires et composante de la matrice extracellulaire, telle que la chondroïtine sulfate protéoglycane, l'héparane sulfate ou la tetraspanine, est observé (Delisle et al., 2020). Ces protéines sont identifiées comme participant à l'attachement et l'entrée du virus *OsHV-1* dans les cellules de l'hôte. De plus, la diminution de la sensibilité des huîtres au POMS à +29°C est également corrélée avec une augmentation de l'expression des

gènes en relation avec l'immunité, avec notamment l'augmentation de certains récepteurs impliqués dans la reconnaissance de pathogènes (Delisle et al., 2020). La température joue aussi un rôle dans la prolifération bactérienne dans la colonne d'eau. En effet, l'abondance dans la colonne d'eau de pathogène appartenant au genre des *Vibrios* (tel que *Vibrio crassostrea*) est corrélée avec la température (Lopez-Joven et al., 2018) or certaines de ces espèces sont identifiées comme des bactéries opportunistes impliquées dans le POMS.

### Apport en nourriture

La disponibilité en ressources nutritives peut influencer le développement de la maladie du POMS. En effet, sans nutriments, la croissance des huîtres est ralentie de même que celle du virus, induisant ainsi un ralentissement de la maladie. Pernet et al. ont observé que la disponibilité de la ressource (nutriment) influence le taux de croissance, les réserves énergétiques et la mortalité des huîtres. Une augmentation des réserves induit une diminution des mortalités, inversement une augmentation de la croissance de l'hôte (huîtres) est corrélée avec une augmentation de la mortalité due au POMS (Figure 5) (Pernet et al., 2019; Petton et al., 2021).

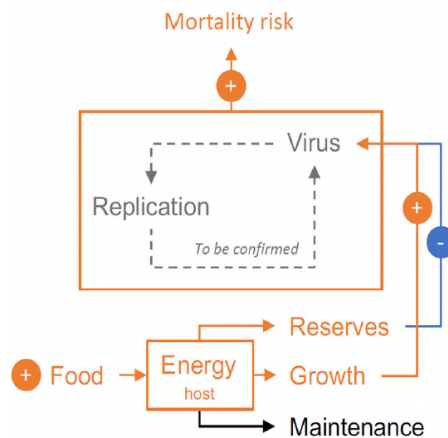


Figure 5 : Effet de la nutrition sur le POMS (Petton et al., 2021)

De plus, il a récemment été mis en évidence des changements au niveau de la structure de la communauté microbienne planctonique pendant les phases d'infection et de mortalité des épisodes de mortalité des huîtres juvéniles (Richard et al., 2019). En effet, lors d'épisode de mortalité, les huîtres malades ou mortes sont laissées avec les huîtres saines (vivantes) dans l'environnement ce qui induit des modifications des communautés microbiennes planctoniques. Il y a une prolifération de picoplancton et de ciliés (*Balanion sp.* et *Uronema sp.*) lorsque le taux d'huîtres moribondes est le plus important de même qu'une augmentation du phosphore et de l'ammoniac dans l'eau.

### III. Effet des contaminants chimiques de l'eau de mer sur les huîtres

#### A. Effet des contaminants chimiques sur les huîtres

Les huîtres étant des organismes filtreurs, elles peuvent accumuler dans leurs chairs les contaminants chimiques (Gadelha et al., 2019; Luna-Acosta et al., 2012) ou microbiens présents dans l'eau.

En effet, de nombreuses études ont déjà montré la sensibilité des huîtres aux polluants présents dans l'environnement marin. Les huîtres peuvent filtrer jusqu'à  $25 \text{ L.h}^{-1}.\text{g}^{-1}$  en accumulant certains composés (nonylphénols, métaux ou hydrocarbures) dans leur chair, ce qui peut affecter leur métabolisme et/ou constituer un risque sanitaire majeur pour les

consommateurs. Dans une eau polluée, les huîtres accumulent les PCB et certains pesticides qui ralentissent leur croissance (Bayen et al., 2007). De même, la diminution de l'activité phagocytaire des hémocytes lors d'une trop forte exposition à des cocktails de pesticides tels que l'atrazine, le glyphosate, l'alachlore, la terbuthylazine, le diuron (Gagnaire et al., 2007, 2006) rend les huîtres plus sensibles aux attaques bactériennes tel que les *Vibrio splendidus* ou *Vibrio atlanticus*. Cette observation a également été faite avec des concentrations en polluants proches des conditions environnementales, les huîtres exposées aux pesticides vont les bio-accumuler ce qui va impacter leur mécanisme de phagocytose (Abi-Khalil et al., 2016; Geret et al., 2013). Les premières observations tendent également à montrer que les huîtres résistantes aux épisodes de mortalités métabolisent mieux le glyphosate que les huîtres sensibles. L'exposition au glyphosate seul induit une inhibition de la catalase chez l'huître ce qui en fait un pesticide relativement nocif pour leur développement (Mottier et al., 2015). De même, la présence de certains composés toxiques dans le milieu peut jouer un rôle indirect dans la mortalité en perturbant le système immunitaire de l'huître la rendant incapable de se défendre contre les agents pathogènes du milieu. Les fonctions immunitaires des hémocytes sont par exemple affaiblies lorsque les huîtres entrent en contact avec du cuivre (Huang et al., 2018) et la phagocytose des pathogènes lors de la réaction immunitaire est inhibée lors de l'exposition au cadmium (Cao et al., 2018). D'autres études, menées dans l'étang de Thau et la baie de Marenne-Oléron, ont montré que l'exposition à des pesticides tels que le Diuron pendant la gamétogenèse des huîtres génitrices impacte la capacité de survie de leur descendance (Bachère et al., 2017). L'exposition à certains pesticides tel que l'atrazine peut également modifier le microbiote de l'huître au profit du développement de bactéries pathogènes (Britt et al., 2020). Aujourd'hui de plus en plus de nanoparticules NP (nTiO<sub>2</sub>, nSiO<sub>2</sub>, nZnO) sont également utilisées dans le quotidien, ces NP sont notamment présentes comme additifs dans la nourriture, les crèmes solaires... (Ministère de l'Ecologie et du Développement Durable, 2006) et peuvent ainsi se retrouver dans l'eau, par exemple la concentration environnementale prédite du nTiO<sub>2</sub> est de 0.2 pg.L<sup>-1</sup> en eau de mer (Giese et al., 2018). Ces NP sont déjà connues pour avoir des fonctions antimicrobiennes et depuis quelques années, des études émergent sur les effets de ces NP sur les organismes marins et leurs microbiotes. Des études ont été menées sur l'huître *Crassostrea virginica* et mettent en évidence une bio-réactivité et une toxicité du nTiO<sub>2</sub> (50 mg/L) pour les tissus hématopancréatiques des huîtres (Johnson et al., 2015). De même, des analyses du microbiome de l'hémolymphe d'animaux exposés au nTiO<sub>2</sub> ont été réalisés sur d'autres organismes filtreurs tel que les moules *Mytilus galloprovincialis* et ont montré des changements significatifs de celui-ci (Auguste et al., 2019).

#### B. Prévalence dans l'environnement : exemple d'un lieu de production ostréicole local , la lagune de Salses-Leucate

Située à cheval sur deux départements, l'Aude et les Pyrénées-Orientales, la lagune de Salses-Leucate s'étend sur une superficie de 54 km<sup>2</sup> (14 km de long pour 6,5 km de large à son point le plus étendu) (Direction Départementale des Territoires et de la Mer, 2017). Cette lagune constitue, de par ses dimensions le second plus vaste étang de la région Occitanie. Dans cet environnement unique cohabitent des activités économiques traditionnelles, notamment la pêche, l'aquaculture, et la conchyliculture, et des activités touristiques, telles que les sports nautiques, la navigation de plaisance, et bien d'autres. Le caractère saumâtre de la lagune en fait un environnement favorable au développement de nombreuses espèces. En 1987, pas moins de 131 espèces ont été recensées dans les bassins de la lagune, principalement des mollusques (40%, tels que des palourdes, moules, et huîtres plates),



suivies de crustacés (20%, notamment les crevettes roses et les crevettes grises), d'annélides (10%), ainsi que d'autres taxons tels que les échinodermes (comme les étoiles de mer et les oursins) (Syndicat Mixte Rivage, 2015). Ainsi, la lagune de Salses-Leucate se positionne en tant que deuxième zone de production d'huîtres de la région Occitanie, après Thau, avec une production atteignant 800 tonnes en 2021 et plus d'une vingtaine d'ostréiculteurs avec plus de 250 tables ostréicoles implantées sur le site (Lafont, 2021; Syndicat Mixte Rivage, 2015).

Or en tant que milieu confiné, la lagune est vulnérable aux pollutions provenant notamment des activités agricoles et des communes environnantes. Ces pollutions peuvent être d'ordre biotique ou abiotique et peuvent avoir diverses origines.

Les collines des Corbières à proximité de la lagune sont principalement dédiées aux vergers et aux vignobles, représentant plus de 75% de la surface agricole utile. À l'échelle du département des Pyrénées-Orientales, c'est plus de 4 000 exploitations agricoles qui sont présentes (Chambre d'Agriculture Pyrénées-Orientales, 2020) dont une partie non négligeable des terrains exploités se situe dans la partie sud de la lagune (Salses-le-Château, Saint-Laurant-de-la-Salanque et Opoul-Périllos) (Syndicat Mixte Rivage, 2015). Même si 15% des surfaces agricoles de la région sont exploitées en agriculture biologique (Chambre d'Agriculture Pyrénées-Orientales, 2020), la France reste l'un des grands consommateurs européens de produits phytosanitaires (European Environment Agency, 2021a, 2021b; leem, 2021; Lesueur, 2019; service public d'information sur l'eau, n.d.; Tristan Gaudiaut, 2019). Une partie de ces produits se retrouve dans l'environnement via les phénomènes de transfert. Il est à noter que le "lessivage foliaire" lors d'épisodes cévenols (Aubertot, 2011; Coquillé, 2017) accentue les phénomènes de transfert des produits phytopharmaceutiques.

Par ailleurs, les ports de plaisance présents aux abords de la lagune ainsi que les rejets de stations d'épuration peuvent également favoriser la pollution de l'écosystème lagunaire. En effet, certains composés pharmaceutiques ou pesticides sont mal ou pas éliminés par les stations d'épurations et vont donc persister dans les eaux de rejets pour finir *in fine* dans l'environnement (Margot et al., 2015).

De plus, la présence d'activités aquacoles, telles que la culture de coquillages et la pêche, ainsi que les activités touristiques, soulignent la nécessité de surveiller la qualité de l'eau pour éviter tout risque de contamination de l'Homme, qui pourraient être exposés à de l'eau ou à des animaux contaminés. Depuis quelques années, la filière ostréicole a subi une recrudescence d'épisodes infectieux pouvant conduire régulièrement à des pertes de production dues à des mortalités ou à des fermetures administratives (Lafont, 2021). Or comme cela a été énoncé précédemment, les huîtres ne sont pas soumises uniquement aux pathogènes, mais peuvent également être en contact avec des contaminants abiotiques pouvant impacter leur développement ou empêcher leur commercialisation. De fait, il semble donc nécessaire de dresser un état des lieux de la contamination chimique de la lagune de Salses-Leucate comme exemple local de zone ostréicole.

Afin de détecter et suivre la présence de ces contaminants chimiques dans l'eau de lagune, il est nécessaire de réaliser des échantillonnages d'eau sur lesquels des analyses peuvent être réalisées. A l'heure actuelle, il existe deux méthodes pour l'échantillonnage applicables pour ce type de matrice environnementale : l'échantillonnage ponctuel et l'échantillonnage cumulatif ou passif. Dans la littérature, la principale source d'information concernant les contaminations chimiques de la lagune de Salses-Leucate provient d'études

réalisées par l'Ifremer, PEPS-LAG en 2013 (Munaron et al., 2012) et dans le cadre des suivis ROCCH en 2020 (Ifremer, 2020). Lors de la campagne PEPS-LAG, les métaux, résidus phytosanitaires et pharmaceutiques, alkylphénol, hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) et PolyChloroBiphényles (PCB) ont été analysés par échantillonnage cumulatif entre mai et août en deux points de la lagune l'un au nord dans la zone ostréicole (latitude : 42.816673 – longitude : 2.989783) et l'autre au sud (latitude : 42.883280 – longitude : 3.016570). Ce type d'échantillonneur permet de détecter des composés présents dans le milieu même à l'état de traces puisqu'il concentre les contaminants sur l'échantillonneur exposé sur une longue durée. Les suivis ROCCH sont quant à eux effectués dans les chairs de bivalves principalement pour le suivi des métaux. Quelles que soient les études disponibles dans la littérature, le niveau de contamination de la lagune est stable et bien en deçà des seuils sanitaires depuis plusieurs années.

Dans le cadre de ma thèse, nous avons souhaité dresser un bilan général de la contamination chimique en se focalisant en particulier sur la recherche des contaminants organiques présents dans la lagune de Salses-Leucate. Dans une première approche, un bilan analytique s'appuyant sur un échantillonnage ponctuel a été mené afin de compléter les données obtenues à partir d'échantillonnages passifs déjà disponibles dans la littérature. Dans un second temps, nous avons complété ce bilan analytique en menant une nouvelle campagne en février 2022 mais s'appuyant cette fois sur un échantillonnage cumulatif en se focalisant sur une gamme plus restreinte de contaminants organiques. Étant donné les faibles niveaux de contaminations relevés sur l'ensemble de ces deux campagnes analytiques, les méthodes analytiques et les résultats obtenus ne seront pas développés dans le manuscrit mais sont toutefois présentés en annexe 1.

#### IV. Un procédé de traitement de l'eau : la photocatalyse hétérogène

Nous avons vu que l'ostréiculture est soumise à de nombreuses pertes causées par des mortalités significatives. Ces mortalités sont dues à des maladies complexes comme le POMS faisant intervenir une grande variété de pathogènes parmi lesquels des pathogènes viraux (*OsHV-1  $\mu$ Var*) et des pathogènes bactériens (*Vibriosis*). Or ces mortalités touchent les animaux aux stades juvénile et larvaire qui sont des stades durant lesquels les huîtres sont dans des bassins à terre alimentés en eau de mer traitée pour éliminer les pathogènes présents. Actuellement les moyens de traitement utilisés en éclosiers et nurseries permettent uniquement d'éliminer les contaminants biotiques présents dans l'eau mais n'ont aucun effet sur les contaminants abiotiques. Or comme les huîtres sont des organismes filtreurs non mobiles il serait intéressant de proposer des traitements permettant d'agir à la fois sur le compartiment biotique et abiotique de l'eau comme par exemple avec la photocatalyse hétérogène.

##### A. Présentation générale du procédé

###### 1. Le choix du procédé d'oxydation avancée

Le procédé d'oxydation avancée (AOP) est un procédé tertiaire de décontamination et désinfection des eaux en vue d'améliorer la qualité microbiologique et chimique de celles-ci. En effet, les AOP constituent un ensemble de méthodes efficaces pour éliminer les polluants organiques dits "persistants" (composés difficilement éliminés lors du passage dans les stations d'épuration ou bio-résistants) des eaux (eau douce, effluents de station d'épuration, eau de mers...). Ce sont des techniques dites douces, car fonctionnant à température et pression proches des conditions ambiantes (Glaze et al., 1987). Généralement, l'efficacité des AOPs repose sur des technologies redox avec la production d'espèces fortement oxydantes

(ROS) non sélectives qui vont cibler sans distinction toutes les molécules organiques présentes. Les ROS les plus fréquemment utilisés dans les AOPs est également l'un des oxydants les plus puissants, les radicaux hydroxyles ( $\cdot\text{OH}$ ), mais d'autres ROS sont également produits lors des réactions d'oxydation telles que les radicaux hydroperoxydes ou les radicaux superoxydes (Giannakis et al., 2018). La méthode de génération des ROS dépend de l'agent oxydant utilisé et donc de l'AOP utilisé.

Le terme Procédé d'Oxydation Avancée regroupe de nombreux procédés d'oxydation que l'on peut regrouper en 4 catégories (selon le type de radicaux hydroxyles produits) :

- (i) Les **procédés dits sono-chimiques** comme la sono-lyse
- (i) Les **procédés dits électrochimiques** lorsque des électrodes sont utilisées par exemple des électrodes Boron (Feng, 2004; Moreno-Andrés et al., 2018)
- (ii) Les **procédés dits chimiques**, basés sur l'utilisation ou la production d'espèces réactives intermédiaires, tels que l'ozonation, le procédé Fenton qui sont les plus connus (Diao et al., 2004; fenton, 1894; Gomes et al., 2019; Linley et al., 2012)
- (iii) Les **procédés dits photochimiques** qui utilisent une activation par la lumière (UV ou visible) d'un catalyseur solide (procédé de photocatalyse hétérogène) ou liquide (procédé de photocatalyse homogène) (Moreno-Andrés et al., 2020). Le procédé de photocatalyse homogène le plus étudié est le photo-Fenton, et ceux de photocatalyse hétérogène basé sur l'utilisation d'un semi-conducteur qui permet la photo-conversion de photons en charges. Le catalyseur le plus étudié est le dioxyde de titane  $\text{TiO}_2$  supporté ou non (Malato et al., 2009).

Chaque AOP présente des avantages et des inconvénients dépendant notamment de la matrice dans laquelle il est utilisé (Figure 6).

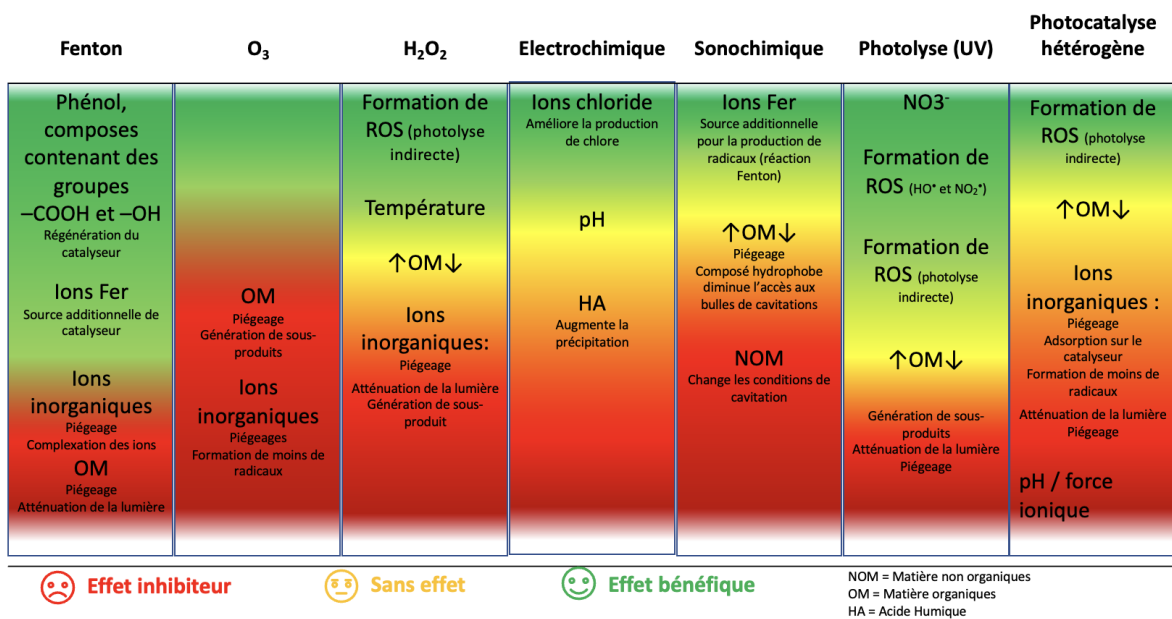
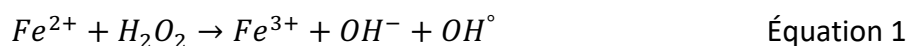


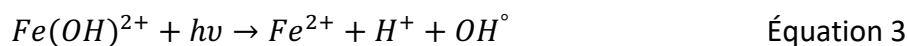
Figure 6 : Effet inhibiteurs et promoteurs des différents AOP (adapté de Lado Ribeiro et al., 2019)

a. *Procédés Fenton et photo-Fenton*

Le procédé de Fenton est le plus ancien et le plus utilisé des AOP, il utilise une solution de Fer(II) et de peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) pour dégrader les polluants via la production de radicaux hydroxyles. Les radicaux hydroxyles sont générés via la réaction entre le peroxyde d'hydrogène (ou eau oxygénée) et les ions ferreux  $Fe^{2+}$  (Équation 1).



Des améliorations ont par la suite été développées notamment avec l'ajout d'un rayonnement UV (> 300 nm) donnant naissance au procédé photo Fenton. Ce procédé est réalisé à pH acide (3-4) et l'ion  $Fe^{3+}$  se trouve dans l'eau sous la forme de  $Fe(OH)^{2+}$  qui va être réduit pour produire des radicaux  $OH^\circ$  supplémentaires.



Le procédé Fenton est largement étudié pour la dégradation de résidus chimiques organiques persistants mais aussi pour la dégradation de micro-organismes. En effet, ce procédé est particulièrement efficace pour la dégradation de micro-organismes puisque d'une part le peroxyde d'hydrogène interagit directement avec les micro-organismes pour les dégrader et d'autre part puisque certaines études ont reporté des cas de "procédé fenton intracellulaire" dans le cas de désinfection bactérienne (Spuhler et al., 2010).

En revanche, le pH reste le principal inconvénient de la méthode Fenton. Pour garder les ions ferreux en solution, il faut maintenir un pH faible ce qui nécessite un ajustement continu du pH au cours de la réaction d'oxydation. De plus, une floculation peut apparaître entre les réactifs et les composés organiques présents.

b. *Réaction avec du peroxyde d'hydrogène*

Le traitement par peroxyde d'hydrogène est largement utilisé comme biocide puisqu'il ne génère pas de sous-produits toxiques. Dans le procédé couplant  $H_2O_2$ /UV, les UV (de 200 à 280 nm) induisent la décomposition de  $H_2O_2$  en  $2 OH^\circ$  (Legrini et al., 1993). L'efficacité de ce procédé est comparable à celle de la photolyse (Mamane, 2007), le rayonnement UV est également absorbé par les composés organiques naturellement présents dans l'eau.



Pour la dégradation de bactéries, certains paramètres peuvent être ajustés pour améliorer la dégradation, c'est par exemple le cas pour la température. A haute température la diffusion du peroxyde d'hydrogène au travers de la membrane cellulaire est accélérée ce qui améliore le procédé de désinfection.

c. *Procédé d'ozonation et ces dérivés*

L'ozonation est l'un des procédés ayant le plus haut potentiel de dégradation des composés organiques. Couplé avec des UV ( $O_3$ /UV) il est très largement utilisé dans le

traitement des eaux potables puisqu'il permet la production de radicaux hydroxyles par plusieurs voies parallèles. C'est un couplage de deux procédés, l'ozonation et le procédé  $H_2O_2/UV$ .



En dehors du coût énergétique et financier de production, l'utilisation de l'ozone a deux inconvénients pour la dégradation de résidus organiques dans l'eau. Le premier est dû à l'ozone lui-même, qui constitue un composé instable et difficile à transporter impliquant de fait une production *in situ*. Le second et principal inconvénient réside dans la composition de l'eau à traiter, si celle-ci contient des composés appartenant aux familles chimiques telles que les bromides, les aldéhydes ou les cétones, des sous-produits toxiques pour l'homme, les animaux et l'environnement vont se former (von Gunten and Hoigne, 1994).

d. *Procédé électrochimique*

L'oxydation électrochimique est l'AOP le plus facilement automatisable avec peu d'opérations nécessaires et une faible consommation de réactifs due à l'utilisation d'électrodes. Les électrodes peuvent être réutilisées mais vont se détériorer au cours des traitements ce qui augmente le coût global du procédé (chanement/entretien des électrodes). Le plus fréquemment, des électrodes BDD (boron-doped diamond), les électrodes de dioxyde de plomb ou de  $SnO_2$  sont utilisées.

En 2004, un mécanisme de dégradation des micro-organismes par oxydation électrochimique a été proposé. L'exposition de bactéries au courant électrique induit dans le milieu par les électrodes augmente la perméabilisation de la membrane facilitant ainsi la diffusion dans la cellule des ROS générés (Feng, 2004).

e. *Photocatalyse hétérogène*

La photocatalyse hétérogène est détaillée dans la partie suivante. Elle utilise un catalyseur, le plus souvent un semi-conducteur solide (Malato et al., 2009), pour produire les radicaux hydroxyles. L'utilisation d'un catalyseur sous forme solide en fait un AOP attractif pour le traitement de l'eau puisque le catalyseur est réutilisable. Ce catalyseur solide représente cependant un inconvénient puisqu'il doit être séparé de la phase liquide après traitement, ce qui rajoute une étape de supplémentaire.

2. *Le choix du catalyseur*

Depuis les premières recherches sur la photocatalyse, de nombreux semi-conducteurs tels que le dioxyde de titane, l'oxyde de zinc, le sulfure de cadmium, le sulfure de zinc, l'oxyde de fer ont été testés (Hoffmann et al., 1995). Un semi-conducteur est un bon candidat pour la photocatalyse s'il est photo-actif, inaltérable au rayonnement, actif à une longueur d'onde du rayonnement solaire (visible ou UV) et est inerte chimiquement (Mills and Le Hunte, 1997). Le dioxyde de titane ( $TiO_2$ ) satisfait la majorité de ces critères, c'est pourquoi c'est le photocatalyseur le plus souvent utilisé. Il présente l'avantage d'être disponible et faiblement toxique car chimiquement stable. En revanche, sous la forme de nanoparticule de  $TiO_2$ , il est

considéré comme un polluant bioaccumulable et bio-concentrable notamment dans les algues et les animaux pouvant perturber la reproduction et la croissance (Auguste et al., 2019; Doyle et al., 2018; Morelli et al., 2018; Shang et al., 2020; Soler de la Vega et al., 2020).

Selon l'application, le photo-catalyseur peut se présenter sous différentes formes (exemples Tableau 1), en particules en suspension dans une phase liquide (poudre micrométrique par exemple, VP Aeroperl P25/20) ou fixé sur un support solide (Plantard and Goetz, 2014). Il existe une diversité de support développé pour répondre à plusieurs contraintes dont les principales sont le maintien du catalyseur dans le réacteur et l'amélioration de la surface d'échange. Pour augmenter la surface d'échange, des médias supportés sous formes de mousse macroporeuse ont notamment été développés pour augmenter la vitesse de réaction en améliorant l'adsorption des polluants et l'absorption des photons (Plantard and Goetz, 2014, 2012). Il existe également des catalyseurs supportés sous forme de film (Levchuk et al., 2019; Rubio et al., 2013a) ou sur des microbilles de verres (appelées photosphères) (Heydari, 2018) ce qui permet un maintien du catalyseur dans le système ainsi qu'une séparation plus aisée. Le  $\text{TiO}_2$  utilisé comme catalyseur est sensible seulement aux rayons UV (longueurs d'ondes inférieures à 390 nm,  $\lambda_{\text{max}}$  de 388 nm) ce qui représente 5% du spectre solaire dans des conditions favorables d'ensoleillement ( $50 \text{ W}\cdot\text{m}^{-2}$ ).

Tableau 1 : exemple de photo-catalyseurs supportés ou sous forme de particules en suspension

Nom du photo-catalyseur	Caractéristiques	Avantages & Inconvénients	Ref
<b>Degussa P25 (Evonik Industries)</b>	<p><u>Composition</u> : <math>\text{TiO}_2</math> 78% d'anatase et 22% de rutile</p> <p><u>Surface spécifique</u> : <math>54 \text{ m}^2\cdot\text{g}^{-1}</math></p> <p><u>Taille moyenne</u> : 20 nm (possibilité d'agglomérats en fonction du pH)</p>	<p><u>Avantages</u> : meilleure efficacité de traitement photocatalytique</p> <p><u>Inconvénients</u> : nano-polluants difficiles à éliminer post traitement</p>	(Kacem, 2015; Plantard and Goetz, 2014)
<b>VP Aeroperl P25/20 (Evonik Industries)</b>	<p><u>Composition</u> : <math>\text{TiO}_2</math> 80% d'anatase et 20% de rutile</p> <p><u>Surface spécifique</u> : <math>46 \text{ m}^2\cdot\text{g}^{-1}</math></p> <p><u>Taille moyenne</u> : 20 <math>\mu\text{m}</math></p>	<p><u>Avantages</u> : homogène dans le milieu réactionnel</p> <p><u>Inconvénients</u> : catalyseur en suspension donc nécessitant une étape d'élimination post traitement (décantation ou filtration)</p>	(Dezani, 2021; Kacem, 2015)
<b>Photosphères</b>	<p><u>Composition</u> : micro-billes de verre avec du <math>\text{TiO}_2</math> fixé</p> <p><u>Surface spécifique</u> : <math>11,5 \text{ m}^2\cdot\text{g}^{-1}</math></p> <p><u>Taille moyenne</u> : 45 <math>\mu\text{m}</math> (5 à 85<math>\mu\text{m}</math>)</p>	<p><u>Avantages</u> : densité de 0,22g/L donc séparation possible par flottaison</p> <p><u>Inconvénients</u> : homogénéisation plus difficile</p>	(Heydari, 2018; Reoyo-Prats et al., 2022)

B. Principe de l'inactivation microbienne et potentielles applications pour le traitement de l'eau de mer : Article 1 – Next Sustainability

L'ensemble du travail bibliographique réalisé sur la photocatalyse en eau de mer est présenté dans l'article 1 : "Heterogeneous photo-oxidation in microbial inactivation: A promising technology for seawater bio-securing?". Cet article a été publié en septembre 2023 dans la revue Next Sustainability. Les données contenues dans le supplementary material de cet article sont exposées en annexe N°2.





Contents lists available at ScienceDirect

Next Sustainability

journal homepage: [www.sciencedirect.com/journal/next-sustainability](http://www.sciencedirect.com/journal/next-sustainability)

## Heterogeneous photo-oxidation in microbial inactivation: A promising technology for seawater bio-securing?

Cécile Blanchon<sup>a,b,c,d,\*</sup>, Ève Toulza<sup>a</sup>, Christophe Calvayrac<sup>b,c</sup>, Gaël Plantard<sup>d</sup>

<sup>a</sup> IHPE, Université de Montpellier, CNRS, Ifremer, Université de Perpignan Via Domitia, Perpignan, France

<sup>b</sup> Biocapteurs Analyses Environnement, Université de Perpignan Via Domitia, 66000 Perpignan, France

<sup>c</sup> Laboratoire de Biodiversité et Biotechnologies Microbiennes (LBBM), Sorbonne Universités, CNRS, 66650 Banyuls sur Mer, France

<sup>d</sup> PROMES-CNRS UPR 8521, Process Material and Solar Energy, Rambla de la Thermodynamique, 66100 Perpignan, France

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

AOPs  
Disinfection  
Seawater  
Photocatalysis  
Microbes

### ABSTRACT

This review is aimed at the actions of radical oxygen species (ROS) produced during the photocatalysis reaction on the different biomolecules composing the microorganisms, as well as the presentation and development of the key operational parameters influencing the efficiency of the photocatalytic treatment in the context of saltwater applications. Our study focuses on the case of heterogeneous photocatalysis, one of the advanced oxidation processes (AOP). This work highlights the importance of the analytical composition of the water (pH, salt, dissolved organic matter.) on the catalyst/target interactions. Similarly, the structural composition of microorganisms (cell wall biomolecules) also plays a key role in the sensitivity to the photocatalysis process, and to a lesser extent, their metabolism also has an impact on their resistance. Another important point of our work is that it highlights the fact that to date, there is no standardization in the way results from the literature are reported, making it extremely difficult to compare data for the purpose of evaluating different processes. Finally, our work underlines that photocatalysis is particularly promising for bio-securing applications like the decontamination of seawater in aquaculture via the treatment of tanks and closed aquariums, as well as for the shipping industry via the treatment of ballast water.

### 1. Introduction

Water is essential to life on Earth. Seawater, as opposed to freshwater, accounts for the vast majority of our planet's water, present within the oceans and seas, and represents 97.2 % of the total mass of water and 70 % of Earth's surface [1]. The quality of this seawater is critical to the health of ecosystems [2]. Further, marine organisms, such as algae, fish, molluscs..., can be negatively affected by contaminated water [3–6] and accumulated contaminants can impact human health. To prevent water contamination in the environment, wastewater treatment processes have been developed [7–9]. To date, the majority of these processes are dedicated to freshwater treatment and are used in either wastewater treatment plants [10] or in the production of fresh drinking water by removing microbial and chemical contaminants. Sometimes these contaminants can bypass treatment processes and end up in rivers, groundwater, and eventually in seawater. It can be cited that some cities still discharge their raw sewage into oceans or rivers to save on treatment, for one city alone this can amount to several billion liters of raw sewage per day [8].

On another hand, seawater invasions by non-native species are one of the most important environmental problems that can cause global economic losses up to tens of billions of dollars per year [11]. This invasion comes from globalization with an increase in shipping, between 5 [12] and 10 billion tons [13,14] of ballast water is exchanged annually and invasive species travel around the world through it. At the international level, the International Maritime Organization (IMO) regulates ballast water management (BMW). In 2004, IMO adopted the International Convention on the Control and Management of Ship's Ballast Water and Sediments. This convention requires all ships to comply with the D-2 standards, i.e. to install a ballast water treatment system before September 8, 2024. The ballast water treatment systems used must be approved by the water management systems (G8). 61 ballast water management systems using active substances received basic IMO approval in 2019 (45 of which received final approval) and 83 are compliant with the guidelines (G8) (resolutions MEPC.125(53) and MEPC.174(58)) [15]. In addition to the shipboard ballast water treatment system, port reception facilities are considered as a possible alternative for ships without treatment facilities, as stated in Regulation

\* Corresponding author at: IHPE, Université de Montpellier, CNRS, Ifremer, Université de Perpignan Via Domitia, Perpignan, France  
E-mail addresses: [blanchon@outlook.com](mailto:blanchon@outlook.com), [cecile.blanchon@univ-perp.fr](mailto:cecile.blanchon@univ-perp.fr) (C. Blanchon).

<https://doi.org/10.1016/j.nxsust.2023.100003>

Received 16 November 2022; Received in revised form 23 June 2023; Accepted 25 June 2023

2949-8236/© 2023 The Authors. Published by Elsevier Ltd. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).



B-3.6 of the BMW Convention and in the Ballast Water Reception Facilities Guidelines (G5) (Resolution MEPC.153(55)). Most of the authorized/studied treatment methods can be grouped into mechanical or chemical treatments [13,16,17]. The mechanical treatments are not currently applied (hydrodynamic cavitation, ultrasounds, microwaves, electric pulse, heat treatment) except for Ultraviolet (UV) radiation whereas chemical treatments such as chlorine, peraclean biocide and sea kleen biocide are currently uses. Similarly, offshore wind turbines have been developed with the increase in demand for green energy, but these turbines are attached to the sea / ocean floor with large ballast water tanks. Like ship ballast water, these tanks accumulate microbes and must be treated to remove any microorganisms present before being released to the environment. In addition, economic losses caused by seawater contamination can also be related to aquaculture activity (pisciculture, shellfish farming...) or fishing activities. Economic losses related to fisheries are significant with approximately 60 millions dollars losses in 2014 [18], caused in particular by a decrease in fishing area with fewer fish due to seawater pollution from toxic runoff of chemicals. Today 40 % of the oceans are impacted by pollution [19]. With the increase in demand for seafood and the decrease in the number of fish in seawater, more intensive farms have been created, such as fish farms and/or aquaculture, in which the density of fish or shellfish is high and diseases frequently appear. For example, the mortality syndrome caused by the bacterial genus *Vibrio* induces a massive loss in shrimp production [20] and significant economic losses in oyster production [21]. To limit mortality events, antibiotics or genetic selection have been widely used. As a result of this massive use of antibiotic compounds, bacterial resistance phenomena have appeared [21]. Therefore, new disinfection processes must be developed for the biosecurity of farm influents and effluents. Moreover, economic losses in fisheries can also be attributed to algae, toxins and mycotoxins produced [22,23], or fungi [24]. Some organisms also produce toxin such as *Dinoflagellate* algae, which can produce phycotoxins (like Diarrhetic Shellfish Poisoning DSP toxin, Paralytic Shellfish Poisoning PSP toxin, and Amnesic Shellfish Poisoning ASP toxin). Only certain water treatment processes are capable of inactivating algal-derived toxins and, in particular, AOPs are known to effectively remove this class of biotic contaminants in water [25].

In this context, the objective of this review is i) to focus on the mechanisms of antimicrobial activity exerted by AOPs, ii) to detail in particular the heterogeneous photo-oxidation process using titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>) described as the most widely used catalyst in this type of process- and iii) to discuss the relevance of the application of heterogeneous photo-oxidation for seawater treatment. In addition, given the increasing need to disinfect seawater in view of the elements described above, this review will present a detailed analysis of the influencing factors of heterogeneous photo-oxidation processes in order to evaluate its applicability to the microbial inactivation of seawater. Finally, a key point of this work is that we wanted to provide readers with a state of the art describing the operation of disinfection mechanisms in microbial inactivation in order to identify key technological parameters to be considered in the design of future photo-oxidation seawater disinfection processes.

## 2. Principle of heterogeneous photo-oxidation and effect on microorganisms

Heterogenous photo-oxidation despite being under-studied has many advantages. As opposed to others AOPs, the heterogenous photo-oxidation also named heterogenous photocatalysis uses a solid catalyst instead of liquid catalyst to simultaneously degrade organic-matter and inactivate the microbial community present in seawater. The use of a solid catalyst allows for a limited operating cost since the catalyst can be separated and reused for the next treatments. Moreover, heterogeneous photo-oxidation operates under environmental temperatures and pH conditions, thus it is not necessary to adjust the experimental

conditions over time such as in Fenton process. Another important advantage of the heterogeneous photo-oxidation for seawater treatment is that even if inorganic ions can reduce the treatment efficiency, no toxic subproducts are being generated [26]. Publications concerning seawater disinfection using photo-oxidation represent only 0.6 % of all AOP publications for seawater disinfection whereas its potential uses are important.

For information, the figure in [Supplementary 1](#) shows the effects of matrix components on the efficiency of the different AOPs.

### 2.1. ROS production during photo-oxidation

Heterogeneous photo-oxidation is an efficient AOP used for the degradation of persistent organic pollutants (biotic and abiotic) from water, wastewater, and seawater [27]. It is a proved process for freshwater disinfection [27,28] and also for water decontamination [29]. In general, AOP efficiency is based on redox reactions with a local of powerful oxidizing species (Reactive Oxygen Species, ROS) characterized by the non-selectivity of the target. The principal ROS produced in AOP is the hydroxyl radical (<sup>•</sup>OH), one of the most powerful oxidants. Other ROS may also be produced such as hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), hydroperoxyl radicals (HOO<sup>•</sup>), superoxide radicals (<sup>•</sup>O<sub>2</sub><sup>-</sup>), etc. [30]. All of these ROS are produced at a concentration which is sufficient to effectively remove pollutants. To generate these ROS, heterogeneous photo-oxidation uses a catalyst (mostly a semi-conductor [27]) as a catalytic active surface. Titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>) is the most widely used catalyst. It has been studied for pharmaceutical, phytosanitary and PolyChloroBisphenyls degradation [31–34], as well as for bacterial disinfection. One of the main advantage of this AOP is that the solid catalyst is easily separable compared to a homogeneous catalyst, and thus can be recycled in further photo-oxidation reactions. Many supported catalysts are developed to improve catalyst separation and cancel the separation step after treatment. TiO<sub>2</sub> has a maxima absorption lengthwave at 350 nm which correspond to UVA, and its activation only append below 400 nm [35]. Solar UV irradiation, composed mostly by UVA and B, represent 5 % of the total solar spectrum and can be an efficient UV source for photo-oxidation reactions. Only UVA and B can pass through the ozone layer (whereas UVC are filtered) and reach the earth surface.

Heterogeneous photo-oxidation uses solid particles in suspension into the treated matrix (water or air). After activation by UV photons, photocatalytic particles react with contaminants in their immediate proximity. Heterogeneous photo-oxidation process can be separated into five steps, and photo-oxidation (ROS production) can be itself separated into three steps [36]:

- Step 1: Matter transfer from the liquid phase to the catalyst surface through the boundary layer.
- Step 2: Adsorption on the catalyst surface.
- Step 3: Photo-oxidation reaction ([Fig. 1](#)).

- a. Catalyst photoexcitation: when catalysts are exposed to sufficient energetic photons electron/hole pairs are produced ([Eq. \(1\)](#)) [37]



- b. Charge transfer into the catalyst: electrons and holes produced migrate to the catalyst surface and react with adsorbed species (electro-donor or electro-acceptor). During this step a recombination phenomenon can occur into electron/hole pairs [38,39].
- c. Free radical reactions: photo-oxidation and photo-reduction reactions occur when oxygen and water molecules adsorb into the catalyst surface to generate free radical species ([Eqs. \(2\)–\(6\)](#)) which can react with organic species close to the catalyst [37,40,41].



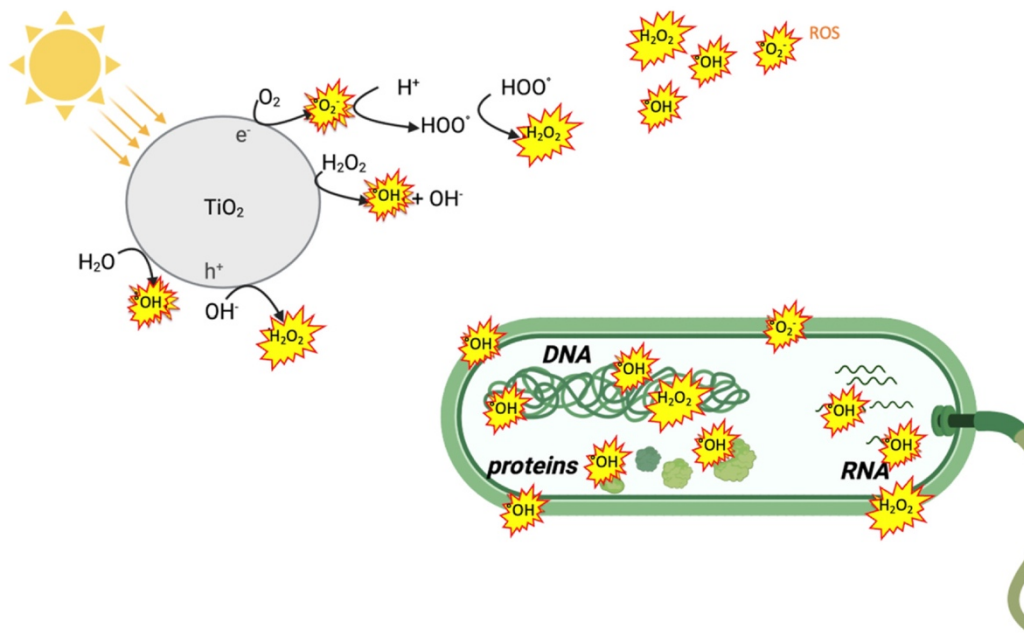


Fig. 1. ROS production in photo-oxidative process and targets for ROS in bacteria.

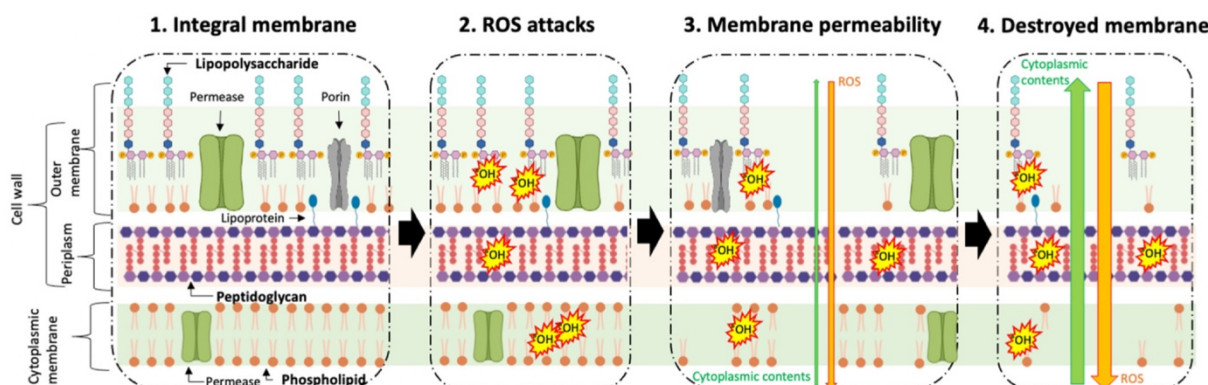
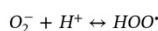
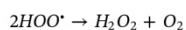


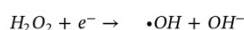
Fig. 2. Hydroxyl radical damage to cell envelope components of Gram-negative bacteria. Susceptibility to oxidative damages presents the following order: lipopolysaccharide > phospholipids > peptidoglycan.



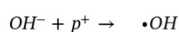
(3)



(4)



(5)



(6)

Step 4: Desorption of the catalyst surface.  
Step 5: Transfer into the medium.

Heterogeneous photo-oxidation efficiency to remove contaminant relies on the ROS generation. ROS are known to efficiently degrade organic contaminant without specificity. In the case of microorganism disinfection, ROS efficiently damages many cellular compounds as presented below.

### 2.2. ROS and UV target biomolecules

Heterogenous photo-oxidation use both catalyst and UV radiation to generate ROS which are involved in microbial inactivation. Most

studies show that ROS are responsible for the death of microbes. With another AOP, homogeneous photo-oxidation (UV chlorination), Wen et al. find, using *tert*-butyl alcohol (TBA) as a radical scavenger, that  $\bullet OH$  were responsible for 20–30 % of the bacterial inactivation, UV-LEDs for a few percent and chlorine for 15–40 % [42]. The remaining percent of bacterial inactivation was due to other factors [42]. In the same way, in heterogeneous photo-oxidation,  $\bullet OH$  are not the only ROS produced molecules. Whereas  $\bullet OH$  are short-lived and very reactive species acting close to the  $TiO_2$  surface,  $H_2O_2$  is acting at a longer distance [43]. Nevertheless  $\bullet OH$  were shown to be the major ROS involved in bacteria killing [44]. The use of hydroxyl radical scavengers in inactivation studies revealed that other ROS such as  $H_2O_2$  and  $\bullet O_2^-$  may also play a role on the global disinfection process by UV/ $TiO_2$  treatment [45,46].

#### 2.2.1. Damages to lipids

Lipids and phospholipids represent an important part of cell composition and especially membrane, constituting for example up to 10 % of bacteria biomass (Figs. 2–4) [47,48]. According to many authors,



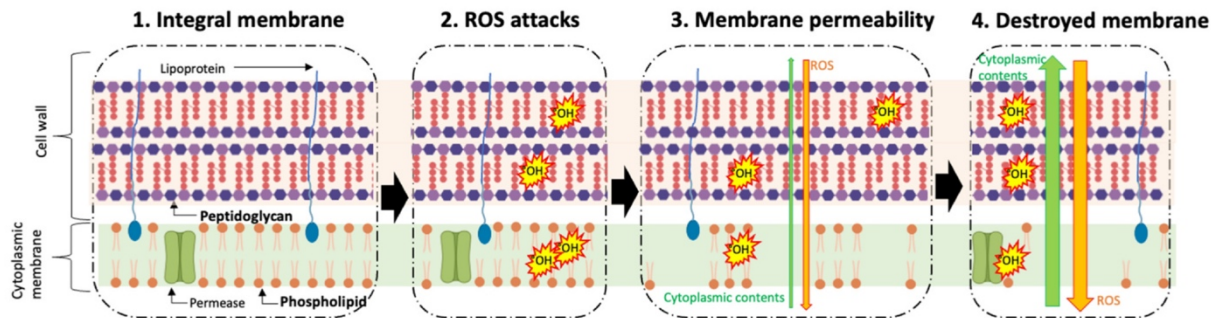


Fig. 3. Hydroxyl radical damage to cell envelope components of Gram-positive bacteria. Susceptibility to oxidative damages presents the following order: phospholipids > peptidoglycan.

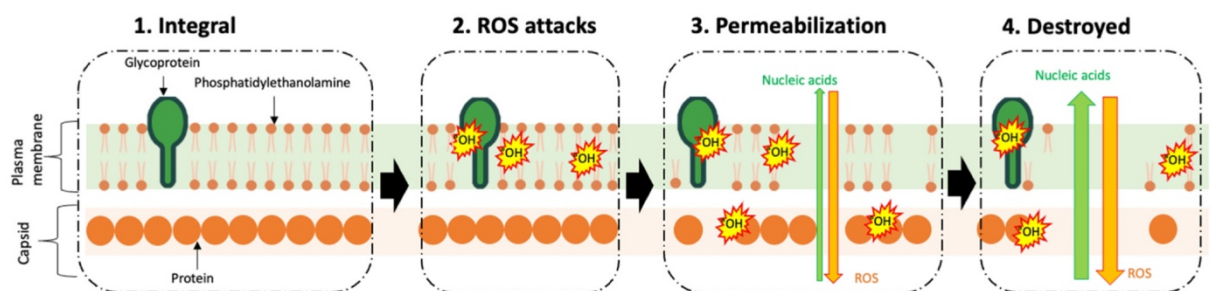


Fig. 4. Hydroxyl radical damage to cell envelope components of enveloped virus. Susceptibility to oxidative damages is almost identical (plasma membrane  $\approx$  capsid).

lipids are sensitive to UV and oxidative degradation by many ROS.  $\cdot\text{OH}$  can oxidize fatty acids such as linoleic acid and induce lipid peroxidation [25,49–51]. The lipid peroxidation by ROS during photo-oxidation experiment was demonstrated by monitoring the release of breakdown product, malondialdehyde (MDA) [52]. Other ROS such as  $\cdot\text{O}_2^-$  are known to induce lipid damages [53] but UV light alone can also induce lipid peroxidation by ROS generation with exogenous chromophores called sensitizers [54,55]. During this oxidation, carbonyl compounds (aldehydes, ketones and carboxylic acids) are formed and can be potentially toxic for bacteria [49,50]. A detailed study conducted by Smith et al. examined the changes of lipid bilayer under UV oxidation by using neutron reflectometry. Unsaturated fatty acids deterioration seemed to be faster than for saturated fatty acids probably because of double bonds that make them more susceptible to oxidative attack [56]. UV light can also cause phospholipid tail deterioration onto unsaturated lipids [57] which is responsible for bacterial membrane reorganization increasing membrane permeability.

### 2.2.2. Damages to protein into the cell

Proteins are the major component of cell biomass with around 50 % of total biomass of bacteria [47,48] making them one of the most abundant intracellular target for ROS [53]. Most reactions of amino acids, peptides and proteins with ROS occur via chemical reactions rather than physical ones (only Tryptophan is subjected to physical quenching) [53,58]. In proteins, some amino acids are more sensitive to oxidation (Table 1). Methionines (Met) and Cysteines (Cys) have a sulfur atom that make them very sensitive to oxidation but their environment into the protein can make them more sensitive. For example, positively charged residues close to Cysteines increase its sensibility to the deprotonation of the thiol group into thiolate ( $\text{S}^-$ ). For the Met, two oxidate forms exist, the first, Methionine sulfoxide (Met-O) is reversible, and the second, Methionine sulfone (Met- $\text{O}_2$ ) is irreversible but less frequent [59]. Others authors also report a difference in susceptibility to oxidative stress for amino acids. Davies et al. report in a very detailed revue that Tryptophan (Trp), Tyrosine (Tyr),

Phenylalanine (Phe) and Histidine (His) are the more sensitive to UV light [53], probably because of double bonds. They also reported that proteins can suffer multiple damages as a consequence of  $\cdot\text{O}_2^-$  oxidation. We can cite for instance peroxide formation that can occur within protein in the Trp, Tyr and His amino acids. Side chain changes at the Trp, Met and Cys amino acids are also observed in photooxidized proteins as well as the creation of cross-links disulfide bond between proteins and/or the aggregates formation (mostly from radical-radical termination reaction of Tyr-derived amino acids). All those chemical and physical changes drive modifications on protein properties and turnover [53] that can induce a decrease in enzymatic activity [51]. During UV irradiation or UV/ $\text{TiO}_2$  photo-oxidation, surface protein degradation has been observed directly by microscopy (transmission electronic microscopy TEM or scanning electronic microscopy SEM) by Kim et al. [60] and Park et al. [61]. Moreover, Park et al. [61] have observed the diminution of total surface proteins by using electrophoresis SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate – PolyAcrylamide Gel Electrophoresis).

### 2.2.3. Damages to peptidoglycans

Surprisingly, studies reported that peptidoglycan show the highest resistance to ROS [25,49,62]. In photocatalytic experiments, bacteria death occurs without visible degradation of peptidoglycan (Figs. 2 and 4). After exposure of *Staphylococcus aureus* to  $\text{TiO}_2/\text{UV}$  treatment for 24 h, a frequent detachment of the cell wall from the cell membrane was observed by TEM [63]. In gram positive bacteria, the cell wall was mainly composed of a peptidoglycan layer (Fig. 3) and TEM imaging revealed no visible degradation [25,63]. The same observation was made using peptidoglycan dosage during bacteria death on  $\text{TiO}_2$  film [62]. However, peptidoglycan alterations may not be obvious because of its highly cross-linked structure so damage can occur without destruction of its overall appearance [25]. In bacteria, peptidoglycan layers form 2 nm size pores thus ROS can penetrate into the cell and damage the other extracellular layer or cellular compounds [64].

**Table 1**  
Rate constants for the interaction of ROS (singlet oxygen or hydroxyl radical) with cell component available in the literature.

Component	ROS	Constant rate (L.mol <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	Refs./authors
<b>Amino acids</b>			
Alpha-alanine	<sup>1</sup> O <sub>2</sub>	2.0 × 10 <sup>6</sup>	[149]
Methionine	<sup>1</sup> O <sub>2</sub>	5.06 × 10 <sup>6</sup> –8.4 × 10 <sup>7</sup>	[149]
Methionine	<sup>1</sup> O <sub>2</sub>	1.6 × 10 <sup>7</sup>	[53]
Arginine	<sup>1</sup> O <sub>2</sub>	< 1 × 10 <sup>6</sup>	[149]
Tyrosine	<sup>1</sup> O <sub>2</sub>	2.7 × 10 <sup>7</sup>	[149]
Tyramine	<sup>1</sup> O <sub>2</sub>	2.8 × 10 <sup>8</sup>	[149]
Histidine	<sup>1</sup> O <sub>2</sub>	3.2 × 10 <sup>7</sup> –5.43 × 10 <sup>9</sup>	[149]
Tryptophan	<sup>1</sup> O <sub>2</sub>	0.8 × 10 <sup>7</sup>	[53]
Tryptophan	<sup>1</sup> O <sub>2</sub>	2.5 × 10 <sup>8</sup>	[149]
Cysteine	<sup>1</sup> O <sub>2</sub>	8.9 × 10 <sup>6</sup>	[53]
<b>Proteins</b>			
Superoxide dismutase	<sup>1</sup> O <sub>2</sub>	8.2 × 10 <sup>5</sup> –2.6 × 10 <sup>9</sup>	[149]
Carbonic anhydrase	<sup>1</sup> O <sub>2</sub>	6.5 × 10 <sup>8</sup> –8.0 × 10 <sup>8</sup>	[149]
Lysozyme	<sup>1</sup> O <sub>2</sub>	7.8 × 10 <sup>8</sup>	[149]
Trypsin	<sup>1</sup> O <sub>2</sub>	7.1 × 10 <sup>9</sup>	[149]
<b>Nucleosides (precursor of nucleotides)</b>			
Thymidine	<sup>•</sup> OH	4.8 × 10 <sup>9</sup>	[67]
Cytidine	<sup>•</sup> OH	4.8 × 10 <sup>9</sup>	[67]
Uridine	<sup>•</sup> OH	4.3 × 10 <sup>9</sup>	[67]
Adenosine	<sup>•</sup> OH	4.0 × 10 <sup>9</sup>	[67]
<b>Nucleotides</b>			
T	<sup>•</sup> OH	5.3 × 10 <sup>9</sup>	[67]
C	<sup>•</sup> OH	4.5 × 10 <sup>9</sup>	[67]
A	<sup>•</sup> OH	3.0 × 10 <sup>9</sup>	[67]
<b>Polynucleotides</b>			
Poly (G)	<sup>•</sup> OH	1.2 × 10 <sup>9</sup>	[67]
Poly (U)	<sup>•</sup> OH	1.25 × 10 <sup>9</sup>	[67]
Poly (A)	<sup>•</sup> OH	0.9 × 10 <sup>9</sup>	[67]
Poly (U + A)	<sup>•</sup> OH	0.5 × 10 <sup>9</sup>	[67]
DNA	<sup>•</sup> OH	0.3 × 10 <sup>9</sup> –0.8 × 10 <sup>9</sup>	[67]
<b>Polysaccharides</b>			
Glucose	<sup>•</sup> OH	1.0 × 10 <sup>6</sup> –2.3 × 10 <sup>6</sup>	[162]
Carboxymethylcellulose 2.2	<sup>•</sup> OH	1.0 × 10 <sup>9</sup>	[163]
Carboxymethylcellulose 1.3	<sup>•</sup> OH	1.0 × 10 <sup>9</sup>	[163]
Carboxymethylcellulose 0.86	<sup>•</sup> OH	9.8 × 10 <sup>8</sup>	[163]
Dextran	<sup>•</sup> OH	7 × 10 <sup>9</sup> –9 × 10 <sup>8</sup>	[163]

#### 2.2.4. Damages to nucleic acid (DNA and RNA)

ROS can break the phosphodiester bonds between nucleotide chains of DNA and RNA, can induce changes in nitrogenous bases (T or C becoming U) or can enhance the formation of pyrimidine dimers by cross-linking [65–68]. DNA damages by UV radiation out of cell using specific ROS scavengers have been studied to dissociate damages caused by <sup>1</sup>O<sub>2</sub> and <sup>•</sup>OH [69]. <sup>1</sup>O<sub>2</sub> can induce oxidative DNA damages by reacting with guanine residues and cause few strand breaks. In contrast, <sup>•</sup>OH attacks all four DNA bases and produce much more stand breaks and base loss [69]. Those structural damages conduct to the decreased of the concentration of the genomic DNA as treatment time progress [60]. Oxidative damages accumulated in RNA can also indirectly affect protein synthesis and may generate lack of cultivability [65]. The accumulation of oxidative damages in DNA can affect tridimensional structure, replication and transcription conducting to RNA and proteins modifications. All the nucleosides and nucleotides are not degradable by ROS at the same rate thus nucleic acids damages depends on its composition (Table 1).

#### 2.3. Effect of the heterogeneous photo-oxidation on microorganisms

Microorganisms include a variety of organisms such as viruses, bacteria, fungi and protists. Even if there are many functional differences between microorganisms (bacterial respiration, ATP production, antioxidant system...), the structural difference in the composition of the cell wall remains one of the most important factors for comparing the sensitivity of microorganisms to photocatalysis. However, the impact of functional difference will be discussed briefly in the case of bacteria. The cell wall is a complex structure that protects microorganisms from their environment. It is the first ROS target and is

composed of proteins, lipids, and polysaccharides. Inside of a taxonomic group the membrane composition can be different, the difference around Gram-positive bacteria cell wall and Gram-negative bacterial cell wall can be cite as example [70] (Figs. 2 and 4). Other organisms have a different composition of their cell walls, such as fungi, which cell wall is composed by chitin, glucans, and proteins [70]. Moreover, some microorganisms have increased their resistance to biocides and as a result, also present a lower sensibility to AOP disinfection than other microorganisms. For example, several bacteria exhibit the capacity to limit ROS action in the cytoplasm by: *i*) decreasing biocide penetration by changing membrane composition and by porin regulation, *ii*) decreasing intracellular biocide concentration by activation of detoxifying superoxide dismutase and catalase enzymes [71], *iii*) changing metabolic pathways [72] and enhancing DNA repair mechanisms [73]. Bacteria can also promote cell aggregation (biofilm production) to decrease cell accessibility and improve cell protection. Moreover, it is important to underline that microorganism sensitivity also depend on operative conditions (see Section 5). Some authors have already reported that in freshwater, microbial disinfection by photo-oxidation depends on cell wall composition. Most of the time, virus and prions are the most susceptible organisms to AOPs disinfection. Additionally, gram-negative bacteria are generally more susceptible to disinfection than gram-positive bacteria [74,75]. There is an important diversity of composition within the same taxonomic group that can influence the general AOPs disinfection susceptibility and partly explain differences observed in the literature.

##### 2.3.1. Bacteria

The majority of photocatalytic antimicrobial studies have been performed with gram-negative bacteria (often with *Escherichia coli* in



freshwater) but a few studies with Gram-positive are available. Probably ascribed to difference in cell wall structure, many authors have observed that Gram-positive bacteria are more resistant to photocatalytic disinfection than Gram-negative bacteria [25,76–78]. Gram-positive bacteria cell wall is composed by two parts, an inner membrane/cytoplasmic membrane composed by phospholipids and proteins and a cell wall composed by peptidoglycans and lipoproteins (Fig. 3). Whereas Gram-negative bacteria have much less peptidoglycans, but a second layer cell wall called outer membrane and composed by lipopolysaccharides, phospholipids, and proteins (Fig. 2). Conversely, other authors have reported a more efficient inactivation for Gram-positive bacteria [79] possibly because of experimental conditions. In their study, the catalyst surface charge was negatively charged, and Gram-negative bacteria are coated with lipopolysaccharide molecules, which carry a negative charge with can decrease bacteria/catalyst interaction and enhance Gram-positive bacteria inactivation [80]. To understand inactivation mechanisms, many studies have followed bacteria integrity during photocatalytic treatment by electron or fluorescence microscopy to visualize membrane and damages to cell wall [81,82]. Detection of lipid peroxidation products, the leakage of intracellular components (RNA, protein, DNA...) has also been performed [31,61]. Interestingly, several authors have already proposed a process of bacteria killing during TiO<sub>2</sub> photocatalytic treatment [25,49,51,54,81]. First, the outer membrane is damaged, then the cytoplasmic membrane until complete degradation. Peptidoglycan being much more resistant, photocatalytic killing occurs without substantial visible degradation of periplasm but peptidoglycan were still damaged [25,62]. The cell wall permeabilization by photo-oxidation is progressive (Figs. 2–4). At the beginning of disinfection, small molecules such as ONPG (o-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside) can go through the membrane and when cell wall damage/permeability is sufficient, large molecules such as β-D-galactosidase may leak [83]. The membrane permeabilization occur soon after bacteria attach to catalyst particles [25,50].

In freshwater some authors have also attribute the difference in sensitivity between bacteria to metabolic differences or to the physiological state of the bacterial [84–86]. Indeed, Skorbe et al. [85] looked at the inactivation of *Pseudomonas fluorescens* (obligate aerobic gram negative bacteria) and *Lactococcus lactis ssp. Lactis* (facultative aerobic gram positive bacteria) by TiO<sub>2</sub> photocatalysis. During the photocatalysis, the damages induced by ROS increases the ion permeability of the cytoplasmic membrane and causes the loss of the proton gradient. *P. fluorescens* uses oxidative phosphorylation to store energy necessary for the respiratory functions which are therefore inhibited by photocatalysis whereas cytoplasmic membrane damages impact less for *Lc. Lactis* (facultative aerobic) which uses other energy storage mechanisms such as lactic acid fermentation. Similarly, some bacteria have endogenous antioxidant response systems to deal with ROS that are more effective with enzymes (such as catalase) with higher activity, which confers greater resistance to ROS produced during photocatalysis (such as H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) [87,88]. As Rincon et al. [89] shown the physiological state of bacteria during the inactivation experiment strongly impact the disinfection rate even if the inactivation is slower for bacteria in stationary state than for that on exponential state the inactivation by photocatalysis still remain efficient. During the exponential state bacteria are more sensitive to photocatalysis than that one on the stationary state. During the stationary state, bacterial metabolism change, for example, proteins expression can be modified influencing the regulation of genes involved in the protection against oxidants or in the reparation of oxidative damage [90,91].

The majority of studies have focused on the antimicrobial efficacy of photo-oxidation in freshwater, but there are few studies dedicated to microbial inactivation in seawater [28,74,75,79,92–98]. In those studies, the photocatalytic disinfection efficiency has been analyzed on one or more bacteria (Supplementary 2). Most of the time, bacteria inactivation is monitored by culture which limits the detection to viable and cultivable bacteria and does not allow an estimation of the effect of

the process on viable but not cultivable bacteria. Sometimes bacteria can be so damaged by the treatment that they cannot grow back immediately but may regrow after some time (1 or 2 days after stopping the treatment). Despite what would seem to be a successful disinfection treatment, there can be a regrowth of treated bacteria [99,100]. Some studies have shown that AOP treatments can limit bacterial regrowth [96,101,102]. When Residual Oxidant (TRO), part of oxidant used for treatment, is still in solution at the end of the photocatalytic treatment, the bacterial regrowth is reduced for several days. The inhibition of bacterial regrowth after treatment occur as long as residual oxidant is in solution after heterogeneous photo-oxidation [103]. As highlighted by Rubio et al. [96] and Wu et al. [104], photo-oxidation has a stronger effect on bacterial regrowth compared to UVC treatment.

In addition, some studies have also shown that some microorganisms can develop a resistance to the photocatalytic process [95,103,105] which may be due to: (i) the genetic or morphologic heterogeneity of the population [106,107], (ii) the competition for photo-oxidation between viable bacteria and partially lysis bacteria (cytoplasmic compounds released when membrane became permeable) [80,108–110], or (iii) the bacteria agglomeration that protect a part of the population.

### 2.3.2. Viruses

Viruses with sizes from 20 to 300 nm have been recognized as important microbial targets to ensure water safety. For example, enteric viruses are listed as emerging biological contaminants on the United States Environmental Protection Agency Contaminant Candidate List [111]. Some research has been done to study virus disinfection by photo-oxidation in freshwater, but to our best knowledge no study has been performed in seawater. In freshwater, the viral disinfection is a complex process which depends on many parameters and in particular, virus sensibility to photo-oxidation is dependent on both the composition of the envelope, the capsid, the nature of the genetic material of the virus and the type of process applied [112]. The viral inactivation with photocatalytic process consists of three steps (Fig. 4): particle shape distortion, protein oxidation, and DNA leakage and damages on the genetic material [113]. Oxidizing disinfectants as <sup>•</sup>OH primarily target amino acids of the protein capsid affecting the structure and the morphology of the virus [61]. For example, the abundance of Tyrosine amino acid (Tyr or Y) appears to be related to virus susceptibility to <sup>•</sup>OH-based disinfection. UV disinfection efficiency is correlated to virus size both in terms of virion size as well as genome length and nature. For example, viruses with double strand DNA genomes (such as enteric viruses), are more resistant to UV disinfection because photorepair of UV damages after disinfection could be facilitated by dsDNA form. Virus capsid composition is also essential to predict virus resistance to disinfection processes. Moreover, high percentages of aromatic amino acids can reduce UV penetration which would then reduce viral nucleic acid damage and thereby increase UV resistance of the microbe [112]. Nakano et al. [114] reported that non-enveloped viruses are more resistant to UV/TiO<sub>2</sub> inactivation compared to enveloped viruses whereas according to Liga et al. [115], non-enveloped viruses are more susceptible to hydroxyl radicals than enveloped viruses. Other authors like to Bogdan et al. [49] have demonstrated that the peroxidation of the phospholipidic membrane in the envelope promotes the oxidation of capsid proteins resulting in increased damages to the nucleic acid of the viruses.

Furthermore, it should be noted that protein oxidation might not be completely lethal to viruses because most of them can still stay infective and replicate again under proper conditions and the mechanisms responsible for these reparations are still largely unknown [113].

### 2.3.3. Protists

Protists constitute a very large and heterogenous group composed of mostly unicellular eukaryotes. This group includes algae, protozoa, and fungi. Seawater protists represent the second most important part of the



seawater biomass after bacteria [116]. They play an important ecological role because of the photosynthetic activity of algae, or by helping to recycle nutrients [117]. To date, no publication related to fungus disinfection by heterogeneous photo-oxidation in seawater was found so the following part will focus on seawater algae disinfection.

Algae are a complex group of organisms with different sizes (from a few microns to few meters in length). Some algae are invasive species as *Dunaliella salina* that can affect ecosystems, while others can produce phycotoxins that can be harmful for other marine organisms and for humans when contaminated molluscs or crustaceans are consumed. For this reason, some algae are frequently measured in seawater. Most of the photo-oxidation seawater studies have focused on two algae: *Dunaliella salina*, an invasive unicellular green alga from ballast waters, and dinoflagellate algae, some of which can produce phycotoxins. Photocatalytic treatments have the advantage to efficiently inactivate toxins as well as microorganisms [25,118]. Algae disinfection such as for *D. salina* by photo-oxidation seems to be quick, and hydraulic residence time ranges from a few seconds to few minutes to achieve one log degradation [105,119]. After the end of the photo-oxidation treatment, gross photosynthesis by algae and chlorophyll quantity drastically decreases and after treatment by ZnO (another catalyst) no re-growth occurs even after 4 days [120]. Moreover, during treatment, ROS attack both the algal cell membrane and intracellular organelles. Algal organelles are degraded via lipid peroxidation, DNA damages and protein oxidation [121–123]. Interestingly, even if the majority of authors reported that algae are rapidly degraded in seawater by AOP (few minutes), because of the heterogeneity in this group some other authors studying the global plankton (zooplankton and phytoplankton) found that plankton seems to be more resistant to AOP than bacteria [95], [164].

### 3. Microbial inactivation modeling

Many studies have already been done to model the disinfection of fresh water by AOPs and many equations have been written. These models have been around for many years and over time have been modified to describe the process leading more accurately and rigorously to the inactivation of microorganisms. In the literature, bacterial disinfection follows a 3-step process [109]. In most studies, bacterial degradation is analyzed by viable and growable bacteria counts. At the beginning of the treatment, the bacteria are damaged but multiple damages are required to inhibit the growth process [109,124–126] leads to an initial shoulder in the disinfection kinetics. Once the process is initiated, the damage caused leads to microbial inactivation and the degradation can be modeled by first order kinetics. After a few hours, a stabilization of the concentration, linked to the development of bacteria resistant to the process, can be observed. In 2000, Lambert and Johnston divided inactivation models into two groups of assumptions used to describe them, namely, the mechanistic assumption or the vitalist assumption. For the latter, the model is built on the major principle that part of the microbial population is resistant to chemical disinfection, while in the second case, the models consider a degradation process similar to those described for the degradation of chemical compounds [127]. In freshwater, four kinetic models were frequently described in the literature [93,94]: i) Chick's model [128], ii) Watson and Chick's model [129], iii) Delayed Watson and Chick's model and iv) Hom's model [130]. Chick's model was the first to describe bacterial disinfection due to radical attack. It consisted in describing the degradation of bacteria according to a mechanistic approach, namely a chemical reaction. This approach has evolved to finally lead to the creation of the delayed model of Watson and Chick. This model allows to model either the shoulder or the tail in the disinfection curve. Another approach, particularly adapted to describe the whole process of bacterial disinfection during a radical attack, is the Hom model. It is based on a power law to model the three steps of disinfection (initial shoulder, exponential disinfection and final resistance). Other models have been

written [92,93,131–133] since Watson and Chick's model and Hom's model to improve the representation of experimental data. These models often include too many empirical parameters, are particularly complex, and therefore are rarely applied. Watson and Chick's model and Hom's model remain the most frequently used models [93,94] and are often used as a starting point for the development of empirical models of kinetic power law models. Some studies have compared and validated the use of similar models between different water matrix by studying disinfection in fresh water, MQ water and artificial seawater, and showing that the same kinetic law is suitable to describe the kinetics in all three matrices [96]. As the reaction kinetics are of the same order, so it seems possible to consider applying the freshwater model to saltwater. The two simple and representative models, namely, the delayed Watson and Chick model and the Hom model, are detailed below as well as a more complex empirical model as an example of a recent model.

#### 3.1. First order models relative to the target concentration

##### 3.1.1. Delayed Watson and Chick's model

In 1908, the Chick's model [128] was the first model to compare bacterial inactivation to a chemical reaction. In this model individual bacteria were considered as molecules and the disinfection was modeled as a first order kinetics. Watson modified the Chick's model to introduce a concentration-time product to consider disinfectant concentration variation [129]. Thus, the delayed model of Watson and Chick, accounting for the initial time lag, was developed. It allows to represent the shoulder observed at the beginning of the disinfection process which translates the necessity to have multiple radical attacks on several sites before observing the inactivation of the bacteria. Then, this model considers that the disinfection process is of pseudo-first order (Eq. (7)) [94].

$$\ln \left( \frac{N}{N_0} \right) = -KC^n T \rightarrow \frac{N}{N_0} = \begin{cases} 1, & t \leq t_{lag} \\ e^{-k'(t-t_{lag})}, & t > t_{lag} \end{cases} \quad (7)$$

With  $N$  the bacterial concentration at time  $t$ ,  $N_0$  the initial bacterial concentration and  $t_{lag}$  the time at the end of the lag phase (initial shoulder),  $k' = kC^n$  with  $k$  is directly related to irradiation  $I$ ,  $C$  the catalyst concentration at time  $t$  and  $T$  the needed time to achieve the wanted inactivation.

##### 3.1.2. Hom's model

Hom's equation can model both the initial lag and the tailing off in the curve at the same time [130]. It is very similar to Watson and Chick's model but differs with the addition of a power factor  $m$  for time  $T$  (Eq. (8)). When  $m = 1$ , the equation corresponds to Watson and Chick's law,  $m > 1$  represents the initial shoulder in the kinetic curve and  $m < 1$  represents the tailing off [94].

$$\ln \left( \frac{N}{N_0} \right) = -KC^n T^m \rightarrow \frac{N}{N_0} = -K_1 \left[ 1 - e^{-K_2 T} \right]^{K_3} \quad (8)$$

With  $N$  the bacterial concentration at time  $t$ ,  $N_0$  the initial bacterial concentration,  $C$  the catalyst concentration at time  $t$  and  $T$  the needed time to achieve the wanted inactivation and  $K_1$ ,  $K_2$  and  $K_3$  are empirical constant of the model.

#### 3.2. Models based also on the flux density

As for the previous models, models with flux density have been developed for bacteria degradation in freshwater mostly using empirical approaches. For example, Kacem et al. [132] developed a photocatalytic inactivation model for *E. coli* in freshwater. This model considers the influence of flux density  $I$  as well as the variation of bacteria concentration  $C$  in the liquid phase. The variation of the

bacterial concentration in the liquid phase is mainly due to two coupled phenomena which are the adhesion of the bacteria on the surface of the catalyst and the degradation by photo-oxidation. To be relevant, this approach is built on the writing of two mass balances respectively representative of the variation taking place in liquid phase and at the solid interface (catalyst) (Eqs. (9) and (10)).

$$\frac{dC}{dt} = -K_s \cdot S_{cat} \cdot (q_e - q) - \frac{V_r}{V_t} \cdot \alpha \cdot I_r^f \cdot C \quad (9)$$

$$\frac{dq}{dt} = K_s \cdot (q_e - q) - \frac{V_r}{V_t} \cdot \alpha' \cdot I_r^f \cdot q \quad (10)$$

With C the bacterial concentration at time t, q the bacteria density attached on the catalyst surface at time t,  $q_e = F \cdot C_t^{\frac{1}{n}}$  the bacteria density attached on the catalyst surface at the equilibria where F and n are model parameters,  $K_s$  the fluid film mass-transfer coefficient ( $s^{-1}$ ),  $S_{cat}$  the equivalent surface of catalyst per unit of total volume to be treated ( $m^2/L$ ),  $V_r$  the irradiated volume (L),  $V_t$  the total volume (L),  $I_r$  the average irradiation ( $W/m^3$ ), and a, a', f and f' are kinetic parameters.

Thus, there are several types of models to represent bacterial inactivation by photo-oxidation. Nevertheless, all models have been established with a bacterial model target (*E. coli*) in fresh water. No model exists to describe the microbial disinfection process in seawater which is a more complex matrix due to its composition.

#### 4. Key operating parameters to be optimized for microbial inactivation by heterogeneous photo-oxidation processes

Microbial inactivation is induced by the coupling of two phenomena. The production of ROS which is mainly limited by the quantity of photons. The mass transfer in the medium which translates the microbial transfer from the liquid to the catalyst surface. This second phenomenon is partly based on the interaction between the catalyst particles and the microorganism. The production of ROS can be affected by different parameters such as the effect of pH, temperature, the presence of organic and inorganic matter. But, the influencing factors of photo-oxidation are finally classified into two groups: (1) those that govern the inactivation process such as flux density, target concentration and (2) those that have a direct impact on the microorganisms such as additional stress, heat, or change in the interaction with the catalyst with pH, organic and inorganic matter. As previously mentioned,  $\cdot OH$  are the main ROS involved in the destruction of microbes in heterogeneous photooxidation mechanisms, but these radicals being short-lived, are unlikely to diffuse far from the catalyst surface (no further than 1  $\mu m$ ) [25,43]. Kikuchi et al. showed that killing of *E. coli* still occurred even when bacteria are separated from the catalyst by porous membrane probably because of  $H_2O_2$ . On the other hand, bacteria membrane permeabilization occurs mostly when cells adhere to catalyst surfaces [25]. The interaction between the catalyst and the microorganisms is dependent on the experimental conditions such as pH or dissolved organic matter.

##### 4.1. Flux density

Majority of modeling written for bacteria disinfection by photo-oxidation process are based on flux density and initial concentration on bacteria as it was present previously (see Section 3.2). Therefore, flux density remains an important operating factor to photo-oxidation efficiency. Conversely, all the studies described in the literature reveal a strong dependence of the degradation rate on the flux density [108,132]. Consequently, the duration and intensity of the light flux are the key parameters to control the disinfection process. Kacem et al. [28] conducted disinfection experiments over a range of flux intensities while keeping the other operating conditions constant. This experiment highlighted that the kinetics of bacterial inactivation evolves non-linearly with flux density. It also shows that the tail formed at the end of

the kinetics appears in a more marked and premature way for the low density of flux. This characteristic, indicating the development of bacteria resistant to the treatment, seems to be favored at low flux density. It has been shown that the inactivation process of viruses and bacteria is dependent on the UV/TiO<sub>2</sub> treatment time [114].

##### 4.2. Temperature

Temperature plays a key role in the photo-oxidation process for microbial disinfection [99]. During the photo-oxidation period, oxidizing free radicals react with oxidizing microorganisms to oxidize organic biomass. Temperature can affect the global inactivation process in two ways: (1) at the ROS production step, and (2) on microorganism's physical condition (thermic stress).

Majority of studies on the temperature impact onto photocatalytic experiment have been performed with abiotic organic matter in freshwater. It results that over a range of 10–60 °C the temperature does not impact photocatalytic efficiency [134]. The increase in temperature favors the production of ROS but inhibits the adsorption process of the pollutants on the catalyst. These two phenomena having antagonistic effects, the influence of the temperature is not observed. On the other hand, high temperatures decrease the solubility of oxygen and negatively affect the production of superoxide radicals [135]. Recently, El Hakim et al. observed a photothermal effect onto the EDTA degradation by photo-oxidation. By performing EDTA photocatalytic experiments at tree temperature (40 °C, 60 °C and 80 °C), they show that the EDTA degradation is raised at high temperature due to oxidizing radicals enhancement [136]. For disinfection, temperature plays a key role in the photo-oxidation process of bacteria. As shown in numerous studies, inactivation by free radical attack is significantly intensified when the temperature increases [46,94,137,138]. Cho et al. [46] justify the inactivation of *E. coli* at high temperature by the increase of ROS generated, while Evgenidou et al. [137] explain it by an increase of the collision frequency at high temperature.

With respect to microorganisms, temperature plays a very important role. Each organism has its optimal growth temperature and beyond this temperature heat stress occurs. During heat stress phenomena, vegetative cells have to face external damages onto cell wall components or onto the cytoplasmic membrane. On the other hand internal damage have been observed onto ribosomes, ribosomal RNA and onto tricarboxylic acid (TCA) enzymes (such as the enzyme found in the citric acid cycle which is involved in cellular metabolism) [104,139]. Liu et al. [138] demonstrated that temperature stress alters the composition of saturated fatty acids by forming unsaturated fatty acids. The increasing on the unsaturated fatty acid proportion made cell wall less rigid. Thus, during heat stress, some organisms develop thermal resistance while others die. Smelt and al. thus proposed a model to represent the inactivation of organisms in response to heat stress [140].

##### 4.3. Seawater matrix complexity

Organic matter and inorganic matter are the two main components of seawater. This complex matrix is composed mostly of water and salts (2.5 % of salts, the most abundant ions of seawater are chloride Cl<sup>-</sup>, sodium Na<sup>+</sup>, sulfate SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, magnesium Mg<sup>2+</sup>, calcium Ca<sup>2+</sup> and potassium K<sup>+</sup>), but there are also dissolved organic (such as carbohydrate and amino acids) and inorganic materials (mostly carbon, bromide, boron, strontium and fluoride), particulates and a few atmospheric gases such as oxygen, argon and carbon dioxide [141]. The salinity of seawater varies according to its location, the seasons, and the weather conditions. Heat, by promoting evaporation, increases salinity, while cold water and rainfall tend to limit the salinity level. Thus, the Atlantic and Pacific oceans have relatively low salt concentrations of about 35 g/L, while seas such as the Mediterranean reach values of 38 g/L, and up to 45 g/L for the most salty ones such as the Persian Gulf [142]. These compounds by modifying the conditions of photo-oxidation and



the process of radical production can reduce the effectiveness of AOP disinfection (Supplementary 1).

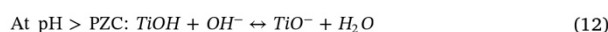
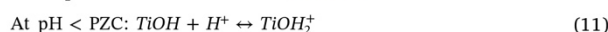
The effect of inorganic ions on the photocatalytic disinfection is worth exploring. Indeed, many studies have found that the presence of inorganic ions can significantly influence the photocatalytic disinfection [95,96]. According to Liu et al. chloride ions, which are scavengers of hydroxyl radicals, have an effect on the microbial inactivation process, while sulfate does not seem to alter the disinfection process of *E. coli* [138]. Unlike ozonation, photo-oxidation do not produce toxic species by reacting with inorganic ions. Thus, the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> process is not recommended for seawater treatment due to the presence of dissolved bromide in seawater. More generally, the Fenton and ozonation processes, due to the inhibitory effects of inorganic matter, do not seem to be suitable technologies (Supplementary 1) [26]. When inorganic ions are present in large quantities, they interfere physically and chemically with the catalyst. Thus, the presence of inorganic ions, and in particular chlorides, is responsible for the loss of photoactivity of TiO<sub>2</sub> due to two mechanisms: *i*) the scavenging effect where chlorine ions react with oxidizing radicals and *ii*) the fouling of the active site on the catalyst surface. For example, several authors demonstrated that a prolonged exposition period of TiO<sub>2</sub> film to artificial seawater decreased catalyst activity by elimination of TiO<sub>2</sub> (hydrodynamic stress) and by recovering the catalyst with a chemical or biological film [79].

The effect of organic matter, widely studied for photocatalytic disinfection of fresh and wastewaters, deserves to be explored in the case of saline waters [95,96]. Indeed, even if organic matters have not been identified as an inhibitor of the heterogeneous photocatalysis process, the efficiency of the process is limited in the presence of organic matter. This impact could have two origins. First, the presence of organic matter, by absorbing part of the radiation, limits the flux of photons transmitted in the medium to the surface of the catalyst. Thus, the high concentrations of ions and organic matter, particularly present in seawater, can potentially reduce significantly the available photons to initiate the photo-excitation process. [96]. The second reason is related to the presence of dissolved organic matter which can react with the ROS produced by the catalyst. Indeed, as the disinfection process takes place at the vicinity of the catalyst (ROS lifetime is short), the organic matter can consume part of the ROS intended for the degradation of microorganisms. This competition between the species presents by decreasing the number of ROS available, limits the efficiency of the disinfection process. Thus, when organic matter interact strongly with the catalyst, they slow down the disinfection rate either by competition or by covering the catalyst. These effects were highlighted in the work of Reoyo-Prat et al. [34] on abiotic pollutants, using four pharmaceutical molecules. They have shown that one together into the matrix the degradation rate of each compound are reduce compared to those of molecule alone.

#### 4.4. pH

Even if we can consider that the pH is almost constant in all the seas of the world (around 8.2 [143,144]), his parameter significantly influences the disinfection process and has been studied under controlled conditions. The pH acts in different ways on the properties of the catalyst either by changing the number and nature of the charges on the surface of the catalyst, or by facilitating the formation of catalyst aggregates but also by modifying the position of the valence and conduction bands. Thus, the surface properties of the catalysts during heterogeneous photo-oxidation are sensitive to the pH variation. Indeed, the isoelectric point or point of zero charge (PZC) of the catalyst switches positively or negatively according to the pH. When the pH value is lower than the PZC, the positively charged surface of the catalyst increases the electrostatic attraction to the negatively charged contaminant. As the adsorption of negatively charged contaminants on the photocatalyst is improved, the disinfection process is facilitated. Above the PZC, the negatively charged catalyst surface, attracts the

positively charged contaminants. At the PZC, the interactions between the catalyst and the targets are reduced because the electrostatic forces at the surface of the solid are negligible. For example, for TiO<sub>2</sub> catalyst, the PZC is around 7 and surface charge changing occurs according to Eqs. (11) and (12). Below pH 7, microorganisms that are negatively charged are attracted to the catalyst and those positively charged are repulsed, suggesting that negative microorganisms are more susceptible to disinfection. Now, in the opposite situation, positively charged microorganisms interacting more strongly with the catalyst surface and are more easily subjected to the disinfection process [75,145]. In seawater, whereby an immobilized TiO<sub>2</sub> at pH 7.8-8 (> PZC) renders gram-positive bacterium like *Corynebacterium stationis* more susceptible than gram-negative bacterium like *Alteromonas sp.* [79]. Kormann et al. [147] having studied the distribution of TiO<sub>2</sub> forms as a function of pH, report that, between 3 < pH < 10, the surface is mainly functionalized to TiOH, for pH > 10, TiO<sup>-</sup> is present at more than 20%, while at pH < 3, TiOH<sub>2</sub><sup>+</sup> is present at more than 20%. They also determined the equilibrium constant of the reaction at different pH values.:  $pK_{TiOH_2^+} = 2.4$  and  $pK_{TiOH} = 8.0$  [146,147].



Bacterial adhesion on the catalyst surface clearly depends on the pH. Schwegmann et al. [145] observed by scanning electronic microscopy (SEM) that *E. coli* adhesion on solid catalysts are more efficient at low pH (pH at 4, thus below the PZC) than at high pH (pH at 10, thus above the PZC). In freshwater, Kacem et al. observed that bacterial adhesion to solid catalysts also depends on catalyst size. When the catalyst is micrometric i.e. the catalyst particles are larger than the bacteria, it has been observed (by SEM) that several bacteria adhere to the same catalyst particle. On the other hand, when the particles are nano-sized (smaller than the bacteria), several catalyst particles adhered to the same bacteria. However, the particles size can be influenced by pH, at PZC the neutral surface charge of the catalyst enhances the catalyst particles aggregation. Catalyst particles are unable to produce the interactive rejection for solid-liquid separation so catalyst particles start aggregate and particles become larger [27].

Interestingly, several authors have been demonstrated that the pH has an impact on reaction rate between ROS and cell component [53,148,149]. Matheson et al. [148] having studied the reaction rate constant of histidine with singlet oxygen, find that this reaction rate in a function of pH. The photo-oxidative disinfection being based on ROS attacks onto micro-organisms, so a change on the reaction rate between ROS and protein can impact the global inactivation rate.

#### 5. Seawater bio-securing application of photo-oxidation processes

Over the past decade, seawater bio-securing has become an interesting field for AOPs disinfection processes applications with ballast seawater treatment or aquaculture. Most efficient AOPs treatment used UVC irradiations combined to hydroxide peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) which have a great disinfectant power on plankton and bacteria (both gram positive and negative) (Supplementary 2) [95,96,150–152]. The disadvantage is that using UVC requires an energy-consuming UV lamp, whereas the development of AOPs using UVA or UVB allows the use of solar UV, and the liquid catalyst remain in the seawater after the end of the treatment. Even if less efficient, in combination with catalyst (solid as TiO<sub>2</sub> or C<sub>N</sub>-TiO<sub>2</sub> [79,95,153], or liquid as H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, O<sub>3</sub>, Fe<sup>2+</sup> or HSO<sub>5</sub><sup>-</sup> [95,98,151]) UVA and UVB AOPs have a great disinfectant power in seawater. Photocatalytic treatment applied for the seawater disinfection need to be choose carefully depending on the application. In seawater the used of O<sub>3</sub> will generate bromide which is toxic so an adsorption process such as activated carbon (AC) need to be add at the end of the treatment. Once the bromide has been eliminated, the seawater can be re-used in aquaculture, as Pobleto-Chavez et al. show with the rotifer culture



(rotifer comprise one of the most used feeds in finfish aquaculture) [154]. The photo-Fenton treatment is strongly modified the seawater pH by acidifying it [155] so after or during the treatment the pH need to be adjust to avoid negative impact on fishes or mollusks if the treated seawater was used in aquaculture. Moreover, generator of radicals such as  $H_2O_2$  can reduce metabolisms of marine organisms and induce mortality. For example, mussel exposition to 10 mg/L of  $H_2O_2$  start inducing mortality after 200 h [156] whereas for the *Vibrio alginolyticus* inactivation Moreno-Andrés et al. used 5 mg/L of  $H_2O_2$  [151] which had a half-lives in seawater from 15 to 70 h [157]. Solid catalyst such as  $TiO_2$  can also impact marine organisms (mussel and oysters) [158–160] but as it is solid it can be separated from the treated seawater before it used in aquaculture that made UV/ $TiO_2$  disinfection processes an promising processes for seawater treatment.

## 6. Conclusion and future prospects

In this review, the focus was on disinfection of seawater by heterogeneous photooxidation. Operational factors (flux density, temperature, seawater composition, pH) and ROS-targeted biomolecules are considered to gain insight into the potential of seawater disinfection via this process. Despite the limited number of seawater disinfection studies available in the literature and the lack of knowledge, heterogeneous photocatalytic oxidation is positioned as a promising technology for microbial seawater disinfection applications, but in doing so, additional studies on viral seawater disinfection are however needed.

Heterogeneous photo-oxidation has four major advantages:

- efficient elimination of all microbes present in seawater as well as toxins.
- do not generate toxic subproducts.
- no need to add reagents during treatment and reused of catalyst.
- sustainable process (solar irradiation as UV source) applied under environmental condition (pH, temperature...).

In the years to come, the demand for seawater disinfection is expected to increase and heterogeneous photo-oxidation seems to be a promising disinfection process to apply. in:

### (1) Ballast water treatment:

With globalization, shipping has increased and with it invasives species dissemination around the world. Since 2004, the International Maritime Organization (IMO) who regulates ballast water management (BMW) have adopted the International Convention on the Control and Management of Ship's Ballast Water and Sediments. In addition, with the increase of green energy demand, offshore wind turbines have been developed. Those turbines are moored to sea floor with big ballast water tanks. Those tanks are accumulating microorganisms that can be released into the environment, and thus need to be treated to eliminate all microbes present.

### (2) Aquaculture (and pisciculture) bio-securing:

With the increase in demand for seafood, intensive farming has developed. On these farms, the density of fish or molluscs is high, and diseases appear frequently. To limit mortality episodes, antibiotic treatments and/or genetic selection are widely used. An increasing number of antibiotic-resistant bacterial strains are emerging, and new disinfection methods need to be developed to bio-secure this type of effluent. Moreover, it has already been shown that water treatment processes using photocatalysis can achieve sufficient water quality to be applied in closed-loop aquariums containing coral reefs as well as fish and other invertebrates [161].

One of the undeniable advantages of photocatalysis is that it can act simultaneously on biotic and abiotic contaminants present in water (microorganisms, microbial toxins, pesticides, pharmaceutical substances). However, the application of such a process still requires several

methodological developments as highlighted in our review: firstly, no study was found in the literature devoted to the disinfection of viruses present in seawater by heterogeneous photocatalysis. Secondly, among the studies cited in this paper (Supplementary 2), we pointed out the lack of homogeneity in units of inactivation efficiency according to the microorganisms considered, which would allow researchers and professionals to compare the inactivation performance of AOP processes applied to seawater treatment. Indeed, the sensitivity of each microorganism to disinfection remains one of the key points to really predict the global disinfection of seawater.

## Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

## Acknowledgments

This work received support from the French National Research Agency (ANR) under Grant no. ANR-10-LABX-22-01-SOLSTICE, the Région Occitanie (PHOTODEPOL, No. 19015248), and the University of Perpignan Via Domitia through the Energy Environment Research Federation (FREE) under projects “Lagoon Ecosystem Health and Remediation” and “PHOTOMIC” of the axis “Sustainable processes, management and ecosystem health”. This study is set within the framework of the “Laboratoire d'Excellence (LABEX)” TULIP (ANR-10-LABX-41). This work was also funded by the doctoral school Énergie - Environnement (ED305), University of Perpignan Via Domitia, France.

## Appendix A. Supporting information

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at [doi:10.1016/j.nxsust.2023.100003](https://doi.org/10.1016/j.nxsust.2023.100003).

## References

- [1] britannica.com, Seawater, n.d. (<https://www.britannica.com/science/seawater/>), (Accessed 4 January 2022).
- [2] L.M. Hernández-Terrones, K.A. Null, D. Ortega-Camacho, A. Paytan, Water quality assessment in the Mexican Caribbean: impacts on the coastal ecosystem, *Cont. Shelf Res.* 102 (2015) 62–72, <https://doi.org/10.1016/j.csr.2015.04.015>
- [3] A. Bado-Nilles, B. Gagnaire, H. Thomas-Guyon, S. Le Floch, T. Renault, Effects of 16 pure hydrocarbons and two oils on haemocyte and haemolymphatic parameters in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), *Toxicol. In Vitro* 22 (2008) 1610–1617, <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2008.04.011>
- [4] S. Bayen, H. Kee Lee, J. Philip Obbard, Exposure and response of aquacultured oysters, *Crassostrea gigas*, to marine contaminants, *Environ. Res.* 103 (2007) 375–382, <https://doi.org/10.1016/j.envres.2006.06.012>
- [5] B. Gagnaire, H. Thomas-Guyon, Th Burgeot, T. Renault, Pollutant effects on Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), hemocytes: screening of 23 molecules using flow cytometry, *Cell Biol. Toxicol.* 22 (2006) 1–14, <https://doi.org/10.1007/s10565-006-0011-6>
- [6] B. Gagnaire, M. Gay, A. Huvet, J.-Y. Daniel, D. Saulnier, T. Renault, Combination of a pesticide exposure and a bacterial challenge: in vivo effects on immune response of Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), *Aquat. Toxicol.* 84 (2007) 92–102, <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2007.06.002>
- [7] Ambulkar Nathanson, wastewater treatment: process, history, importance, systems, & technologies, *Britannica* (2022), (<https://www.britannica.com/technology/wastewater-treatment>) (Accessed 21 July 2022).
- [8] SDWF, Wastewater Treatment, Safe Drink. Water Found, 2017. (<https://www.safewater.org/fact-sheets-1/2017/1/23/wastewater-treatment>), (Accessed 21 July 2022).
- [9] C. Tuser, What is wastewater treatment? *Water Wastes Dig.* (2021), (<https://www.wwdmag.com/wastewater-treatment/wastewater-treatment/article/10938537/what-is-wastewater-treatment>) (Accessed 21 July 2022).
- [10] M.C.V.M. Starling, R.P. de Mendonça Neto, G.F.F. Pires, P.B. Vilela, C.C. Amorim, Combat of antimicrobial resistance in municipal wastewater treatment plant effluent via solar advanced oxidation processes: achievements and perspectives, *Sci. Total Environ.* 786 (2021) 147448, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.147448>
- [11] G. Marbuah, I.-M. Gren, B. McKie, Economics of harmful invasive species: a review, *Diversity* 6 (2014) 500–523, <https://doi.org/10.3390/d6030500>
- [12] Nippon Kaiji Kyokai, Ballast Water Management Convention | ClassNK - English, ClassNK, 2022. (<https://www.classnk.or.jp/hp/en/activities/statutory/ballastwater/index.html>), (Accessed 21 June 2022).



- [13] E. Tsolaki, E. Diamadopoulou, Technologies for ballast water treatment: a review, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 85 (2010) 19–32, <https://doi.org/10.1002/jctb.2276>
- [14] United Nations Conference on Trade and Development, Review of maritime transport 2017, 2017.
- [15] (IMO) International Marine Organisation, List of ballast water management systems that make use of Active Substances which received Basic Approval, 2020.
- [16] IMO London, Global Ballast Water Management Programme, 2nd International Ballast Water Treatment - R&D Symposium, 2003.
- [17] E. Lakshmi, M. Priya, V.S. Achari, An overview on the treatment of ballast water in ships, *Ocean Coast. Manag.* 199 (2021) 105296, <https://doi.org/10.1016/j.ocecoaman.2020.105296>
- [18] R. El Zrelli, L. Rabaoui, R.H. Roa-Ureta, N. Gallai, S. Castet, M. Grégoire, N. Bejaoui, P. Courjault-Radé, Economic impact of human-induced shrinkage of Posidonia oceanica meadows on coastal fisheries in the Gabes Gulf (Tunisia, Southern Mediterranean Sea), *Mar. Pollut. Bull.* 155 (2020) 111124, <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2020.111124>
- [19] B.S. Halpern, M. Frazier, J. Potapenko, K.S. Casey, K. Koenig, C. Longo, J.S. Lowndes, R.C. Rockwood, E.R. Selig, K.A. Selkoe, S. Walbridge, Spatial and temporal changes in cumulative human impacts on the world's ocean, *Nat. Commun.* 6 (2015) 7615, <https://doi.org/10.1038/ncomms8615>
- [20] N. Ahmed, S. Thompson, M. Glaser, Global aquaculture productivity, environmental sustainability, and climate change adaptability, *Environ. Manag.* 63 (2019) 159–172, <https://doi.org/10.1007/s00267-018-1117-3>
- [21] H.J. You, J.H. Lee, M. Oh, S.Y. Hong, D. Kim, J. Noh, M. Kim, B.S. Kim, Tackling *Vibrio parahaemolyticus* in ready-to-eat raw fish flesh slices using lytic phage VPT02 isolated from market oyster, *Food Res. Int.* 150 (2021) 110779, <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110779>
- [22] Z. Gholami, M.S. Mortazavi, A. Karbassi, Environmental risk assessment of harmful algal blooms case study: Persian Gulf and Oman Sea located at Hormozgan Province, Iran, *Hum. Ecol. Risk Assess.* Int. J. 25 (2019) 271–296, <https://doi.org/10.1080/10807039.2018.1501660>
- [23] R.P.E. Yanong, Fungal diseases of fish, *Veterinary Clin. North Am. Exot. Anim. Pract.* 6 (2003) 377–400, [https://doi.org/10.1016/S1094-9194\(03\)00005-7](https://doi.org/10.1016/S1094-9194(03)00005-7)
- [24] Radcliffe, What types of fungi grow in the ocean? *Sciencing* (2017), <https://sciencing.com/types-fungi-grow-ocean-8467074.html> (Accessed 21 July 2022).
- [25] H.A. Foster, I.B. Ditta, S. Varghese, A. Steele, Photocatalytic disinfection using titanium dioxide: spectrum and mechanism of antimicrobial activity, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 90 (2011) 1847–1868, <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3213-7>
- [26] A.R. Lado Ribeiro, N.F.F. Moreira, G. Li Puma, A.M.T. Silva, Impact of water matrix on the removal of micropollutants by advanced oxidation technologies, *Chem. Eng. J.* 363 (2019) 155–173, <https://doi.org/10.1016/j.cej.2019.01.080>
- [27] S. Malato, P. Fernández-Ibáñez, M.I. Maldonado, J. Blanco, W. Gernjak, Decontamination and disinfection of water by solar photocatalysis: recent overview and trends, *Catal. Today.* 147 (2009) 1–59, <https://doi.org/10.1016/j.cattod.2009.06.018>
- [28] M. Kacem, Inactivation bactérienne par photocatalyse hétérogène Application à *Escherichia coli*, 2015.
- [29] C. Joannis-Cassan, A.S. Rodriguez Castillo, C. Dezani, C. Gómez-Canela, B. Reoyo-Prats, C. Calas-Blanchard, C. Barata, S. Lacorte, G. Plantard, Towards an innovative combined process coupling biodegradation and photo-oxidation for the removal of pharmaceutical residues, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 96 (2021) 755–763, <https://doi.org/10.1002/jctb.6589>
- [30] S. Giannakis, B. Androulaki, C. Comninellis, C. Pulgarin, Wastewater and urine treatment by UVC-based advanced oxidation processes: implications from the interactions of bacteria, viruses, and chemical contaminants, *Chem. Eng. J.* 343 (2018) 270–282, <https://doi.org/10.1016/j.cej.2018.03.019>
- [31] Q. Huang, C.-S. Hong, TiO<sub>2</sub> photocatalytic degradation of PCBs in soil-water systems containing  $\alpha$ -nuro surfactant, 2000, 9.
- [32] S. Malato, J. Cáceres, A.R. Fernández-Alba, L. Piedra, M.D. Hernando, A. Agüera, J. Vial, Photocatalytic treatment of diuron by solar photocatalysis: evaluation of main intermediates and toxicity, *Environ. Sci. Technol.* 37 (2003) 2516–2524, <https://doi.org/10.1021/es0261170>
- [33] F. Méndez-Arriaga, M.I. Maldonado, J. Gimenez, S. Esplugas, S. Malato, Abatement of ibuprofen by solar photocatalysis process: enhancement and scale up, *Catal. Today.* 144 (2009) 112–116, <https://doi.org/10.1016/j.cattod.2009.01.028>
- [34] brice Reoyo-Prats, J.-C. Claire, H. Mouldi, G. Vincent, C.-B. Carole, P. Gaël, Photo-oxidation of three major pharmaceuticals in urban wastewater under artificial and solar irradiations, *J. Photochem. Photobiol. Chem.* 425 (2022) 113673, <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2021.113673>
- [35] T. Janin, Traitement d'effluents phytosanitaires par héliocatalyse – Hybridation sorption/photocatalyse, 2011.
- [36] J.-M. Herrmann, Heterogeneous photocatalysis: an emerging discipline involving multiphase systems, *Catal. Today* 24 (1995) 157–164, [https://doi.org/10.1016/0920-5861\(95\)00005-Z](https://doi.org/10.1016/0920-5861(95)00005-Z)
- [37] F. Zaviscka, P. Drogui, G. Mercier, J.-F. Blais, Procédés d'oxydation avancée dans le traitement des eaux et des effluents industriels: application à la dégradation des polluants réfractaires, *Rev. Sci. Eau* 22 (2009) 535–564, <https://doi.org/10.7202/038330ar>
- [38] A. Rosset, G. Plantard, K. Djessas, Photocatalytic efficiencies of Zn1-xMxO compounds synthesized with a broad panel of M elements: responses in the UV, visible and solar range, *J. Environ. Chem. Eng.* 6 (2018) 7273–7283, <https://doi.org/10.1016/j.jece.2018.11.018>
- [39] K. Michael, Schindler, Marinus. Kunst, Charge-carrier dynamics in titania powders, *J. Phys. Chem.* 94 (1990) 8222–8226, <https://doi.org/10.1021/j100384a045>
- [40] M.E.A. Kribèche, T. Sehili, G. Lesage, J. Mendret, S. Broillon, Insight into photochemical oxidation of Fenuron in water using iron oxide and oxalate: the roles of the dissolved oxygen, *J. Photochem. Photobiol. Chem.* 329 (2016) 120–129, <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2016.06.021>
- [41] E. Pelizzetti, C. Minero, Role of oxidative and reductive pathways in the photocatalytic degradation of organic compounds, *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.* 151 (1999) 321–327, [https://doi.org/10.1016/S0927-7757\(98\)00580-9](https://doi.org/10.1016/S0927-7757(98)00580-9)
- [42] D. Wen, D. Chen, Y. Jiang, Synergistic algicidal effects of combined UV-LED/chlorine treatments on *Tetraselmis* sp.: optimization and mode-of-action, *Chem. Eng. J.* 422 (2021) 130043, <https://doi.org/10.1016/j.cej.2021.130043>
- [43] Y. Kikuchi, K. Sunada, T. Iyoda, K. Hashimoto, A. Fujishima, Photocatalytic bactericidal effect of TiO<sub>2</sub> thin films: dynamic view of the active oxygen species responsible for the effect, *J. Photochem. Photobiol. Chem.* 106 (1997) 51–56, [https://doi.org/10.1016/S1010-6030\(97\)00038-5](https://doi.org/10.1016/S1010-6030(97)00038-5)
- [44] M. Cho, J. Yoon, Measurement of OH radical CT for inactivating *Cryptosporidium parvum* using photo/ferrioxalate and photo/TiO<sub>2</sub> systems, *J. Appl. Microbiol.* 104 (2008) 759–766, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03682.x>
- [45] M. Cho, H. Chung, W. Choi, J. Yoon, Different inactivation behaviors of MS-2 phage and *Escherichia coli* in TiO<sub>2</sub> photocatalytic disinfection, *Appl. Environ. Microbiol.* 71 (2005) 270–275, <https://doi.org/10.1128/AEM.71.1.270-275.2005>
- [46] M. Cho, H. Chung, W. Choi, J. Yoon, Linear correlation between inactivation of *E. coli* and OH radical concentration in TiO<sub>2</sub> photocatalytic disinfection, *Water Res.* 38 (2004) 1069–1077, <https://doi.org/10.1016/j.watres.2003.10.029>
- [47] A.E. Beck, K.A. Hunt, R.P. Carlson, Measuring cellular biomass composition for computational biology applications, *Processes* 6 (2018) 38, <https://doi.org/10.3390/pr6050038>
- [48] J.D. Liefer, A. Garg, M.H. Fyfe, A.J. Irwin, I. Benner, C.M. Brown, M.J. Follows, A.W. Omta, Z.V. Finkel, The macromolecular basis of phytoplankton C:N:P under nitrogen starvation, *Front. Microbiol.* 10 (2019), <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2019.00763> (Accessed 15 June 2022).
- [49] J. Bogdan, Comparison of Infectious Agents Susceptibility to Photocatalytic Effects of Nanosized Titanium and Zinc Oxides: A Practical Approach, 2015, 15.
- [50] J.K. Kiwi, V. Nadtchenko, New Evidence for TiO<sub>2</sub> Photocatalysis during Bilayer Lipid Peroxidation, 2004, <https://doi.org/10.1021/JP048281A>.
- [51] C. Regmi, B. Joshi, S.K. Ray, G. Gyawali, R.P. Pandey, Understanding mechanism of photocatalytic microbial decontamination of environmental wastewater, *Front. Chem.* 6 (2018) 33, <https://doi.org/10.3389/fchem.2018.00033>
- [52] P.-C. Maness, S. Smolinski, D.M. Blake, Z. Huang, E.J. Wolfrum, W.A. Jacoby, Bactericidal activity of photocatalytic TiO<sub>2</sub> reaction: toward an understanding of its killing mechanism, *Appl. Environ. Microbiol.* 65 (1999) 4094–4098, <https://doi.org/10.1128/AEM.65.9.4094-4098.1999>
- [53] M.J. Davies, Singlet oxygen-mediated damage to proteins and its consequences, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 305 (2003) 761–770, [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(03\)00817-9](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(03)00817-9)
- [54] K.L. Nelson, A.B. Boehm, R.J. Davies-Colley, M.C. Dodd, T. Kohn, Karl G. Linden, Y. Liu, P.A. Maraccini, K. McNeill, W.A. Mitch, T.H. Nguyen, K.M. Parker, R.A. Rodriguez, L.M. Sassoubre, A.I. Silverman, K.R. Wigginton, R.G. Zepp, Sunlight-mediated inactivation of health-relevant microorganisms in water: a review of mechanisms and modeling approaches, *Environ. Sci. Process. Impacts* 20 (2018) 1089–1122, <https://doi.org/10.1039/C8EM00047F>
- [55] M. Zeeshan, S.M. Prasad, Differential response of growth, photosynthesis, anti-oxidant enzymes and lipid peroxidation to UV-B radiation in three cyanobacteria, *South Afr. J. Bot.* 75 (2009) 466–474, <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2009.03.003>
- [56] H.L. Smith, M.C. Howland, A.W. Szmudzis, Q. Li, L.L. Daemen, A.N. Parikh, J. Majewski, Early stages of oxidative stress-induced membrane permeabilization: a neutron reflectometry study, *ACS Publ.* (2009), <https://doi.org/10.1021/ja807680m>
- [57] S.-K. Yeo, M.-T. Liong, Effects and applications of sub-lethal ultrasound, electro-poration and UV radiations in bioprocessing, *Ann. Microbiol.* 63 (2013) 813–824, <https://doi.org/10.1007/s13213-012-0559-8>
- [58] S. Bellmaine, A. Schnellbaecher, A. Zimmer, Reactivity and degradation products of tryptophan in solution and proteins, *Free Radic. Biol. Med.* 160 (2020) 696–718, <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2020.09.002>
- [59] B. Ezraty, A. Gennaris, F. Barras, J.-F. Collet, Oxidative stress, protein damage and repair in bacteria, *Nat. Rev. Microbiol.* 15 (2017) 385–396, <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.26>
- [60] M.-J. Kim, Photocatalytic degradation of seawater organic matter using a submerged membrane reactor, 2010, 6.
- [61] D. Park, H.M. Shahbaz, S.-H. Kim, M. Lee, W. Lee, J.-W. Oh, D.-U. Lee, J. Park, Inactivation efficiency and mechanism of UV-TiO<sub>2</sub> photocatalysis against murine norovirus using a solidified agar matrix, *Int. J. Food Microbiol.* 238 (2016) 256–264, <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.09.025>
- [62] K. Sunada, T. Watanabe, K. Hashimoto, Studies on photokilling of bacteria on TiO<sub>2</sub> thin film, *J. Photochem. Photobiol. Chem.* 156 (2003) 227–233, [https://doi.org/10.1016/S1010-6030\(02\)00434-3](https://doi.org/10.1016/S1010-6030(02)00434-3)
- [63] C.-J. Chung, H.-I. Lin, C.-M. Chou, P.-Y. Hsieh, C.-H. Hsiao, Z.-Y. Shi, J.-L. He, Inactivation of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* under various light sources on photocatalytic titanium dioxide thin film, *Surf. Coat. Technol.* 203 (2009) 1081–1085, <https://doi.org/10.1016/j.surfcoat.2008.09.036>
- [64] A. Lebedev, F. Anariba, J.C. Tan, X. Li, P. Wu, A review of physicochemical and photocatalytic properties of metal oxides against *Escherichia coli*, *J. Photochem. Photobiol. Chem.* 360 (2018) 306–315, <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2018.04.013>



- [65] A. Gil, L.A. Galeano, M.Á. Vicente (Eds.), Applications of Advanced Oxidation Processes (AOPs) in Drinking Water Treatment, Springer International Publishing, Cham, 2019, <https://doi.org/10.1007/978-3-319-76882-3>
- [66] C.A. Juan, The chemistry of reactive oxygen species (ROS) revisited: outlining their role in biological macromolecules (DNA, lipids and proteins) and induced pathologies, *Int. J. Mol. Sci.* (2021) 21.
- [67] D.G. Knorre, O.S. Fedorova, E.I. Frolova, Oxidative degradation of nucleic acids, *Russ. Chem. Rev.* 62 (1993) 65–86, <https://doi.org/10.1070/RC1993v062n01ABEH000006>
- [68] X.L.L. Yan, X.H.S. Zaher, How do cells cope with RNA damage and its consequences?, 2019, 14.
- [69] C. Zhang, Continuous photocatalysis via photo-charging and dark-discharging for sustainable environmental remediation: performance, mechanism, and influencing factors, *J. Hazard. Mater.* (2021) 13.
- [70] N. Kashef, Y.-Y. Huang, M.R. Hamblin, Advances in antimicrobial photodynamic inactivation at the nanoscale, *Nanophotonics* 6 (2017) 853–879, <https://doi.org/10.1515/nanoph-2016-0189>
- [71] J.-Y. Maillard, Bacterial resistance to biocides in the healthcare environment: should it be of genuine concern? *J. Hosp. Infect.* 65 (2007) 60–72, [https://doi.org/10.1016/S0195-6701\(07\)60018-8](https://doi.org/10.1016/S0195-6701(07)60018-8)
- [72] M.A. Webber, L.P. Randall, S. Cooles, M.J. Woodward, L.J.V. Piddock, Triclosan resistance in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, *J. Antimicrob. Chemother.* 62 (2008) 83–91, <https://doi.org/10.1093/jac/dkn137>
- [73] M. Finnegan, E. Linley, S.P. Denyer, G. McDonnell, C. Simons, J.-Y. Maillard, Mode of action of hydrogen peroxide and other oxidizing agents: differences between liquid and gas forms, *J. Antimicrob. Chemother.* 65 (2010) 2108–2115, <https://doi.org/10.1093/jac/dkq308>
- [74] P.V. Laxma Reddy, B. Kavitha, P.A. Kumar Reddy, K.-H. Kim, TiO<sub>2</sub>-based photocatalytic disinfection of microbes in aqueous media: a review, *Environ. Res.* 154 (2017) 296–303, <https://doi.org/10.1016/j.envres.2017.01.018>
- [75] X. Zheng, Z. Shen, C. Cheng, L. Shi, R. Cheng, D. Yuan, Photocatalytic disinfection performance in virus and virus/bacteria system by Cu-TiO<sub>2</sub> nanofibers under visible light, *Environ. Pollut.* 237 (2018) 452–459, <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.02.074>
- [76] A. Erkan, U. Bakir, G. Karakas, Photocatalytic microbial inactivation over Pd doped SnO<sub>2</sub> and TiO<sub>2</sub> thin films, *J. Photochem. Photobiol. Chem.* 184 (2006) 313–321, <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2006.05.001>
- [77] B. Kim, D. Kim, D. Cho, S. Cho, Bactericidal effect of TiO<sub>2</sub> photocatalyst on selected food-borne pathogenic bacteria, *Chemosphere* 52 (2003) 277–281, [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(03\)00051-1](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(03)00051-1)
- [78] H.-L. Liu, T.C.-K. Yang, Photocatalytic inactivation of *Escherichia coli* and *Lactobacillus helveticus* by ZnO and TiO<sub>2</sub> activated with ultraviolet light, *Process Biochem.* 39 (2003) 475–481, [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(03\)00084-0](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(03)00084-0)
- [79] D. Rubio, J.F. Casanueva, E. Nebot, Improving UV seawater disinfection with immobilized TiO<sub>2</sub>: study of the viability of photocatalysis (UV254/TiO<sub>2</sub>) as seawater disinfection technology, *J. Photochem. Photobiol. Chem.* 271 (2013) 16–23, <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2013.08.002>
- [80] M.N. Chong, B. Jin, H. Zhu, C. Saint, Bacterial inactivation kinetics, regrowth and synergistic competition in a photocatalytic disinfection system using anatase titanate nanofiber catalyst, *J. Photochem. Photobiol. Chem.* 214 (2010) 1–9, <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2010.05.018>
- [81] P.S.M. Dunlop, C.P. Sheeran, J.A. Byrne, M.A.S. McMahon, M.A. Boyle, K.G. McGuigan, Inactivation of clinically relevant pathogens by photocatalytic coatings, *J. Photochem. Photobiol. Chem.* 216 (2010) 303–310, <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2010.07.004>
- [82] S. Kim, K. Ghafoor, J. Lee, M. Feng, J. Hong, D.-U. Lee, J. Park, Bacterial inactivation in water, DNA strand breaking, and membrane damage induced by ultraviolet-assisted titanium dioxide photocatalysis, *Water Res.* 47 (2013) 4403–4411, <https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.05.009>
- [83] Z. Huang, P.-C. Maness, D.M. Blake, E.J. Wolfrum, S.L. Smolinski, W.A. Jacoby, Bactericidal mode of titanium dioxide photocatalysis, *J. Photochem. Photobiol. Chem.* 130 (2000) 163–170, [https://doi.org/10.1016/S1010-6030\(99\)00205-1](https://doi.org/10.1016/S1010-6030(99)00205-1)
- [84] I. De Pasquale, C. Lo Porto, M. Dell'Edera, F. Petronella, A. Agostiano, M.L. Curri, R. Comparelli, Photocatalytic TiO<sub>2</sub>-based nanostructured materials for microbial inactivation, *Catalysts* 10 (2020) 1382, <https://doi.org/10.3390/catal10121382>
- [85] E.V. Skorb, L.I. Antonouskaya, N.A. Belyasova, D.G. Shchukin, H. Möhwald, D.V. Sviridov, Antibacterial activity of thin-film photocatalysts based on metal-modified TiO<sub>2</sub> and TiO<sub>2</sub>:In<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanocomposite, *Appl. Catal. B Environ.* 84 (2008) 94–99, <https://doi.org/10.1016/j.apcatb.2008.03.007>
- [86] A. Rincon, Effect of pH, inorganic ions, organic matter and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> on *E. coli* K12 photocatalytic inactivation by TiO<sub>2</sub> implications in solar water disinfection, *Appl. Catal. B Environ.* 51 (2004) 283–302, <https://doi.org/10.1016/j.apcatb.2004.03.007>
- [87] H. Teramoto, M. Inui, H. Yukawa, OxyR acts as a transcriptional repressor of hydrogen peroxide-inducible antioxidant genes in *Corynebacterium glutamicum* R, *FEBS J.* 280 (2013) 3298–3312, <https://doi.org/10.1111/febs.12312>
- [88] V. Rodríguez-González, S. Obregón, O.A. Patrón-Soberano, C. Terashima, A. Fujishima, An approach to the photocatalytic mechanism in the TiO<sub>2</sub>-nanomaterials microorganism interface for the control of infectious processes, *Appl. Catal. B Environ.* 270 (2020) 118853, <https://doi.org/10.1016/j.apcatb.2020.118853>
- [89] A.-G. Rincón, C. Pulgarin, Bactericidal action of illuminated TiO<sub>2</sub> on pure *Escherichia coli* and natural bacterial consortia: post-irradiation events in the dark and assessment of the effective disinfection time, *Appl. Catal. B Environ.* 49 (2004) 99–112, <https://doi.org/10.1016/j.apcatb.2003.11.013>
- [90] P.M. Munro, G.N. Flatau, R.L. Clément, M.J. Gauthier, Influence of the RpoS (KatF) sigma factor on maintenance of viability and culturability of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* in seawater, *Appl. Environ. Microbiol.* 61 (1995) 1853–1858, <https://doi.org/10.1128/aem.61.5.1853-1858.1995>
- [91] A. Eisenstark, M.J. Calcutt, M. Becker-Hapak, A. Ivanova, Role of *Escherichia coli* rps and associated genes in defense against oxidative damage, *Free Radic. Biol. Med.* 21 (1996) 975–993, [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(96\)00154-2](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(96)00154-2)
- [92] H. Baniamerian, M. Safavi, M. Alvarado-Morales, P. Tsapekos, I. Angelidakis, S. Shokrollahzadeh, Photocatalytic inactivation of *Vibrio fischeri* using Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-TiO<sub>2</sub>-based nanoparticles, *Environ. Res.* 166 (2018) 497–506, <https://doi.org/10.1016/j.envres.2018.06.011>
- [93] O.K. Dalrymple, D.Y. Goswami, Mechanistic modeling of photocatalytic water disinfection, in: T. An, H. Zhao, P.K. Wong (Eds.), *Adv. Photocatalytic Disinfect.* Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2011, pp. 273–315, [https://doi.org/10.1007/978-3-662-53496-0\\_13](https://doi.org/10.1007/978-3-662-53496-0_13)
- [94] P. Ganguly, C. Byrne, A. Breen, S.C. Pillai, Antimicrobial activity of photocatalysts: fundamentals, mechanisms, kinetics and recent advances, *Appl. Catal. B Environ.* 225 (2018) 51–75, <https://doi.org/10.1016/j.apcatb.2017.11.018>
- [95] J. García-Garay, A. Franco-Herera, F. Machuca-Martínez, Wild microorganism and plankton decay in ballast water treatments by solar disinfection (SODIS) and advanced oxidation processes, *Mar. Pollut. Bull.* 154 (2020) 111060, <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2020.111060>
- [96] D. Rubio, E. Nebot, J.F. Casanueva, C. Pulgarin, Comparative effect of simulated solar light, UV, UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and photo-Fenton treatment (UV-Vis/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Fe<sup>2+</sup>+<sub>3</sub>) in the *Escherichia coli* inactivation in artificial seawater, *Water Res.* 47 (2013) 6367–6379, <https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.08.006>
- [97] T. Saito, T. Iwase, J. Horie, T. Morioka, Mode of photocatalytic bactericidal action of powdered semiconductor TiO<sub>2</sub> on mutants streptococci, 1992, 11.
- [98] H. Baniamerian, P. Tsapekos, M. Alvarado-Morales, S. Shokrollahzadeh, M. Safavi, I. Angelidakis, Effect of surfactants on photocatalytic toxicity of TiO<sub>2</sub>-based nanoparticles toward *Vibrio fischeri* marine bacteria, *Inorg. Chem. Commun.* 116 (2020) 107936, <https://doi.org/10.1016/j.inoche.2020.107936>
- [99] S. Giannakis, E. Darakas, A. Escalas-Cañellas, C. Pulgarin, Temperature-dependent change of light dose effects on *E. coli* inactivation during simulated solar treatment of secondary effluent, *Chem. Eng. Sci.* 126 (2015) 483–487, <https://doi.org/10.1016/j.ces.2014.12.045>
- [100] C. Grob, B.G. Pollet, Regrowth in ship's ballast water tanks: think again!, *Mar. Pollut. Bull.* 109 (2016) 46–48, <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.04.061>
- [101] J. Moreno-Andrés, N. Ambauen, O. Vadstein, C. Hallé, A. Acevedo-Merino, E. Nebot, T. Meyn, Inactivation of marine heterotrophic bacteria in ballast water by an electrochemical advanced oxidation process, *Water Res.* 140 (2018) 377–386, <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.04.061>
- [102] P.P. Stehouwer, A. Buma, L. Peperzak, A comparison of six different ballast water treatment systems based on UV radiation, electrochlorination and chlorine dioxide, *Environ. Technol.* 36 (2015) 2094–2104, <https://doi.org/10.1080/09593330.2015.1021858>
- [103] D. Wu, H. You, R. Zhang, C. Chen, D.-J. Lee, Ballast waters treatment using UV/Ag-TiO<sub>2</sub> + O<sub>3</sub> advanced oxidation process with *Escherichia coli* and *Vibrio alginolyticus* as indicator microorganisms, *Chem. Eng. J.* 174 (2011) 714–718, <https://doi.org/10.1016/j.cej.2011.09.087>
- [104] V. Wu, A review of microbial injury and recovery methods in food, *Food Microbiol.* 25 (2008) 735–744, <https://doi.org/10.1016/j.fm.2008.04.011>
- [105] D. Wu, H. You, J. Du, C. Chen, D. Jin, Effects of UV/Ag-TiO<sub>2</sub>/O<sub>3</sub> advanced oxidation on unicellular green alga *Dunaliella salina*: implications for removal of invasive species from ballast water, *J. Environ. Sci.* 23 (2011) 513–519, [https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(10\)60443-3](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(10)60443-3)
- [106] M. Berney, H.-U. Weilenmann, A. Simonetti, T. Egli, Efficacy of solar disinfection of *Escherichia coli*, *Shigella flexneri*, *Salmonella typhimurium* and *Vibrio cholerae*, *J. Appl. Microbiol.* 101 (2006) 828–836, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.02983.x>
- [107] F.L. Hellweger, V. Bucci, M.R. Litman, A.Z. Gu, A. Onnis-Hayden, Biphasic decay kinetics of fecal bacteria in surface water not a density effect, *J. Environ. Eng.* 135 (2009) 372–376, [https://doi.org/10.1061/\(ASCE\)0733-9372\(2009\)135:5\(372\)](https://doi.org/10.1061/(ASCE)0733-9372(2009)135:5(372))
- [108] A.K. Benabbou, Z. Derriche, C. Felix, P. Lejeune, C. Guillard, Photocatalytic inactivation of *Escherichia coli*, *Appl. Catal. B Environ.* 76 (2007) 257–263, <https://doi.org/10.1016/j.apcatb.2007.05.026>
- [109] J. Marugán, R. van Grieken, C. Sordo, C. Cruz, Kinetics of the photocatalytic disinfection of *Escherichia coli* suspensions, *Appl. Catal. B Environ.* 82 (2008) 27–36, <https://doi.org/10.1016/j.apcatb.2008.01.002>
- [110] S. Pigeot-Rémy, F. Simonet, E. Errazuriz-Cerda, J.C. Lazzaroni, D. Atlan, C. Guillard, Photocatalysis and disinfection of water: identification of potential bacterial targets, *Appl. Catal. B Environ.* 104 (2011) 390–398, <https://doi.org/10.1016/j.apcatb.2011.03.001>
- [111] J. Gomes, D. Frasson, R. Quinta-Ferreira, A. Matos, R. Martins, Removal of enteric pathogens from real wastewater using single and catalytic ozonation, *Water* 11 (2019) 127, <https://doi.org/10.3390/w11010127>
- [112] B.K. Mayer, Y. Yang, D.W. Gerrity, M. Abbaszadegan, The impact of capsid proteins on virus removal and inactivation during water treatment processes, *Microbiol. Insights.* 8s2 (2015) MBI.S31441, <https://doi.org/10.4137/MBI.S31441>
- [113] C. Zhang, Y. Li, D. Shuai, Y. Shen, D. Wang, Progress and challenges in photocatalytic disinfection of waterborne Viruses: a review to fill current knowledge gaps, *Chem. Eng. J.* 355 (2019) 399–415, <https://doi.org/10.1016/j.cej.2018.08.158>
- [114] R. Nakano, M. Hara, H. Ishiguro, Y. Yao, T. Ochiai, K. Nakata, T. Murakami, J. Kajioaka, K. Sunada, K. Hashimoto, A. Fujishima, Y. Kubota, Broad spectrum microbicidal activity of photocatalysis by TiO<sub>2</sub>, *Catalysts* 3 (2013) 310–323, <https://doi.org/10.3390/catal3010310>



- [115] M.V. Liga, E.L. Bryant, V.L. Colvin, Q. Li, Virus inactivation by silver doped titanium dioxide nanoparticles for drinking water treatment, *Water Res.* 45 (2011) 535–544, <https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.09.012>
- [116] M. Bai, N. Xie, Y. He, J. Li, J.L. Collier, D.E. Hunt, Z.I. Johnson, N. Jiao, G. Wang, Vertical community patterns of Labyrinthulomycetes protists reveal their potential importance in the oceanic biological pump, *Environ. Microbiol.* (2021), <https://doi.org/10.1111/1462-2920.15709> (1462-2920.15709).
- [117] J.O. Corliss, Biodiversity and Biocomplexity of the Protists and an Overview of Their Significant Roles in Maintenance of Our Biosphere, 2002, 21.
- [118] L. Hu, R. Wang, M. Wang, Y. Xu, C. Wang, Y. Liu, J. Chen, Research progress of photocatalysis for algae killing and inhibition: a review, *Environ. Sci. Pollut. Res.* 29 (2022) 47902–47914, <https://doi.org/10.1007/s11356-022-20645-9>
- [119] Z. Lu, K. Zhang, X. Liu, Y. Shi, High efficiency inactivation of microalgae in ballast water by a new proposed dual-wave UV-photocatalysis system (UVA/UVC-TiO<sub>2</sub>), *Environ. Sci. Pollut. Res.* 26 (2019) 7785–7792, <https://doi.org/10.1007/s11356-019-04268-1>
- [120] P. Sathe, M.T.Z. Myint, S. Dobretsov, J. Dutta, Removal and regrowth inhibition of microalgae using visible light photocatalysis with ZnO nanorods: a green technology, *Sep. Purif. Technol.* 162 (2016) 61–67, <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2016.02.007>
- [121] E. Morelli, E. Gabellieri, A. Bonomini, D. Tognotti, G. Grassi, I. Corsi, TiO<sub>2</sub> nanoparticles in seawater: aggregation and interactions with the green alga *Dunaliella tertiolecta*, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 148 (2018) 184–193, <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.10.024>
- [122] Y. Wang, X. Zhu, Y. Lao, X. Lv, Y. Tao, B. Huang, J. Wang, J. Zhou, Z. Cai, TiO<sub>2</sub> nanoparticles in the marine environment: physical effects responsible for the toxicity on algae *Phaeodactylum tricornutum*, *Sci. Total Environ.* 565 (2016) 818–826, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.03.164>
- [123] X. He, P. Wu, S. Wang, A. Wang, C. Wang, P. Ding, Inactivation of harmful algae using photocatalysts: mechanisms and performance, *J. Clean. Prod.* 289 (2021) 125755, <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.125755>
- [124] A.H. Geeraerd, C.H. Herremans, J.F. Van Impe, Structural model requirements to describe microbial inactivation during a mild heat treatment, *Int. J. Food Microbiol.* 59 (2000) 185–209, [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00362-7](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00362-7)
- [125] M.D. Labas, C.A. Martín, A.E. Cassano, Kinetics of bacteria disinfection with UV radiation in an absorbing and nutritious medium, *Chem. Eng. J.* 114 (2005) 87–97, <https://doi.org/10.1016/j.cej.2005.09.013>
- [126] B.F. Severin, M.T. Suidan, R.S. Engelbrecht, Kinetic modeling of U.V. disinfection of water, *Water Res.* 17 (1983) 1669–1678, [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(83\)90027-1](https://doi.org/10.1016/0043-1354(83)90027-1)
- [127] R.J.W. Lambert, M.D. Johnston, Disinfection kinetics: a new hypothesis and model for the tailing of log-survivor/time curves, *J. Appl. Microbiol.* 88 (2000) 907–913, <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.01060.x>
- [128] H. Chick, An investigation of the laws of disinfection, *J. Hyg.* 8 (1908) 92–158, <https://doi.org/10.1017/S002217240006987>
- [129] H.E. Watson, A note on the variation of the rate of disinfection with change in the concentration of the disinfectant, *Epidemiol. Infect.* 8 (1908) 536–542, <https://doi.org/10.1017/S0022172400015928>
- [130] L.W. Hom, Kinetics of chlorine disinfection in an ecosystem, 1972. <https://ascelibrary.org/doi/pdf/10.1061/JSEDA1.0001370>.
- [131] J. Marugán, R. van Grieken, A.E. Cassano, O.M. Alfano, Kinetic modelling of the photocatalytic inactivation of bacteria, *Water Sci. Technol.* 61 (2010) 1547–1553, <https://doi.org/10.2166/wst.2010.057>
- [132] M. Kacem, V. Goetz, G. Plantard, N. Wery, Modeling heterogeneous photocatalytic inactivation of *E. coli* using suspended and immobilized TiO<sub>2</sub> reactors, *AIChE J.* 61 (2015) 2532–2542, <https://doi.org/10.1002/aic.14834>
- [133] O.K. Dalrymple, E. Stefanakos, M.A. Trotz, D.Y. Goswami, A review of the mechanisms and modeling of photocatalytic disinfection, 2010, 12.
- [134] T. Zhang, T. Oyama, A. Aoshima, H. Hidaka, J. Zhao, N. Serpone, Photooxidative N-demethylation of methylene blue in aqueous TiO<sub>2</sub> dispersions under UV irradiation, *J. Photochem. Photobiol. Chem.* 140 (2001) 163–172, [https://doi.org/10.1016/S1010-6030\(01\)00398-7](https://doi.org/10.1016/S1010-6030(01)00398-7)
- [135] D.S. Bhatkhande, V.G. Pangarkar, A.A. Beenackers, Photocatalytic degradation for environmental applications – a review, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 77 (2002) 102–116, <https://doi.org/10.1002/jctb.532>
- [136] S. El Hakim, T. Chave, S.I. Nikitenko, Photocatalytic and sonocatalytic degradation of EDTA and rhodamine B over TiO and Ti@TiO<sub>2</sub> nanoparticles, *Catalysts* 11 (2021) 928, <https://doi.org/10.3390/catal11080928>
- [137] E. Evgenidou, K. Fytianos, I. Poullos, Semiconductor-sensitized photodegradation of dichlorvos in water using TiO<sub>2</sub> and ZnO as catalysts, *Appl. Catal. B Environ.* 59 (2005) 81–89, <https://doi.org/10.1016/j.apcatb.2005.01.005>
- [138] N. Liu, Q. Zhu, N. Zhang, C. Zhang, N. Kawazoe, G. Chen, N. Negishi, Y. Yang, Superior disinfection effect of *Escherichia coli* by hydrothermal synthesized TiO<sub>2</sub>-based composite photocatalyst under LED irradiation: influence of environmental factors and disinfection mechanism, *Environ. Pollut.* 247 (2019) 847–856, <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.01.082>
- [139] R.G. Earnshaw, J. Appleyard, R.M. Hurst, Understanding physical inactivation processes: combined preservation opportunities using heat, ultrasound and pressure, *Int. J. Food Microbiol.* 28 (1995) 197–219, [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(95\)00057-7](https://doi.org/10.1016/0168-1605(95)00057-7)
- [140] J.P.P.M. Smelt, S. Brul, Thermal inactivation of microorganisms, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 54 (2014) 1371–1385, <https://doi.org/10.1080/10408398.2011.637645>
- [141] T.K. Lowenstein, M.N. Timofeeff, V.M. Kovalevych, J. Horita, The major-ion composition of Permian seawater, *Geochim. Cosmochim. Acta* 69 (2005) 1701–1719, <https://doi.org/10.1016/j.gca.2004.09.015>
- [142] N. Voutchkov, Introduction to reverse osmosis, *Desalination* (2010) 49.
- [143] European Environmental Agency, Ocean acidification, n.d. <https://www.eea.europa.eu/ims/ocean-acidification>, (Accessed 23 June 2022).
- [144] The European Space Agency, Surface ocean pH, n.d. [https://www.esa.int/ESA\\_Multimedia/Images/2015/01/Surface\\_ocean\\_pH](https://www.esa.int/ESA_Multimedia/Images/2015/01/Surface_ocean_pH), (Accessed 23 June 2022).
- [145] H. Schwegmann, J. Ruppert, F.H. Frimmel, Influence of the pH-value on the photocatalytic disinfection of bacteria with TiO<sub>2</sub> – explanation by DLVO and XDLVO theory, *Water Res.* 47 (2013) 1503–1511, <https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.11.030>
- [146] M.N. Chong, B. Jin, C.W.K. Chow, C. Saint, Recent developments in photocatalytic water treatment technology: a review, *WATER TREATMENT* (2010) 31.
- [147] C. Kormann, D.W. Bahnemann, M.R. Hoffmann, Photolysis of chloroform and other organic molecules in aqueous titanium dioxide suspensions, *Environ. Sci. Technol.* 25 (1991) 494–500, <https://doi.org/10.1021/es00015a018>
- [148] I.B.C. Matheson, J. Lee, Chemical reaction rates of amino acids with singlet oxygen, *Photochem. Photobiol.* 29 (1979) 879–881, <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1979.tb07786.x>
- [149] F. Wilkinson, J.G. Brummer, Rate constants for the decay and reactions of the lowest electronically excited singlet state of molecular oxygen in solution, *J. Phys. Chem. Ref. Data* 10 (1981) 809–999, <https://doi.org/10.1063/1.555655>
- [150] E. Villar-Navarro, I. Levchuk, J.J. Rueda-Márquez, M. Manzano, Combination of solar disinfection (SODIS) with H2O2 for enhanced disinfection of marine aquaculture effluents, *Sol. Energy* 177 (2019) 144–154, <https://doi.org/10.1016/j.solener.2018.11.018>
- [151] J. Moreno-Andrés, M. Tierno-Galán, L. Romero-Martínez, A. Acevedo-Merino, E. Nebot, Inactivation of the waterborne marine pathogen *Vibrio alginolyticus* by photo-chemical processes driven by UV-A, UV-B, or UV-C LED combined with H2O2 or HSO<sub>5</sub><sup>-</sup>, *Water Res.* 232 (2023) 119686, <https://doi.org/10.1016/j.watres.2023.119686>
- [152] L. Romero-Martínez, I. Rivas-Zaballos, J. Moreno-Andrés, I. Moreno-Garrido, A. Acevedo-Merino, E. Nebot, Improving the microalgae inactivating efficacy of ultraviolet ballast water treatment in combination with hydrogen peroxide or peroxymonosulfate salt, *Mar. Pollut. Bull.* 162 (2021) 111886, <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2020.111886>
- [153] Z. Lu, Y. Wang, S. Zhang, K. Zhang, Y. Shi, C. Meng, Multi-wave UV-photocatalysis system (UVA + UVC + VUV/Cu-N-TiO<sub>2</sub>) for efficient inactivation of microorganisms in ballast water, *Mater. Express* 11 (2021) 1608–1614, <https://doi.org/10.1166/mex.2021.2062>
- [154] R. Poblete Chavez, E. Cortes Pizarro, R. Rojas Araya, Treatment of seawater for rotifer culture uses applying adsorption and advanced oxidation processes, *Lat. Am. J. Aquat. Res.* 44 (2016) 779–791, <https://doi.org/10.3856/vol44-issue4-fulltext-13>
- [155] W. Wang, H. Xie, G. Li, J. Li, P.K. Wong, T. An, Visible-Light-Induced Marine Bacterial Inactivation in Seawater by In-Situ Photo-Fenton System Without Additional Oxidants: Implications for Ballast Water Sterilization, 2021.
- [156] M.N. Haque, S.-H. Kwon, Physiological effects of biocide on marine bivalve blue mussels in context prevent macrofouling, *J. Ecol. Environ.* 40 (2016) 16, <https://doi.org/10.1186/s41610-016-0015-y>
- [157] L. Pedersen, C. Lazado, Decay of peracetic acid in seawater and implications for its chemotherapeutic potential in aquaculture, *Aquac. Environ. Interact.* 12 (2020) 153–165, <https://doi.org/10.3354/aei00354>
- [158] B.D. Johnson, S.L. Gilbert, B. Khan, D.L. Carroll, A.H. Ringwood, Cellular responses of eastern oysters, *Crassostrea virginica*, to titanium dioxide nanoparticles, *Mar. Environ. Res.* 111 (2015) 135–143, <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2015.06.019>
- [159] J.J. Doyle, J.E. Ward, G.H. Wikfors, Acute exposure to TiO<sub>2</sub> nanoparticles produces minimal apparent effects on oyster, *Crassostrea virginica* (Gmelin), hemocytes, *Mar. Pollut. Bull.* 127 (2018) 512–523, <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.12.039>
- [160] Y. Shang, F. Wu, S. Wei, W. Guo, J. Chen, W. Huang, M. Hu, Y. Wang, Specific dynamic action of mussels exposed to TiO<sub>2</sub> nanoparticles and seawater acidification, *Chemosphere* 241 (2020) 125104, <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.125104>
- [161] G. Camera-Roda, V. Loddò, L. Palmisano, F. Parrino, Photocatalytic ozonation for a sustainable aquaculture: a long-term test in a seawater aquarium, *Appl. Catal. B Environ.* 253 (2019) 69–76, <https://doi.org/10.1016/j.apcatb.2019.04.048>
- [162] S.C. Fry, Oxidative scission of plant cell wall polysaccharides by ascorbate-induced hydroxyl radicals, *Biochem. J.* 332 (1998) 507–515, <https://doi.org/10.1042/bj320507>
- [163] R.A. Wach, H. Kudoh, M. Zhai, N. Nagasawa, Y. Muroya, F. Yoshii, Y. Katsumura, Rate constants of reactions of carboxymethylcellulose with hydrated electron, hydroxyl radical and the decay of CMC macroradicals. A pulse radiolysis study, *Polymer* 45 (2004) 8165–8171, <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2004.09.086>
- [164] J. Zhang, H. Wang, Study on mechanism of algal inactivation and pollution removal by Fe-ACF electro Fenton-like process, *Water Sci. Technol.* 72 (2015) 1700–1712, <https://doi.org/10.2166/wst.2015.388>



## Objectifs de la thèse



À la lumière de la littérature présentée dans ce premier chapitre du manuscrit, plusieurs points cruciaux émergent. Tout d'abord, il est évident qu'il existe un besoin réel d'outils de traitement des eaux salines dans le domaine de l'aquaculture. La présence de contaminants bactériens et viraux dans les eaux d'aquaculture entraîne fréquemment d'importantes pertes de production. De plus, le métabolisme des huîtres, y compris leur croissance et le fonctionnement de leur système immunitaire, peut être altéré par la présence de contaminants abiotiques tels que les pesticides ou les toxines algales. Cependant, jusqu'à présent, aucune méthode de traitement n'a été utilisée en aquaculture pour éliminer simultanément ces deux types de contaminations. Les procédés d'oxydation avancée semblent se profiler comme une méthode de traitement alternative permettant d'éliminer tous les contaminants organiques, qu'ils soient d'origine biotique ou abiotique. Parmi ces procédés d'oxydation avancée, la photocatalyse hétérogène se distingue pour des applications en eau salée de par ses multiples atouts : en premier lieu, il s'agit d'une méthode faisant appel à l'utilisation d'un catalyseur solide ré-utilisable ; ensuite, ce procédé peut utiliser la ressource solaire pour photo-activer le catalyseur ce qui limite les coûts énergétiques en proposant une technologie durable ; et pour finir, la réaction n'entraîne pas l'apparition de sous-produits réactionnels toxiques. De nombreux efforts de recherche ont été entrepris, permettant des avancées significatives dans la compréhension des mécanismes d'inactivation microbienne par photocatalyse hétérogène en eau douce. Toutefois, les capacités des photo-réacteurs solaires restent à ce jour mal définies en eau de mer, en particulier pour les pathogènes viraux, qui ne sont pas étudiés en milieu marin en raison de la complexité de leur suivi.

Dans ce contexte, l'objectif de mon projet de thèse a été d'investiguer les effets du procédé de photocatalyse hétérogène utilisant du  $\text{TiO}_2$ , en l'appliquant sur deux modèles biologiques d'intérêt, l'*Ostreid Herpes Virus 1  $\mu$ Var* et la bactérie marine *Vibrio harveyi*, étant donné les pertes économiques considérables engendrées par ces deux agents microbiens dans le milieu de l'aquaculture.

Pour atteindre cet objectif, mon travail de thèse a d'abord consisté à caractériser les effets de la photocatalyse, comparativement au procédé de photolyse, à partir de deux modèles biologiques. Dans un deuxième temps, un outil de prédiction, s'appuyant de concert sur des travaux expérimentaux et de la modélisation *in silico* a été développé afin de transposer les expériences réalisées à l'échelle du laboratoire vers des installations aquacoles à terre en s'appuyant sur l'exploitation de la ressource solaire.

La présentation des résultats est organisée en deux chapitres :

- Le premier chapitre décrit la caractérisation du mécanisme d'inactivation photocatalytique de deux pathogènes de l'huître : la bactérie *Vibrio harveyi* et l'*Ostreid Herpes Virus 1  $\mu$ Var*. Une approche d'écologie microbienne a été également développée afin de mesurer les effets du traitement sur les communautés microbiennes présentes dans l'eau de mer et quantifier l'effet de la désinfection à une échelle plus globale que celle des pathogènes seuls.
- Le second chapitre présente en détails l'inactivation du pathogène bactérien *Vibrio harveyi*. En analysant les différents mécanismes en jeu, les lois régissant l'inactivation par photocatalyse hétérogène de *Vibrio harveyi* ont été déterminées.



Une étude de modélisation et de simulation des performances de traitement à l'échelle du procédé (ou photo-réacteur) a été conduite avec pour objectif de prédire les capacités d'inactivation sous des conditions d'irradiation solaire. Une solution permettant la gestion des intermittences de la ressource solaire a été proposée pour répondre aux contraintes de biosécurisation.

Le présent manuscrit se conclut la présentation des principales conclusions scientifiques de cette étude puis aborde notamment, les questions scientifiques en lien avec les principaux verrous technologiques à lever pour l'optimisation du procédé et de ses futures applications possibles dans le monde de l'aquaculture.

## Chapitre 2 : Inactivation de pathogènes d'huître et effet du traitement de photocatalyse



## I. Introduction

Les mortalités d'huîtres font intervenir une grande variété de pathogènes, notamment viraux et bactériens, mais peuvent également être influencées par d'autres facteurs tels que la qualité de l'eau (présence de contaminants chimiques). La majorité des moyens de traitement des eaux utilisées en éclosiers se concentre sur l'inactivation des pathogènes mais n'ont aucune action sur les contaminants chimiques organiques. Or, il est clairement établi dans la littérature que les contaminants peuvent impacter le bon développement des animaux et/ou leur système immunitaire (Abi-Khalil et al., 2016; Bachère et al., 2017; Bayen et al., 2007; Britt et al., 2020; Gagnaire et al., 2007, 2006; Geret et al., 2013; Mottier et al., 2015). La photocatalyse hétérogène, de par son action à la fois sur les cibles biotiques et abiotiques, constitue un candidat idéal pour la bio-sécurisation des installations aquacoles à terre. La directive 2006/88/CE impose depuis 2006 aux établissements de production conchylicole de disposer d'agrément zoo-sanitaire et de mettre en place des mesures de prévention et lutte contre certaines maladies chez les animaux aquatiques (Directive Européenne, 2006). Une haute qualité de l'eau est donc nécessaire pour empêcher l'apparition de maladie et assurer la survie des animaux élevés dans les structures à terre (éclosiers, nurseries ou autres installations), mais également pour préserver le littoral des rejets d'élevage aquacoles contenant potentiellement du matériel biologique non endémique (Cordier et al., 2023; Eljaddi et al., 2021; Stavrakakis et al., 2020). Comme cela a pu être présenté tout au long de l'état de l'art, malgré de nombreuses études sur l'utilisation de la photocatalyse pour la décontamination de l'eau (élimination de contaminants abiotiques), l'aspect désinfection reste à ce jour peu ou très peu investigué (inactivation de contaminants biotiques), en particulier pour des applications ciblées telles que la bio-sécurisation en aquaculture nécessitant l'inactivation de pathogènes viraux.

Dans ce contexte, nous avons donc cherché à évaluer le potentiel d'un procédé de photocatalyse hétérogène pour la bio-sécurisation d'installations aquacoles grâce à une approche globale visant à (i) étudier l'inactivation du virus *OsHV-1  $\mu$ Var*, et (ii) évaluer l'effet du traitement sur les communautés bactériennes totales de l'eau de mer. Pour cela, nous avons couplé des approches d'analyse ciblées de pathogènes (virus et bactéries) permettant d'évaluer la viabilité avec l'infectiosité des particules virales et le dénombrement de bactéries viables et cultivables, avec des approches d'analyse exhaustive la composition du microbiote bactérien total (approche de Barcoding 16S).

A notre connaissance, cette étude est la première à analyser l'inactivation virale par photocatalyse hétérogène en condition eau de mer. Cette inactivation virale est ici étudiée dans le cadre d'applications à la désinfection du virus *OsHV-1  $\mu$ Var* impliqué dans le POMS. Elle souligne également les changements qu'implique un tel traitement sur le microbiote bactérien de l'eau ainsi que la capacité de résilience de celui-ci une fois le traitement terminé. L'ensemble du travail qui a été réalisé pour l'évaluation de l'efficacité du procédé de photocatalyse pour la désinfection d'eau de mer est présenté dans l'article 2 intitulé : "*Inactivation of two oyster pathogens by photo-oxidation and monitoring of changes in the microbiota of seawater: a case study on Ostreid Herpes Virus 1  $\mu$ Var and Vibrio harveyi*".

En amont de ce travail, nous avons également évalué si la présence de catalyseur de type  $\text{TiO}_2$  pouvait entraîner des effets sur l'organisme *Crassostrea gigas*, de façon à privilégier la forme particulière de  $\text{TiO}_2$  présentant l'innocuité la plus faible pour l'huître et apte à répondre à nos exigences en terme photocatalytiques.

## II. Étude préliminaire : Effet du catalyseur sur les huîtres

Les nanoparticules (NPs) sont déjà connues pour avoir des fonctions antimicrobiennes et impacter les organismes marins et leurs microbiotes (Auguste et al., 2019). Des études sur l'huître *Crassostrea virginica* ont mis en évidence la bio-réactivité et la toxicité des nanoparticules de dioxyde de titane ( $n\text{TiO}_2$ , à une concentration de 50 mg/L) sur les tissus héмато-pancréatiques des huîtres (Johnson et al., 2015) alors qu'aucune modification significative n'a été observée sur la viabilité des hémocytes (Doyle et al., 2018). En revanche, les fonctions phagocytaires des hémocytes sont modifiées suite à une exposition au  $n\text{TiO}_2$  ce qui pourrait jouer un rôle lors d'infections parasitaires (Auguste et al., 2019; Doyle et al., 2018).

Même si aucune étude n'a été réalisée sur l'impact de l'exposition au  $\text{TiO}_2$  sur le microbiote des huîtres, des études précédentes ont déjà été menées sur les moules *Mytilus galloprovincialis* montrant des modifications significatives du microbiome de l'hémolymphe de moule (Auguste et al., 2019).

Afin d'évaluer la toxicité du dioxyde de titane sur les huîtres, deux approches ont donc été menées : (i) le suivi des mortalités pendant l'exposition et post exposition, et (ii) le suivi des modifications du microbiote des huîtres dans deux cas de figures, à savoir soit pour une exposition ponctuelle des animaux au  $\text{TiO}_2$ , soit pour une exposition prolongée.

### A. Matériels et Méthodes

#### Matériel biologique

Les animaux utilisés pour vérifier la toxicité du  $\text{TiO}_2$  sont issus du même fonds génétique que ceux utilisés pour l'évaluation de l'inactivation virale par photo-oxydation (détaillé par la suite dans l'article N°2). Il s'agit d'huîtres juvéniles sensibles au virus *OsHV-1  $\mu\text{Var}$* , diploïdes et provenant d'une lignée biparentale appelée F14V (De Lorgeril et al., 2018). Les animaux utilisés dans notre étude étaient âgés de 3.5 mois, avec un poids moyen de 3 g et exemptes de pathogènes, c'est-à-dire qu'à leur réception ils n'étaient contaminés par aucun des pathogènes principaux identifiés (virus *OsHV-1*, *Vibrio aestivianus* ou *Haplosporidium*). L'ensemble des huîtres ont été anesthésiées 2 heures dans du chlorure de magnésium ( $30 \text{ g.L}^{-1}$ ) avant d'être utilisées (Suquet, 2009). Deux conditions contrôles ont été utilisées à chaque fois, la première avec des animaux non injectés et la seconde avec des animaux injectés d'eau de mer non contaminée (EM, eau de mer filtrée à  $0.2 \mu\text{m}$  avant injection).

#### Forme du catalyseur et exposition des animaux

Le dioxyde de titane ( $\text{TiO}_2$ ) utilisé pour la désinfection de l'eau de mer se présente sous deux formes micrométriques présentées dans le chapitre 1 (tableau 1). La première appelée VP Aeroperl P25/20 se présente sous forme de poudre de particules de taille moyenne de  $20 \mu\text{m}$  (Dezani, 2021; Kacem, 2015), alors que la seconde appelée Photosphères possède une taille moyenne de particules deux fois plus grande ( $45 \mu\text{m}$ ) et se compose de micro-billes de verre sur lesquels est fixé du  $\text{TiO}_2$  (Heydari, 2018; Reoyo-Prats et al., 2022). Pour les différents tests de toxicité des catalyseurs, ceux-ci ont été mis en suspension dans de l'eau de mer naturelle, provenant de l'observatoire océanologique de Banyuls-sur-Mer filtrée à  $0.2 \mu\text{m}$  et présentant une salinité ajustée à 35 PSU et pH à 8. Les concentrations de catalyseur utilisées étaient, respectivement, de  $0.8 \text{ g.L}^{-1}$  et  $5 \text{ g.L}^{-1}$  pour l'Aeroperl et les Photosphères (Plantard

and Goetz, 2014). Les concentrations en catalyseurs choisies pour notre étude ont été optimisées lors de travaux précédemment effectués au laboratoire PROMES en eau douce. Ces concentrations permettent une absorption optimale de tout le rayonnement UV incident sur l'ensemble de l'épaisseur du réacteur. Dans notre cas, il s'agit d'un bécher de 500 mL (surface irradiée de 60 cm<sup>2</sup>) contenant 200 mL d'eau de mer, soit une épaisseur de liquide de 3.4 cm.

Les huîtres ont été exposées au TiO<sub>2</sub>, soit par injection de 50 µl de suspension de TiO<sub>2</sub> directement dans le muscle adducteur de l'animal, soit par balnéation dans de l'eau de mer contenant le TiO<sub>2</sub> à la concentration souhaitée. Pour l'exposition par balnéation, aucune agitation supplémentaire du TiO<sub>2</sub> n'a été mise en place sur la durée de l'exposition.

### *Méthodes de suivi*

#### *a. Suivi des mortalités d'huîtres*

Afin de déterminer l'effet du TiO<sub>2</sub> sur la viabilité des huîtres, un suivi de mortalité a été effectué pendant 10 jours. Également, le suivi de l'inactivation virale ne peut se faire qu'au travers d'une infection expérimentale permettant de constater la diminution de l'infectiosité de la suspension virale. Pour cela, les huîtres injectées (ou non selon les conditions) ont été placées dans des aquariums de 500 mL d'eau de mer de Banyuls oxygénée et filtrée à 1 µm (salinité ajustée à 35 PSU, pH ajusté à 8, +21 °C) pour atteindre une densité d'animaux de 60 g de biomasse / L (soit 10 animaux). Pour chaque condition, des tripliquas d'aquarium ont été réalisés permettant d'atteindre un total de 30 animaux par condition. Sur les 10 jours de suivi des mortalités, les animaux n'ont pas été nourris et ont été comptés deux fois par jour en début et fin des cycles jour/nuit.

Les courbes de survies ont ensuite été tracées suivant l'estimation non paramétrique de la fonction de survie avec la méthode de Kaplan & Meyer (Article n°2).

#### *b. Analyse du microbiote de l'eau de mer ou des huîtres*

L'analyse du microbiote joue un rôle important en donnant une meilleure vision de l'effet qu'a le TiO<sub>2</sub> utilisé comme catalyseur sur les huîtres et leur microbiote. Dans cette partie, nous nous sommes concentrés uniquement sur l'analyse du microbiote associé aux huîtres exposées ou non au TiO<sub>2</sub>.

Pour réaliser l'analyse de microbiote sur les animaux exposés au dioxyde de titane, des huîtres vivantes ont été échantillonnées dans les différents aquariums (n = 3 animaux par aquarium soit 9 animaux par conditions), décoquillées puis congelées à l'azote liquide. L'ADN total des huîtres a été extrait suivant le protocole tissu du kit Machrey-Nagel NucleoSpin tissue (référence 740952) dans un volume d'élution de 30 µL. Pour améliorer l'extraction d'ADN, une étape de broyage à l'Ultraturrax a été rajouté avant l'extraction (concentration de 120 µg de chair d'huître / mL d'eau de Lewis 1X (composé de 23,4 g.L<sup>-1</sup> de NaCl, 1,5 g.L<sup>-1</sup> de KCl, 1,2 g.L<sup>-1</sup> de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O et 0,2 g.L<sup>-1</sup> de NaCl<sub>2</sub>, pH de 7,4). L'extraction a ensuite été réalisée à partir de 200 µL de broyat en rajoutant également une étape de lyse mécanique de 12 min avec des billes de zirconium suivie d'une étape de RNase avant la récupération de l'ADN sur la colonne. Les extraits d'ADN ont été conservés à - 20°C jusqu'au séquençage.

L'analyse du microbiote des huîtres a été réalisée par Metabarcoding 16S. Pour cela, le gène de l'ARNr 16S des communautés bactériennes a été amplifié en utilisant les boucles variables V3-V4 (341F / 805R) (De Lorgeril et al., 2018; Klindworth et al., 2013). Puis le

séquençage en paires a été réalisé sur le système MiSeq (Illumina) à l'Université de Perpignan Via Domitia (plateforme Bio-Environnement, Université de Perpignan, France).

Deux méthodes de traitement sont aujourd'hui utilisées pour les données de barcoding : (i) la méthode la plus ancienne utilisant un regroupement en *Operating Taxonomic Units* ou OTU, et (ii) une méthode plus récente générant des *Amplicons Sequence Variant* ou ASV. Ces deux méthodologies ont chacune des avantages et des inconvénients. Nous avons fait le choix de les appliquer en parallèle de façon à pouvoir dresser un comparatif de ces deux techniques. Il est disponible en annexe 3. Les OTUs s'appuient sur une méthode de clustering *de novo* des séquences avec un seuil de similarité de 97% d'identité de séquences. Cela a comme inconvénient majeur d'entraîner la perte d'information lorsque plusieurs espèces ont des séquences très similaires. Celles-ci vont être regroupées dans un même *cluster* (OTU) et donc être considérées comme un seul taxon dans la suite des analyses. L'autre inconvénient majeur de cette méthode est la difficulté de comparaison entre plusieurs expériences indépendantes. Les séquences graines (initiales) utilisées pour la création des OTUs est aléatoire, cela ne permet pas de générer de séquences exactes et identiques entre les études pour chaque taxon, mais des séquences consensus créés à partir du *clustering*. En revanche, les ASVs sont des séquences exactes identifiées pour chaque taxon. Ces séquences exactes sont corrigées pour tenir compte des erreurs potentielles de séquençage. Les séquences ainsi définies sont les mêmes pour les différentes études de manière à pouvoir comparer les résultats d'une étude à l'autre. L'inconvénient principal des ASVs réside dans l'apparition de bruit de fond provenant des erreurs de séquençage et/ou amplification PCR induisant la création d'ASV supplémentaires artefactuels.

Dans notre étude, les données de séquençage ont été traitées en utilisant des ASVs générées avec Quiime 2 2022.8 et DADA2 (Bolyen et al., 2019) de la même manière que pour les échantillons d'eau de mer analysés dans l'Article N°2.

L'analyse statistique a ensuite été réalisée sur R v4.2.1 (2022-06-23). Des méthodes de *clustering* hiérarchique et d'ordination ont été utilisées pour décrire et comparer la composition des communautés microbiennes entre les échantillons à partir de matrices de distance. Les Analyses de Coordonnées Principales (PCoA) des communautés microbiennes (capscale, {vegan}) (Oksanen et al., 2022) ont été calculées en utilisant les dissimilarités de Bray-Curtis (diversité  $\beta$ ) (distance, {phyloseq}) (McMurdie and Holmes, 2013). La PCoA permet de représenter les distances entre les différents échantillons suivant deux axes représentant la dissimilarité des communautés bactériennes entre les échantillons. L'impact du dioxyde de titane sur le microbiote des huîtres a été évalué par traitement statistique de type ANOVA (pairwise.perm.manova, {RVAideMemoire}) (Herve, 2023). Les analyses de la dissimilarité  $\beta$  permettent de mettre en lumière des changements entre les communautés microbiennes. Les analyses présentées par la suite permettent d'identifier les variations au niveau des proportions individuelles des taxons. L'importance des changements induits par l'exposition au TiO<sub>2</sub> sur chacun des taxons du microbiote ont été évalués grâce au Log<sub>2</sub> Fold Change. Il permet de voir le différentiel de proportion de chaque taxon entre la condition "huîtres exposées" et le contrôle correspondant "huîtres non-exposées" (DESeq, {DESeq2}) (Love et al., 2014). Pour ce test, la dispersion des données de chaque échantillon est normalisée par la moyenne suivant un test de Wald (nbinomWaldTest, {DESeq2}). De même, le core microbien a été identifié pour chaque condition afin d'identifier les genres bactériens conservés et abondants au sein des répliques (core, {microbiome}) (Lahti et al., 2019). Celui-ci est défini par un taux d'ubiquité, c'est-à-dire une présence dans, au moins, un certain nombre de répliques, et une abondance relative minimale dans chacun des répliques. Cela permet de ne retenir que

les genres bactériens conservés et abondants au sein de la population pour chaque condition étudiée.

## Résultats

### A. Exposition ponctuelle des huîtres au dioxyde de titane : injection

L'exposition ponctuelle a été réalisée par injection d'une suspension de  $\text{TiO}_2$  directement dans l'animal avant de suivre quotidiennement les mortalités et d'analyser ponctuellement le microbiote des animaux.

Le suivi des mortalités chez des huîtres injectées avec du dioxyde de titane (micrométrique) a permis de mettre en évidence qu'à court terme, c'est-à-dire entre 7 et 10 jours, le  $\text{TiO}_2$  ne présente pas d'impact sur la survie des huîtres (figure 7). En revanche, la forme nanométrique du  $\text{TiO}_2$  est considérée comme un nano-polluant susceptible d'affecter divers organismes comme les vertébrés, les invertébrés, et les plantes (Schulz, 2022). L'injection de dioxyde de titane (micrométrique) directement dans les huîtres n'a pas induit de mortalité significative chez les animaux avec l'apparition de mortalités (30%) dans uniquement un seul des réplicats 5 jours après l'exposition au  $\text{TiO}_2$  (Aeroperl, figure 7). Étant donné qu'aucune mortalité n'est apparue dans les deux autres réplicats, ces mortalités n'ont pas été considérées comme significatives mais très probablement imputables à une potentielle contamination de l'eau de l'un des réplicats.

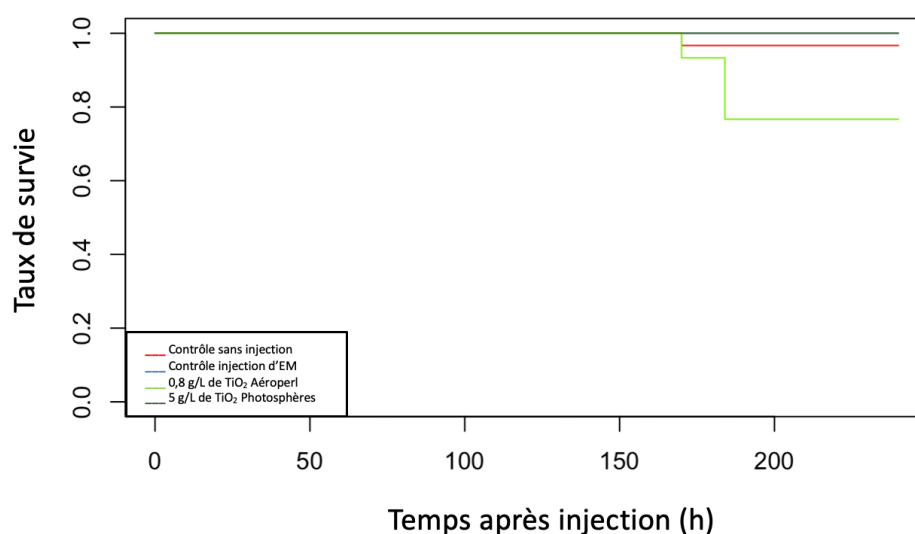


Figure 7 : Effet d'une exposition ponctuelle au dioxyde de titane sur la survie des huîtres, courbe de survie (Kaplan-Meier) obtenue pour des huîtres injectées avec du dioxyde de titane micrométrique au début du suivi (0 h)

En revanche, l'analyse du microbiote des huîtres 24 h après l'exposition au  $\text{TiO}_2$  révèle un changement significatif de ce dernier comparé à celui d'animaux injectés uniquement avec de l'eau de mer (figure 8). Même si l'analyse du différentiel d'abondance relative entre les animaux exposés et non exposés ( $\text{Log}_2$  Fold Change) ne permet pas de mettre en évidence de différence, c'est-à-dire qu'aucun taxon n'apparaît comme étant modifié avec une p-value ajustée significative lorsque l'on regarde le rapport des abondances, les analyses globales mettent en évidence des changements. En effet, l'analyse en coordonnée principale (PCoA, figure 8) permet de mettre en évidence des changements significatifs à l'échelle de la composition du microbiote global et non du taxon. Lorsque l'on étudie avec intérêt la composition du core microbien des huîtres exposées ou non au  $\text{TiO}_2$  des différences sont



néanmoins visibles (tableau 2). Aucun des genres bactériens retrouvés comme significativement sur-représenté après l'exposition ponctuelle au dioxyde de titane n'a été identifiée comme étant une bactérie opportuniste détectée lors du POMS (*Arcobacter*, *Marinobacterium*, *Marinomonas*, *Vibrio*, et *Pseudoalteromonas*) (Petton et al., 2021). Suite à une exposition au dioxyde de titane, les genres bactériens *Croceibacter*, *Mesonina* et *Sulfitobacter* sont plus abondants et présents dans plus de la moitié des échantillons avec une abondance relative importante alors que les *Pseudoalteromonas* sont eux moins abondant même si faisant toujours partie du core microbien. De la même manière, même si en présence d'*OsHV-1* le microbiote des huîtres a été modifié par une exposition ponctuelle au  $TiO_2$ , cela n'a pas favorisé le développement de la maladie du POMS. La cinétique de mortalité n'a pas été accélérée et aucun genre bactérien identifié comme associé au POMS n'a été présent en plus forte abondance relative (résultats non montrés ici).

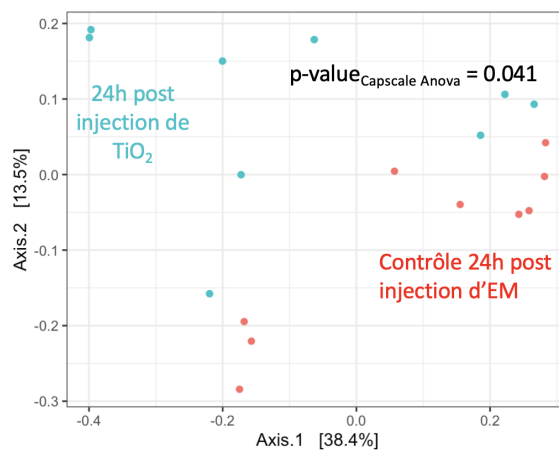


Figure 8 : Effet d'une exposition ponctuelle au dioxyde de titane sur le microbiote des huîtres, représentation en PCoA de la dissimilarité de Bray-Curtis (●) huîtres de références, non exposées au  $TiO_2$  mais ayant été injectées avec de l'eau de mer filtrée, et (●) huîtres 24 h après exposition au  $TiO_2$  par une injection directement dans le muscle adducteur.

Tableau 2 : Effet d'une exposition ponctuelle au  $TiO_2$  (Photosphère) sur la composition du core microbiome (détection du gène codant pour l'ARNr 16S sur 9 répliquas par Metabarcoding) de l'huître (*Crassostrea gigas*) 24 h après l'exposition.

Ubiquité	70%	75%	80%	95%
Abondance relative	10	5	2.5	1
Condition contrôle : 24h post injection d'eau de mer	<i>Tenacibaculum</i> <i>Polaribacter</i> <i>Kordia</i> <i>Marinomonas</i> <i>Neptuniibacter</i> <i>Pseudoalteromonas</i> <i>Thalassotalea</i> <i>Alteromonas</i> <i>Cognatishimia</i> <i>Ruegeria</i> <i>Phaeobacter</i> <i>Maricaulis</i> <i>Malaciobacter</i>	<i>Tenacibaculum</i> <i>Polaribacter</i> <i>Kordia</i> <i>Marinomonas</i> <i>Neptuniibacter</i> <i>Vibrio</i> <i>Pseudoalteromonas</i> <i>Thalassotalea</i> <i>Colwellia</i> <i>Alteromonas</i> <i>Cognatishimia</i> <i>Aliiroseovarius</i> <i>Ruegeria</i> <i>Phaeobacter</i> <i>Maricaulis</i> <i>Malaciobacter</i> <i>Poseidonibacter</i>	<i>Tenacibaculum</i> <i>Polaribacter</i> <i>Kordia</i> <i>Persicirhabdus</i> <i>Marinomonas</i> <i>Neptuniibacter</i> <i>Vibrio</i> <i>Pseudoalteromonas</i> <i>Thalassotalea</i> <i>Colwellia</i> <i>Alteromonas</i> <i>Cohaesibacter</i> <i>Cognatishimia</i> <i>Aliiroseovarius</i> <i>Ruegeria</i> <i>Phaeobacter</i> <i>Maricaulis</i> <i>Malaciobacter</i> <i>Poseidonibacter</i>	<i>Tenacibaculum</i> <i>Polaribacter</i> <i>Kordia</i> <i>Maribacter</i> <i>Persicirhabdus</i> <i>Neptuniibacter</i> <i>Vibrio</i> <i>Pseudoalteromonas</i> <i>Thalassotalea</i> <i>Colwellia</i> <i>Alteromonas</i> <i>Maritalea</i> <i>Cohaesibacter</i> <i>Cognatishimia</i> <i>Aliiroseovarius</i> <i>Ruegeria</i> <i>Phaeobacter</i> <i>Hyphomonas</i> <i>Maricaulis</i> <i>Malaciobacter</i> <i>Halarcobacter</i> <i>Poseidonibacter</i>
Condition exposée : 24h post exposition au $TiO_2$	<i>Cutibacterium</i> <i>Tenacibaculum</i> <i>Kordia</i> <i>Persicirhabdus</i> <i>Neptuniibacter</i> <i>Pseudomonas</i> <i>Pseudoalteromonas</i> <i>Cognatishimia</i> <i>Aliiroseovarius</i> <i>Ruegeria</i> <i>Phaeobacter</i> <i>Maricaulis</i> <i>Malaciobacter</i>	<i>Prauserella</i> <i>Cutibacterium</i> <i>Tenacibaculum</i> <i>Polaribacter</i> <i>Kordia</i> <i>Persicirhabdus</i> <i>Neptuniibacter</i> <i>Vibrio</i> <i>Pseudomonas</i> <i>Pseudoalteromonas</i> <i>Thalassotalea</i> <i>Cognatishimia</i> <i>Aliiroseovarius</i> <i>Ruegeria</i> <i>Sulfitobacter</i> <i>Pseudophaeobacter</i> <i>Phaeobacter</i> <i>Maricaulis</i> <i>Malaciobacter</i>	<i>Prauserella</i> <i>Cutibacterium</i> <i>Flaviflexus</i> <i>Tenacibaculum</i> <i>Kordia</i> <i>Maribacter</i> <i>Persicirhabdus</i> <i>Neptuniibacter</i> <i>Vibrio</i> <i>Pseudoalteromonas</i> <i>Thalassotalea</i> <i>Cognatishimia</i> <i>Dinoroseobacter</i> <i>Aliiroseovarius</i> <i>Ruegeria</i> <i>Sulfitobacter</i> <i>Pseudophaeobacter</i> <i>Phaeobacter</i> <i>Maricaulis</i> <i>Malaciobacter</i>	<i>Sva0996_marine_group</i> <i>Prauserella</i> <i>Cutibacterium</i> <i>Tenacibaculum</i> <i>Polaribacter</i> <i>Kordia</i> <i>Maribacter</i> <i>Croceibacter</i> <i>37-13</i> <i>Persicirhabdus</i> <i>Neptuniibacter</i> <i>Pseudomonas</i> <i>Pseudoalteromonas</i> <i>Pseudahrensia</i> <i>Ahrensia</i> <i>Cohaesibacter</i> <i>Cognatishimia</i> <i>Dinoroseobacter</i> <i>Aliiroseovarius</i> <i>Ruegeria</i> <i>Pseudophaeobacter</i> <i>Phaeobacter</i> <i>Maricaulis</i> <i>Malaciobacter</i>

Les Photosphères de dioxyde de titane étant plus aisément retirables de l'eau mer, cette mise en forme du  $TiO_2$  a été retenue pour toute la suite des travaux présentés dans ce chapitre afin de limiter l'impact d'éventuels résidus de catalyseur sur les huîtres.

### B. Exposition prolongée des huîtres au dioxyde de titane

Même si une exposition ponctuelle au dioxyde de titane est plus représentative des changements de microbiote potentiel lors de l'étude de l'inactivation microbienne par photocatalyse (travail sera présenté dans la suite de ce chapitre), une exposition prolongée présente également un intérêt. L'exposition prolongée par balnéation dans de l'eau contenant

du TiO<sub>2</sub> (à 5 g.L<sup>-1</sup>) est, elle, plus représentative d'une exposition des animaux lors d'un traitement de l'eau à plus grande échelle.

Même si aucune mortalité n'a été observée chez les animaux, l'exposition prolongée au dioxyde de titane a modifié le microbiote des huîtres, (figure 9a). En effet, la représentation des dissimilarités en PCoA permet bien de séparer les réplicats par conditions suivant les deux axes aussi bien pour différencier les temps d'échantillonnages (séparé par la droite  $y=x$ , les échantillons à 24 h situés en dessous et ceux à 10 jours au-dessus) que l'exposition au TiO<sub>2</sub> (séparé par la droite  $y=-x$ , les échantillons exposés situés au-dessus et les contrôles en dessous). La composition bactérienne du microbiote est significativement différente entre les échantillons contrôles et ceux exposés au TiO<sub>2</sub> aussi bien après une exposition de 24 h (*p-value* de 0,029) qu'après une exposition de 10 jours (*p-value* de 0,026). On peut notamment se rendre compte que les phylums majoritairement associés au microbiote des huîtres se retrouvent impactés par l'exposition au TiO<sub>2</sub> (King et al., 2022; Li et al., 2017; Qu et al., 2022). Les *Proteobacteries* et les *Campilocaterota* sont devenus de plus en plus abondants dans le microbiote lorsque le temps d'exposition s'allonge. A l'inverse, les *Bacteroidota* deviennent moins abondants lorsque l'exposition au TiO<sub>2</sub> s'allonge. En revanche, l'abondance des *Planctomycetota* reste inchangée dans les échantillons contrôles lorsque la durée d'exposition s'allonge alors qu'elle augmente fortement dans les échantillons contrôles avec le temps d'échantillonnage.

Contrairement à l'exposition ponctuelle, un grand nombre de genres bactériens se sont trouvés modifiés significativement par une exposition prolongée (24 h et 10 jours) comme le montre en particulier l'analyse Log<sub>2</sub> Fold Change (figures 9b et c). Quatre genres bactériens sont donc présents en plus forte abondance dans les animaux exposés au dioxyde de titane, parmi lesquels sont représentés les genres bactériens *Alteromonas*, *Halarcobacter*, *Pseudoalteromonas* et *Vibrio*. Pour ces quatre genres bactériens, plus l'exposition est longue, plus l'écart avec le contrôle non exposé est grand. Par exemple, pour le genre des *Vibrio*, après une exposition de 24 h, seul un ASV appartenant à ce genre se retrouve significativement modifié. Celui-ci est moins abondant dans les animaux exposés que dans ceux non exposés. En revanche, après 10 jours d'exposition, même si le microbiote des animaux non exposés a évolué, six ASVs appartenant aux *Vibrios* (parmi lesquels l'ASV identifié à 24 h) se retrouvent en abondance significativement plus importante que dans les contrôles non exposés. De même, pour une exposition de 24 h seul 15 ASVs correspondant à 10 genres bactériens différents sont modifiés par la présence de TiO<sub>2</sub> alors qu'au bout de 10 jours d'exposition ce nombre s'élève à 33 ASVs correspondant à 20 genres bactériens. Parmi les genres bactériens retrouvés en plus grande abondance suite à l'exposition au TiO<sub>2</sub>, certains ont déjà été décrits comme aptes à réduire de façon significative la microflore présente (Richards et al., 2017) grâce à leur activité antimicrobienne (Bibi et al., 2020; Desriac et al., 2020; Jeganathan et al., 2013; Longeon et al., 2004). Comme cela a déjà été montré chez d'autres bivalves, l'exposition au TiO<sub>2</sub> altère notamment les fonctions hématocytaires de l'animal (De Marchi et al., 2019; Li et al., 2021), les fonctions de phagocytose, phénomènes à l'origine de changements majeurs du microbiote chez l'huître (Auguste et al., 2019).

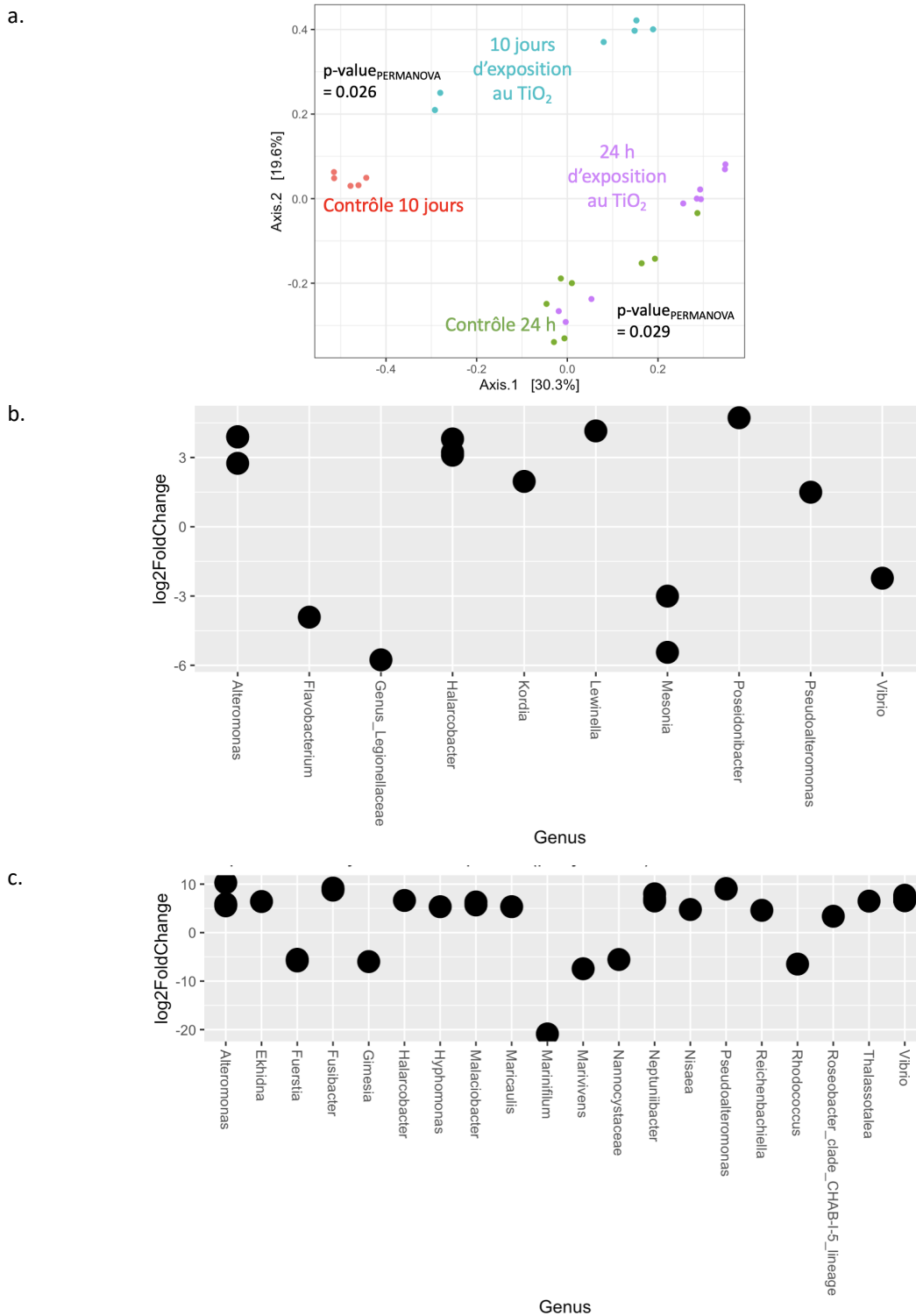


Figure 9 : Effet d'une exposition prolongée au dioxyde de titane sur le microbiote des huîtres (a) représentation en PCoA de la dissimilarité de Bray-Curtis (•) huîtres de références 24 h après la mise en eau, non exposées au  $TiO_2$ , (•) huîtres après 24 h d'expositions au  $TiO_2$ , (•) huîtres de références 10 jours après la mise en eau, non exposées au  $TiO_2$ , et (•) huîtres après 10 jours d'exposition au  $TiO_2$ , (b) genres bactériens significativement modifiés par l'exposition au  $TiO_2$ ,  $\log_2$  fold change (avec une p-value ajustée < 0.05) animaux exposés 24 h comparé au non exposés, et (c) genres bactériens significativement modifiés par l'exposition au  $TiO_2$ ,  $\log_2$  fold change (avec une p-value ajustée < 0.05) animaux exposés 10 jours comparé au non exposés.

### C. Conclusions et perspectives

La méthode d'exposition des huîtres ainsi que la durée d'exposition jouent un rôle sur les changements au sein du microbiote des huîtres. En effet, aucun genre bactérien retrouvé comme significativement modifié lors d'une exposition ponctuelle par injection ne l'est également lors de l'exposition prolongée par balnéation. En revanche, pour une même méthode d'exposition, une partie des genres bactériens modifiés par l'exposition au TiO<sub>2</sub> est commun aux deux temps d'expositions testés. Concernant la durée d'exposition, plus celle-ci est longue, plus le microbiote des animaux se trouve modifié avec un nombre important de genres bactériens présents en abondance plus importante que dans le microbiote des contrôles.

Dans le futur, il serait donc intéressant de vérifier de façon plus approfondie l'effet du dioxyde de titane sur les huîtres et leur microbiote en réalisant notamment une étude sur une plus longue période avec un effort d'échantillonnage plus conséquent. En outre, il pourrait également être intéressant de coupler cette analyse avec une étude des fonctions immunitaires de l'huître (analyse des populations hémycytaires, viabilité des hémycytes, ou analyse de l'expression des gènes en particulier) afin d'estimer ou d'évaluer comment ces fonctions biologiques sont affectées par la présence de TiO<sub>2</sub>. Il est important de souligner que des études préalables ont déjà montré que les huîtres filtrent le TiO<sub>2</sub> présent dans l'eau lors d'exposition de plusieurs heures, mais, sans observer de bioaccumulation chez l'animal (Doyle et al., 2015). Il serait donc pertinent de vérifier si lors d'expositions chroniques comme nous l'avons réalisé dans notre étude, le TiO<sub>2</sub> est bioaccumulé dans les tissus de l'huître et d'évaluer la quantité de catalyseur bio-accumulée au cours du temps d'exposition.

### III. Effets des traitements photo-oxidatifs sur les pathogènes d'huîtres cibles et le microbiote de l'eau de mer

Comme cela a déjà été dit en introduction de ce chapitre, nous avons cherché à évaluer la pertinence du procédé de photocatalyse hétérogène (UV/TiO<sub>2</sub>) pour la bio-sécurisation d'installations aquacoles. Pour empêcher le développement de mortalité dans ces installations, les pathogènes d'huîtres doivent être inactivés. Parmi ces pathogènes, le virus *OsHV-1 μVar* et la bactérie *Vibrio harveyi* ont servis de référence pour cette étude. Ces deux pathogènes sont connus pour induire de forte mortalité chez les huîtres juvéniles notamment avec le *Pacific Oyster Mortality Syndrom* (POMS) comme cela a été plus largement décrit dans le Chapitre 1 (De Lorgeril et al., 2018; King et al., 2019b; Martenot, 2013; Oyanedel et al., 2023; Petton et al., 2021). Or, le procédé de photocatalyse hétérogène comme tout procédé de désinfection ne cible pas seulement les microorganismes pathogènes mais impacte également l'ensemble du microbiote de l'eau. C'est pourquoi dans cette étude il est question de coupler des approches d'analyse ciblées de pathogènes (viraux et bactériens) permettant d'évaluer la viabilité (infectiosité des particules virales et dénombrement de bactéries viables et cultivables), avec des approches d'analyse exhaustive de la composition du microbiote bactérien total (Barcoding 16S). Dans ce travail, l'analyse du microbiote joue un rôle important en complétant l'analyse de l'inactivation du pathogène cible et en donnant une vision plus globale de l'effet du traitement sur la flore bactérienne totale de l'eau.

Ce travail est à notre connaissance, la première étude qui s'est focalisée sur l'analyse de l'inactivation virale par photocatalyse hétérogène en eau de mer. Ce travail souligne également les changements écosystémiques possibles qu'impliquent un tel traitement sur le microbiote bactérien de l'eau. Il met également en exergue la capacité de résilience du

microbiote de l'eau de mer une fois le traitement terminé. La désinfection n'étant pas totale, la part du microbiote toujours viable après 2 h de traitement peut recoloniser l'eau de mer et ainsi rétablir un microbiote bactérien proche de celui de l'eau non traitée. Le virus étant plus sensible au traitement photocatalytique que les bactéries, l'inactivation virale permet d'obtenir un taux de survie des huîtres de 100% sans pour autant éliminer la totalité du microbiote de l'eau de mer.

L'ensemble du travail réalisé est présenté dans l'article 2 : *"Inactivation of two oyster pathogens by photo-oxidation and monitoring of changes in the microbiota of seawater: a case study on Ostreid Herpes Virus 1  $\mu$ Var and Vibrio harveyi."* Cet article sera publié en janvier 2024 dans la revue Chemosphere. Les données du supplementary material de cet article sont présentés dans l'annexe N°4.

Article 2: *"Inactivation of two oyster pathogens by photo-oxidation and monitoring of changes in the microbiota of seawater: a case study on Ostreid Herpes Virus 1  $\mu$ Var and Vibrio harveyi"*

1        Inactivation of two oyster pathogens by photo-  
2            oxidation and monitoring of changes in the  
3        microbiota of seawater: a case study on *Ostreid*  
4            *Herpes Virus 1  $\mu$ Var* and *Vibrio harveyi*.

5

6    Cécile Blanchon<sup>1,2,3,4</sup>, Eve Toulza<sup>1</sup>, Christophe Calvayrac<sup>2,3</sup>, Stanislaw Eichendorff<sup>4</sup>, Marie-  
7    Agnès Travers<sup>1</sup>, Jeremie Vidal-Dupiol<sup>1</sup>, Caroline Montagnani<sup>1</sup>, Jean-Michel Escoubas<sup>1</sup>,  
8    Christophe Stavrakakis<sup>5</sup>, Gael Plantard<sup>4</sup>

9    <sup>1</sup> IHPE, Université de Montpellier, CNRS, Ifremer, Université de Perpignan Via Domitia,  
10    Perpignan, France

11    <sup>2</sup> Biocapteurs Analyses Environnement, Université de Perpignan Via Domitia, 66000  
12    Perpignan, France

13    <sup>3</sup> Laboratoire de Biodiversité et Biotechnologies Microbiennes (LBBM), Sorbonne Universités,  
14    CNRS, 66650 Banyuls sur Mer, France

15    <sup>4</sup> PROMES-CNRS UPR 8521, Process Material and Solar Energy, Rambla de la  
16    Thermodynamique, 66100

17    Perpignan, France

18    <sup>5</sup> Ifremer – Unité EMMA Expérimentale Mollusques Marins Atlantique, F-85230 Bouin, France

19

20

21

22

1

## 23 Abstract

24 The pollution of seawater by both biotic (bacteria, viruses) and abiotic contaminants  
25 (biocides, pharmaceutical residues) frequently leads to economic losses in aquaculture  
26 activities mostly mortality events caused by microbial infection. Advanced Oxidation  
27 Processes (AOPs) such as heterogeneous photocatalysis allow the removal of all organic  
28 contaminants present in water and therefore could reduce production losses in land-based  
29 farms. Oysters in land-based farms such as hatcheries and nurseries suffer from a large  
30 number of mortality events, resulting in significant losses. If photocatalysis has been widely  
31 studied for the decontamination, its application for disinfection is still overlooked, especially  
32 on seawater for viruses. We therefore studied seawater disinfection using the photo-  
33 oxidation ( $UV_{365}/TiO_2$ ) method in the context of Pacific oyster mortality syndrome (POMS).  
34 POMS has been defined as a polymicrobial disease involving an initial viral infection with  
35 *Ostreid Herpes Virus 1*, accompanied by multiple bacterial infections. We investigated the  
36 impact of treatment on *Vibrio harveyi*, a unique opportunistic pathogenic bacterium, and on  
37 a complex microbial community reflecting a natural POMS event. Viral inactivation was  
38 monitored using experimental infections to determine whether viral particles were still  
39 infectious after. Changes in the total bacterial community in seawater were studied by  
40 comparing  $UV_{365}/TiO_2$  treatment with  $UV_{365}$ -irradiated seawater and untreated seawater. In  
41 the case of *OsHV-1*, a 2-hour photocatalytic treatment prevents POMS disease and oyster  
42 mortality. The same treatment also inactivates 80% of viable *Vibrio harveyi* culture (*c.a.* 1.5  
43 log). Since *OsHV-1* and *Vibrio harveyi* are effectively inactivated without long-term  
44 destabilization of the total bacterial microbiota in the seawater, photocatalysis appears to be  
45 a relevant alternative for disinfecting seawater in land-based oyster beds.



46 **Keywords:** OshV-1  $\mu$ Var, *Vibrio harveyi*, seawater microbiota, photocatalysis, oyster  
47 pathogens, inactivation.

48

## 49 1. Introduction

50 Contaminated seawater is one of the biggest sources of economic losses in  
51 aquaculture (pisciculture, shellfish farming,...) and fishing activity with approximately 60  
52 millions euros losses in 2014 (SE Tunisia) [1]. Those losses are related to a fish density  
53 decrease in the fishing areas due to ecosystem changes [2], and especially the contamination  
54 of seawater which can negatively affect fish, shellfish, molluscs and algae [3–6] or the rights  
55 of to harvest these organisms. At the same time, more intensive farms have been created but,  
56 in those places, the higher animal density enhance disease development. In seafood  
57 production, diseases are often caused by bacterial and/or virus infections and various  
58 microorganisms (algae, fungi, bacteria), and can induce production losses but sometimes  
59 those losses can be attributed to biomolecules as toxins or mycotoxins produced by fungi or  
60 algae [7–9]. Till date, antibiotics remain the most used method to indulge the bacterial  
61 infections in aquaculture but this treatment does not protect against virus or toxins and it  
62 enhances emergence of resistance to antibiotics [10,11]. To eliminate potential pathogens,  
63 disinfection procedures are currently applied in closed-loop aquaculture systems, such as  
64 filtration of incoming seawater to 20 microns [12,13], chlorination [14], UVC disinfection  
65 [15,16], disinfection with peracetic acid [17] or hydrogen peroxide [18,19], or ozonation [20].  
66 These methods can lead to the production of toxic by-products in the water [21], are  
67 expensive due to chemical and energy costs [22] or do not inactivate toxins of biological  
68 origin. Therefore, although these seawater treatments are now being applied in the

69 aquaculture sector, there is still a need to develop alternative seawater disinfection methods.  
70 In order to inactivate microbial contaminants present in seawater, as well as toxins and other  
71 organic contaminants, advanced oxidation processes (AOPs) [23], such as heterogeneous  
72 photo-oxidation, are one of the most promising solutions. As opposed to homogeneous  
73 photo-oxidation (ozonation or fenton), these require the use of a solid catalyst, which can be  
74 reused, and no toxic by-products are produced during the reaction. Nonetheless, while the  
75 use of the photocatalytic oxidation reaction of titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>) for the elimination of  
76 organic biotic contamination in freshwater and wastewater has been widely documented  
77 [24–29], it remains largely unexplored in the case of seawater, particularly for bacterial  
78 and/or viral inactivation [30–33]. In addition, it should be pointed out that titanium dioxide  
79 (TiO<sub>2</sub>) is one of the most interesting catalysts for photo-oxidation water treatment  
80 applications [24], as this compound is inert, can be converted into different forms and allows  
81 the production of radicals capable of treating chemical compounds as pharmaceutical or  
82 herbicide substances and biotic contaminants such as gram-positive and gram-negative  
83 bacteria [34,35]. However, using photocatalysis to treat seawater raises a number of  
84 challenges, not least because of the presence of salt and other suspended residues that can  
85 slow down the inactivation of targeted pathogens [36].

86 In seafood production, aquaculture represents one of the fastest-growing food  
87 industries with more than 50% of the worldwide production [37]. The mollusk aquaculture  
88 production is dominated by oyster production which is subject to mortality events at every  
89 life stage, induced by many *Vibrio* bacteria. During the larval stage oysters are subject to  
90 mortality induced by *Vibrio coralliilyticus* or *Vibrio tubiashii* [38]. Then, juvenils oysters can be  
91 subject to mortality induced by *Vibrio alginolyticus* [39], *Vibrio tasmaniensis* or *Vibrio*  
92 *crassostreae*. Once adult, oysters can be subject to mortality induce by *Vibrio aestuarianus*

93 [40] or *Vibrio harveyi* [41,42]. Production losses in aquaculture can also be caused by the  
94 accumulation of human vibrio pathogens on oysters such as *Vibrio vulnificus* and *Vibrio*  
95 *parahaemolyticus* [43], which will result in a ban on sales. The Pacific Oyster Mortality  
96 Syndrome (POMS) is one of the most prevalent diseases which can kill up to 100% of oysters  
97 spat in France every year [44]. This disease specifically affecting larvae and juvenile oysters is  
98 dependent on multiple environmental factors and microbes [45,46]. We recently evidenced  
99 the course of events leading to oyster death when facing POMS [46]. POMS is triggered by an  
100 early infection with OshV-1  $\mu$ Var herpes virus (ostreid herpes virus) which impairs the oyster  
101 antibacterial defenses following the infection of oyster immune cells (hemocytes). This  
102 immune suppression induces a dysbiosis that enhances the proliferation of opportunistic  
103 bacteria, ultimately causing septicemia and the death of the oyster.

104

105         The aim of this study was to investigate the potential of UV<sub>365</sub>/TiO<sub>2</sub> seawater  
106 treatment for microbial inactivation in the context of oyster mortality. This article attempts  
107 to provide new insight into the impact of heterogeneous photocatalytic treatment on two  
108 major classes of aquaculture pathogens, *Vibrio* bacteria and herpes virus considered  
109 separately (*Vibrio harveyi* isolate) and on a complex microbial community composed of  
110 herpes virus and bacteria released by diseased oysters. The impact of photocatalytic  
111 treatment was systematically compared with that of UV<sub>365</sub> treatment alone (photolysis), in  
112 terms of pathogen survival (viable, cultivable *Vibrio* or virus infectivity during experimental  
113 infection) and DNA integrity (DNA quantification).

114

115

116

## 117 2. Materials & Methods

### 118 2.1. Catalyst and pilot used for seawater disinfection

119 In this study, TiO<sub>2</sub> in its photosphere form was used [47]. These are anatase TiO<sub>2</sub>-coated glass  
120 microspheres centered on a diameter of 45 μm (range of 5 μm to 85 μm) and with a specific  
121 surface of 11.5 m<sup>2</sup>.g<sup>-1</sup> [48]. Due to their low density (ρ=0.22 g.L<sup>-1</sup>), they facilitate the  
122 separation of the liquid/solid phases by flotation at the end of the treatment process [49].  
123 Preliminary tests carried out in freshwater during previous work on the decontamination of  
124 pharmaceutical targets concluded that a concentration of 5 g.L<sup>-1</sup> of photospheres was optimal  
125 to capture all the incident radiation. All photons are absorbed across the thickness of the  
126 reactor, so transmittance is zero at the bottom. As the presence of salt in the medium has no  
127 influence on photon absorption, this concentration was retained in this study [50]. The  
128 experiments were conducted in 200 mL beakers (60 cm<sup>2</sup> surface area) containing seawater  
129 and catalyst. The suspension was homogenized with a magnetic stirrer and maintained at 19  
130 ± 1 °C by a water bath. During the experiment, the beakers were subjected to generated  
131 artificial UV radiation (Vilbert Lourmat lamp, model VL-300 with an emission spectrum from  
132 300 nm to 400 nm centered at 365 nm). A flux density of 35 W.m<sup>-2</sup> was applied for 2 hours  
133 and checked at the surface of the batch reactor using a UV sensor (UV Radiation, apogee  
134 instruments). Experiments were conducted in parallel to evaluate the effects of photolysis.  
135 Photolysis experiments were conducted in a beaker with seawater without a catalyst,  
136 maintained at a flux density of 35 W.m<sup>-2</sup>.

### 137 2.2. Disinfection of a bacterial pathogen

#### 138 2.2.1. Bacterial pathogen: *Vibrio harveyi*

139 An oyster pathogen, *Vibrio harveyi* Th15\_O\_G11 modified with a stable Green Fluorescent  
140 Protein (GFP) plasmid pFD086 (GFP, TrimR) [41] was used to study the disinfection of a single  
141 pathogen. This bacterium was cultured in Zobell medium (4 g.L<sup>-1</sup> bactopectone, 1 g.L<sup>-1</sup> yeast  
142 extract in sterile seawater, pH 7.4) with 10 µg.mL<sup>-1</sup> of trimethoprim (T7883, Sigma Aldrich,  
143 France) in order to maintain the GFP plasmid at 20 °C until the stationary phase was reached.  
144 Then filtered natural seawater (Banyuls, France, seawater filtered at 1 µm, pH 8 and salinity  
145 of 35 PSU) was inoculated to reach 10<sup>7</sup> CFU/100mL at the beginning of the photocatalysis and  
146 photolysis treatments (Supplementary 1). The inoculation was performed directly without  
147 separating bacterial cells from the culture media. To avoid contamination of seawater by  
148 cultivable bacteria, negative control was carried out by spreading 200 µl on Marine Agar plate  
149 before spiking the seawater with *Vibrio harveyi*.

#### 150 2.2.2. Monitoring

151 Disinfection was monitored by the enumeration of cultivable bacteria. The culture media was  
152 Marine Agar (Marine Broth medium with 15 g.L<sup>-1</sup> of agar, 76448, Sigma Aldrich, France) with  
153 10 µg.mL<sup>-1</sup> of trimethoprim and all counting were performed in triplicate by spreading 200 µl  
154 of treated seawater. This method allows a detection limit of 10<sup>4</sup> cfu/100mL, corresponding to  
155 99.99 % of inactivation (*i.e.* 3 log). The *Vibrio* samples were incubated at 20 °C for 48 h until  
156 counting (Supplementary 1). In addition to the trimethoprim screen, the fluorescence of the  
157 colonies was checked at 395 nm (Lepro Lampe Torche UV LED) before cultivable bacteria  
158 enumeration. The bacterial inactivation curves connected to the seawater disinfection by  
159 photocatalysis and photolysis were compared using *Pairwise-t-test* with Benjamini &  
160 Hochberg adjusting method, and *Tukey multiple pairwise-comparisons*. Then the disinfection  
161 efficiency was estimated by fitting the experimental point to a first- order kinetic model  
162 (Equation 1). In this law, the UV dose was expressed as the quantity of energy received



163 corrected by volume of water in the reactor as for solar treatment [51]. It allows to consider  
 164 the reactor geometry with the irradiated surface / volume of the reactor ratio.

165

$$\ln\left(\frac{C}{C_0}\right) = -\alpha \cdot Q_{(t)} \quad \text{equation 1}$$

167 *first-order kinetic equation with C and C<sub>0</sub> respectively the bacteria concentration at the sampling time and at the*  
 168 *beginning of the experiment in UFC/100mL, Q<sub>(t)</sub> the UV dose accumulated since the start of the experiment in kJ.L<sup>-1</sup>*  
 169 *(equation 2), and α the first order kinetic constant.*

$$Q_{(t)} = \frac{S_{\text{irradiated}}}{V_{\text{total}}} \cdot I \cdot t \quad \text{equation 2}$$

171 *UV dose accumulated since the start of the experiment in kJ.L<sup>-1</sup>, with S<sub>irradiated</sub> the irradiated surface of the reactor*  
 172 *in m<sup>2</sup>, V<sub>total</sub> the total volume of the reactor in L and I the flux density received in W.m<sup>-2</sup>.*

173

## 174 2.3. Disinfection of a seawater microbial complex community

### 175 2.3.1. Production of contaminated seawater

176 The microbial community tested in this work was composed of seawater enriched in virus and  
 177 bacteria obtained following the experimental infection of juvenile oysters by OsHV-1 μVar,  
 178 the inducer of the POMS disease. Susceptible pathogen-free juvenile oysters F14V [46] aged  
 179 of 3.5 months were injected in the adductor muscle with 4.10<sup>8</sup> Genomic Unity (UG) of OsHV-  
 180 1 μVar virus (injection of 50 μl of F14-TFF suspension at 7.10<sup>6</sup> UG.μl<sup>-1</sup>). 30 *Crassostrea gigas*  
 181 oysters spats (mean weight 3 g) were put in a 1 L tank to reach an animal density of 90 g of  
 182 biomass/L. Oysters were kept in oxygenated seawater during 24 h at 21 °C by controlling the  
 183 room temperature. The contaminated seawater (CSW) produced was directly used for  
 184 photocatalysis and photolysis treatments (Figure 1a). During experiments, virus inactivation  
 185 and seawater bacterial microbiota inactivation were analyzed separately.

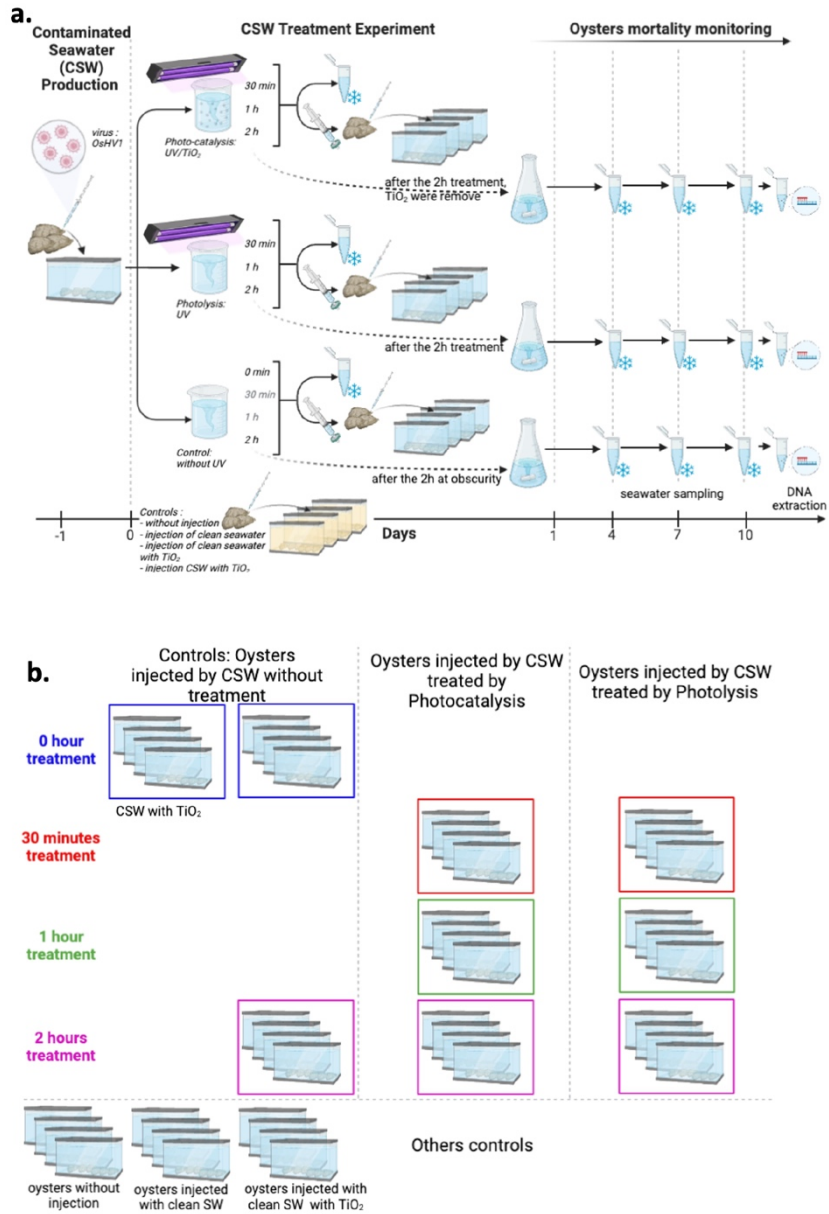


Figure 1: (a) experimental design for the OshV-1  $\mu$ Var virus and seawater total bacterial community inactivation with (b) the detail of oyster injections. DNA extracts were used for the barcoding analysis and also for the total bacteria, total *Vibrio* bacteria and OshV-1  $\mu$ Var quantification by qPCR.

186

187

188



### 189 2.3.2. Oyster mortality monitoring

190 During the seawater disinfection process, seawater was sampled and filtered at 0.2  $\mu\text{m}$  (to  
191 eliminate bacteria) before injection on oysters. Susceptible pathogen-free juvenile oysters  
192 (family F14V aged 3.5 months) initially pathogen-free were injected in the adductor muscle  
193 either with 50  $\mu\text{l}$  of contaminated seawater treated using photocatalysis ( $\text{UV}_{365}/\text{TiO}_2$ ) or  
194 photolysis ( $\text{UV}_{365}$  alone) or not treated (kept to obscurity) (figure 1a and figure 1b). In  
195 addition, non-injected oysters were used as infection control and no mortality occurred in  
196 this group during the trial. As previous experiments (Supplementary 2) did not show viral  
197 adhesion on  $\text{TiO}_2$  catalysis, no adhesion control was performed in this study. Four tank  
198 replicates were used with 10 oysters (mean weight of 3g) / 500 mL tanks to reach an animal  
199 density of 60 g of biomass/L. Then oysters were put in aerated seawater at 21 °C. Oyster  
200 mortality was monitored twice a day for 10 days. Oysters were not fed during the 10 days of  
201 monitoring and day/night (10h/14h) cycles were performed.

202 The nonparametric estimates of the survival function were computed according to Kaplan &  
203 Meier (survfit, {survival}) [52]. Survival time started when oysters were injected with treated  
204 seawater and stopped after 10 days, when no additional mortality has been observed in the  
205 past 48h. The data was read as the number of dead animals within each condition on each  
206 day, the tanks replicated for each condition were considered as one tank for the survival  
207 analysis (i.e.  $n = 40$  per condition). Survival curves of exposed oysters were plotted and  
208 compared among the treatments and their duration. The survival time curves of oysters  
209 connected to the seawater disinfection by photocatalysis and photolysis were compared  
210 using the Cox regression model (coxph and cox.zph, {survival}) [52] and the Log-Rank  
211 regression model (survdiff, {survival}) [52]. To evaluate viral inactivation, the time required to  
212 reach 50% oyster mortality for each treatment (TL50) was calculated from the survival curves.

213 This corresponds to the post-injection time at which 50% of the oysters in the condition have  
214 died.

### 215 2.3.3. DNA extraction

216 All seawater samples were stored at -80 °C until the DNA was extracted. The total DNA of  
217 seawater samples was extracted using the blood protocol from Machrey-Nagel NucleoSpin  
218 tissue kit (reference 740952). The extractions were realized on 200 µl of seawater with a final  
219 elution volume of 30 µl. In order to improve DNA extractions, a crushing step of 12 min  
220 mechanical lysis with zirconium beads followed by an RNase step was added before the DNA  
221 binding step. The DNA extracts were stored at -20°C before analysis.

222

### 223 2.3.4. Metabarcoding analysis

224 The 16S rRNA gene of bacterial communities was amplified using the variable V3-V4 loops  
225 (341F / 805R). Paired-end sequencing was performed on the MiSeq system (Illumina) at the  
226 University of Perpignan Via Domitia (Bio-Environment platform, Perpignan University,  
227 France). Sequencing data are available at the NCBI-SRA under the accession number  
228 PRJNA987558. The microbiome bioinformatics analyses were performed with *QIIME 2 2022.8*  
229 pipeline to generate Amplicon Sequence Variant (ASV) [53]. Sequence data was already  
230 demultiplexed so we directly denoised it with *DADA2* using the *---p-pooling-method* and *-p-*  
231 *chimera-method* parameters to pool the sequence between sample for the chimeras  
232 elimination and the ASV creation. Then the taxonomy affiliation was performed on ASV using  
233 a Silva 138 V3V4 classifier (classifier train with the used primers). The phylogenetic tree was  
234 created with *FastTree*, using the *mafft* program. After creating the phylogenetic tree, the  
235 taxonomic assignment and the ASVs, all the statistical analyses were done using R v4.2.1  
236 (2022-06-23) (Supplementary 3).

237 Samples were normalized using the rarefaction method before any statistical analyses at a  
238 sample depth of 10 301. Principal coordinate analysis (ordinate, {phyloseq}) [54] was  
239 computed to describe compositions of microbial communities between samples using Bray-  
240 Curtis dissimilarities (distance, {phyloseq}) [54]. The impact of seawater treatment on  
241 seawater microbiota was tested using ANOVA (anova, {stats}) [55] on the Constrained  
242 Analysis of Principal coordinates calculated with the Bray-Curtis distance (capscale, {vegan})  
243 [56]. Log Fold Change analysis was performed to analyze changes on bacteria abundance  
244 between treatment and control (DESeq, {DESeq2}) [57] using a adjusted p-value at 0.05. For  
245 all analysis, the threshold significance level was set at 0.05.

246

### 247 2.3.5. Quantification of bacteria and virus

248 Quantifications of OsHV-1  $\mu$ Var, total bacteria 16S rDNA and total *Vibrio* 16S rDNA were  
249 performed using quantitative PCR (qPCR) with a Roche LightCycler 480 thermocycler (Bio-  
250 Environment platform, University of Perpignan, France). The total qPCR reaction volume was  
251 10  $\mu$ l including 2.5  $\mu$ l of pure DNA extract, 1  $\mu$ l of each PCR primer at 5  $\mu$ M and 5  $\mu$ l of SYBER  
252 Green Takyon Master Mix at 2X (Eurogentec SA). OsHV-1  $\mu$ Var specific primer pairs targeted  
253 a DNA polymerase catalytic subunit (named DP or ORF100): 5'-  
254 ATTGATGATGTGGATAATCTGTG-3' and 5'-GGTAAATACCATTGGTCTTGTCC-3' [58]. The total  
255 bacteria quantification used the same specific primer pairs as for the metabarcoding analysis  
256 (see above). The specific primers used for the total *Vibrio* quantifications targeted 567F/680R  
257 region of the 16S rDNA: 5'-GGCGTAAAGCGCATGCAGGT-3' and 5'-  
258 GAAATTCTACCCCCTCTACAG-3' [59]. qPCR reactions were performed in triplicate with the  
259 following program: 95°C for 3min, followed by 40 cycles of denaturation (95 °C, 10 s),  
260 hybridation (60 °C, 20 s) and elongation (72 °C, 30 s). The absolute quantification of the OsHV-

261 1  $\mu$ Var DNA copies in the seawater was carried out by comparison of Cp value of sample to  
262 Cp value of a standard curve (obtained from a plasmid of the DNA polymerase catalytic  
263 subunit) according to Lafont et al. 2017 [60]. The results were expressed as the number of  
264 OsHV-1  $\mu$ Var DNA copies per ml of seawater (UG/mL). The absolute quantification of the total  
265 bacteria and total *Vibrio* in the seawater was carried out by comparison of Cp value of sample  
266 to Cp value of a standard curve obtained from *Vibrio* genomic DNA of known concentration.  
267 The results were expressed as the number of *Vibrio* DNA copies per mL of seawater (CP/mL).  
268 The DNA concentration connected to the seawater disinfection by photocatalysis and  
269 photolysis was compared using *Pairwise-t-test* with Benjamini & Hochberg adjusting method,  
270 and *Tukey multiple pairwise-comparisons*.

271

## 272 3. Results and discussion

### 273 3.1. Inactivation of the oyster pathogen *Vibrio harveyi*

274 The efficiency of photocatalysis and photolysis treatments to inactivate simple and complex  
275 microbial communities was evaluated by testing in water either a bacterial pathogen alone or  
276 the  $\mu$ Var OsHV-1 virus present in a complex community composed of seawater microbiota.  
277 We began by assessing the inactivation by photocatalysis and photolysis of *V. harveyi*, a  
278 bacterium pathogenic to oysters in seawater.

279

280 Briefly, sterile seawater was artificially contaminated with *V. harveyi* population in  
281 stationary phase before applying photocatalysis and photolysis treatments. Two disinfection  
282 experiments were carried out to achieve various levels of seawater decontamination. The first  
283 one was a 2 h photocatalytic treatment (UV<sub>365</sub> associated with TiO<sub>2</sub> catalyst) and the second

284 one was a photolytic treatment (only UV<sub>365</sub> irradiation without catalyst). The bacterial  
285 inactivation was followed by counting the cultivable bacteria during treatment. Preliminary  
286 work (Supplementary 4) on the adhesion of *V. harveyi* has shown that under our experimental  
287 conditions of pH and salinity, adhesion to the catalyst was negligible in comparison with the  
288 duration of the treatment experiments. The inactivation results of *V. harveyi* in seawater are  
289 presented as a function of the cumulative UV<sub>365</sub> dose ( $Q_{(t)}$ ) versus the normalized survival ratio  
290 (Figure 2). The raw data was fitted by a first-order model (with or without shoulder) to  
291 calculate the constant rate  $k$ . Only the UV<sub>365</sub> treatment exhibited a shoulder in the first  
292 15 minutes of treatment corresponding to a UV<sub>365</sub> dose of 1 kJ.L<sup>-1</sup> and even if authors have  
293 already reported evidence of a photoreactivation mechanism of *Vibrio* in freshwater [61] and  
294 in marine water [30,62], no such observation had been observed in our study. The inactivation  
295 experiment (figure 2) showed that photocatalysis treatment was much more effective than  
296 photolysis in inactivating *Vibrio* cells. Where only 30 % (or 0.2 log) of the *bacterium* were  
297 inactivated by 2 h of UV<sub>365</sub> irradiation alone ( $\alpha = 0.046 \pm 0.004 \text{ L.kJ}^{-1}$ ;  $R^2 = 0.98$ ) corresponding  
298 to a UV<sub>365</sub> dose of 8 kJ.L<sup>-1</sup> (or 25 000 mJ.cm<sup>-2</sup>), almost 80 % (or 0.7 log) were inactivated in  
299 the presence of TiO<sub>2</sub> catalyst ( $\alpha = 0.218 \pm 0.017 \text{ L.kJ}^{-1}$ ;  $R^2 = 0.97$ ). Most of the photocatalysis  
300 disinfection experiments found in the literature ran UVC sources (254 nm) [31,63] which have  
301 a higher bacteria inactivation power than UVA (365 nm) [64] so a higher inactivation rate.  
302 Most of those studies compare efficiency of treatment by UV alone or with a catalyst and  
303 always found that photocatalysis treatments are the most efficient processes. The UV dose  
304 required to obtain the desired level of disinfection has a direct impact on the cost of  
305 disinfection [60]. It is therefore valuable to estimate the ratio between the UV dose required  
306 for photocatalysis and photolysis to obtain the same level of disinfection. Rubio et al. (2013)  
307 reported a value of 38.6 mJ.cm<sup>-2</sup> to achieve 99.9% disinfection of *Alteromonas sp.* with UV<sub>254</sub>



308 alone against  $25.9 \text{ mJ.cm}^{-2}$  with  $\text{UV}_{254}/\text{TiO}_2$  which reduces the amount of UV needed by 1.5  
309 [31]. In our study, a  $\text{UV}_{365}$  dose of  $25\,000 \text{ mJ.cm}^{-2}$  ( $8 \text{ kJ.L}^{-1}$ ) was needed to achieve 30% of the  
310 *Vibrio harveyi* inactivation with  $\text{UV}_{365}$  alone against  $3\,000 \text{ mJ.cm}^{-2}$  ( $1 \text{ kJ.L}^{-1}$ ) with  $\text{TiO}_2$ , allowing  
311 to drastically reduce the amount of  $\text{UV}_{365}$  needed (by 8). As shown for *Vibrio alginolyticus*  
312 which is highly resistant to  $\text{UV}_{365}$  photolysis (UV dose greater than  $18 \text{ J.cm}^{-2}$  for less than 0.5  
313 log inactivation) [62], *V. harveyi* strain tested in our study does not appear to be  $\text{UV}_{365}$   
314 sensitive as it was shown by the kinetic curves (Figure 2). Indeed, it has already been observed  
315 that autochthonous bacteria such as *Vibrio spp.* (*Vibrio owensii*, *Vibrio alfacensis* and *V.*  
316 *harveyi*) in seawater are more resistant to inactivation by SODIS than non-indigenous bacteria  
317 such as *E. coli*, *T. coliforms* and *Enterococci* in contaminated drinking water [32]. It is difficult  
318 to compare these results with our study, especially when crucial parameters as experimental  
319 conditions, bacteria concentration, radiation type and photocatalyst are different. However,  
320 given that the light intensity was  $48 \text{ W.m}^{-2}$ , we can estimate that the UV dose required for  
321 *Vibrio spp.* inactivation obtained in the study by Levchuk, et al. (2019) under UVA and SODIS  
322 was greater than that found in the present study.

323 Given the good efficiency of the photocatalytic treatment obtained under our experimental  
324 conditions, it may be considered that this type of process could be applied to the  
325 disinfection of aquaculture influents and effluents [32,33,65,66] or ballast water [67],  
326 provided that further studies on the inactivation of other aquaculture pathogens are carried  
327 out.

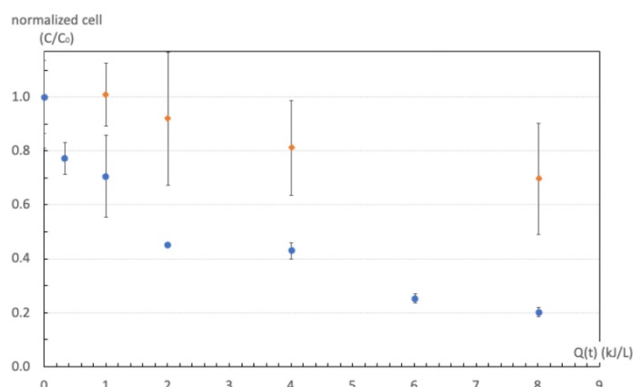


Figure 2 : Photo-oxidation kinetics of *Vibrio harveyi* inactivated by UV<sub>365</sub> alone (♦) or inactivated by UV<sub>365</sub>/TiO<sub>2</sub> (◆).  $C/C_0$  is the survival ratio along with the standard error of the means ( $n = 3$ )

328

### 329 3.2. Inactivation of a complex microbial community

#### 330 3.2.1. Effect on OsHV-1 $\mu$ Var infectivity

331 Complex microbial community composed of OsHV-1  $\mu$ Var virus associated with a marine  
 332 bacterial community was treated by photocatalysis and photolysis processes. The treated or  
 333 untreated seawater was filtered before injection into the oysters, to eliminate the bacterial  
 334 fraction (Figure 1). Briefly, the contaminated seawater infectivity was followed by evaluating  
 335 the mortality in oysters, and monitoring of the viral DNA in seawater was also assayed. Three  
 336 disinfection experiments were carried out to obtain various levels of virus contaminated  
 337 seawater. The first two experiments involved a 2-hour treatment, one by photocatalysis and  
 338 the other by photolysis (Figure 1), to achieve a final UV dose of 8 kJ.L<sup>-1</sup>. A control that had not  
 339 been subjected to any treatment and had been kept protected from radiation for 2 hours was  
 340 used. Next, virus-susceptible oysters were injected with the treated or not contaminated  
 341 seawater from the 3 disinfection experiments. For each treatment, 40 oysters were injected  
 342 with treated or not treated seawater for 0, 0.5, 1 or 2 hours (respectively 0, 2, 4 and 8 kJ.L<sup>-1</sup>)  
 343 and then mortality was followed to assess the suitability of the treatments (Figure 1).



344 The Kaplan-Meier survival curves thus obtained (Figures 3) allowed us to visualize the survival  
345 rates and the efficiency of photocatalysis and photolysis treatment to inactivate OsHV-1  $\mu$ Var  
346 virus. A better oyster survival rate was directly correlated with better virus inactivation (with  
347 a lower quantity of virus still infectious). The oyster mortality is caused directly by the  
348 injection of still-infectious virus as verified using qPCR on oysters. As showed by blue curve,  
349 mortality occurred during the first 80 h on oysters injected with non-treated seawater  
350 whereas it started later and to a less rapid rate for oysters injected with treated seawater  
351 until there was no mortality at all (see curves in red and green and purple). On one hand, the  
352 mortality rate of oysters for the control seawater (seawater without treatment at 0 h and  
353 after 2 h) reached 100% (Figure 3a). All the oysters died quickly after 80 hours of monitoring,  
354 and no oysters were left alive in the tanks. We also note that the presence of the  $\text{TiO}_2$  catalyst  
355 does not seem to have a quantifiable impact on the survival rate, indicating that the catalyst  
356 alone does not affect the virus and does not induce direct mortality of the oysters (figure 3a).  
357 On the other hand, the survival rates of oysters injected with treated seawater was  
358 significantly improved (Figure 3b and Figure 3c) and the longer the treatment was, the better  
359 the survival rate was. As indicated by statistical analysis (Cox test, p-value =  $6e-16$  for  $\text{UV}_{365}$   
360 treatment vs. control and p-value  $< 2e-16$  for  $\text{UV}_{365}/\text{TiO}_2$  treatment vs. control), both  
361 treatments are significantly different from the control condition. For both oysters injected  
362 with seawater treated for long time by photolysis and photocatalysis (1 or 2 hours) part of  
363 those oysters were still alive after 10 days (20% to 100% of survival proportion) (Figure 3b,  
364 Figure 3c). Photocatalysis ( $\text{UV}_{365}/\text{TiO}_2$ ) was efficient to inactivate viruses, same as, photolysis  
365 ( $\text{UV}_{365}$  alone) alone also decreased virus infectivity but to a lesser extent. Calculating the time  
366 needed to achieve 50% oyster mortality for each treatment ( $\text{TL}_{50}$ ) shows that virus  
367 inactivation by photocatalysis is twice as effective as by photolysis. In fact, it takes half as long

368 to achieve 50% mortality in oysters injected with CSW treated for 1 hour by photolysis (96h)  
369 as by photocatalysis (192h). Indeed, 2 hours of treatment by photocatalysis of the  
370 contaminated seawater allows sufficient inactivation of OsHV-1  $\mu$ Var to have 100 % survival  
371 of the oysters whereas exposure to UV<sub>365</sub> alone only allows a 50 % reduction in final oyster  
372 mortality (Figure 3b and Figure 3c).

373         Viral inactivation by photocatalytic process consists in three steps: (1) the viral particle  
374 shape distortion, (2) the protein oxidation, and (3) the DNA leakage and damage to the  
375 genetic material [68]. Quantification of viral DNA (Supplementary 5a) showed that DNA  
376 degradation by photocatalytic treatment was not essential to effectively reduce viral  
377 infectivity and halt oyster mortality. We observed that the amount of viral DNA present in  
378 UV<sub>365</sub>-treated seawater was quite similar to that measured in UV<sub>365</sub>/TiO<sub>2</sub>-treated seawater  
379 (respectively for UV<sub>365</sub>/TiO<sub>2</sub> and UV<sub>365</sub> 2h-treatment,  $4.23e+03 \pm 1.35e+03$  UG/ $\mu$ L and  
380  $1.11e+04 \pm 4.47e+03$  UG/ $\mu$ L). However, we also observed that oyster mortality was lower for  
381 oysters injected with UV<sub>365</sub>/TiO<sub>2</sub>-treated seawater than with UV<sub>365</sub>-treated seawater alone.  
382 These results are consistent with the data of Bounty et al. (2012) [69] who showed that the  
383 increase in viral inactivation by photocatalysis *versus* photolysis was not due to an increase of  
384 DNA damages. The 2 hours treatment reduced the OsHV-1  $\mu$ Var DNA concentration for  
385 photolysis treatment and photocatalysis by 95 to 98 % respectively whereas in seawater kept  
386 out of any UV sources the OsHV-1  $\mu$ Var DNA was only reduced by 30 % (degradation of free  
387 DNA during the 2h at obscurity). Several authors have already reported that virus sensibility  
388 to photo-oxidative treatment depends on the capsid composition and the nature of the  
389 genetic material [28]. The OsHV-1  $\mu$ Var virus is an herpesvirus composed of double-stranded  
390 DNA (dsDNA) encapsulated in an enveloped icosahedral capsid of 116 nm diameter [70,71].  
391 The virus size, both in terms of diameter and genome length, plays a role in the virus

392 inactivation by photocatalysis [28], as well as the presence of an enveloped capsid [28,72,73].  
 393 The addition of TiO<sub>2</sub> catalyst (the photocatalysis treatment vs photolysis one) enhances the  
 394 viral inactivation without inducing more DNA degradation but could have target the viral  
 395 envelope, increasing the reduction of the infectivity.

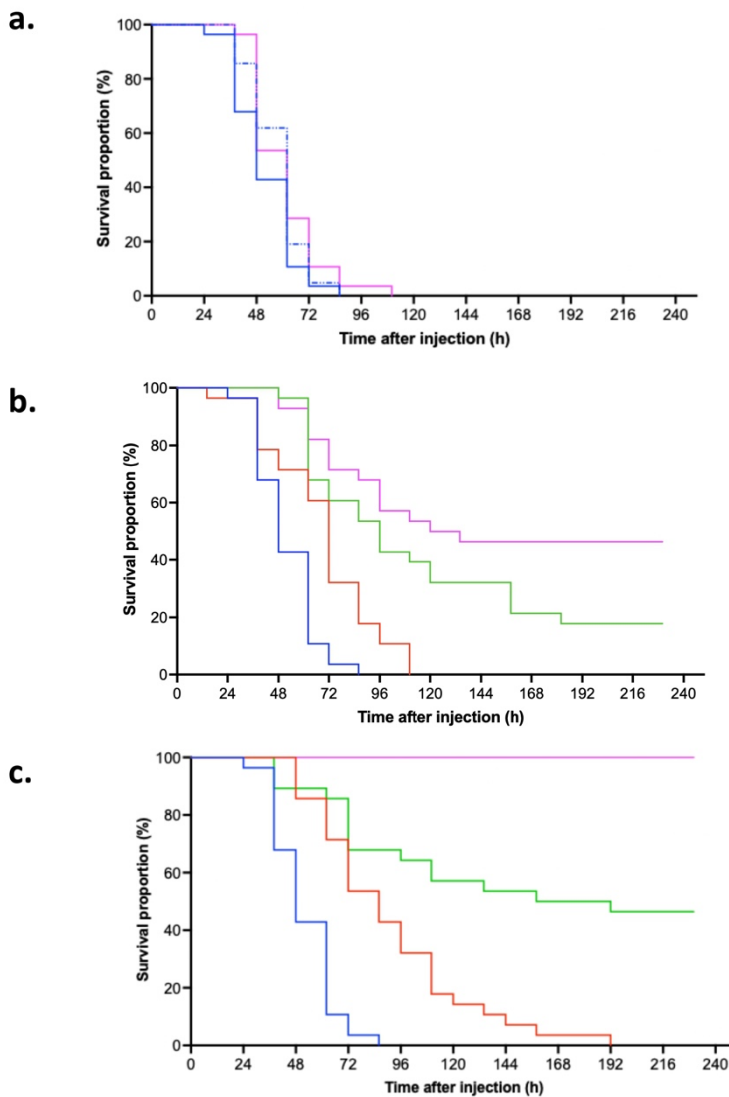


Figure 3 : Survival curves for oysters injected by (a) seawater without any treatment, (b) seawater disinfected by UV<sub>365</sub> only, and (c) seawater disinfected by UV<sub>365</sub>/TiO<sub>2</sub> treatment. — CSW without treatment, — CSW after 30min of treatment, — CSW after 1h of treatment, — CSW after 2h of treatment or 2h kept out of UV for the control, and - - - CSW with TiO<sub>2</sub> particles

396 3.2.2. Effect on a complex *pathobiota* (virus and bacteria)

397 Both experiments showed that microbial contaminants were efficiently inactivated by the  
398 treatment, especially the photocatalytic one. The DNA quantifications of both total *Vibrio* and  
399 total bacteria highlighted that DNA was not destroyed by the 2h of treatment while more  
400 than 95% of the OsHV-1  $\mu$ Var DNA was destroyed by the same treatment (Supplementary 5a).  
401 In freshwater some authors have already reported that viruses were the most susceptible  
402 organisms to Advanced Oxidative Processes (AOPs) such as photocatalysis [74,75]. This  
403 observation seems to be verified both in terms of DNA quantification and in terms of virus  
404 infectivity or cultivable GFP *V. harveyi* quantification. The OsHV-1  $\mu$ Var infectivity does not  
405 induce any oyster mortality after the 2h of photocatalytic treatment whereas only 80% of  
406 cultivable GFP *V. harveyi* were inactivated. In addition, the photolytic treatment was less  
407 efficient than the photocatalytic one both the OsHV-1  $\mu$ Var inactivation and the *V. harveyi*  
408 inactivation. The use of TiO<sub>2</sub> with the UV treatment enhanced the formation of OH radical  
409 which improved the seawater disinfection but that was not linked to a higher level of DNA  
410 damage since the DNA quantification was the same between photolysis and photocatalysis  
411 experiments. A better oyster survival rate is directly correlated with better virus inactivation  
412 (with a lower quantity of virus still infectious). However, this reduction in the number of  
413 infectious viruses was not correlated with the viral DNA load detected. In fact, the viral DNA  
414 load remain the same for photolysis-treated and photocatalysis-treated seawater samples,  
415 whereas the infectivity of photocatalysis-treated seawater was lower than that of photolysis-  
416 treated seawater. Photocatalytic treatment therefore appears to inactivate viral particles  
417 without destroying their DNA. The same observation was already done on virus by Bounty et  
418 al. (2012) with adenovirus inactivation in freshwater by UV<sub>254</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> advanced oxidation [69]  
419 and by Park et al. (2016) with murine norovirus in solidified agar matrix by UV/TiO<sub>2</sub> processes

420 [76]. On bacteria, Kim et al. (2013) showed that the use of TiO<sub>2</sub> with UV<sub>352</sub> or UV<sub>306</sub> treatment  
421 induces more damage to DNA than the UV alone including the plasmid DNA linearization [64].  
422

### 423 3.2.3. Effects of the photocatalysis process on the seawater bacterial community

#### 424 3.2.3.1. Microbiota change was linked to seawater treatments

425 As the POMS is triggered by an OsHV-1  $\mu$ Var oysters infection causing immune-suppression  
426 inducing a fatal bacteraemia [45], we also analyzed the effect of treatment on whole seawater  
427 bacterial communities using the 16S rRNA gene sequencing from samples taken before and  
428 during the contaminated seawater treatment (0, 0.5, 1 and 2h). In parallel with the analysis  
429 of the total bacteria microbiota analysis, the total bacteria and *Vibrio* loads were quantified  
430 using qPCR. All the analyses presented in this section were carried out on contaminated  
431 seawater without water filtration, containing both bacteria and viruses (Figure 1).

432 To investigate the effect of treatment on the dynamics of bacterial microbiota in  
433 contaminated seawater, we analyzed total bacterial communities using 16S rDNA  
434 metabarcoding during (0.5, 1 and 2 hours) and after the treatment (4, 7 and 10 days). The  
435 normalization to a depth of 10 301 sequences per sample allowed us to keep 1 014 ASVs.  
436 Given that the total composition of the microbiota is likely to evolve between the end of  
437 treatment and the various post-treatment points, we decided to analyze photocatalysis and  
438 photolysis effects during and after exposition separately. The principal coordinate analysis  
439 (PCoA) based on Bray-Curtis dissimilarities computed on samples obtained during the  
440 treatment highlighted that seawater microbiota changed between the two treatments and  
441 the control (p-value = 7e-04 for *capscale* ANOVA) (Figure 4) but no significant differences were  
442 observed on total bacteria loads between treatments and control (p-value > 0.05 for both



443 *Pairwise-t-test* and *Tukey multiple pairwise-comparisons*) (Supplementary 5b).  
444 Photocatalysis-treated samples cluster further apart on the figure 4, revealing that the  
445 microbiota composition of photocatalysis-treated CSWs is more affected than that of  
446 photolysis-treated CSWs. Furthermore, the longer the treatment, the more important the  
447 effect on photocatalysis-treated CSWs. The same taxa were found (Figure 5a), but the  
448 proportion of each bacterial genus changed between the UV<sub>365</sub> treatment, the UV<sub>365</sub>/TiO<sub>2</sub>  
449 treatment and the control (seawater kept in the dark during treatment). In the control and  
450 UV<sub>365</sub>-treated samples, the relative proportion of bacteria did not change over time, whereas  
451 treatment duration had an impact on the relative proportion of bacteria for the  
452 photocatalysis treatment (Figure 5a). The DESeq2 analysis allowed us to identify genus  
453 significantly modified by the treatment applied by calculating the log<sub>2</sub> fold change value. In  
454 UV<sub>365</sub>/TiO<sub>2</sub>-treated seawater, ASVs affiliated to the genera *Aesturiibacter* and *Vibrio* were  
455 found to be more abundant than in control seawater (log<sub>2</sub> fold change > 0 with adjusted p-  
456 value < 0.05), while *Croceibacter* and *Pseudophaeobacter* were less abundant (log<sub>2</sub> fold  
457 change < 0 with adjusted p-value < 0.05). (Figure 5b). In seawater treated by UV<sub>365</sub> alone, only  
458 *Pseudoalteromonas* genus was modified and was more abundant in UV<sub>365</sub> treated seawater  
459 than in control seawater (Figure 5b). Although the log<sub>2</sub> fold change shows a variation in *Vibrio*  
460 bacteria in the UV<sub>365</sub>/TiO<sub>2</sub> treated seawater compared to the untreated one, the  
461 quantification of total *Vibrio* did not show any significant changes (Supplementary 5c).  
462 Bacteria belonging to the *Vibrio* and *Pseudoalteromonas* genera have been shown to be the  
463 opportunistic strains associated with POMS disease [45]. More specifically, numerous *Vibrio*  
464 species are involved in oysters production losses both by inducing mortality in oysters [35,54]  
465 or by making them not consumable [77]. These results are consistent with data found in the  
466 literature concerning *Vibriosis* associated with POM disease during oyster life stages and in

467 particular *i*) during the spat or larval stage with *V. anguillarum*, *V. alginolyticus*, *V. tubiashii*,  
 468 *V. ostreicida*, *V. coralliilyticus*, *V. neptunius*, *V. bivalvicida* and other *Vibrios* of the *Splendidus*  
 469 clade [71,72], *ii*) during the juvenile stage with *Vibrio* of the *Splendidus* clade such as *V.*  
 470 *splendidus*, *V. tasmaniensis*, *V. cyclitrophicus* or *V. crassostreae* in POMS mortality events  
 471 [46,78,79] and *V. harveyi* and *iii*) once adult by *V. aestuarianus* [80,81].

472 In conclusion, the 16S rDNA barcoding analyses of the *Vibrio* genera did not allow to show  
 473 any pattern in the change of the global proportion of the *Vibrio* affiliated ASVs according to  
 474 the oxidative treatment type or to the treatment duration (data no show). Nevertheless, the  
 475 taxonomic resolution of the marker used in this study did not provide a reliable identification  
 476 of the different species within the *Vibrio* genus.

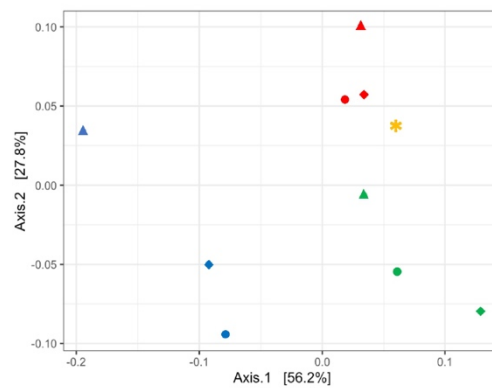


Figure 4 : Change in the microbial composition inducing by the photo-oxidative treatment (PCoA representation of the Bray-Curtis dissimilarity), (\*) initial seawater (seawater before treatment), and the seawater at different exposition time (●) after 0.5 h, (◆) after 1 h, and (■) after 2 h, for (●) the references seawater (seawater without UV<sub>365</sub>), (●) the seawater treated by UV<sub>365</sub>, and (●) the seawater treated by UV<sub>365</sub>/TiO<sub>2</sub>.

477  
 478  
 479  
 480



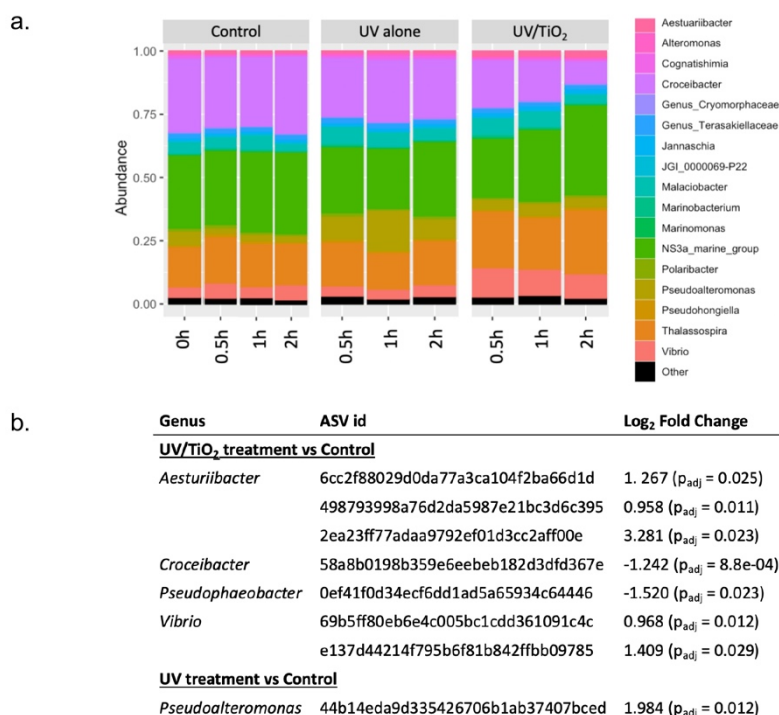


Figure 5: Bacteria genus modified according to the seawater photo-oxidative treatment applied (a) genus composition of the 17 more abundant genus, (b) genus significantly modified, log<sub>2</sub> fold change (with a p-value adjust < 0.05) of photo-oxidative treatment compared to untreated seawater (kept out of any UV<sub>365</sub> irradiation)

481

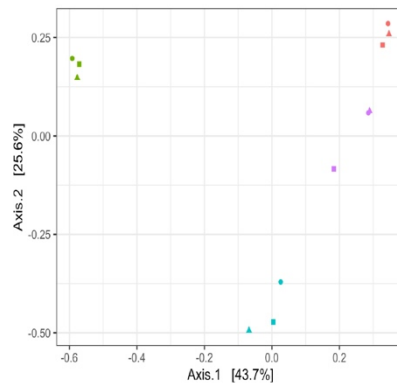
### 482 3.2.3.2. Assessment of microbiota resilience at the end of photo-oxidation treatment

483 After the end of the treatment and once the TiO<sub>2</sub> was fully removed by flotation from the seawater,  
 484 the microbiota shifted towards that of the one of control seawater (Figure 6a). Some bacteria genus  
 485 remains nevertheless with abundances significantly different from those of the control seawater  
 486 (Figure 6b). After the catalysis removal, the *BD7-11* and *Roseibacillus* bacteria remain more abundant  
 487 in UV<sub>365</sub>/TiO<sub>2</sub> treated seawater than in the control seawater (log<sub>2</sub> fold change > 0) whereas *VadinHA49*  
 488 bacteria were less abundant. The same trend was observed for UV<sub>365</sub> treated seawater where  
 489 *Roseibacillus* bacteria were also more abundant than in the control. Even if some genus showed  
 490 significant abundance differences, no correlation was observed between seawater bacterial  
 491 composition and the treatment applied a few days after the end of photo-oxidative treatments (p-  
 492 value = 0.9725 > 0.05 for *capscale ANOVA*). The total 16S rDNA bacteria quantification was also the

24

493 same after treatment between treated seawater and the reference seawater (Supplementary 5b).  
 494 Thus, 10 days after the treatment, the total bacterial community was resilient both in term of quantity  
 495 and quality by comparison to the control. In the present study, disinfection was not total, and it is  
 496 quite conceivable that the part of the microbiota still viable after treatment could grow again,  
 497 restoring a bacterial microbiota closer to that of untreated water. As previously mentioned by Falet  
 498 et al. (2022), the resilience observed here is an imperative requirement for aquaculture, as pathogen  
 499 removal must not alter the entire seawater microbiota in order to limit the impact on shellfish and  
 500 fish development [82].

a.



b.

Genus	ASV id	Log <sub>2</sub> Fold Change
<b>UV/TiO<sub>2</sub> treatment vs Control</b>		
<i>vadinHA49</i> ( <i>Planctomycetota</i> )	6039762db2d5077b52dfcca5705dc427 e0c86b41e39439b4da07e788d97ad8c0	-23.678 (p <sub>adj</sub> = 3.57e-08) -24.711 (p <sub>adj</sub> = 7.97e-09)
<i>BD7-11</i> ( <i>Planctomycetota</i> )	0865eafea28ebc73911cd6a23bb9e7ee	25.471 (p <sub>adj</sub> = 3.74e-09)
<i>Roseibacillus</i>	4871b4a3b38bfce10cccfa648820929	20.078 (p <sub>adj</sub> = 1.12e-05)
<b>UV treatment vs Control</b>		
<i>Taeseokella</i>	3d04a3aeb7c7aab28a5ed6df926370e	-21.053 (p <sub>adj</sub> = 5.98e-06)
<i>Roseibacillus</i>	4871b4a3b38bfce10cccfa648820929	20.888 (p <sub>adj</sub> = 5.98e-06)

Figure 6: Bacteria genus modified according to the time after the photo-oxidative treatment was applied (a) PCoA representation of the Bray-Curtis dissimilarity (●) at the end of the treatment, (●) 4 days, (●) 7 days, and (●) 10 days after the end of the treatment, for (●) the references seawater (seawater without UV<sub>365</sub>), (▲) the seawater treated by UV<sub>365</sub>, and (■) the seawater treated by UV<sub>365</sub>/TiO<sub>2</sub>, (b) genus significantly modified, log<sub>2</sub> fold change (with a p-value adjust < 0.05) of photo-oxidative treatment compared to Control (seawater without treatment)

501

502

25

## 503 4. Conclusion

504 The aim of this study was to apply a photo-oxidation process to seawater, either using UV<sub>365</sub>  
505 treatment alone, or using a combination of UV<sub>365</sub> and titanium dioxide photospheres, in order  
506 to assess the microbial inactivation. The feasibility of viral and bacterial inactivation in a  
507 context of aquaculture influent and effluent disinfection was investigated as well as the effect  
508 of such treatment on the global bacterial community. The main conclusion of this study is that  
509 photo-oxidizing treatments effectively inactivate the *OsHV-1*  $\mu$ Var virus and the *V. harveyi*  
510 bacterium, both considered to be the main pathogens of oysters. More specifically the  
511 photocatalysis treatment (UV<sub>365</sub>/TiO<sub>2</sub>) was more efficient in inactivating pathogens without  
512 inducing more DNA degradation. In addition, our results suggest that treatment by  
513 photocatalysis may be a promising technique for the biosecurity of land-based aquaculture  
514 facilities, as they demonstrate that under 2-hour treatment conditions, disinfection of  $\mu$ Var  
515 OsHV-1 by photocatalysis was effective in completely inactivating the virus and achieving a  
516 100% survival rate of injected oysters, without observing the installation of POMS. Finally,  
517 although the composition of the total bacterial community in seawater changes during photo-  
518 oxidative treatment, we nevertheless observed a resilience phenomenon in the seawater  
519 microbiota 10 days after treatment, as it recovered in terms of quantity and composition. In  
520 the perspective of future application for seawater disinfection, it will be necessary to go a  
521 step further by looking at the abiotic compartment and evaluate the potential production of  
522 toxic compounds in water. Further studies on microbial inactivation involving different flux  
523 densities are underway in the laboratory to model photocatalytic inactivation and propose a  
524 short- to medium-term solar photocatalytic solution for land-based aquaculture facilities such  
525 as hatcheries or oyster nurseries.

## 526 Acknowledgements

527 We would like to express our sincere gratitude to all the individuals and organizations that  
528 have contributed to the publication of this research paper. First, we would like to thanks  
529 Virginie Le Razavet and Bruno Petton, from the IFREMER Bouin Marine Mollusc Experimental  
530 Platform, for providing us the oysters used for experimental infection in this study. We are  
531 also grateful to Betty Faliex and Gael Simon, from the CEFREM laboratory at the Perpignan  
532 University, for providing us a place to experiment on oysters. We would also like to thank  
533 Pascal Romans and Nancy Trouillard, from the Oceanographic Observatory of Banyuls, for  
534 providing us the seawater used for all the experiments. Finally, we would like to thank all the  
535 participants in this study for their time and willingness to share their experiences, thanks to  
536 Jean-François Allienne from the IHPE and Margot Doberva from the Perpignan University  
537 Bioenvironment Platform.

538 This work received support from the French National Research Agency (ANR) under grant  
539 number ANR-10-LABX-22-01-SOLSTICE, the Région Occitanie (PHOTODEPOL, N°19015248),  
540 and the University of Perpignan Via Domitia through the Energy Environment Research  
541 Federation (FREE) under projects “Lagoon Ecosystem Health and Remediation” and  
542 “PHOTOMIC” of the axis “Sustainable processes, management and ecosystem health”. This  
543 study is set within the framework of the “Laboratoire d’Excellence (LABEX)” TULIP (ANR-10-  
544 LABX-41). This work was also funded by the doctoral school Énergie - Environnement (ED305),  
545 University of Perpignan Via Domitia, France.

## 546 References

- 547 [1] R. El Zrelli, L. Rabaoui, R.H. Roa-Ureta, N. Gallai, S. Castet, M. Grégoire, N. Bejaoui, P.  
548 Courjault-Radé, Economic impact of human-induced shrinkage of *Posidonia oceanica* meadows on  
549 coastal fisheries in the Gabes Gulf (Tunisia, Southern Mediterranean Sea), *Mar. Pollut. Bull.* 155



- 550 (2020) 111124. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2020.111124>.
- 551 [2] L.M. Hernández-Terrones, K.A. Null, D. Ortega-Camacho, A. Paytan, Water quality  
552 assessment in the Mexican Caribbean: Impacts on the coastal ecosystem, *Cont. Shelf Res.* 102 (2015)  
553 62–72. <https://doi.org/10.1016/j.csr.2015.04.015>.
- 554 [3] A. Bado-Nilles, B. Gagnaire, H. Thomas-Guyon, S. Le Floch, T. Renault, Effects of 16 pure  
555 hydrocarbons and two oils on haemocyte and haemolymphatic parameters in the Pacific oyster,  
556 *Crassostrea gigas* (Thunberg), *Toxicol. In Vitro.* 22 (2008) 1610–1617.  
557 <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2008.04.011>.
- 558 [4] S. Bayen, H. Kee Lee, J. Philip Obbard, Exposure and response of aquacultured oysters,  
559 *Crassostrea gigas*, to marine contaminants, *Environ. Res.* 103 (2007) 375–382.  
560 <https://doi.org/10.1016/j.envres.2006.06.012>.
- 561 [5] B. Gagnaire, H. Thomas-Guyon, Th. Burgeot, T. Renault, Pollutant effects on Pacific oyster,  
562 *Crassostrea gigas* (Thunberg), hemocytes: Screening of 23 molecules using flow cytometry, *Cell Biol.*  
563 *Toxicol.* 22 (2006) 1–14. <https://doi.org/10.1007/s10565-006-0011-6>.
- 564 [6] B. Gagnaire, M. Gay, A. Huvet, J.-Y. Daniel, D. Saulnier, T. Renault, Combination of a  
565 pesticide exposure and a bacterial challenge: In vivo effects on immune response of Pacific oyster,  
566 *Crassostrea gigas* (Thunberg), *Aquat. Toxicol.* 84 (2007) 92–102.  
567 <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2007.06.002>.
- 568 [7] Z. Gholami, M.S. Mortazavi, A. Karbassi, Environmental risk assessment of harmful algal  
569 blooms case study: Persian Gulf and Oman Sea located at Hormozgan Province, Iran, *Hum. Ecol.*  
570 *Risk Assess. Int. J.* 25 (2019) 271–296. <https://doi.org/10.1080/10807039.2018.1501660>.
- 571 [8] R.P.E. Yanong, Fungal diseases of fish, *Veterinary Clin. North Am. Exot. Anim. Pract.* 6  
572 (2003) 377–400. [https://doi.org/10.1016/S1094-9194\(03\)00005-7](https://doi.org/10.1016/S1094-9194(03)00005-7).
- 573 [9] Radcliffe, What Types of Fungi Grow in the Ocean?, *Sciencing.* (2017).  
574 <https://sciencing.com/types-fungi-grow-ocean-8467074.html> (accessed July 21, 2022).
- 575 [10] T. Pérez-Sánchez, B. Mora-Sánchez, J.L. Balcázar, Biological Approaches for Disease  
576 Control in Aquaculture: Advantages, Limitations and Challenges, *Trends Microbiol.* 26 (2018) 896–  
577 903. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2018.05.002>.
- 578 [11] H.J. You, J.H. Lee, M. Oh, S.Y. Hong, D. Kim, J. Noh, M. Kim, B.S. Kim, Tackling *Vibrio*  
579 *parahaemolyticus* in ready-to-eat raw fish flesh slices using lytic phage VPT02 isolated from market  
580 oyster, *Food Res. Int.* 150 (2021) 110779. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110779>.
- 581 [12] C. Cordier, C. Stavrakakis, B. Morga, L. Degrémont, A. Voulgaris, A. Bacchi, P. Sauvade, F.  
582 Coelho, P. Moulin, Removal of pathogens by ultrafiltration from sea water, *Environ. Int.* 142 (2020)  
583 105809. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.105809>.
- 584 [13] R.J. Whittington, P. Hick, M. Fuhrmann, O. Liu, I. Paul-Pont, Removal of oyster pathogens  
585 from seawater, *Environ. Int.* 150 (2021) 106258. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.106258>.
- 586 [14] R. Ben-Asher, S. Ravid, M. Ucko, M. Smirnov, O. Lahav, Chlorine-based disinfection for  
587 controlling horizontal transmission of VNN in a seawater recirculating aquaculture system growing  
588 European seabass, *Aquaculture.* 510 (2019) 329–336.  
589 <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.06.001>.
- 590 [15] M.J. Sharrer, S.T. Summerfelt, G.L. Bullock, L.E. Gleason, J. Taeuber, Inactivation of  
591 bacteria using ultraviolet irradiation in a recirculating salmonid culture system, *Aquac. Eng.* 33 (2005)  
592 135–149. <https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2004.12.001>.
- 593 [16] S. Aguilar, D. Rosado, J. Moreno-Andrés, L. Cartuche, D. Cruz, A. Acevedo-Merino, E.  
594 Nebot, Inactivation of a wild isolated *Klebsiella pneumoniae* by photo-chemical processes: UV-C,  
595 UV-C/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and UV-C/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Fe<sup>3+</sup>, *Catal. Today.* 313 (2018) 94–99.  
596 <https://doi.org/10.1016/j.cattod.2017.10.043>.
- 597 [17] D. Liu, S. Behrens, L.-F. Pedersen, D.L. Straus, T. Meinelt, Peracetic acid is a suitable



- 598 disinfectant for recirculating fish-microalgae integrated multi-trophic aquaculture systems, *Aquac.*  
599 *Rep.* 4 (2016) 136–142. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2016.09.002>.
- 600 [18] L.-F. Pedersen, P.B. Pedersen, Hydrogen peroxide application to a commercial recirculating  
601 aquaculture system, *Aquac. Eng.* 46 (2012) 40–46. <https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2011.11.001>.
- 602 [19] D. Bögner, M. Bögner, F. Schmachtl, N. Bill, J. Halfer, M.J. Slater, Hydrogen peroxide  
603 oxygenation and disinfection capacity in recirculating aquaculture systems, *Aquac. Eng.* 92 (2021)  
604 102140. <https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2020.102140>.
- 605 [20] J. Davidson, C. Good, C. Welsh, S. Summerfelt, The effects of ozone and water exchange  
606 rates on water quality and rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* performance in replicated water  
607 recirculating systems, *Aquac. Eng.* 44 (2011) 80–96. <https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2011.04.001>.
- 608 [21] R.K. Chhetri, A. Baun, H.R. Andersen, Acute toxicity and risk evaluation of the CSO  
609 disinfectants performic acid, peracetic acid, chlorine dioxide and their by-products hydrogen peroxide  
610 and chlorite, *Sci. Total Environ.* 677 (2019) 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.04.350>.
- 611 [22] M. Badiola, O.C. Basurko, R. Piedrahita, P. Hundley, D. Mendiola, Energy use in  
612 Recirculating Aquaculture Systems (RAS): A review, *Aquac. Eng.* 81 (2018) 57–70.  
613 <https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2018.03.003>.
- 614 [23] H.A. Foster, I.B. Ditta, S. Varghese, A. Steele, Photocatalytic disinfection using titanium  
615 dioxide: spectrum and mechanism of antimicrobial activity, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 90 (2011)  
616 1847–1868. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3213-7>.
- 617 [24] S. Malato, P. Fernández-Ibáñez, M.I. Maldonado, J. Blanco, W. Gernjak, Decontamination  
618 and disinfection of water by solar photocatalysis: Recent overview and trends, *Catal. Today.* 147  
619 (2009) 1–59. <https://doi.org/10.1016/j.cattod.2009.06.018>.
- 620 [25] M. Kacem, V. Goetz, G. Plantard, N. Wery, Modeling heterogeneous photocatalytic  
621 inactivation of *E. coli* using suspended and immobilized TiO<sub>2</sub> reactors, *AIChE J.* 61 (2015) 2532–  
622 2542. <https://doi.org/10.1002/aic.14834>.
- 623 [26] I. De Pasquale, C. Lo Porto, M. Dell’Edera, M.L. Curri, R. Comparelli, TiO<sub>2</sub>-based  
624 nanomaterials assisted photocatalytic treatment for virus inactivation: perspectives and applications,  
625 *Curr. Opin. Chem. Eng.* 34 (2021) 100716. <https://doi.org/10.1016/j.coche.2021.100716>.
- 626 [27] M.V. Liga, E.L. Bryant, V.L. Colvin, Q. Li, Virus inactivation by silver doped titanium  
627 dioxide nanoparticles for drinking water treatment, *Water Res.* 45 (2011) 535–544.  
628 <https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.09.012>.
- 629 [28] B.K. Mayer, Y. Yang, D.W. Gerrity, M. Abbaszadegan, The Impact of Capsid Proteins on  
630 Virus Removal and Inactivation during Water Treatment Processes, *Microbiol. Insights.* 8s2 (2015)  
631 MBI.S31441. <https://doi.org/10.4137/MBI.S31441>.
- 632 [29] N. Yamada, Differences in elimination efficiencies of *Escherichia coli* in freshwater and  
633 seawater as a result of TiO<sub>2</sub> photocatalysis, *W T E R R E E R C H.* (2013) 7.
- 634 [30] J. García-Garay, A. Franco-Herera, F. Machuca-Martínez, Wild microorganism and plankton  
635 decay in ballast water treatments by solar disinfection (SODIS) and advanced oxidation processes,  
636 *Mar. Pollut. Bull.* 154 (2020) 111060. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2020.111060>.
- 637 [31] D. Rubio, J.F. Casanueva, E. Nebot, Improving UV seawater disinfection with immobilized  
638 TiO<sub>2</sub>: Study of the viability of photocatalysis (UV254/TiO<sub>2</sub>) as seawater disinfection technology, *J.*  
639 *Photochem. Photobiol. Chem.* 271 (2013) 16–23. <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2013.08.002>.
- 640 [32] I. Levchuk, T. Homola, J. Moreno-Andrés, J.J. Rueda-Márquez, P. Dzik, M.Á. Moríñigo, M.  
641 Sillanpää, M.A. Manzano, R. Vahala, Solar photocatalytic disinfection using ink-jet printed composite  
642 TiO<sub>2</sub>/SiO<sub>2</sub> thin films on flexible substrate: Applicability to drinking and marine water, *Sol. Energy.*  
643 191 (2019) 518–529. <https://doi.org/10.1016/j.solener.2019.09.038>.
- 644 [33] I. Levchuk, T. Homola, G. Singhal, J.J. Rueda-Márquez, J. Vida, P. Souček, T. Svoboda, E.  
645 Villar-Navarro, O. Levchuk, P. Dzik, A. Lähde, J. Moreno-Andrés, UVA and solar driven

- 646 photocatalysis with rGO/TiO<sub>2</sub>/polysiloxane for inactivation of pathogens in recirculation aquaculture  
647 systems (RAS) streams, Chem. Eng. J. Adv. 10 (2022) 100243.  
648 <https://doi.org/10.1016/j.cej.2022.100243>.
- 649 [34] M. Kacem, G. Plantard, N. Wery, V. Goetz, Kinetics and efficiency displayed by supported  
650 and suspended TiO<sub>2</sub> catalysts applied to the disinfection of *Escherichia coli*, Chin. J. Catal. 35 (2014)  
651 1571–1577. [https://doi.org/10.1016/S1872-2067\(14\)60212-6](https://doi.org/10.1016/S1872-2067(14)60212-6).
- 652 [35] M. Brienza, Use of solar advanced oxidation processes for wastewater treatment: Follow-up  
653 on degradation products, acute toxicity, genotoxicity and estrogenicity, (2016) 8.
- 654 [36] C. Blanchon, Heterogeneous photo-oxidation in microbial inactivation\_ A promising  
655 technology for seawater bio-securing?, (2023).
- 656 [37] H. Ritchie, The world now produces more seafood from fish farms than wild catch, Our  
657 World Data. (2019). <https://ourworldindata.org/rise-of-aquaculture> (accessed June 9, 2023).
- 658 [38] G.P. Richards, M.A. Watson, D.S. Needleman, K.M. Church, C.C. Häse, Mortalities of  
659 Eastern and Pacific Oyster Larvae Caused by the Pathogens *Vibrio coralliilyticus* and *Vibrio*  
660 *tubiiashii*, Appl. Environ. Microbiol. 81 (2015) 292–297. <https://doi.org/10.1128/AEM.02930-14>.
- 661 [39] B. Yang, S. Zhai, X. Li, J. Tian, Q. Li, H. Shan, S. Liu, Identification of *Vibrio alginolyticus*  
662 as a causative pathogen associated with mass summer mortality of the Pacific Oyster (*Crassostrea*  
663 *gigas*) in China, Aquaculture. 535 (2021) 736363. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.736363>.
- 664 [40] A. Mesnil, Emergence and clonal expansion of *Vibrio aestuarianus* lineages pathogenic for  
665 oysters in Europe, (2022).
- 666 [41] D. Oyanedel, A. Lagorce, M. Bruto, P. Haffner, A. Morot, Y. Dorant, S. De La Forest  
667 Divonne, F. Delavat, N. Inguibert, C. Montagnani, B. Morga, E. Toulza, C. Chaparro, J.-M.  
668 Escoubas, Y. Labreuche, Y. Gueguen, J. Vidal-Dupiol, J. De Lorgeril, B. Petton, L. Degremont, D.  
669 Tourbiez, L.-L. Pimparé, M. Leroy, O. Romatif, J. Pouzadoux, G. Mitta, F.L. Roux, G.M. Charrière,  
670 M.-A. Travers, D. Destoumieux-Garzón, Cooperation and cheating orchestrate *Vibrio* assemblages  
671 and polymicrobial synergy in oysters infected with OsHV-1 virus, (2023).  
672 <https://doi.org/10.1101/2023.02.11.528104>.
- 673 [42] D. Saulnier, S. De Decker, P. Haffner, L. Cobret, M. Robert, C. Garcia, A Large-Scale  
674 Epidemiological Study to Identify Bacteria Pathogenic to Pacific Oyster *Crassostrea gigas* and  
675 Correlation Between Virulence and Metalloprotease-like Activity, Microb. Ecol. 59 (2010) 787–798.  
676 <https://doi.org/10.1007/s00248-009-9620-y>.
- 677 [43] V.M. Campbell, A. Chouljenko, S.G. Hall, Depuration of live oysters to reduce *Vibrio*  
678 *parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus*: A review of ecology and processing parameters, Compr.  
679 Rev. Food Sci. Food Saf. 21 (2022) 3480–3506. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12969>.
- 680 [44] ECOSCOPA, Réseau d'Observations Conchylicoles (Ifremer), (2020).  
681 [https://www.ifremer.fr/observatoire\\_conchylicole/](https://www.ifremer.fr/observatoire_conchylicole/).
- 682 [45] B. Petton, D. Destoumieux-Garzón, F. Pernet, E. Toulza, J. de Lorgeril, L. Degremont, G.  
683 Mitta, The Pacific Oyster Mortality Syndrome, a Polymicrobial and Multifactorial Disease: State of  
684 Knowledge and Future Directions, Front. Immunol. 12 (2021) 630343.  
685 <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.630343>.
- 686 [46] J. de Lorgeril, A. Lucasson, B. Petton, E. Toulza, C. Montagnani, C. Clerissi, J. Vidal-Dupiol,  
687 C. Chaparro, R. Galinier, J.-M. Escoubas, P. Haffner, L. Degremont, G.M. Charrière, M. Lafont, A.  
688 Delort, A. Vergnes, M. Chiarello, N. Fauray, T. Rubio, M.A. Leroy, A. Pérignon, D. Régler, B. Morga,  
689 M. Alunno-Bruscia, P. Boudry, F. Le Roux, D. Destoumieux-Garzón, Y. Gueguen, G. Mitta,  
690 Immune-suppression by OsHV-1 viral infection causes fatal bacteraemia in Pacific oysters, Nat.  
691 Commun. 9 (2018) 4215. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06659-3>.
- 692 [47] C. Joannis-Cassan, A.S. Rodriguez Castillo, C. Dezani, C. Gómez-Canela, B. Reoyo-Prats, C.  
693 Calas-Blanchard, C. Barata, S. Lacorte, G. Plantard, Towards an innovative combined process



- 694 coupling biodegradation and photo-oxidation for the removal of pharmaceutical residues, *J. Chem.*  
695 *Technol. Biotechnol.* 96 (2021) 755–763. <https://doi.org/10.1002/jctb.6589>.
- 696 [48] G. Heydari, Passive or Semi-Passive Photocatalytic Treatment of Organic Pollutants in  
697 Water, (2018). <https://doi.org/10.11575/PRISM/33048>.
- 698 [49] brice Reoyo-Prats, J.-C. Claire, H. Mouldi, G. Vincent, C.-B. Carole, P. Gaël, Photo-  
699 oxidation of three major pharmaceuticals in urban wastewater under artificial and solar irradiations, *J.*  
700 *Photochem. Photobiol. Chem.* 425 (2022) 113673. <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2021.113673>.
- 701 [50] G. Plantard, V. Goetz, Correlations between optical, specific surface and photocatalytic  
702 properties of media integrated in a photo-reactor, *Chem. Eng. J.* 252 (2014) 194–201.  
703 <https://doi.org/10.1016/j.cej.2014.04.055>.
- 704 [51] G. Plantard, V. Goetz, Experimental and numerical studies of a solar photocatalytic process in  
705 a dynamic mode applied to three catalyst media, *Chem. Eng. Process. Process Intensif.* 62 (2012)  
706 129–136. <https://doi.org/10.1016/j.cep.2012.08.002>.
- 707 [52] T.M. Therneau, A Package for Survival Analysis in R, (2023). [https://CRAN.R-](https://CRAN.R-project.org/package=survival)  
708 [project.org/package=survival](https://CRAN.R-project.org/package=survival).
- 709 [53] E. Bolyen, J.R. Rideout, M.R. Dillon, N.A. Bokulich, C.C. Abnet, G.A. Al-Ghalith, H.  
710 Alexander, E.J. Alm, M. Arumugam, F. Asnicar, Y. Bai, J.E. Bisanz, K. Bittinger, A. Brejnrod, C.J.  
711 Brislawn, C.T. Brown, B.J. Callahan, A.M. Caraballo-Rodríguez, J. Chase, E.K. Cope, R. Da Silva,  
712 C. Diener, P.C. Dorrestein, G.M. Douglas, D.M. Durall, C. Duvallet, C.F. Edwardson, M. Ernst, M.  
713 Estaki, J. Fouquier, J.M. Gauglitz, S.M. Gibbons, D.L. Gibson, A. Gonzalez, K. Gorlick, J. Guo, B.  
714 Hillmann, S. Holmes, H. Holste, C. Huttenhower, G.A. Huttley, S. Janssen, A.K. Jarmusch, L. Jiang,  
715 B.D. Kaehler, K.B. Kang, C.R. Keefe, P. Keim, S.T. Kelley, D. Knights, I. Koester, T. Kosciolk, J.  
716 Kreps, M.G.I. Langille, J. Lee, R. Ley, Y.-X. Liu, E. Loftfield, C. Lozupone, M. Maher, C. Marotz,  
717 B.D. Martin, D. McDonald, L.J. McIver, A.V. Melnik, J.L. Metcalf, S.C. Morgan, J.T. Morton, A.T.  
718 Naimey, J.A. Navas-Molina, L.F. Nothias, S.B. Orchanian, T. Pearson, S.L. Peoples, D. Petras, M.L.  
719 Preuss, E. Pruesse, L.B. Rasmussen, A. Rivers, M.S. Robeson, P. Rosenthal, N. Segata, M. Shaffer,  
720 A. Shiffer, R. Sinha, S.J. Song, J.R. Spear, A.D. Swafford, L.R. Thompson, P.J. Torres, P. Trinh, A.  
721 Tripathi, P.J. Turnbaugh, S. Ul-Hasan, J.J.J. van der Hooft, F. Vargas, Y. Vázquez-Baeza, E.  
722 Vogtmann, M. von Hippel, W. Walters, Y. Wan, M. Wang, J. Warren, K.C. Weber, C.H.D.  
723 Williamson, A.D. Willis, Z.Z. Xu, J.R. Zaneveld, Y. Zhang, Q. Zhu, R. Knight, J.G. Caporaso,  
724 Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2, *Nat.*  
725 *Biotechnol.* 37 (2019) 852–857. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0209-9>.
- 726 [54] P.J. McMurdie, S. Holmes, phyloseq: An R package for reproducible interactive analysis and  
727 graphics of microbiome census data., (2013). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061217>.
- 728 [55] R Core Team, R: A language and environment for statistical computing., (2022).  
729 <https://www.R-project.org/>.
- 730 [56] J. Oksanen, G.L. Simpson, F.G. Blanchet, R. Kindt, P. Legendre, P.R. Minchin, R.B. O'Hara,  
731 P. Solymos, M.H.H. Stevens, E. Szoecs, H. Wagner, M. Barbour, M. Bedward, B. Bolker, D. Borcard,  
732 G. Carvalho, M. Chirico, M.D. Caceres, S. Durand, H.B.A. Evangelista, R. FitzJohn, M. Friendly, B.  
733 Furneaux, G. Hannigan, M.O. Hill, L. Lahti, D. McGlinn, M.-H. Ouellette, E.R. Cunha, T. Smith, A.  
734 Stier, C.J.F.T. Braak, J. Weedon, vegan: Community Ecology Package, (2022). [https://cran.r-](https://cran.r-project.org/web/packages/vegan/index.html)  
735 [project.org/web/packages/vegan/index.html](https://cran.r-project.org/web/packages/vegan/index.html) (accessed June 11, 2023).
- 736 [57] M.I. Love, W. Huber, S. Anders, Moderated estimation of fold change and dispersion for  
737 RNA-seq data with DESeq2, *Genome Biol.* 15 (2014) 550. [https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-](https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8)  
738 8.
- 739 [58] S.C. Webb, A. Fidler, T. Renault, Primers for PCR-based detection of ostreid herpes virus-1  
740 (OsHV-1): Application in a survey of New Zealand molluscs, *Aquaculture.* 272 (2007) 126–139.  
741 <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.07.224>.

- 742 [59] S. Mansergh, J.P. Zehr, *Vibrio* diversity and dynamics in the Monterey Bay upwelling region,  
743 *Front. Microbiol.* 5 (2014). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00048>.
- 744 [60] M. Lafont, B. Petton, A. Vergnes, M. Pauletto, A. Segarra, B. Gourbal, C. Montagnani, Long-  
745 lasting antiviral innate immune priming in the Lophotrochozoan Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, *Sci.*  
746 *Rep.* 7 (2017) 13143. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-13564-0>.
- 747 [61] G. Das, K. Sil, J. Das, Repair of ultraviolet-light-induced DNA damage in *Vibrio cholerae*,  
748 *Biochim. Biophys. Acta BBA - Nucleic Acids Protein Synth.* 655 (1981) 413–420.  
749 [https://doi.org/10.1016/0005-2787\(81\)90053-8](https://doi.org/10.1016/0005-2787(81)90053-8).
- 750 [62] J. Moreno-Andrés, M. Tierno-Galán, L. Romero-Martínez, A. Acevedo-Merino, E. Nebot,  
751 Inactivation of the waterborne marine pathogen *Vibrio alginolyticus* by photo-chemical processes  
752 driven by UV-A, UV-B, or UV-C LED combined with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> or HSO<sub>5</sub><sup>-</sup>, *Water Res.* 232 (2023)  
753 119686. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2023.119686>.
- 754 [63] D. Wu, H. You, R. Zhang, C. Chen, D.-J. Lee, Ballast waters treatment using UV/Ag–  
755 TiO<sub>2</sub>+O<sub>3</sub> advanced oxidation process with *Escherichia coli* and *Vibrio alginolyticus* as indicator  
756 microorganisms, *Chem. Eng. J.* 174 (2011) 714–718. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2011.09.087>.
- 757 [64] S. Kim, K. Ghafoor, J. Lee, M. Feng, J. Hong, D.-U. Lee, J. Park, Bacterial inactivation in  
758 water, DNA strand breaking, and membrane damage induced by ultraviolet-assisted titanium dioxide  
759 photocatalysis, *Water Res.* 47 (2013) 4403–4411. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.05.009>.
- 760 [65] E. Villar-Navarro, I. Levchuk, J.J. Rueda-Márquez, M. Manzano, Combination of solar  
761 disinfection (SODIS) with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for enhanced disinfection of marine aquaculture effluents, *Sol.*  
762 *Energy.* 177 (2019) 144–154. <https://doi.org/10.1016/j.solener.2018.11.018>.
- 763 [66] J. Moreno-Andrés, J.J. Rueda-Márquez, T. Homola, J. Vielma, M.Á. Moríñigo, A. Mikola,  
764 M. Sillanpää, A. Acevedo-Merino, E. Nebot, I. Levchuk, A comparison of photolytic, photochemical  
765 and photocatalytic processes for disinfection of recirculation aquaculture systems (RAS) streams,  
766 *Water Res.* 181 (2020) 115928. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.115928>.
- 767 [67] J. Moreno-Andrés, L. Romero-Martínez, A. Acevedo-Merino, E. Nebot, UV-based  
768 technologies for marine water disinfection and the application to ballast water: Does salinity interfere  
769 with disinfection processes?, *Sci. Total Environ.* 581–582 (2017) 144–152.  
770 <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.12.077>.
- 771 [68] C. Zhang, Y. Li, D. Shuai, Y. Shen, D. Wang, Progress and challenges in photocatalytic  
772 disinfection of waterborne Viruses: A review to fill current knowledge gaps, *Chem. Eng. J.* 355  
773 (2019) 399–415. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2018.08.158>.
- 774 [69] S. Bounty, R.A. Rodriguez, K.G. Linden, Inactivation of adenovirus using low-dose  
775 UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> advanced oxidation, *Water Res.* 46 (2012) 6273–6278.  
776 <https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.08.036>.
- 777 [70] Adamson, Mapping the proteins of herpes simplex virus type 1 capsid, 2006.
- 778 [71] A.J. Davison, B.L. Trus, N. Cheng, A.C. Steven, M.S. Watson, C. Cunningham, R.-M.L.  
779 Deuff, T. Renault, A novel class of herpesvirus with bivalve hosts, *J. Gen. Virol.* 86 (2005) 41–53.  
780 <https://doi.org/10.1099/vir.0.80382-0>.
- 781 [72] R. Nakano, M. Hara, H. Ishiguro, Y. Yao, T. Ochiai, K. Nakata, T. Murakami, J. Kajioka, K.  
782 Sunada, K. Hashimoto, A. Fujishima, Y. Kubota, Broad Spectrum Microbicidal Activity of  
783 Photocatalysis by TiO<sub>2</sub>, *Catalysts.* 3 (2013) 310–323. <https://doi.org/10.3390/catal3010310>.
- 784 [73] J. Bogdan, Comparison of Infectious Agents Susceptibility to Photocatalytic Effects of  
785 Nanosized Titanium and Zinc Oxides: A Practical Approach, (2015) 15.
- 786 [74] P.V. Laxma Reddy, B. Kavitha, P.A. Kumar Reddy, K.-H. Kim, TiO<sub>2</sub> -based photocatalytic  
787 disinfection of microbes in aqueous media: A review, *Environ. Res.* 154 (2017) 296–303.  
788 <https://doi.org/10.1016/j.envres.2017.01.018>.
- 789 [75] X. Zheng, Z. Shen, C. Cheng, L. Shi, R. Cheng, D. Yuan, Photocatalytic disinfection

- 790 performance in virus and virus/bacteria system by Cu-TiO<sub>2</sub> nanofibers under visible light, Environ.  
791 Pollut. 237 (2018) 452–459. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.02.074>.
- 792 [76] D. Park, H.M. Shahbaz, S.-H. Kim, M. Lee, W. Lee, J.-W. Oh, D.-U. Lee, J. Park,  
793 Inactivation efficiency and mechanism of UV-TiO<sub>2</sub> photocatalysis against murine norovirus using a  
794 solidified agar matrix, Int. J. Food Microbiol. 238 (2016) 256–264.  
795 <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.09.025>.
- 796 [77] B.A. Froelich, R.T. Noble, *Vibrio* bacteria in raw oysters: managing risks to human health,  
797 Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci. 371 (2016) 20150209. <https://doi.org/10.1098/rstb.2015.0209>.
- 798 [78] A. Lemire, D. Goudenège, T. Versigny, B. Petton, A. Calteau, Y. Labreuche, F. Le Roux,  
799 Populations, not clones, are the unit of vibrio pathogenesis in naturally infected oysters, ISME J. 9  
800 (2015) 1523–1531. <https://doi.org/10.1038/ismej.2014.233>.
- 801 [79] M. Bruto, A. James, B. Petton, Y. Labreuche, S. Chenivresse, M. Alunno-Bruscia, M.F. Polz,  
802 F. Le Roux, *Vibrio crassostreae*, a benign oyster colonizer turned into a pathogen after plasmid  
803 acquisition, ISME J. 11 (2017) 1043–1052. <https://doi.org/10.1038/ismej.2016.162>.
- 804 [80] M. Garnier, Y. Labreuche, J.-L. Nicolas, Molecular and phenotypic characterization of *Vibrio*  
805 *aestuarianus* subsp. *francensis* subsp. nov., a pathogen of the oyster *Crassostrea gigas*, Syst. Appl.  
806 Microbiol. 31 (2008) 358–365. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2008.06.003>.
- 807 [81] M.-A. Travers, D. Tourbiez, L. Parizadeh, P. Haffner, A. Kozic-Djellouli, M. Aboubaker, M.  
808 Koken, L. Dégremont, C. Lupo, Several strains, one disease: experimental investigation of *Vibrio*  
809 *aestuarianus* infection parameters in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, Vet. Res. 48 (2017) 32.  
810 <https://doi.org/10.1186/s13567-017-0438-1>.
- 811 [82] M. Fallet, C. Montagnani, B. Petton, L. Dantan, J. De Lorgeril, S. Comarmond, C. Chaparro,  
812 E. Toulza, S. Boitard, J.-M. Escoubas, A. Vergnes, J. Le Grand, I. Bulla, Y. Gueguen, J. Vidal-  
813 Dupiol, C. Grunau, G. Mitta, C. Cosseau, Early life microbial exposures shape the *Crassostrea gigas*  
814 immune system for lifelong and intergenerational disease protection, Microbiome. 10 (2022) 85.  
815 <https://doi.org/10.1186/s40168-022-01280-5>.
- 816



## **Chapitre 3 : Étude de l'inactivation de *Vibrio harveyi* par photocatalyse hétérogène**



## I. Introduction

Comme cela a déjà été décrit dans le chapitre 1, l'inactivation microbienne par photocatalyse est un phénomène complexe faisant intervenir de nombreux paramètres opératoires et caractéristiques de la matrice. Les interactions cibles / catalyseurs sont, par exemple, fortement modifiées par la composition de la matrice et ses paramètres physico-chimiques. La présence de composés en suspension ou de sels peuvent notamment affecter la disponibilité des sites actifs du catalyseur (García-Garay et al., 2020; Liu et al., 2019; Rubio et al., 2013b, 2013a). De même, le pH peut modifier la charge de surface du catalyseur et ainsi modifier son affinité avec la cible (Chong et al., 2010; Davies, 2003; Kormann et al., 1991; Matheson and Lee, 1979; Schwegmann et al., 2013; Wilkinson and Brummer, 1981; Zheng et al., 2018). Certains paramètres, tels que la composition de la matrice, vont également impacter le procédé de photocatalyse au niveau du transfert de photons. En effet, les matières en suspensions présentes dans l'eau peuvent absorber une fraction de l'irradiation incidente, rendant une partie des photons non disponibles pour la photo-excitation du catalyseur, ce qui aura pour conséquence un ralentissement de la photocatalyse (García-Garay et al., 2020; Rubio et al., 2013b). Cette inactivation microbienne a largement été caractérisée en eau douce et de nombreuses études proposent des formalismes de lois cinétiques permettant de la modéliser. A ce jour, aucune loi ne faisant consensus n'a été établie dans la littérature pour décrire de manière analytique les différentes situations de dégradation, même si plusieurs lois empiriques ont été proposées (Chick, 1908; Dalrymple et al., 2010; Dalrymple and Goswami, 2011; Ganguly et al., 2018; Hom, 1972; Kacem et al., 2015; Lambert and Johnston, 2000; Watson, 1908). Ces lois expriment principalement une dépendance de l'inactivation à la densité de flux ainsi qu'à la concentration en microorganisme cible. En eau de mer, l'inactivation microbienne par photocatalyse est nettement moins étudiée et peu d'études sur la détermination de loi cinétique dédiée à l'eau de mer sont disponibles (Moreno-Andrés et al., 2020).

Dans ce contexte, nous avons donc cherché à évaluer l'applicabilité du procédé de photocatalyse hétérogène pour une utilisation pour des installations aquacoles à terre. Nous avons notamment montré la pertinence de l'utilisation de la photocatalyse hétérogène pour des applications en aquaculture avec l'inactivation de pathogènes d'huîtres tels que la bactérie *Vibrio harveyi* et le virus *OsHV-1*. Nos expérimentations ont été réalisées en laboratoire sous UV artificiels. Or, le principal intérêt des photo-procédés est de pouvoir utiliser la ressource solaire comme source d'UV. Notre objectif est donc de montrer la pertinence de la photocatalyse hétérogène comme procédé durable, s'appuyant sur une utilisation de la ressource solaire pour le traitement des eaux d'aquaculture. Pour ce faire, ce travail se décompose en trois parties.

La première partie vise à étudier et caractériser la souche de la bactérie *Vibrio harveyi* utilisée comme bactérie modèle cible. En effet, de nombreux travaux ont déjà mis en lumière la complexité et la multiplicité des phénomènes entrant en jeu et pouvant influencer l'inactivation bactérienne par photocatalyse (Kacem et al., 2015, 2014). Nombre de ces études ont utilisé *Escherichia coli* comme microorganisme modèle, bactérie très largement caractérisée en condition de traitement en eau douce. De fait, notre souhait de travailler avec le pathogène bactérien *Vibrio harveyi* a nécessité une caractérisation préalable de la souche utilisée. En particulier, une étape importante d'étude de son comportement / interaction avec les différents compartiments (croissance en milieu riche et pauvre, sensibilité au rayonnement UV, interaction avec le catalyseur...) a été nécessaire.

La seconde partie de notre travail constitue le cœur de ce chapitre puisque l'objectif était d'établir les capacités d'inactivation sous conditions d'irradiation solaire de la souche de *Vibrio harveyi* via la photocatalyse. Pour ce faire, nous avons étudié deux étapes clefs : i) la prédiction des taux d'abattement journaliers par photocatalyse, et ii) la gestion du procédé de photocatalyse pour tenir compte des caractéristiques variables de la ressource solaire et notamment la prise en compte de l'intermittence de la ressource au cours de la journée avec les passages nuageux et les variations saisonnières. Pour ce faire, une loi cinétique représentative de l'inactivation de la bactérie cible a été identifiée sous conditions d'irradiations contrôlées en réacteur fermé (batch). Par la suite, la simulation sous différentes conditions d'irradiation représentatives de la ressource solaire sur différents sites aquacoles français nous a permis de prédire l'inactivation journalière de bactéries en fonction de la période de l'année et de la localisation de l'installation aquacole. Enfin, la modulation du débit d'alimentation du réacteur en continu a été proposée comme méthode pour pallier la fluctuation de la ressource solaire et garantir ainsi une qualité de l'eau suffisante pour des applications aquacoles. A partir de l'emplacement désiré de l'installation et de la modulation de débit en fonction de la période de l'année, le dimensionnement des installations a donc pu être réalisé. L'ensemble du travail qui a été mené pour la simulation et la prédiction de l'inactivation bactérienne par photocatalyse hétérogène en eau de mer est présenté dans l'article 3 intitulé "*Trials and in silico simulations to predict daily photo-oxidative capacity under solar conditions: A case study on the inactivation of oyster pathogenic bacteria, Vibrio harveyi*".

Pour finir, la dernière partie de ce travail a visé à identifier les contraintes liées à l'utilisation d'eau de mer pour la photocatalyse et plus particulièrement l'effet sur le catalyseur lors d'exposition prolongée en réacteur continu.

## II. Étude préliminaire : inactivation par photocatalyse et caractérisation de la souche de *Vibrio harveyi* utilisée

### A. Caractérisation de la souche de *Vibrio harveyi*

#### Protocole

La bactérie utilisée pour étudier l'inactivation par photocatalyse hétérogène est un pathogène d'huître fréquemment détecté lors d'épisodes de mortalités, *Vibrio* (Go et al., 2017; King et al., 2019b; Oyanedel et al., 2023; Saulnier et al., 2010; Wang et al., 2021). La souche sélectionnée ici a été isolée lors d'un épisode de mortalité d'huîtres survenu sur l'étang de Thau en 2015. Cette souche a ensuite été modifiée avec le plasmide pFD086 (GFP, TrimR) (Oyanedel et al., 2023). Il s'agit d'un plasmide permettant d'exprimer la *Green Fluorescent Protein* (GFP) et contenant le gène de résistance à la triméthoprine. Cela permet de maintenir le plasmide chez les bactéries cultivées et également de bénéficier d'un crible de sélection dans le cadre d'une approche cultivable. *Vibrio harveyi* a été cultivé en milieu Zobell liquide contenant  $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de triméthoprine à  $+20^\circ\text{C}$ . Une préculture de la souche a été réalisée à partir d'une colonie isolée sur boîte de Marine Agar + triméthoprine puis régénérée au bout de 24 h avec du milieu Zobell + triméthoprine (2 mL de préculture dans qsp 100 mL). Après 24 h d'incubation / croissance à  $+20^\circ\text{C}$ , la phase stationnaire ayant été atteinte, la culture a été utilisée pour les expériences de photocatalyse. L'étude de la cinétique de croissance de la souche nous a permis d'établir une corrélation Densité Optique (DO) à 600 nm - UFC (Unités formant des colonies). La concentration bactérienne de la culture a donc pu être vérifiée par une simple mesure de la densité optique.

Le dénombrement des bactéries vivantes a été réalisé sur milieu Marine Agar (milieu Marine Broth avec 15 g.L<sup>-1</sup> d'agar) supplémenté avec 10 µg.mL<sup>-1</sup> de triméthoprime. Toutes les mesures de dénombrement bactérien ont été réalisées en triplicats à partir du dépôt d'une goutte de 10 µL d'une gamme de dilution décimale dans de l'eau de Lewis (Figure 10) suivant un protocole adapté de la thèse de Cibrario (2019) (Cibrario, 2019). Les boîtes ont ensuite été incubées 24 h à +20°C avant dénombrement des colonies. Lors du dénombrement, la fluorescence des colonies a été vérifiée à 395 nm, longueur d'onde d'émission de la GFP, afin de dénombrer spécifiquement la souche de *Vibrio harveyi* et de s'affranchir de toute contamination microbienne toujours possible au moment des prélèvements.

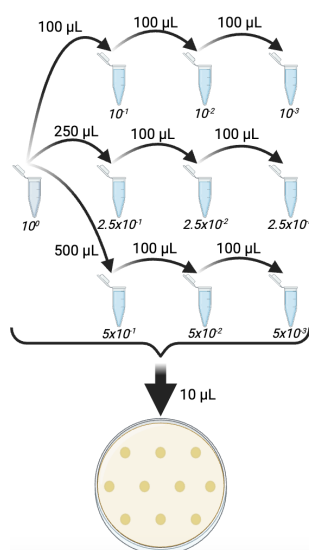


Figure 10: protocole de dépôt pour le dénombrement des *Vibrio harveyi* vivants.

## Résultats

La croissance bactérienne se décompose en plusieurs phases durant lesquelles les mécanismes cellulaires en jeu peuvent influencer la sensibilité des bactéries aux attaques des radicaux libres (ROS). En effet, lors de la phase exponentielle des bactéries, celles-ci utilisent une grande partie de leur ressource énergétique pour leur croissance, ce qui les rend plus sensibles aux différents stress. Une fois la phase stationnaire atteinte, la croissance bactérienne ralentie et les bactéries utilisent une plus grande partie de leur ressource énergétique pour la maintenance cellulaire, ce qui les rend plus résistantes aux stress (De Pasquale et al., 2020; Rincón and Pulgarin, 2004).

Pour garantir l'état physiologique des bactéries, il est important de connaître la cinétique de croissance de la souche utilisée. La figure 11a présente la cinétique de croissance en milieu riche (milieu Zobell) de la souche de *Vibrio harveyi* modifiée avec le plasmide pFD086 (GFP, TrimR) (*Th15\_O\_G11 GFP*) versus celui de la souche sauvage non modifiée (*Th15\_O\_G11*, appelée WT, accession number : ERS9919775) (Oyanedel et al., 2023). Dans la suite de manuscrit, lorsque la souche sauvage est utilisée cela sera précisé, si aucune précision n'est donnée cela signifie que la souche exprimant la GFP est utilisée. La souche GFP a une croissance plus rapide que la souche WT avec un taux de croissance  $\mu_{\max}$  de 0.73 h<sup>-1</sup> contre 0.47 h<sup>-1</sup> (figure 11a). En revanche, pour les deux souches, la phase stationnaire est atteinte entre 13 et 24 h avec une concentration en *Vibrio* de l'ordre de 5x10<sup>9</sup> - 1x10<sup>10</sup> UFC.mL<sup>-1</sup>. La corrélation DO<sub>600nm</sub> / UFC présentée en figure 11b permet de



déterminer le volume de culture nécessaire pour inoculer le réacteur à la concentration voulue lors des expériences d'inactivation présentées par la suite.

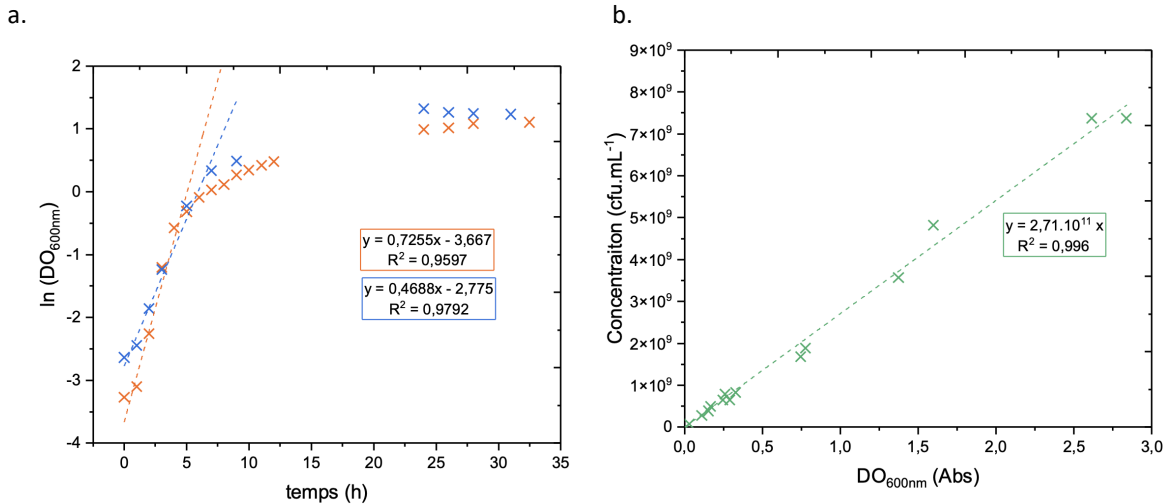


Figure 11 : caractérisation de la souche de *Vibrio harveyi* exprimant le plasmide pFD086 (GFP, TrimR) : (a) cinétique de croissance en milieu Zobell/triméthoprime pour la souche modifiée avec le plasmide (x) ou en milieu Zobell pour la souche sauvage (x), et (b) corrélation DO / UFC pour la souche modifiée avec le plasmide. Chaque point expérimental représente la valeur moyenne de 3 expérimentations indépendantes avec un coefficient de variation inférieur à 35%.

Un typage biochimique a également été réalisé à l'aide de galerie API 20E (Biomérieux). Ces résultats sont détaillés en annexe 5. Pour étudier au mieux l'inactivation par photocatalyse, il est important que les bactéries soient dans leur état le plus résistant, c'est pourquoi, pour la suite des expériences, l'inoculation des réacteurs a été réalisée à partir du volume adéquat d'une culture en début de phase stationnaire (culture âgée de 24h) (De Pasquale et al., 2020; Rincón and Pulgarin, 2004).

Les expériences de photocatalyse ont été réalisées en eau de mer naturelle (provenant de la réserve de Banyuls, pH 8 avec une salinité de 35 PSU), matrice dans laquelle se développe *Vibrio harveyi*. La croissance en eau de mer de la souche exprimant la GFP (*Th15\_O\_G11 GFP*) a également été vérifiée par dénombrement sur milieu gélosé (Marine Agar supplémenté en triméthoprime) et mesure de la  $DO_{600nm}$  (figure 12). Sur les deux premières heures suivant l'inoculation de l'eau de mer avec une concentration de  $10^5$  UFC  $\cdot mL^{-1}$ , une diminution de la concentration bactérienne allant jusqu'à 50% a été observée. Dans un milieu riche, une phase de latence est généralement observée en début de culture, comme le montre par exemple la cinétique de croissance de notre souche en milieu Zobell/triméthoprime (Figure 11a), où une phase de latence de 1 heure a été identifiée. La diminution de la concentration observée lors des premières heures suivant le passage en eau de mer est probablement causée par le stress occasionné par le changement de milieu, l'eau de mer ayant une composition en nutriments beaucoup plus limitée que le milieu Zobell. Deux heures après le passage en eau de mer, nous observons un changement accompagné par une vitesse de croissance  $\mu$  de  $0,2 h^{-1}$ , associé à un temps de génération de 3,5 h. Afin de déterminer l'importance de la croissance bactérienne au cours de la réaction d'inactivation, la vitesse de croissance a été comparée à la vitesse d'inactivation. Dans le chapitre 2 de notre manuscrit, après 2 h de traitement l'inactivation de 1,6 log de *Vibrio harveyi* a été observée soit une inactivation de 80% des bactéries initialement présentes. La vitesse d'inactivation des *Vibrio* par photocatalyse est

donc presque 2 fois supérieure au temps de génération de la souche en eau de mer. Pour déterminer s'il est nécessaire de prendre en compte la croissance bactérienne dans l'écriture des bilans de matière pour la modélisation de l'inactivation par photocatalyse, il faudra néanmoins également comparer la vitesse de croissance bactérienne aux vitesses d'inactivation pour les différentes conditions d'irradiation.

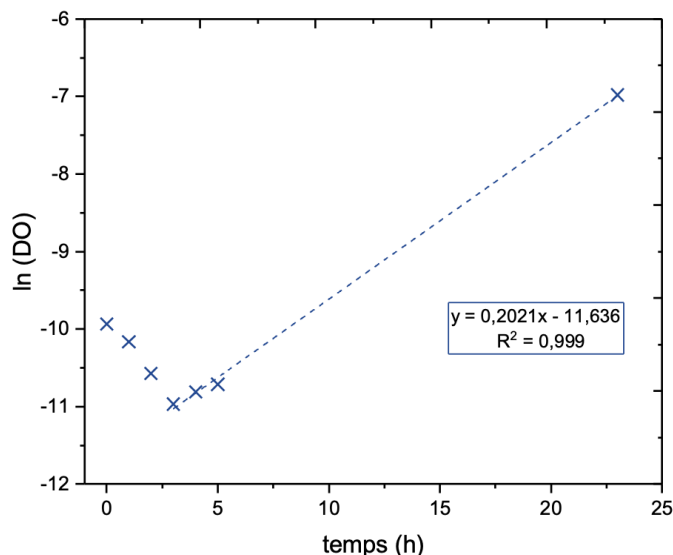


Figure 12 : cinétique de croissance en eau de mer naturelle pour la souche de *Vibrio harveyi* avec le plasmide pFD086 (GFP, TrimR). Chaque point expérimental représente la valeur moyenne de 3 expérimentations indépendantes avec un coefficient de variation inférieur à 35%.

## B. Inactivation de la souche de *Vibrio harveyi* par photocatalyse

Afin de comprendre et d'étudier la réaction de photocatalyse pour l'inactivation de *Vibrio harveyi* en eau de mer, trois phénomènes ont été préalablement étudiés afin d'identifier les processus mis en jeu lors de la photo-oxydation : (i) l'adhérence des bactéries à la surface du catalyseur, (ii) l'inactivation des bactéries par irradiation UV via le phénomène de photolyse, et (iii) l'inactivation des bactéries par photocatalyse.

### 1. Adhérence au dioxyde de titane

#### Le catalyseur

Les expérimentations d'inactivation bactérienne par photocatalyse hétérogène ont été conduites en utilisant du dioxyde de titane (TiO<sub>2</sub>) micrométrique commercial appelé aeroperl P20-25 (Evonik Industries). Afin de faciliter la séparation de l'aeroperl, un protocole d'élimination des particules de petite taille a été appliqué (figure 13a) (Dezani, 2021). Pour cela, 20 g d'aeroperl ont été soumis à dix décantations successives réalisées dans 2 L d'eau. Entre chaque décantation de 5 min, le surnageant a été retiré de manière à enlever les plus petites particules de catalyseur. L'aeroperl restant a été remis en suspension. Après cette opération, la suspension a été séchée 24 h à +100°C pour récupérer le catalyseur sous forme de poudre. Des études préalables ont montré une diminution notable de la quantité de particules fines (taille inférieure à 10 µm) tout en conservant une taille de particules centrée sur 20 µm (figure 13b) (Dezani, 2021). Dans la suite de cette thèse, le catalyseur appelé aeroperl se réfère au dioxyde de titane ainsi préparé.

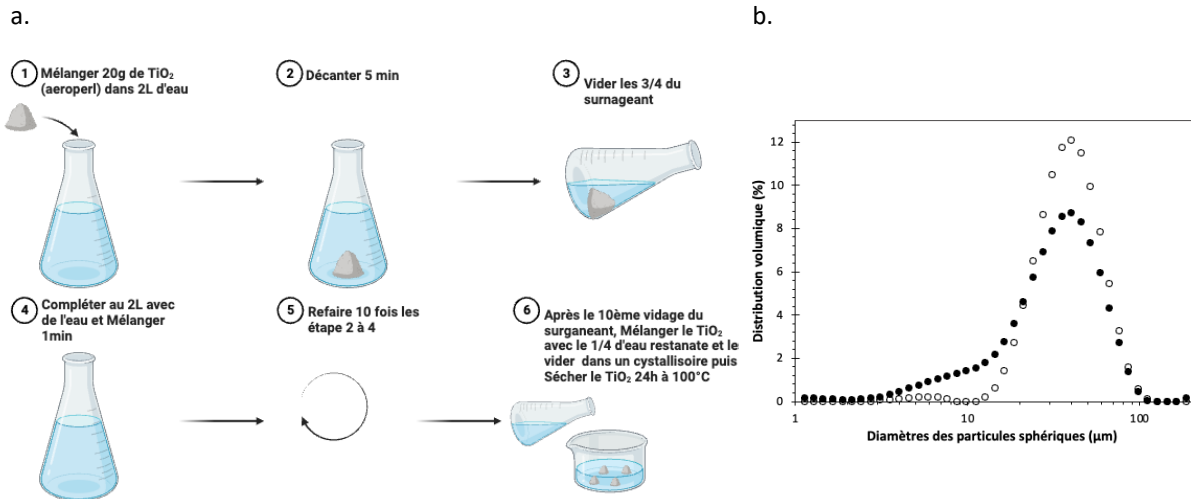


Figure 13 : (a) protocole de préparation de l'aeroperl utilisé pour les expériences de photocatalyse, et (b) distribution de taille en% volumique d'aeroperl (o) avant et (•) après le protocole de préparation (Dezani, 2021).

### Conditions expérimentales

L'inactivation bactérienne par photocatalyse repose sur la destruction / endommagement de la membrane des bactéries par les radicaux libres générés à la surface du catalyseur aussi appelés ROS. Compte tenu de la faible durée de vie des ROS, l'inactivation a lieu à la surface du catalyseur ou dans son environnement proche. L'inactivation est dépendante de l'interaction bactéries / particules de catalyseur ou adhérence. Le transfert des bactéries vers la surface du catalyseur joue donc un rôle majeur dans le processus d'inactivation. L'objectif de cette partie est de vérifier l'affinité de la bactérie *Vibrio harveyi* vis-à-vis du dioxyde de titane (TiO<sub>2</sub>) pour quantifier le phénomène d'adhérence. Pour cela, un protocole a été mis en place dans le but d'évaluer la quantité de bactéries étant transférées de la phase liquide vers la surface du catalyseur ou dans son environnement proche. Ce protocole permet notamment de contrôler l'impact de paramètres tels que le pH (European Environmental Agency, n.d.; Hájek et al., 2021; The European Space Agency, 2010) ou la salinité (National Oceanic and Atmospheric Administration, n.d.; Voutchkov, 2010) sur les phénomènes d'adhérence dans une gamme de variation environnementale.

### Protocole

Afin de limiter la croissance bactérienne, l'adhérence a été étudiée en eau de mer artificielle (eau de Lewis) pour différentes conditions de pH (6, 7 et 8) et salinité (20, 30 et 40 PSU) avec une concentration bactérienne de  $10^3$  UFC.mL<sup>-1</sup>. Pour cela, des béchers (préalablement stérilisés) avec 350 mL d'eau de Lewis contenant les *Vibrio* ainsi que 4 g.L<sup>-1</sup> de TiO<sub>2</sub> sous forme d'aeroperl ont été placés à l'obscurité et maintenus fermés pour éviter toute contamination microbienne. L'homogénéisation du catalyseur et des bactéries lors des 5 h d'expérience est garantie par une agitation constante. Pour différents temps de mise en contact, 2 mL ont été prélevés et les bactéries restantes en phase liquide ont été dénombrées. Brièvement, la phase solide correspondant au catalyseur a été éliminée par décantation 5 min à l'obscurité puis les bactéries présentes dans le surnageant ont été dénombrées sur milieu Marine agar (Figure 10). Le nombre de *Vibrio* ayant adhéré au catalyseur a été déterminé par comparaison entre la concentration dans le surnageant à l'instant t et à l'instant initial, avant la mise en contact avec le catalyseur.

Chacune des expériences a été réalisée en duplicats, et tous les dénombrements de bactéries ont été réalisés en triplicats. Pour chaque expérience, la concentration bactérienne

dans l'eau de mer a été vérifiée avant enrichissement en *Vibrio* par étalement de 200  $\mu\text{L}$  d'eau sur boîte Marine agar.

## Résultats

Les figures 14a et b représentent la variation de la concentration bactérienne dans la phase liquide en fonction du temps. Cela correspond aux bactéries n'ayant pas adhéré au catalyseur. Lorsque les bactéries interagissent avec le catalyseur via le phénomène d'adhérence, elles vont décanter en même temps que ce dernier ce qui se traduira par une diminution de la concentration bactérienne dans la phase liquide. Les expériences de photocatalyse présentées brièvement dans le chapitre précédent ont mis en évidence une inactivation de 80% des bactéries présentes, corroborant de fait l'hypothèse d'un transfert de matière satisfaisant. En effet, la réaction de photocatalyse n'ayant lieu qu'à la surface du catalyseur ou dans son environnement proche, même si aucune modification de la concentration bactérienne n'est observée avec une concentration initiale de  $10^3 \text{ UFC.mL}^{-1}$ , le transfert des bactéries vers le catalyseur a bien lieu.

Le pH joue un rôle clef dans l'adhérence bactérienne comme le montre la figure 14b. Plus le pH est basique (pH 8), plus l'adhérence est faible, ce qui se traduit par une diminution moins importante de la concentration dans la phase liquide. À l'inverse, plus le pH est acide (pH 6), plus l'adhérence est importante, avec une augmentation des bactéries adhérees de 10% comparé au pH basique. Même pour de faible variation de pH et en restant dans une gamme environnementalement réaliste, les changements de pH influencent l'adhérence *Vibrio* /  $\text{TiO}_2$ . Il est établi dans la littérature que la charge de surface du dioxyde de titane varie en fonction du pH donnant lieu à une charge de surface positive à pH acide, négative à pH basique, ou neutre à un pH égale au Point Zéro Charge PZC (pH $\sim$ 7 pour le  $\text{TiO}_2$ ) (Schwegmann et al., 2013). *Vibrio harveyi* étant une bactérie Gram négative avec une charge de surface globalement négative (Pajerski et al., 2019; Wilson et al., 2001), les changements de la charge de surface du catalyseur vont modifier l'affinité des bactéries pour celui-ci et donc limiter le transfert de matière. Lorsque le pH est inférieur au PZC, la charge de surface du dioxyde de titane est positive, ce qui pourrait donc favoriser l'adhérence des *Vibrio* sur la surface des particules de catalyseurs.

De même, la présence de sels semble aussi limiter l'adhérence des bactéries (Figure 14a). Même si la totalité de nos expérimentations ont été réalisées à un pH voisin de 8, pH donnant lieu aux plus faibles adhérences, l'effet de la salinité sur l'adhérence reste marqué. L'augmentation de la salinité du milieu semblerait impacter négativement l'adhérence bactérienne, ce qui se traduit par une diminution de la concentration bactérienne dans la phase liquide moins importante : 10% pour la salinité testée la plus importante (40 PSU). Ce phénomène pourrait être lié un recouvrement des sites du catalyseur par les sels dissous dans la matrice eau de mer. Il a en effet, déjà été montré que la présence de sels dissous pouvait notamment recouvrir des films de dioxyde de titane après plusieurs jours titane (García-Garay et al., 2020; Levchuk et al., 2019; Rubio et al., 2013a, 2013b).

En conclusion, même si l'impact de la salinité et du pH pourrait limiter l'adhérence des *Vibrio* dans les conditions de l'eau de mer naturelle utilisée, le transfert de matière reste néanmoins non limitant. Cela sous-entend donc que la quantité de *Vibrio* ayant adhéré à la surface du catalyseur ou dans son environnement proche, atteint rapidement un équilibre et que par conséquent, la variation de la concentration dans la phase liquide devient négligeable. Dans la suite des travaux présentés, l'inactivation a été étudiée en eau de mer naturelle (pH 8, salinité voisine de 35 PSU). Ces conditions permettent donc de considérer le terme de

transfert de matière comme non limitant dans l'écriture du bilan de matière, et de fait, de ne pas prendre en compte le phénomène d'adhérence dans le formalisme mathématique proposé.

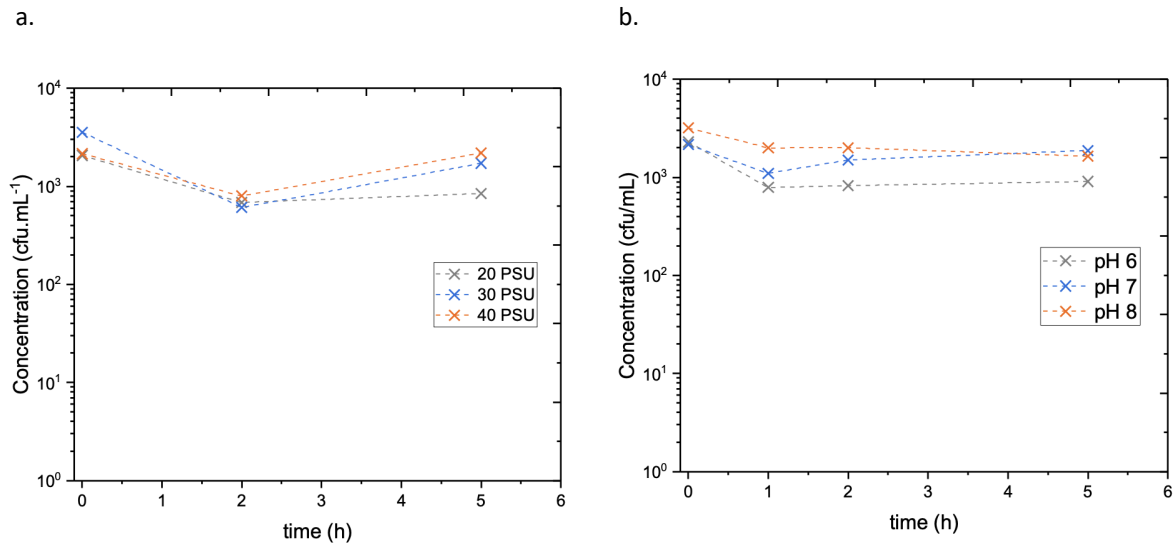


Figure 14 : adhérence de *Vibrio harveyi* (a) à différentes salinités (pour un pH de 8), et (b) à différents pH (pour une salinité de 35 PSU). Les expérimentations d'adhérence ont duré 5 h et ont été réalisées en eau de Lewis agitée et placée à l'abri de toutes sources d'UV. Chaque point expérimental représente la valeur moyenne de 3 expérimentations indépendantes avec un coefficient de variation inférieur à 35%.

## 2. Sensibilité de la souche aux UV : photolyse

Dans le but d'utiliser la souche de *Vibrio* exprimant la GFP (*Th15\_O\_G11 GFP*) comme bactérie modèle pour la caractérisation de la photocatalyse en eau de mer, il est indispensable de connaître et quantifier sa sensibilité aux UV. En effet, pour décrire correctement l'inactivation, il faut être capable de distinguer la part de l'inactivation des bactéries provoquée par l'irradiation UV de celle provoquée par la photocatalyse à proprement parler. Pour y parvenir, l'inactivation bactérienne par photolyse (irradiation UVA) a été étudiée dans le but de quantifier son impact sur l'inactivation de *Vibrio* lors des expériences de photocatalyse.

### Présentation du pilote utilisé

#### Le pilote

Le réacteur est composé de deux parties. Le photo-réacteur d'un volume de 300 mL correspondant à la zone irradiée par le panneau de LED, et une boucle de recirculation de 50 mL permettant de mélanger la suspension afin de garantir le fonctionnement dit parfaitement agité du réacteur (Dezani, 2021; Kacem, 2015). Le photo-réacteur, siège de la réaction de photocatalyse, est constitué d'un réacteur plan agité et positionné dans une enceinte opaque à la verticale, faisant face au panneau de LED. Seule la face irradiée est en PMMA (poly-méthacrylate de méthyle, d'une épaisseur de 7 mm) permettant de passage de la lumière, le reste du photo-réacteur est constitué d'inco. La face irradiée mesure 15 cm de hauteur sur 10 cm de large, soit une surface irradiée de 0.015 m<sup>2</sup> (figure 15c.). Avant toute utilisation, le réacteur est stérilisé à la soude (1 M pendant 1 h). Ce nettoyage s'accompagne de 3 rinçages successifs de 15-20 min à l'eau milliQ. Le pilote utilisé permet un fonctionnement en mode batch ou continu (Figure 15a et b). La prise d'échantillon est réalisée au niveau de la boucle de recirculation pour un fonctionnement batch ou au niveau du soutirage pour un fonctionnement continu. Le dioxyde de titane est éliminé par décantation

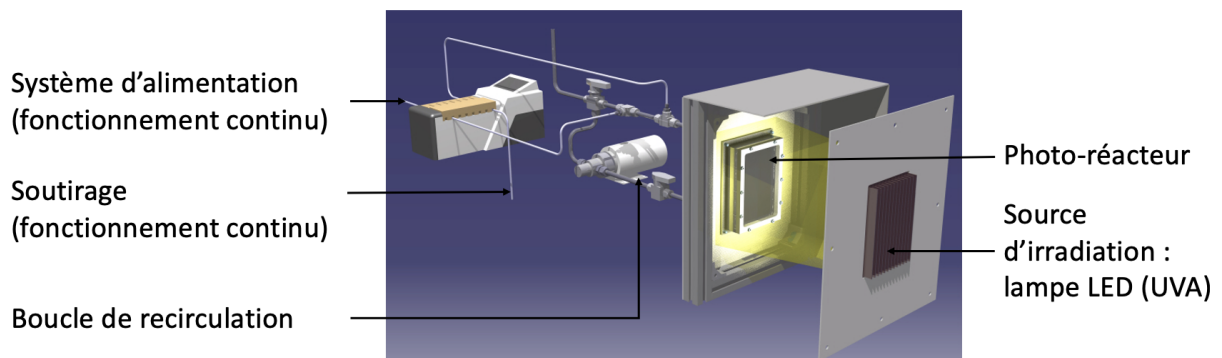


à l'obscurité après la prise d'essai. Les volumes prélevés étant de l'ordre de 3 mL, la variation de volume entre le début et la fin de l'expérience reste inférieure à 15%, ce qui reste tout à fait acceptable pour un tel système.

a.



b.



c.

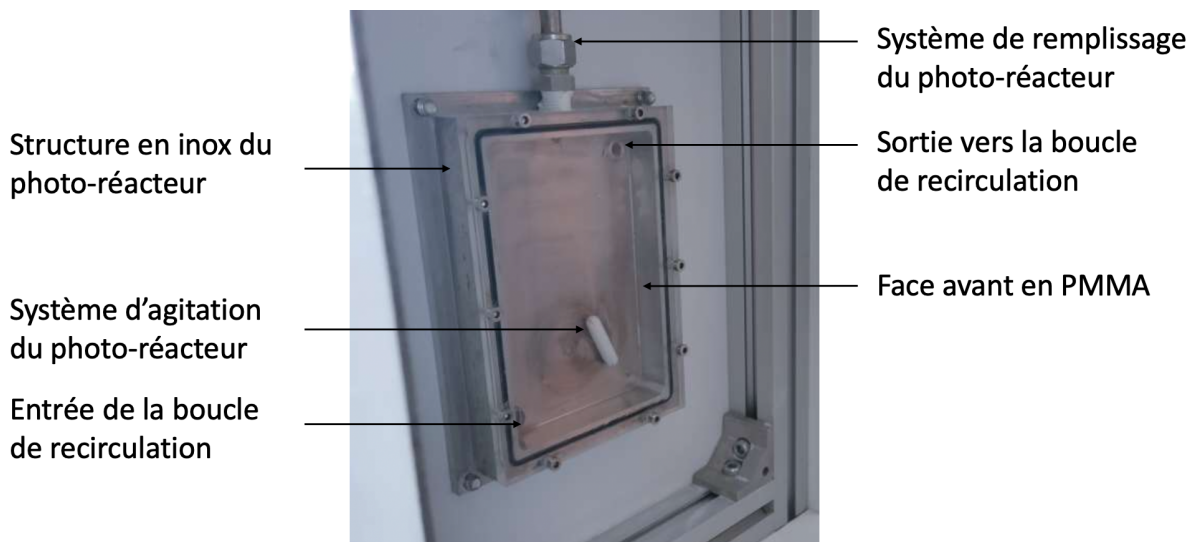


Figure 15: présentation du réacteur utilisé (a) photo du montage expérimental, (b) schéma du réacteur, le circuit en orange correspond à un fonctionnement continu du réacteur, et (c) photo de la face avant du photo-réacteur

### La source de lumière

La source d'irradiation est constituée d'un panneau de 280 diodes électroluminescentes (LED) réparties en 10 rangées. Ce panneau émet des UVA avec une longueur d'onde centrée sur 375 nm (figure 16a). Le spectre d'émission a été défini dans de précédents travaux (Dezani, 2021). La densité de flux émise par le panneau de LED est pilotée via une interface PC (logiciel easy stand alone) et peut être modulée sur une plage de 0 à 110 W.m<sup>-2</sup>. La courbe d'étalonnage présentée en figure 16b permet de déterminer les paramètres à entrer sur le logiciel de contrôle afin d'appliquer la densité de flux voulu à la surface du photo-réacteur (Dezani, 2021).

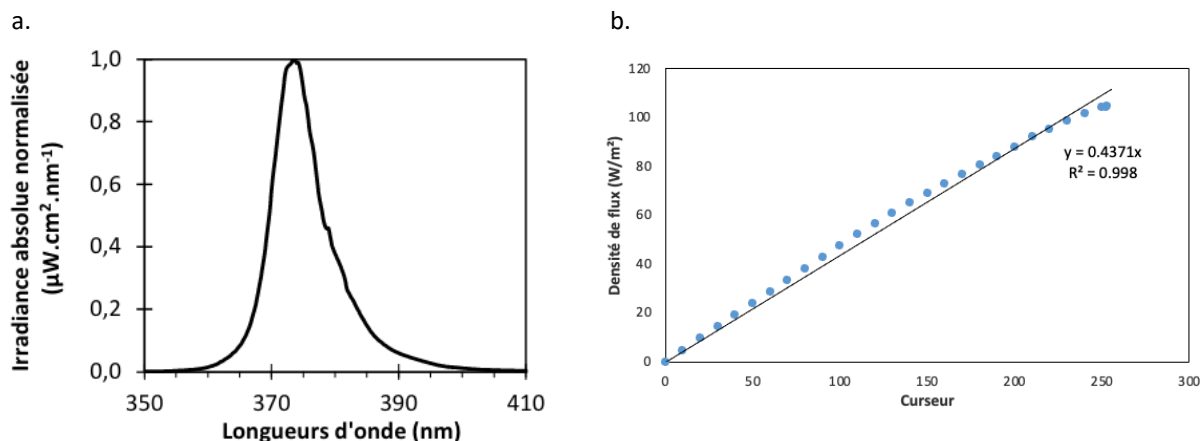


Figure 16 : caractéristiques du panneau de LED utilisé (Dezani, 2021), (a) spectre d'émission normalisé par rapport à la densité de flux incidente, et (b) courbe d'étalonnage obtenue pour une mesure effectuée avec un capteur UV situé au centre de la face incidente du photo-réacteur situé à 14 cm du panneau de LED

### Conditions expérimentales

Afin de vérifier la sensibilité de la bactérie *Vibrio harveyi* aux UVA, des expériences de photolyse ont été réalisées. Elles ont été réalisées dans de l'eau de mer naturelle provenant de l'observatoire océanologique de Banyuls-sur-Mer et présentant une salinité ajustée à 35 PSU et un pH de 8. La composition analytique de l'eau de la baie de Banyuls est suivie par la station de l'observatoire SOLA (NW Mediterranean Sea, France) dans le cadre du programme Service d'Observation en Milieu Littoral (SOLMIT) (OASU, 2018). L'eau a été stérilisée par autoclavage après une filtration préalable à 1  $\mu\text{m}$  avant d'être enrichie en *Vibrio harveyi* en phase stationnaire afin d'atteindre une concentration voisine de  $10^5$  UFC.mL<sup>-1</sup>. L'eau a ensuite été exposée à une irradiation UV constante de 45 W.m<sup>-2</sup>. Durant toute l'exposition, l'eau a été constamment agitée à l'aide d'un barreau aimanté pour garantir une homogénéité continue du réacteur. L'évolution de la concentration bactérienne a été suivie périodiquement via un dénombrement des bactéries cultivables. L'expression de la GFP par la souche de *Vibrio harveyi* modifiée peut affecter la sensibilité de la bactérie au rayonnement UV, c'est pourquoi l'inactivation par photolyse de la souche de *Vibrio harveyi* exprimant la GFP a été comparée à celle de la souche sauvage (appelé Wild type, WT).

Chacune des expérimentations a été réalisée en duplicats, puis, tous les dénombrements de bactéries ont été réalisés en triplicats. Pour chaque expérience, la concentration bactérienne dans l'eau de mer a été vérifiée avant enrichissement en *Vibrio* par étalement de 200  $\mu\text{L}$  d'eau sur milieu Marine agar.

## Résultats

La figure 17 montre une cinétique d'inactivation photolytique inhabituelle. En effet, la remontée observée de concentration bactérienne entre 30 min et 1h30 d'exposition aux UV n'était pas attendue. La diminution importante dans les premières 30 min d'exposition pourrait s'expliquer par une perte de cultivabilité d'une partie de la population en réponse au stress. En effet, le même phénomène a été observé lors de l'étude de la cinétique de croissance en eau de mer (Figure 12) avec une diminution de la concentration bactérienne durant les premières heures après l'inoculation de l'eau de mer. La méthode de suivi utilisée pour dénombrer les bactéries (culture sur milieu gélosé) ne permet de détecter que les bactéries cultivables. En réponse aux stress comme par exemple le passage d'un milieu riche en nutriment vers un milieu pauvre en nutriments, nous faisons l'hypothèse que l'exposition aux UV pourrait induire une perte de cultivabilité sur les premières heures. Une partie des bactéries seraient donc dans un état viable non cultivable et pourraient par la suite, retrouver leur faculté à croître sur milieux gélosés. Pour vérifier cette hypothèse, il faudrait refaire les expériences de photolyse en initiant l'irradiation seulement plusieurs heures après l'inoculation de l'eau de mer. Dans ces conditions opératoires, si la phase de décroissance/reprise de croissance observée sur la première partie de la courbe disparaît, cela pourrait très certainement signifier qu'il y a bien un phénomène d'acclimatation des microorganismes au cours du traitement. Cette cinétique n'étant pas caractéristique et représentative de ce qui est classiquement observé pour des bactéries, nous avons fait le choix de ne considérer que la deuxième partie de la courbe comme correspondant à la cinétique d'inactivation par photolyse (de 1h30 à 2h20).

Au cours de la dernière heure de traitement, la concentration en *Vibrio harveyi* ne varie pas pour la souche exprimant la GFP pour atteindre une inactivation de 10% des bactéries à la fin de l'expérience. En revanche, la photolyse est particulièrement efficace pour la souche sauvage avec une inactivation de 40% des bactéries en seulement 1h à la fin de l'expérience. Ces observations sont en accord avec l'acquisition d'une meilleure résistance aux UV de la souche lors de la modification avec le plasmide et l'expression de la GFP.

Même s'il s'avère compliqué de comparer les cinétiques d'inactivation entre différentes études, car les conditions opératoires peuvent varier selon les études (sources d'UV, géométrie du réacteur, souche bactérienne différentes...), d'autres auteurs s'attardent malgré tout sur l'inactivation par photolyse de divers isolats de *Vibrios* sous UVA (Levchuk et al., 2019). Dans cette étude, l'irradiation pendant 90 min à  $48 \text{ W.m}^{-2}$  correspondant à une dose d'UV de  $25\,920 \text{ mJ.cm}^{-2}$  d'un réacteur tubulaire de 100 mL permet d'inactiver environ 30% des *Vibrio spp.* présents (*Vibrio owensii*, *Vibrio alfacensis* et *Vibrio harveyi*). Les résultats que nous avons obtenus avec la souche sauvage de *Vibrio harveyi* semblent donc cohérents avec ceux obtenus par Levchuk et al. (2019).

La comparaison de la cinétique d'inactivation par les UVA pour la souche exprimant la GFP peut être comparée avec celle obtenue dans le chapitre précédent avec une source UV légèrement différente mais des doses d'UV sensiblement identiques. En effet, dans ce chapitre, les UV sont générés grâce à des LEDs dont la gamme spectrale d'émission est plus faible que pour la lampe UV utilisé dans le chapitre 2, avec un spectre d'émission allant de 350 à 400 nm (figure 16a) *versus* de 300 nm à 400 nm. La gamme d'UV reçu par les bactéries étant plus importante dans le chapitre 2, l'inactivation est 10% meilleure mais reste également faible. L'ordre de grandeur est identique pour les différentes expériences de photolyse de la souche exprimant la GFP avec une inactivation de l'ordre de 10 à 20% après quelques heures d'irradiation aux UVA.

En conclusion, l'acquisition du plasmide permettant l'expression de la GFP chez la souche de *Vibrio harveyi* confère également une meilleure résistance aux UVA. L'expression de la GFP semblerait donc favoriser mécanismes de détoxification des ROS, rendant l'inactivation par photolyse moins efficace.

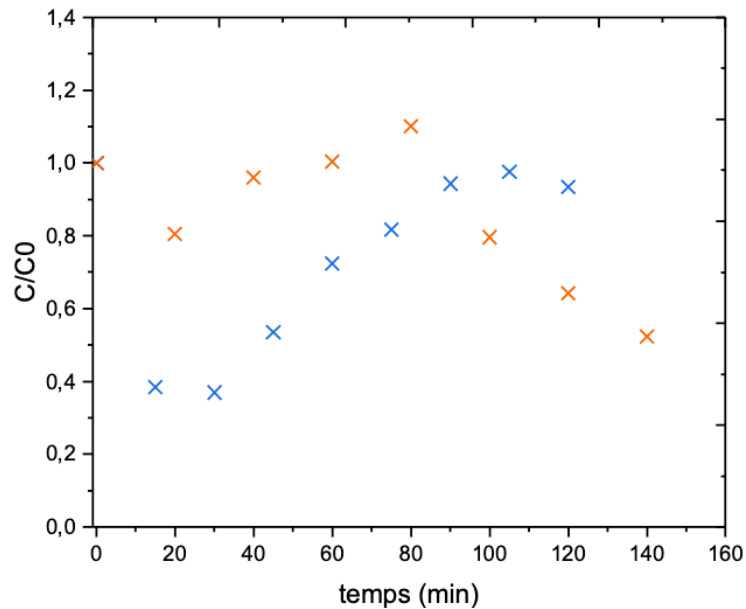


Figure 17 : cinétique d'inactivation par photolyse (irradiation UVA à  $45 \text{ W.m}^{-2}$ ) en eau de mer naturelle pour la souche de *Vibrio harveyi* avec le plasmide pFD086 (GFP, TrimR) (x), ou sauvage (x). Chaque point expérimental représente la valeur moyenne de 3 expérimentations indépendantes avec un coefficient de variation inférieur à 35%.

### 3. Inactivation par photocatalyse hétérogène, résultats préliminaires en système fermé

Afin de tenter de comprendre les mécanismes de l'inactivation par photocatalyse, l'influence de la densité de flux appliqué ainsi que de la concentration en *Vibrio harveyi* (souche exprime la GFP, *Th15\_O\_G11 GFP*) a été étudiée en réacteur fermé. La comparaison des cinétiques d'inactivation par photocatalyse aux différentes densités de flux a pour but de mettre en évidence l'importance de ce paramètre dans le processus global de photocatalyse. Les expériences ont été réalisées avec des irradiations constantes comprises entre 10 et  $45 \text{ W.m}^{-2}$  pour des concentrations bactériennes entre  $10^4$  et  $10^5 \text{ UFC.mL}^{-1}$  (tableau 3). Chacune des expériences a été réalisée en triplicats à l'aide du pilote déjà utilisé dans le cadre de l'étude de la photolyse avec  $4 \text{ g.L}^{-1}$  de  $\text{TiO}_2$  aeroperl dans de l'eau de mer naturelle, préalablement stérilisée puis enrichie en *Vibrio*. Tous les dénombrements de bactéries ont également été réalisés en triplicat (dépôt et comptage en triplicat pour chaque expérience). Pour chaque expérience, la concentration bactérienne dans l'eau de mer a été vérifiée avant enrichissement en *Vibrio* par étalement de  $200 \mu\text{L}$  d'eau sur boîte de Marine agar.

Tableau 3 : conditions expérimentales de photocatalyse en réacteur fermé

	Concentration en <i>Vibrio harveyi</i> (UFC.mL <sup>-1</sup> )	Concentration en TiO <sub>2</sub> aeroperl (g.L <sup>-1</sup> )	Densité de flux appliquée (W.m <sup>-2</sup> )
Condition N°1	10 <sup>4</sup>	4	10
Condition N°2	10 <sup>4</sup>		20
Condition N°3	10 <sup>4</sup>		35
Condition N°4	10 <sup>5</sup>		45
Condition N°5	10 <sup>4</sup>		

Comme présenté dans la figure 18a, la variation de la concentration présente un profil en deux étapes. Un plateau caractéristique suivi par une phase de décroissance. La densité de flux appliquée influence aussi bien la longueur du plateau initial que la vitesse d'inactivation.

La longueur du plateau diminue lorsque la densité de flux augmente. Ce plateau initial est caractéristique des bactéries qui ont été altérées mais pas inactivées. En effet, il faut plusieurs attaques successives de ROS pour rendre une bactérie non cultivable et donc non détectable lors des dénombrements sur boîtes. Plus la densité de flux est importante, plus la quantité de ROS générés par le catalyseur est importante. Par conséquent, la perméabilisation des membranes bactériennes est d'autant plus rapide que la densité de flux est forte, ce qui se traduit par un temps de plateau plus court (Benabbou et al., 2007; Marugán et al., 2008).

La vitesse d'inactivation est également fortement dépendante de la quantité de photons reçus. Une densité de flux plus forte se traduit par une augmentation de la pente sur la cinétique d'inactivation (figure 18a). En effet, une quantité de plus de photons est reçue par le catalyseur ce qui augmente la quantité de ROS générés et donc accélère l'inactivation des bactéries.

Comme énoncé précédemment, la quantité de bactéries présentes peut également avoir des effets sur la cinétique d'inactivation. La figure 18b, qui présente les cinétiques d'inactivation pour deux concentrations bactériennes, met en évidence un changement de la vitesse d'inactivation une fois le plateau initial dépassé. En effet, la quantité de bactéries présentes n'influence pas la durée du plateau initial (figure 18b) mais joue en revanche sur le transfert de matière et donc sur la vitesse d'inactivation (Kacem et al., 2015).

En conclusion, ces premiers essais ont permis de souligner l'importance de la densité de flux reçu par le système dans le phénomène d'inactivation chez les *Vibrio*. En outre, nos résultats montrent également l'impact de la concentration initiale en bactérie sur l'inactivation microbienne et notamment au travers du transfert de matière.



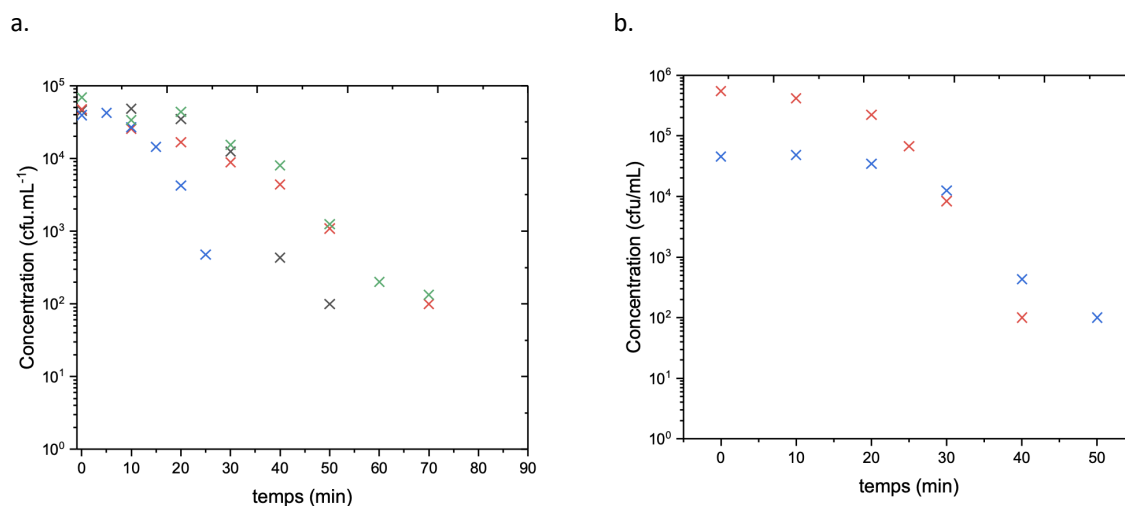


Figure 18 : photocatalyse de *Vibrio harveyi* (a) à différentes densités de flux (10 W.m<sup>-2</sup> (x), 20 W.m<sup>-2</sup> (x), 35 W.m<sup>-2</sup> (x), et 45 W.m<sup>-2</sup> (x)), et (b) différente concentration bactérienne (à 35 W.m<sup>-2</sup>). Les expériences de photocatalyse ont été réalisées en eau de mer naturelle (pH 8 et salinité de 35 PSU) avec une concentration de 4 g.L<sup>-1</sup> de dioxyde de titane aeroperl. Chaque point expérimental représente la valeur moyenne de 3 expérimentations indépendantes avec un coefficient de variation inférieur à 35%.

### III. Prédiction de l'efficacité du traitement photocatalytique pour l'aquaculture

Comme cela a déjà été présenté en introduction de ce chapitre, nous avons pour objectif de décrire, modéliser puis simuler l'inactivation de pathogènes bactériens d'huîtres au sein d'une matrice eau de mer par photocatalyse hétérogène (UV/TiO<sub>2</sub>). La principale finalité de notre travail est de pouvoir prédire les capacités d'abattement du procédé de traitement pour des applications en installations aquacoles. Pour pouvoir appliquer un procédé de désinfection, celui-ci doit pouvoir garantir une concentration de pathogènes en entrée des bassins de culture (ou en sortie du traitement) suffisamment faible pour limiter le développement de mortalités dans les installations. Parmi les pathogènes d'huîtres, la bactérie *Vibrio harveyi* est ici utilisée pour l'étude du procédé de photocatalyse comme bactérie modèle. C'est un pathogène connu pour induire de fortes mortalités chez les huîtres juvéniles notamment lors de la septicémie induite dans le *Pacific Oyster Mortality Syndrom* (POMS) comme cela a été plus largement décrit dans les chapitres 1 et 2 du présent manuscrit (De Lorgeril et al., 2018; King et al., 2019b; Martenot, 2013; Oyanedel et al., 2023; Petton et al., 2021). Comme nous l'avons déjà souligné, dans le cadre des expériences de photocatalyse en système fermé, la vitesse d'inactivation bactérienne est dépendante de la quantité de photons reçus ainsi que de la quantité de bactéries présentes. Il est donc important d'établir des équations fiables et claires pour décrire et prédire la désinfection. De plus, la quantité de photons incidents est inhérente au lieu où le procédé souhaite être utilisé ainsi que de la période de l'année c'est pourquoi il est également intéressant d'analyser l'inactivation théorique en fonction de la localité et des conditions journalières variables selon les passages nuageux, la saisonnalité ainsi que la durée des journées.

Cette étude cherche à prédire l'inactivation de *Vibrio harveyi* par photocatalyse en eau de mer pour simuler autant que possible, des conditions opératoires les plus proches de conditions environnementales au sein d'unités de productions aquacoles. Elle souligne également l'importance de la compréhension et la modulation des conditions opératoires au cours de la journée pour répondre aux contraintes de qualité de l'eau. Les phénomènes

d'adhérence, de photolyse et de croissance bactérienne étant faible au regard de la vitesse de désinfection par photocatalyse, nous assumons que le bilan matière sur le photo-réacteur peut se réduire à une loi cinétique simple ne faisant intervenir que la limitation par le transfert des bactéries et par la quantité de photons reçu.

L'ensemble du travail réalisé est présenté dans l'article 3 : *“Trials and in silico simulations to predict daily photo-oxidative capacity under solar conditions: A case study on the inactivation of oyster pathogenic bacteria, Vibrio harveyi”*. Cet article est une version finale pas encore soumise. L'ensemble des fichiers et du code Matlab utilisé pour la prédiction et les simulations est disponible en annexe 6. Le Supplementary material de cet article n'a pas été mis dans ce rapport de thèse puisqu'il s'agit de résultats exposés précédemment dans ce chapitre.

Article 3 : *“Trials and in silico simulations to predict daily photo-oxidative capacity under solar conditions: A case study on the inactivation of oyster pathogenic bacteria, *Vibrio harveyi*.”*

1 Trials and *in silico* simulations to predict daily photo-oxidative  
2 capacity under solar conditions: A case study on the  
3 inactivation of oyster pathogenic bacteria, *Vibrio harveyi*

4

5 Cécile Blanchon<sup>1,2,3,4</sup>, Eve Toulza<sup>1</sup>, Christophe Calvayrac<sup>2,3</sup>, Stanislaw Eichendorff<sup>4</sup>, Gael  
6 Plantard<sup>4</sup>

7 <sup>1</sup> IHPE, Université de Montpellier, CNRS, Ifremer, Université de Perpignan Via Domitia,  
8 Perpignan, France

9 <sup>2</sup> Biocapteurs Analyses Environnement, Université de Perpignan Via Domitia, 66000  
10 Perpignan, France

11 <sup>3</sup> Laboratoire de Biodiversité et Biotechnologies Microbiennes (LBBM), Sorbonne Universités,  
12 CNRS, 66650 Banyuls sur Mer, France

13 <sup>4</sup> PROMES-CNRS UPR 8521, Process Material and Solar Energy, Rambla de la  
14 Thermodynamique, 66100 Perpignan, France

15

16 **Abstract**

17 In today's world of increasing seafood demand, aquaculture has become a food security  
18 issue. Farms often face high population densities of fish or mollusks, leading to frequent  
19 outbreaks of infectious diseases. In an effort to mitigate mortality events, antibiotics and

20 genetic selection have been widely used. However, the emergence of new pathogen strains  
21 and antibiotic-resistant bacteria has necessitated the development of new disinfection  
22 processes for influent and effluent bio-securing in aquaculture production. Currently, these  
23 installations use mostly filtration and UVC treatment. Advanced Oxidation Processes (AOPs)  
24 offer a promising and sustainable solution to eliminate both biotic and abiotic contaminants  
25 in seawater effluents. While abiotic decontamination via photocatalysis has been widely  
26 studied, biotic disinfection remains largely overlooked, particularly in seawater.  
27 Heterogeneous photocatalysis has demonstrated its potential for effectively removing  
28 microbial and chemical contaminants (such as toxins) from seawater. The primary goal of this  
29 work is to determine the capacity of a solar photo-oxidation reactor scaled up to dedicated  
30 aquaculture water treatment plants. In this study, we defined and tested an inactivation  
31 kinetic law capable of representing the bacterial concentration changes resulting from  
32 variations in applied conditions for an oyster pathogen, *Vibrio harveyi*. A kinetic model with  
33 orders of 1.23 concerning the *V.harveyi* target and 0.23 regarding flux density was chosen  
34 from among the different models considered in the literature. In a second step, the photo-  
35 oxidative capacities were simulated under various photo-reactor operating conditions. Solar  
36 irradiation data from three French aquaculture sites, accounting for meteorological effects  
37 and variations in the duration and irradiation of sunshine representative of different days and  
38 seasons, were applied. Based on these simulations, the prediction of solar treatment  
39 capacities was proposed for scaling up a plant capable of inactivating oyster pathogens in  
40 seawater sourced from land-based aquaculture farms. To address variations in flux density  
41 resulting from sunshine discontinuities, such as cloudy periods and the daily cycles, the flow  
42 rate was modulated in accordance with flux density levels, ensuring a consistent  
43 concentration at the reactor outlet. The results of this study show promise in offering technical

44 solutions for UV/TiO<sub>2</sub> disinfection of *V.harveyi*-contaminated seawater in aquaculture  
45 settings.

46 **Keywords:** *Vibrio harveyi*, solar photocatalysis, oyster pathogens, inactivation, simulation.

47

## 48 1. Introduction

49 Ostreiculture production represents a significant part of aquaculture, with a strong  
50 increase in demand. Since several years, this production has been subject to heavy losses due  
51 to recurrent mortality episodes [1–6]. Most oyster mortalities are caused by bacterial and/or  
52 viral infections leading to the death of the animals. These pathogen infections can affect  
53 animals throughout their lives, sometimes decimating entire farm productions. Several  
54 production stages are carried out in closed land-based basins with controlled water quality.  
55 Among the stages carried out in onshore facilities are larval development and growth, which  
56 take place in hatcheries. Similarly, juvenile and spat oysters can be grown on land in facilities  
57 known as nurseries. In these facilities, the oysters/larvae are placed in closed batch tanks or  
58 continuously fed with seawater disinfected by filtration and UVC treatment [7–9].

59 Currently, few technologies are being developed for the biosecurity of aquaculture ponds,  
60 whether in freshwater or seawater. However, a number of systems for filtering water  
61 (membrane process, carbon column) have been developed on an industrial scale [10–13].  
62 However, these technologies are costly both in terms of construction, operation and energy  
63 demand [14]. To address these issues, advanced oxidation processes, and in particular  
64 photochemical processes, appear to be a promising alternative [15]. These processes, based  
65 on the use of catalysts in soluble (photosensitive reagents) or solid (photocatalysts) form,  
66 enable radiation to be photo-converted into reactive chemical species [16–18]. It consists in a



67 photo-excitation process in which the catalyst absorbs radiation to release charges (electron-  
68 hole pairs), which initiate oxidation-reduction reactions. These reactions lead to the  
69 production of chemically unstable radical species capable of breaking the carbon-carbon  
70 bonds of organic compounds. This photo-conversion process is widely studied in the literature  
71 for the detoxification of abiotic contaminants (pharmaceuticals, biocides) [19–21] but also for  
72 water disinfection [22–25]. The vast majority of studies have been carried out on effluents and  
73 wastewater but work on disinfection in seawater is emerging.

74 In this context, the heterogeneous photocatalysis process is an alternative offering the  
75 possibility of exploiting the solar resource [15,26]. Like other solar processes, the performance  
76 of this technology is closely dependent on the availability of the resource [19,26,27]. It is  
77 characterized by discontinuities on several scales, linked to daily (day/night alternation) and  
78 seasonal cycles, which will define the amount of energy available [21,28]. The energy available  
79 therefore depends on the duration of daily sunshine and the level of radiation received  
80 [29,30]. Weather conditions (strong sunshine, cloudy periods) and location (latitude, annual  
81 sunshine) should also be taken into account when assessing photo-conversion capacity  
82 [19,21,31].

83 In order to design solar installations capable of ensuring the biosecurity of aquaculture  
84 waters, the performance of oxidative photoreactors must be established taking into account  
85 the specific characteristics of the solar resource and the targeted pathogen. To do this, two  
86 key points need to be considered in order to establish the capacities of the photoreactor  
87 operating in continuous mode under dynamic irradiation conditions. The first is to define a  
88 kinetic law representative of the photodegradation process of the bacterial target. In the  
89 literature, numerous laws have been proposed to describe the degradation of abiotic  
90 contaminants [19,32–34], which are mainly empirical laws or formalisms that take into

91 account degradation phenomena and the mass transfer of targets to the surface of catalysts.  
92 Concerning disinfection, the number of laws is more limited. Since the inactivation process is  
93 not immediate, several successive radical attacks are required to damage the membrane of  
94 bacterial targets [35–37]. Once the membrane is degraded, bacterial inactivation becomes  
95 effective, resulting in a sharp drop in the number of viable bacteria. To describe inactivation  
96 profiles in most conditions, empirical models based on a power law according to  
97 concentration, involving parameters of no physical or chemical significance, have been  
98 developed [23,37–44]. Langmuir-Hinshelwood type models, directly inspired by the laws used  
99 for the mineralization of organic pollutants, have also been proposed. These models include  
100 an initial lag time to account for the multiple radical attacks required to initiate inactivation,  
101 but do not consider the effect of irradiation level. More recently, authors have proposed to  
102 represent the inactivation rate as a function of two key variables: bacterial concentration and  
103 flux density [22–24,45–48].

104 A description of the functioning of a photoreactor operating in continuous mode requires  
105 its configuration to be taken into account, in terms of geometry (tubular, planar) [11,27,49],  
106 operating mode (batch or continuous) [20,21], and operating conditions applied, *i.e.* the  
107 concentration level, flux density and feed rate [50,51]. A process engineering approach, the  
108 mass balance, including a feed term and a kinetic term, is used to formalize the capacity of the  
109 photoreactor under dynamic irradiation conditions [11,21,33,52]. It is thus possible to predict  
110 the daily capacity of the photoreactor under irradiation conditions representative of different  
111 sunshine conditions.

112

113 The aim of this paper was to represent the capacities of the photoreactor operating under  
114 simulated solar irradiation conditions with a view to being able to predict and scale up

115 saltwater treatment facilities intended for aquaculture. A formalism based on kinetic laws  
116 from the literature is proposed in order to select a kinetic law representative of the *V. harveyi*  
117 inactivation process and to identify the kinetic parameters. Based on the established law, the  
118 capacities of the photoreactor operating under different irradiation conditions are  
119 determined to define the importance of sunshine conditions (period of year, day length,  
120 meteorological conditions) at three oyster farming sites. Based on the daily capacities  
121 obtained, this study proposes, on the one hand, a solution for managing discontinuities in the  
122 solar resource on different scales (day/night cycle and cloudy periods) and, on the other hand,  
123 the scaling up of installations dedicated to the biosecurity of aquaculture water.

124

## 125 2. Materials & Methods

### 126 2.1. Photoreactor

127 Photo-oxidation experiments were conducted (Fig. 1) using TiO<sub>2</sub> microparticles from  
128 commercial TiO<sub>2</sub> powder VP Aeroperl with an average diameter of 41 µm. TiO<sub>2</sub> smallest  
129 particles were removed by multiple decantation to improve the downstream separation to  
130 have a standard deviation of the size distribution of 17 µm [28]. The catalyst concentration  
131 has been optimized in previous work in order to capture all the incident radiation. The optimal  
132 concentration of 4 g.L<sup>-1</sup> of TiO<sub>2</sub> found for freshwater decontamination using this photoreactor  
133 was applied for disinfecting seawater [51].

134 The pilot operated in batch mode. It is composed of three parts as is reported in Fig. 1  
135 [22,52]. The photoreactor is composed of an agitated irradiated volume of 0.3 L  
136 (0.15 m x 0.1 m x 0.02 m). The irradiated face was in a 95% UV-transparent polymethyl  
137 methacrylate (PMMA). The UV was emitted by light-emitting diodes (LEDs) which delivered

138 homogeneous illumination onto the photoreactor's incident face and with an emission  
139 spectrum centered around 375 nm. The flux density applied was between a range of 0 to  
140 45 W.m<sup>-2</sup> and measured with a UV solar sensor (UV Radiation, apogee instruments) at the  
141 center of the PMMA incident photoreactor face. The last part of the pilot is the recirculating  
142 loop of 50 mL to assure a perfectly homogenized reactor. The fluid flow is driven by a  
143 centrifugal pump (Cole Parmer).

144 Before each disinfection experiment, the photoreactor was sterilized using 0.1 M of  
145 NaOH followed by milliQ water rinsing.

146 All the photo-oxidative experiments were conducted in triplicate.

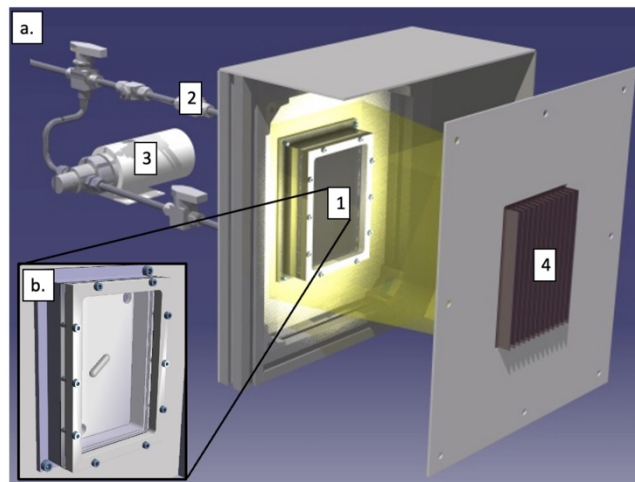


Figure 1: Presentation of the apparatus: pilot (a) composed of the photoreactor (1), the recirculating loop (2) with the centrifugal pump (3) and the UV LED panel (4). The figure (b) shows a closed view of the photoreactor.

147

### 148 1.1. Biological material

149 An oyster pathogen, *Vibrio harveyi* Th15\_O\_G11 modified with a stable Green  
150 Fluorescent Protein (GFP) plasmid with trimethoprim resistance pFD086 (GFP, TrimR) [4] was  
151 used to study the disinfection process *V. harveyi* cells (Th15\_O\_G11 GFP) were grown under  
152 sterile conditions in 200 mL of Zobell medium (4 g.L<sup>-1</sup> bactopeptone, 1 g.L<sup>-1</sup> yeast extract in

153 sterile seawater, pH 7.4) with  $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  of trimethoprim (T7883, Sigma Aldrich, France) at  
154  $20^\circ\text{C}$  until the stationary phase was reached. The bacterial growth was monitored by optical  
155 density at 600 nm (UV-1800, Shimadzu). Cultures in the stationary phase were appropriately  
156 diluted in sterile natural seawater (Banyuls, France, pH 8 and salinity of 35 PSU) to reach the  
157 desired concentration at the beginning of the photo-oxidative treatments. Before inoculation,  
158 a part of the suspended particles was eliminated by filtration of the seawater at  $1 \mu\text{m}$  and  
159 followed by sterilization by autoclaving.

160 Disinfection was monitored by the enumeration of cultivable bacteria on Petri dishes.  
161 The culture medium was Marine Agar (Marine Broth medium with  $15 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  of agar, 76448,  
162 Sigma Aldrich, France) with  $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  of trimethoprim and all countings were performed in  
163 triplicate by drip deposit of  $10 \mu\text{l}$  of a range of serial dilutions of treated seawater in Lewis  
164 seawater (supplementary 1) [53]. Agar plates were incubated at  $20^\circ\text{C}$  for 24 h until counting.  
165 In addition to the trimethoprim screen, the fluorescence of the colonies was checked at  
166 395 nm (Lepro Lampe Torche UV LED) before cultivable bacteria enumeration to check for  
167 potential contaminants. For all counts, a  $200 \mu\text{l}$  spread of sterile seawater (prior to bacterial  
168 inoculation) was used as a negative control to check for the presence of contaminants in the  
169 seawater prior to inoculation.

## 170 2. Photocatalysis kinetic law

171 To determine the disinfection capacity of a photoreactor, we described the phenomenon  
172 both at the scale of the inactivation reaction and at the level of the complete reactor. At the  
173 reaction level, we need to express a kinetic law representative of the photo-oxidation process  
174 taking place in the photoreactor. This process must represent both the limits of radical  
175 production and the degradation of the target. At reactor level, the aim was to formalize the



176 variations in the quantity of matter occurring during the treatment, which are formalized by  
177 a mass balance. This balance takes into account the reactor configuration, its operating mode  
178 and the operating conditions applied.

179

## 180 II.1 Kinetic law formalism

181 Bacterial disinfection follows a 3-step process. In the initial stages of the treatment,  
182 the bacteria experience damage. However, multiple instances of damage are necessary to  
183 hinder the growth process, as previously highlighted in several studies [54–57]. This  
184 requirement for multiple damage events results in an initial shoulder in the disinfection  
185 kinetics. As the treatment progresses, the cumulative damage inflicted on the bacteria  
186 eventually leads to their inactivation. This degradation process can be accurately represented  
187 by the photocatalysis kinetics law. After several hours of treatment, a phase characterized by  
188 a stabilization in bacterial concentration, often referred to as tailing off, becomes apparent.  
189 This observed phenomenon can be attributed to various factors. It might be associated with  
190 the emergence of bacterial strains that have developed resistance to the treatment, or it could  
191 be due to limitations such as the detection threshold of the culture method or mass transfer  
192 constraints [54–57].

193 In addition, the inactivation profile depends on the specific bacteria-catalyst  
194 combination. This variability adds complexity to the task of formulating a universally  
195 applicable process suitable for all target microorganisms making impossible the establishment  
196 of a universal kinetic law. To date, many formalisms have been developed for bacterial  
197 inactivation by photocatalysis in freshwater, but none of them has achieved consensus  
198 [23,37–44]. Nevertheless, the majority of the expressions are based on the dependence of the  
199 inactivation rate on the target concentration [37–42,44,58–60]. Only few kinetic laws

200 translate at the same time the impact of both the target concentration and the flux density  
 201 applied [22,23]. However, the impact of flux density is a key parameter to describe the  
 202 capacity of the photoreactor particularly for solar applications. In this context and considering  
 203 that the incident photons are not applied on the closed fluid loop but only on the irradiated  
 204 reactor volume  $V_r$  (L) across the irradiated surface  $S$ , the generic formalism, eq. (1), was  
 205 written to consider both impact of incident photon quantity and bacterial quantity.

$$206 \quad \dot{r} = \alpha \cdot \frac{(S \cdot I(t))^f}{\beta \cdot S \cdot I(t) + 1} \cdot \frac{(V_r \cdot C)^n}{\beta' \cdot C \cdot V_r + 1} \quad (1)$$

207 with  $S$  the irradiated surface of the reactor ( $\text{m}^2$ ),  $V_r$  the irradiated reactor volume (L),  $I$  the flux  
 208 density directly measured as a function of the exposition time ( $\text{W} \cdot \text{m}^{-2}$ ), and  $C$  the *Vibrio harveyi*  
 209 concentration at the time  $t$  ( $\text{cfu} \cdot \text{L}^{-1}$ ). The photo-conversion efficiency was carried out by the  
 210 constant  $\alpha$  ( $\text{s}^{f-1} \cdot \text{J}^{-f} \cdot \text{cfu}^{1-n}$ ).

211 In this kinetic law, the  $\beta'$  and  $n$  constants reflect the inactivation rate limitation by mass  
 212 transfer. The adsorption/desorption equilibrium between bacteria and the surface of the  
 213 photocatalyst is reflected by the Langmuir constant  $\beta'$  ( $\text{cfu}^{-1}$ ). The photons  
 214 absorption / Reactive Oxygen Species (ROS) production equilibrium is reflected by the  
 215 Langmuir type constant  $\beta$  ( $\text{W}^{-1}$ ) and the  $f$  constant. For example, a value of  $f$  equal to 1 and  $\beta$   
 216 to 0 translates a linear dependence of the inactivation rate to the incident photon quantity,  
 217 meaning that photon absorption is linearly related to the flux density applied. In this case  
 218 there is no limitation by catalyst due to photon absorption. The ROS production rate is directly  
 219 related to the flux density. Similarly, a value of  $f$  superior to 1 reflects a saturation of the  
 220 catalyst by incident photons leading to a decrease of the photo-conversion efficiency.

221 The specific case of pseudo first-order kinetic law described in the literature can be  
 222 represented by the following constant value,  $n$  equal to 1, with  $\beta$  and  $\beta'$  are equal to 0. This

223 representation shows the direct and proportional dependence of the inactivation rate to the  
 224 target concentration and to the flux density [23].

225 In this context, five formulations of the rate of bacterial inactivation derivated from the rate  
 226 of inactivation present in eq. (1) were selected (eq. (2) to (6)).

227  $\dot{r} = \alpha \cdot (S \cdot I_{(t)})^f \cdot C \cdot V_r$  (2) Model N°1

228  $\dot{r} = \alpha \cdot (S \cdot I_{(t)})^f \cdot \frac{C \cdot V_r}{\beta' \cdot C \cdot V_r + 1}$  (3) Model N°2

229  $\dot{r} = \alpha \cdot (S \cdot I_{(t)})^f \cdot (C \cdot V_r)^n$  (4) Model N°3

230  $\dot{r} = \alpha \cdot (C \cdot V_r)^n \cdot \frac{S \cdot I_{(t)}}{\beta \cdot S \cdot I_{(t)} + 1}$  (5) Model N°4

231  $\dot{r} = \alpha \cdot \frac{S \cdot I_{(t)}}{\beta \cdot S \cdot I_{(t)} + 1} \cdot \frac{C \cdot V_r}{\beta' \cdot C \cdot V_r + 1}$  (6) Model N°4

232

## 233 II.2 Mass balance formalism

234 Several authors have already reported that the inactivation of bacteria by photocatalysis  
 235 in freshwater encompasses several concurrent mechanisms [23,24], with the primary ones  
 236 being photolysis and photocatalysis. Photolysis directly results in bacterial inactivation  
 237 through the direct effects of radiation, playing a significant role in degrading bacteria in  
 238 solution. In contrast, photocatalysis is a more intricate process involving various steps. Firstly,  
 239 as degradation can only occur in the immediate vicinity of the catalyst, mass transfer (both  
 240 target and photon) plays a key role. This encompasses the migration of bacteria from the liquid  
 241 phase to the solid catalyst surface, along with the transfer of photons to the catalyst. Once  
 242 species are in proximity to the catalyst, photon absorption and bacterial adhesion occurs.  
 243 Photon absorption initiates the generation of radicals (ROS) responsible for bacteria  
 244 degradation. Lastly, the desorption of degraded bacteria is also crucial, allowing for the  
 245 release of catalyst active sites for the adhesion of other intact bacteria. Hence, Kacem et al.

246 have highlighted the importance of writing mass balances considering both mass transfer in  
247 the reactor (photon and bacterial transfer) and disinfection kinetics [22,23]. To this end, terms  
248 for catalyst adhesion and inactivation kinetics have been written. As some of the incident  
249 photons may react directly with organic species present in the medium, a photolysis  
250 inactivation term can also be added. But none of those models have been developed for  
251 seawater inactivation. The objective is to determine the kinetic law of *V. harveyi* inactivation  
252 in natural seawater.

253 We conducted preliminary experiments at high flux density at  $45 \text{ W.m}^{-2}$  to assess the  
254 photolysis of *Vibrio harveyi*. At this flux density, photolysis-induced inactivation remained  
255 below 20% even after prolonged irradiation, exhibiting a significantly lower inactivation rate  
256 compared to photocatalysis. Therefore, we decided to not model the contribution of  
257 photolysis-induced degradation since it was considered negligible.

258 Similarly, we conducted adhesion experiments and found that, under the specific  
259 experimental conditions, mass transfer was not a limiting factor. The detailed results from  
260 these two experiments can be found in supplementary 1 and 2. Furthermore, as adhesion was  
261 not a limiting factor, its impact on photocatalysis was also excluded from consideration.

262 Series of photocatalytic experiments were performed in triplicate with an incident flux  
263 density ranging from 10 to  $45 \text{ W.m}^{-2}$ . For all the *Vibrio* initial concentration (ranging from  
264  $10^4$  to  $6.10^5 \text{ cfu.mL}^{-1}$ ), the inactivation at the end of photocatalysis experiment was more than  
265 99% (more than 2 log inactivation). As it was already reported, the bacterial death do not  
266 occur immediately at the start of the treatment, as many ROS attacks are needed to inactivate  
267 a bacteria leading to a shoulder at the beginning of the photocatalytic treatment [54–57] so  
268 we developed a two-step model, eq. (7). As no adhesion or photolysis were observed with the  
269 strain of *Vibrio harveyi* used, the mass balance of the reactor can be summarized in batch to

270 the kinetic law. This equation was written to represent the variation of the bacterial quantity  
 271 inside the reactor.

272 As presented before, the pilot was composed of an irradiated reactor where the  
 273 photocatalytic reaction takes place and a recirculation loop to guarantee a perfectly mixed  
 274 reactor. The mass balance applied to the target bacteria (C) in the process yield the following  
 275 expression considering the overall system reactor as a perfectly mixed reactor (concentration  
 276 gradient inside the reactor was very small):

$$277 \begin{cases} \frac{V_T \cdot dC}{dt} = 0, & \text{for } t < t_{\text{shoulder}} \\ \frac{V_T \cdot dC}{dt} = -\dot{r}, & \text{for } t > t_{\text{shoulder}} \end{cases} \quad (7)$$

278 This mass balance uses a conditional statement, a common practice in the literature, to  
 279 characterize the initial shoulder phase. As a result, two balance equations are formulated: the  
 280 first describes the shoulder phase, in which the population of viable bacteria remains constant  
 281 despite ROS attacks, and the second portrays photocatalytic inactivation in line with the  
 282 kinetic law. In those equations,  $V_T = V_r + V_{loop}$  is the total volume of the reactor (L) comprising  
 283 the irradiated volume and the volume of fluid in the recirculated loop, and  $\dot{r}$  is the kinetic law  
 284 of the bacterial inactivation rate.

285

286 For continuous operating of the reactor, this balance needs to take into account the  
 287 continuous feed of bacteria (first term of eq. (8)), its degradation in the irradiated  
 288 photoreactor (third terms of eq. (8)) and the withdrawal of part of the seawater treated with  
 289 the photoreactor presented above (second term of eq. (8)).

$$290 \frac{V_T \cdot dC}{dt} = q \cdot C_0 - q \cdot C - \alpha \cdot (S \cdot I_{(t)})^f \cdot (C \cdot V_T)^n \quad (8)$$



291 with  $q$  the flow rate for the feed and racking of the reactor ( $L.s^{-1}$ ) and  $C_0$  the target bacteria  
 292 concentration in the photoreactor feed solution ( $cfu.L^{-1}$ ). Given the thorough agitation in the  
 293 photoreactor, the target bacteria concentration remains uniform throughout the reactor.  
 294 Consequently, the bacterial concentration at the reactor outlet accurately mirrors the  
 295 concentration within the reactor.

296

### 297 3. Results

#### 298 3.1. Batch photocatalytic reactor, determination of the kinetic law.

299 The aim of this section is to determine the appropriate kinetic law and to identify the  
 300 kinetic parameters. The selected laws allow good fitting of the *Vibrio harveyi* inactivation on  
 301 natural seawater (containing a multitude of salt and other organic residues) while limiting the  
 302 number of undetermined parameters to a maximum of 3. This allows us to obtain a simple  
 303 kinetic law highlighting the limitations of both the quantity of incident photons and the  
 304 quantity of bacteria. The identification of the unknown parameters ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\beta'$ ,  $n$ , and  $f$ ) was  
 305 performed in Matlab software using the Nelder-Mead simplex algorithm [61] by minimizing  
 306 the mean relative error (MRE) define in eq. (9). This criterion compares the calculated  
 307 concentration profiles obtained using the *ode45* solver to the experimental results. The  
 308 unknown parameters were optimized using an experimental dataset of 15 independent  
 309 experiments with four UV irradiation levels ranging from 10 to 45  $W.m^{-2}$  and target initial  
 310 concentration ranging from  $10^4$  to  $5.10^5$   $cfu.mL^{-1}$ .

$$311 \quad MRE = \frac{1}{n_{exp}} * \sum_{i=1}^{n_{exp}} \left| \frac{C_{exp_i} - C_{simulation_i}}{C_{exp_i}} \right| * 100 \quad (9)$$

312 with  $n_{exp}$  the number of experiments used for the optimization,  $C_{exp}$  and  $C_{simulation}$  the dataset  
 313 from the experience and from the simulation respectively.

14

314

315 As shown in Fig. 2, the average kinetics of the experimental data used to identify the laws  
 316 all show a shoulder followed by a decrease in bacterial concentration. This profile is in  
 317 accordance with the literature [54–57]. The fitting of these experimental curves with all the  
 318 kinetic laws allows an MRE lower than 10% (table 1).

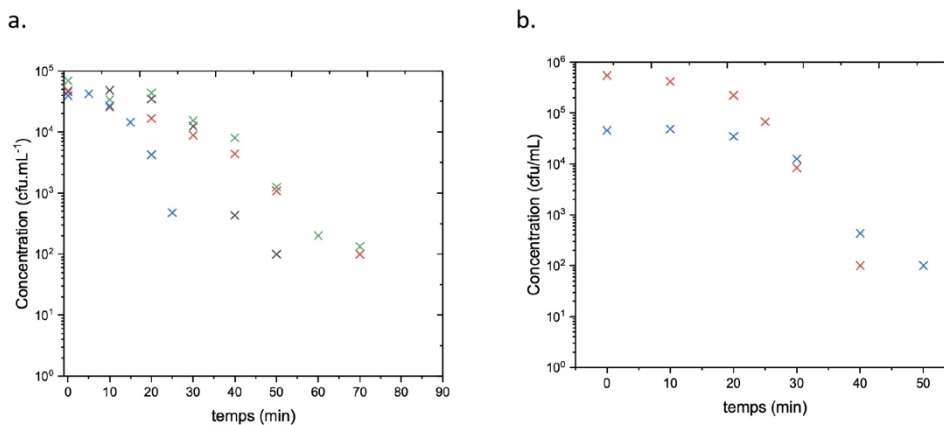


Figure 2 : Photocatalyse of *Vibrio harveyi* in batch (a) at different flux density (10 W.m<sup>-2</sup> (x), 20 W.m<sup>-2</sup> (x), 35 W.m<sup>-2</sup> (x), and 45 W.m<sup>-2</sup> (x)), and (b) at different bacterial concentration (at 35 W.m<sup>-2</sup>). Experiments were performed in natural seawater (pH 8 et salinity of 35 PSU) with titanium dioxide concentration of 4 g.L<sup>-1</sup>. Each experimental point was the average of three experiments with a variation coefficient lower than 35%.

319

320 The kinetic law defined by equations (4) was the best to describe our experimental  
 321 inactivation curves with the lowest MRE (table 1). This law describes the inactivation limitation  
 322 by high flux density which is leading to a slowdown in the inactivation rate. When the flux  
 323 density is too high, the received photons are too important, the catalyst cannot generate all  
 324 the ROS corresponding, resulting in a decrease of the photo-conversion efficiency in  
 325 accordance with the dependency lower than one on the flux density I. The Fig. 3 shows the  
 326 fitting of the average experimental curve for each condition with the best kinetic curve found.  
 327 In this kinetic law, the f value was found to be of a similar order of magnitude (around 0.3) as  
 328 the values typically reported in the literature for abiotic targets in freshwater (typically around

329 0.7) [49]. A  $f$  value was lower than 1, reflecting a limitation in photon transfer in the medium.  
 330 One hypothesis for the higher limitation in seawater compared to freshwater would be the  
 331 absorption of part of the incident photon by salts and other suspended matter.

332 Table 1 : optimal constants found from batch experiments

	$\alpha$ ( $s^{f-1} \cdot J \cdot r \cdot cfu^{1-n}$ )	$n$	$f$	$\beta$ ( $L \cdot cfu^{-1}$ )	$\beta'$ ( $m^2 \cdot W^{-1}$ )	MRE (%)
<b>Model N°1</b> $\dot{r} = \alpha \cdot (S \cdot I(t))^f \cdot C \cdot V_r$	0.003	Fixed at 1	0.337	Fixed at 0	Fixed at 0	6.0
<b>Model N°2</b> $\dot{r} = \alpha \cdot (S \cdot I(t))^f \cdot \frac{C \cdot V_r}{\beta' \cdot C \cdot V_r + 1}$	0.004	Fixed at 1	0.338	Fixed at 0	$1.4 \times 10^{-16}$	6.0
<b>Model N°3</b> $\dot{r} = \alpha \cdot (S \cdot I(t))^f \cdot (C \cdot V_r)^n$	<b>0.0007</b>	<b>1.13</b>	<b>0.311</b>	Fixed at 0	Fixed at 0	<b>5.6</b>
<b>Model N°4</b> $\dot{r} = \alpha \cdot (C \cdot V_r)^n \cdot \frac{S \cdot I(t)}{\beta \cdot S \cdot I(t) + 1}$	0.002	1.21	Fixed at 1	5.67	Fixed at 0	5.7
<b>Model N°5</b> $\dot{r} = \alpha \cdot \frac{S \cdot I(t)}{\beta \cdot S \cdot I(t) + 1} \cdot \frac{C \cdot V_r}{\beta' \cdot C \cdot V_r + 1}$	0.03	Fixed at 1	Fixed at 1	7.17	$4.8 \times 10^{-17}$	6.1

333

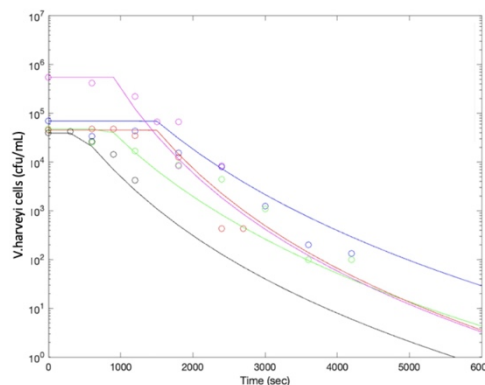


Figure 3: Kinetic inactivation curves obtained for the determination of the best fitting kinetic law : model N°3, (—) for  $I = 10 \text{ W} \cdot \text{m}^{-2}$  and  $C_0 = 10^5 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$ , (—) for  $I = 20 \text{ W} \cdot \text{m}^{-2}$  and  $C_0 = 10^5 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$ , (—) for  $I = 35 \text{ W} \cdot \text{m}^{-2}$  and  $C_0 = 10^5 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$ , (—) for  $I = 45 \text{ W} \cdot \text{m}^{-2}$  and  $C_0 = 10^5 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$ , and (—) for  $I = 35 \text{ W} \cdot \text{m}^{-2}$  and  $C_0 = 10^6 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,

334

335 To validate the selected kinetic law (Eq. 4), two additional batch experiments at  $45 \text{ W} \cdot \text{m}^{-2}$  and  
 336 around  $5 \times 10^4 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$  were performed. Fig. 4 shows the comparison between experimental  
 337 results and *in silico* inactivation profiles calculated with the kinetic law found previously and  
 338 the linear kinetic law. The applied kinetic law and mass balance allowed a good representation  
 339 of parts of the experimental inactivation curve. The relative error between experimental

340 inactivation and simulated inactivation curves was lower than 15% (Fig. 4a and b). Considering  
 341 standard deviations on experimental measurements (Fig. 4c), the kinetic law N°3 (eq. (4)) was  
 342 used for the following part. It was a simple law with only three constants that also allows us  
 343 to well represent our experimentations by considering both the effects of flux density and  
 344 bacterial concentration on the inactivation rate.

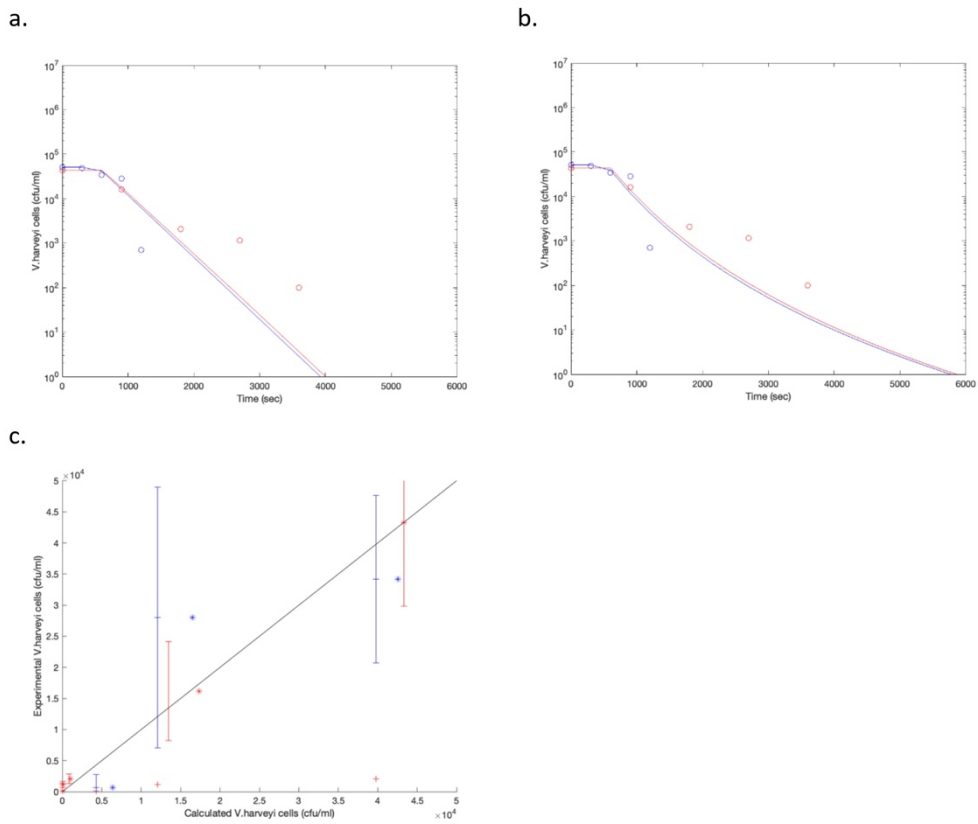


Figure 4: Kinetic inactivation curves obtained for independent experimental data (a) model N°1 (MRE = 4% and 11% respectively for the experimental data N°1 and N°2), (b) model N°3 (MRE = 4% and 8% respectively for the experimental data N°1 and N°2), and (c) the diagram of dispersion for the comparison of the experimental results (two experiments at  $l = 45$  W.m<sup>-2</sup>, with an initial concentration of  $5 \times 10^3$  cfu.mL<sup>-1</sup> in blue and  $4 \times 10^4$  cfu.mL<sup>-1</sup> in red) and the calculated results obtained for the model N°1 (\*), the model N°3 (+).

345

346

347       3.2. Photo-oxidative capacity simulation under daily conditions in continuous  
348               flow: influences of sunshine discontinuities.

349       To assess the photo-oxidative capacities of a photoreactor under natural solar irradiation,  
350 dynamic conditions found in several oyster farming regions in France were applied. This  
351 approach consists in applying irradiation set-up representative of varying solar resource  
352 characteristics, such as daily cycles and seasonal variations such as day length, incident solar  
353 flux, and the influence of weather patterns. For this study, we selected three cities situated  
354 near oyster farms along the French coastline: Bordeaux and Nantes on the Atlantic coast and  
355 Montpellier on the Mediterranean coast. Simulations were conducted with a photoreactor  
356 operating under open mode. The kinetic law (Eq. 4) number 3 was used with the  
357 corresponding parameters identified (Table 1). The mass balance presented in Eq. 8 was  
358 employed to describe the performance of a photoreactor continuously supplied with a  
359 solution containing *Vibrio harveyi*. The photoreactor was subjected to dynamic irradiation  
360 profiles that represent weather conditions in the selected cities. We investigated the reactor's  
361 operation under various feeding conditions, including a range of feed concentrations  
362 resembling those found in nature, as well as different photoreactor feed rates, resulting in  
363 distinct residence times within the photoreactor.

364       3.2.1. Solar irradiation characteristics

365       The solar resource fluctuates around periods and places, it is by nature a discontinuous  
366 resource at several scales. It is highly dependent on location, but also on the period of the  
367 year. In fact, in addition to fluctuating with the alternating day/night cycle, solar resources  
368 also depend on the cycle of the seasons [27,29,30,62,63].

369       Resource availability depends significantly on the length of the day and the flux density  
370 received. Depending on the period of year, the day duration will change (table 2), the shorter



371 day is the Winter solstice (December 21<sup>st</sup>) and the longer is the Summer solstice (June 21<sup>st</sup>).  
372 Days are almost half as long in Winter as in Summer (8h in January vs. 15h in July). Moreover,  
373 the flux density received also changes with the season (Fig. 5a) leading to an increase of the  
374 cumulative energy received on an average day in Summer (July) of more than 75% compared  
375 to Winter (December) (table 2). For example, the maximum flux density can reach 50 W.m<sup>-2</sup>  
376 in July, compared with 25 W.m<sup>-2</sup> in December.

377 Resource availability fluctuates even on shorter time scales, particularly during daily  
378 periods of cloudiness. These transient cloud cover events have a substantial influence on  
379 resource availability by strongly altering the incident flux density. For instance, as depicted in  
380 Fig. 5b, a cloudy day in July leads to a two-fold reduction in cumulative flux density when  
381 compared to a clear, sunny day. Geographical location plays an essential role in this context.  
382 The three sites chosen to represent French oyster-growing areas located in regions with  
383 distinct climatic conditions. In winter, the difference between sites is greater than in summer,  
384 with 21% more cumulative energy received between Bordeaux and Nantes in January,  
385 compared with just 5% in July. In addition to variations between months, there are also  
386 variations within a month on the same site (Fig. 2a and b). For example, in July in Montpellier  
387 (southern France, along the Mediterranean Sea), the flux density received can vary from 10-  
388 20 W.m<sup>-2</sup> on cloudy days to over 45 W.m<sup>-2</sup> on sunny days (Fig. 5b).

389

390 Taking into account the spatio-temporal characteristics of solar resources is essential  
391 for assessing photoreactor performance. This approach enables photoreactor capacities to be  
392 used to predict daily and monthly processing capacities. These considerations are crucial to  
393 adapting the system size to the location and period of operation.

394

395 Table 2 : solar characteristics for each month at each French place (based on Meteonorm data)

	January	February	March	Avril	May	Jun	July	August	September	October	November	December	Total year
	Average day												
	Cumulative energy received (kJ.m <sup>-2</sup> )												
Montpellier	305	480	713	907	1 099	1 273	1 275	1 049	821	508	347	266	275 512
Bordeaux	240	383	607	802	974	1 097	1 066	942	732	468	271	197	237 304
Nantes	189	339	546	788	957	1 083	1 038	917	716	401	234	162	224 641
Day/Night (h)	8	9	12	13	15	15	15	14	13	11	9	8	/

396

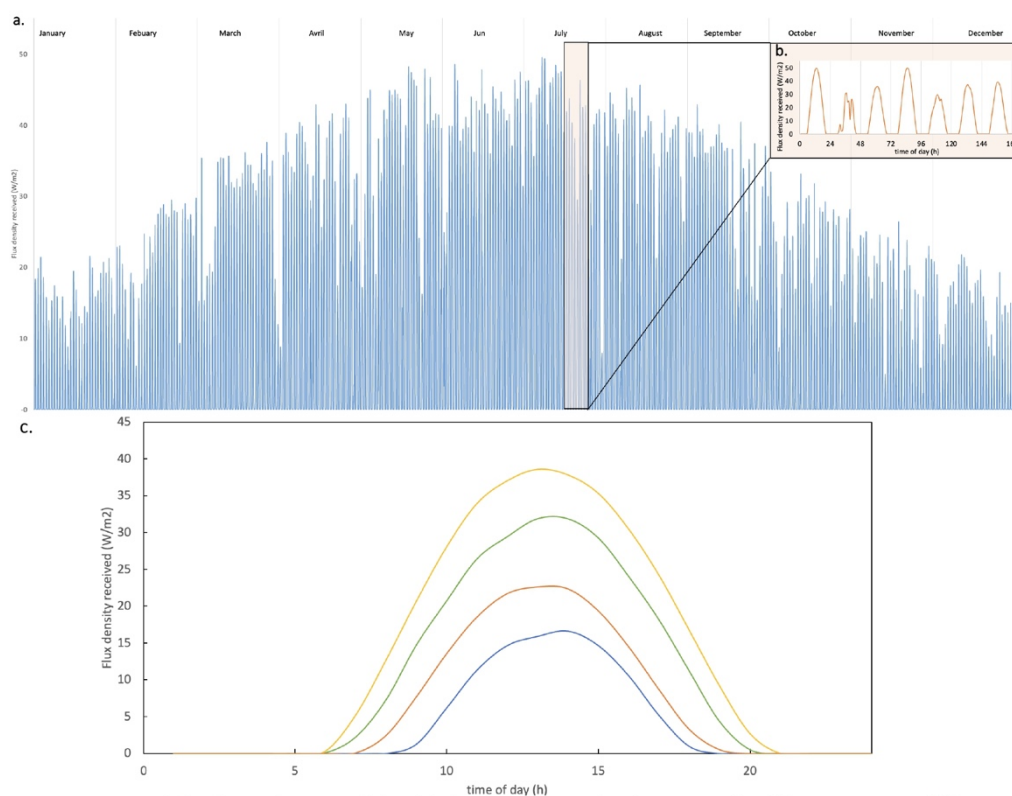


Figure 5: Received flux density (UV part of the global radiation, around 5%) in Montpellier (a) over a year, and (b) over a week in July, and (c) for average day of each season: — Summer, — Spring, — Autumn, and — Winter,.

397

398 3.2.2. Impact of operating conditions on inactivation rate

399 Based on the mass balance of the photoreactor operating in open mode (eq. (8)),

400 inactivation kinetics have been simulated under various operational conditions, such as flow

20

401 density, bacterial concentration, and feed rate. Fig. 6 illustrates an example of the curves  
402 generated for specific fixed operational parameters throughout the inactivation processus.  
403 Under all operational scenarios, the inactivation curve can be divided into two distinct phases.  
404 The first phase represents the transient step, where the bacterial concentration in the reactor  
405 decreases until reaching an equilibrium state. The duration of this transient mode is directly  
406 related to the hydraulic time (residence time of bacteria in the reactor) and to the operating  
407 conditions. For example, a change in flow density or feed rate will lead to a disturbance in the  
408 system, resulting in transient functioning. When the photoreactor is operating under solar  
409 irradiation, due to the discontinuity of the flux density applied the reactor is constantly in  
410 transient mode. In a second step, the reactor reaches a steady-state condition. In steady state,  
411 accumulation within the reactor is zero, *i.e.* there is no longer any variation in the quantity of  
412 bacteria. The quantity of bacteria introduced through the feed reaches an equilibrium with  
413 the amount removed from the reactor, considering both degradation through photo-  
414 oxidation and removal through racking.

415 Examining the influence of each operating parameter individually, both the feed rate and  
416 flux density affect the duration of the transient phase and the achieved inactivation rate (Fig.  
417 6a and c). Higher flux density leads to a faster attainment of the steady state with lower  
418 bacterial concentration in the reactor. Similarly, reducing the feed rate enhances bacterial  
419 inactivation. Lowering the flow rate increases the residence time in the reactor, thereby  
420 boosting bacterial inactivation. On the other hand, when the flow rate is too high, the bacterial  
421 input is too high compared to the inactivation and so the concentration at the reactor outlet  
422 is that applied at the inlet. Conversely, while increasing the bacteria concentration of the feed  
423 affects inactivation kinetics, its impact is less pronounced (Fig. 6b).

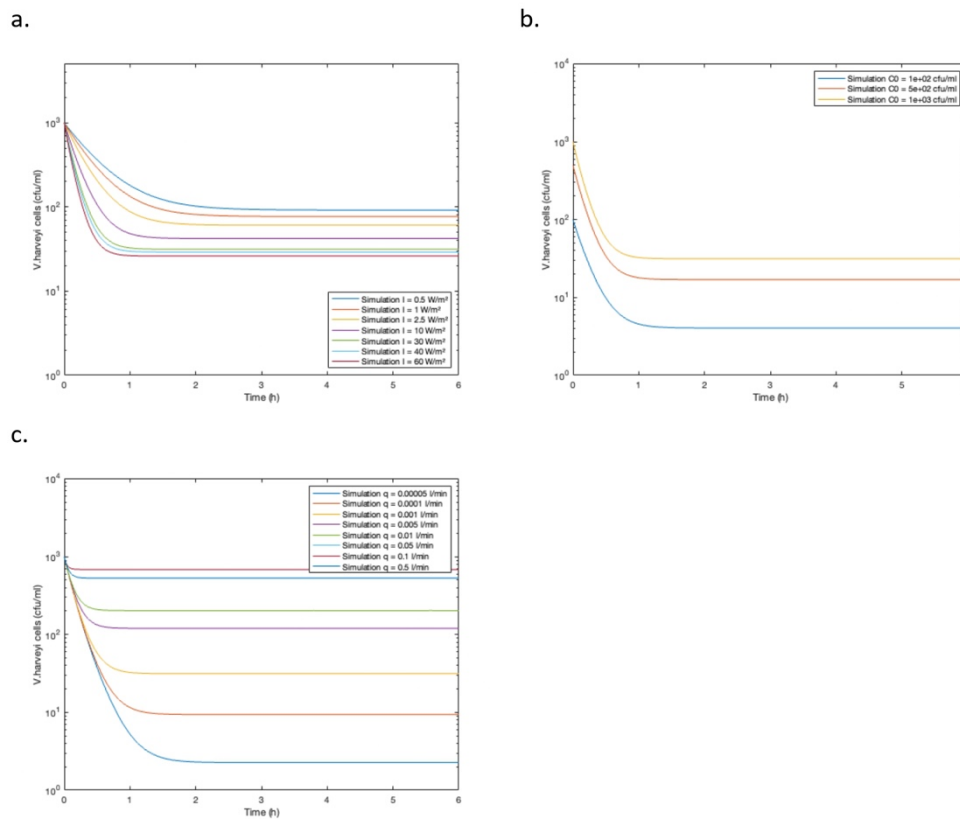


Figure 6: individual influence of each operating parameter on bacterial inactivation by open mode photocatalysis: (a) different flux density  $I$  with  $C_0 = 10^3$  cfu.ml<sup>-1</sup> and  $q = 1$  mL.min<sup>-1</sup>, (b) different bacterial feed concentrations  $C_0$  with  $I = 30$  W.m<sup>-2</sup> and  $q = 1$  mL.min<sup>-1</sup>, and (c) different feed rates  $q$  with  $C_0 = 10^3$  cfu.ml<sup>-1</sup> and  $I = 30$  W.m<sup>-2</sup>.

424 Once reactor equilibrium has been reached, the rate of bacteria inactivation is strongly  
 425 influenced by the amount of photon received. Fig. 7a and b represent the inactivation rate  
 426 once the reactor is in steady state as a function of the flux density (a) and the bacterial  
 427 concentration (b).

428 As shown in Fig. 7a, the influence of flux density on bacterial inactivation rate can be  
 429 divided down into several parts. The inactivation rate is strongly dependent of the flux density  
 430 below 25 W.m<sup>-2</sup>. Then for flux density superior to 25 W.m<sup>-2</sup>, the inactivation rate slows down  
 431 and tend to a plateau until after 50 W.m<sup>-2</sup> no improvement is observed. The plateau observed  
 432 for high flux densities reflects that the ROS production is maximal, enabling maximum target  
 433 degradation [26,49].

434 Fig. 7b shows the variation of the inactivation rate as a function of the pathogen  
 435 concentration in the feed solution. At low bacterial concentration, the inactivation rate was  
 436 limited by the mass transfer. The mass transfer governs the photo-oxidation reaction,  
 437 highlighting that bacteria must be in the vicinity of the catalyst particles for inactivation. Then,  
 438 when the bacterial concentration is high enough, the rate of inactivation is correlated with the  
 439 increase in bacterial concentration. Thus, the photo-oxidation reaction is governed by the  
 440 reaction regime. For the three flux densities presented, the curves showing the evolution of  
 441 the inactivation rate as a function of the reactor feed concentration overlap.

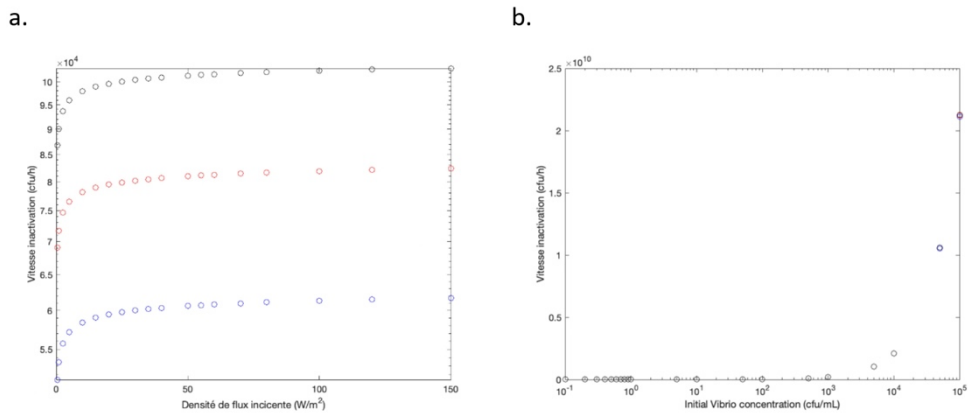


Figure 7: Inactivation rate once the equilibrium of the reactor was reached depending (a) on the flux density applied (with a feed solution of bacteria of  $10^3$  cfu.mL $^{-1}$  (o),  $2 \times 10^3$  cfu.mL $^{-1}$  (o), and  $3 \times 10^3$  cfu.mL $^{-1}$  (o)), and (b) on the feed solution concentration (with a constant irradiation at  $10$   $W.m^{-2}$  (o),  $30$   $W.m^{-2}$  (o), and  $45$   $W.m^{-2}$  (o)). (simulations performed with a constant flow rate  $q = 1$  mL.min $^{-1}$  using the same photoreactor dimension of that one used in batch).

442

### 443 3.2.3. Solar irradiation influence

444 To evaluate the influence of sunshine conditions on the photoreactor's daily treatment  
 445 capacity, treatment capacities were simulated for three oyster production sites and for each  
 446 month of the year (average day, sunny day and cloudy day). Simulations were performed with  
 447 irradiation data from Meteonorm software for three French cities (Bordeaux, Nantes and  
 448 Montpellier). The simulations of bacteria inactivation for average monthly days in Montpellier



449 (Fig. 8a), Bordeaux (Fig. 8b) and Nantes (Fig. 8c) were report in Fig. 8 for a feed solution of  
450  $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  at  $10^4 \text{ cfu}\cdot\text{mL}^{-1}$  in a 0.3 L photoreactor (with an irradiated surface of  $0.015 \text{ m}^2$ ).

451

452 On an average day, the inactivation kinetics consistently exhibit a common pattern,  
453 regardless of the city or period of the year. Three distinct phases are observed. During the  
454 morning, when irradiation levels are low, bacterial concentrations decline rapidly, reaching a  
455 plateau around mid-day. At this point, irradiation peaks at over  $25 \text{ W}\cdot\text{m}^{-2}$ , resulting in the  
456 maximum inactivation rate (Fig. 7a). As the day progresses and the flux density diminishes to  
457 zero in the evening, the bacterial concentration gradually rises, returning to the inlet  
458 concentration. This profile closely resembles the typical pattern observed in freshwater  
459 decontamination [52].

460 A more detailed examination of monthly inactivation patterns reveals a consistent  
461 profile across different locations. In Montpellier, for instance (Fig. 7a), bacterial inactivation  
462 kinetics intensify in correlation with the amount of sunshine. High flux density months with  
463 day length exceeding 13 h of irradiation (mostly Summer months) have a higher inactivation  
464 levels compared with Winter months. Months with sunnier and longer days, such as Summer,  
465 exhibit higher inactivation rates as well as more prolonged maximum inactivation plateaus.  
466 Conversely, Winter months, characterized by limited sunshine and shorter days, display lower  
467 inactivation rates and shorter plateaus. Transitional months with moderate sunshine, like  
468 spring and autumn, fall in between these two categories. When comparing Winter and  
469 Summer months, the duration of the maximum inactivation plateau is directly tied to the  
470 length of daylight. The day length will impact the duration of photocatalysis and therefore the  
471 photoreactor's capacity in terms of treatable volume and total quantity of inactivated bacteria  
472 per day. On the other hand, the higher flux density (received during the Summer months)

473 enables us to achieve better inactivation rates (lower bacterial concentration). As discussed  
474 in Fig. 7, the inactivation rate reaches a maximum at high flux densities, which explains the  
475 plateau in bacterial concentration during the day. The same observation was done for other  
476 locations.

477 Moreover, the maximum inactivation rate in Winter is only 0.2 logarithms lower than  
478 that in Summer, attributed to the inactivation rate's dependence on flux density, which  
479 follows a 0.23 order pattern. As depicted in Fig. 7, once irradiance exceeds  $25 \text{ W.m}^{-2}$ , the  
480 inactivation rate experiences minimal variation, resulting in similar inactivation rates between  
481 Winter and Summer. The limitation by the received quantity of photons is particularly striking  
482 on Fig. 8d which represents the inactivation of *Vibrio harveyi* for all three locations in July. The  
483 flux density received by the photoreactor is different between, but the inactivation rate is  
484 similar with more than 450 kJ received by the photoreactor during the day at Montpellier  
485 versus around 375 kJ at Bordeaux and Nantes with a maximum of  $40 \text{ W.m}^{-2}$  for Montpellier  
486 versus  $35 \text{ W.m}^{-2}$  for Nantes and Bordeaux. Those irradiations allow to achieve an inactivation  
487 of 2.5 log corresponding to an inactivation of 99.99% of the income bacteria. The same  
488 observation has also been done for all months.

489

490 Focusing now on the effects of weather conditions, irradiation between days varies  
491 significantly (Fig. 5). Looking at inactivation on three typical days of July in Montpellier (Fig.  
492 8e), corresponding to a very sunny day (day 1 on Fig. 5b), a very cloudy day (day 2 on Fig. 5b)  
493 and an average day (day 3 on Fig. 5b). The influence of irradiation variations on the  
494 photocatalysis efficiency is clearly visible. The cumulative amount of energy received on a  
495 sunny day is twice more than for a cloudy day with rapid and important variations of the flux  
496 density. As Fig. 8e shown, on a cloudy day, the outlet concentration changes over the day

497 according to irradiation (cloud passage). The average inactivation rate is  $4.1 \times 10^3$  cfu.h<sup>-1</sup> for a  
 498 cloudy day of July in Montpellier versus  $4.3 \times 10^3$  cfu.h<sup>-1</sup> for a sunny day.

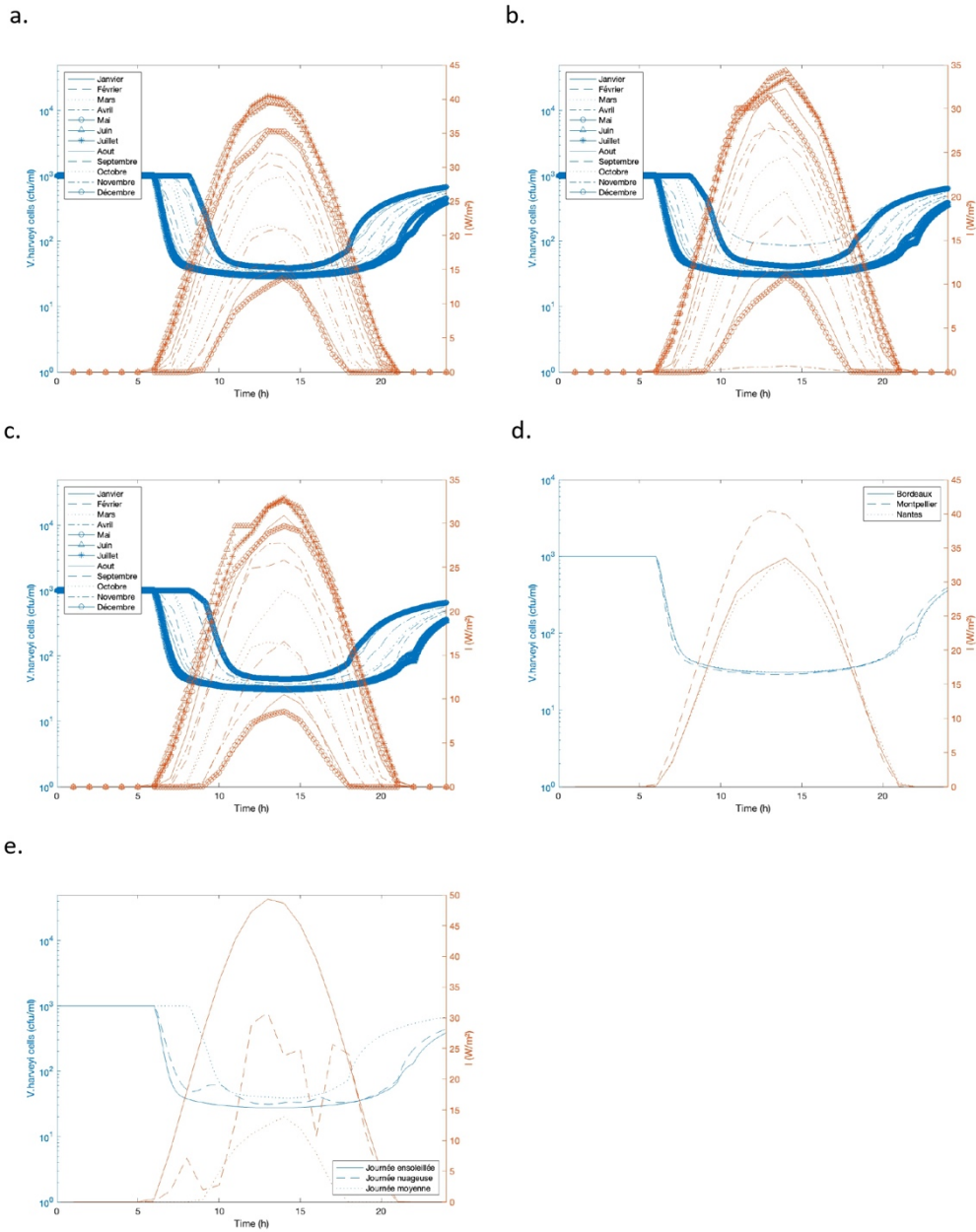


Figure 8: Daily *Vibrio harveyi* inactivation by photocatalysis for average day of each month in three locations close to aquaculture facilities (simulation performed with a constant flow rate  $q = 1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$  and an feed solution at  $10^3 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$  of *Vibrio harveyi* bacteria using the same photoreactor dimension of that one used in batch) (a) in Montpellier (France), (b) in Bordeaux (France), (c) in Nantes (France), (d) comparison of the three locations for the average day of July, and (e) comparison of daily irradiation in July at Montpellier.

499 To conclude, the duration of daily irradiation, rather than the total irradiation received,  
500 is the primary driver of bacterial inactivation. Notably, bacterial inactivation rates are  
501 significantly influenced by irradiation fluctuations when irradiance remains below  $25 \text{ W.m}^{-2}$ .  
502 However, across the multiple locations examined, this threshold value is typically surpassed.  
503 It is only during cloudy days that variations in irradiance have a notable impact on the  
504 inactivation rate and, consequently, on inactivation capacity. Therefore, to develop a real-  
505 time solution to effectively manage these intermittent conditions is crucial.

## 506 1. Discussion

### 507 1.1. How to manage solar intermittencies

508 Fluctuations management in solar resources is one of the key challenges that faces solar  
509 photocatalysis. To compensate for the fluctuation in solar resources, most authors focused on  
510 the development of new materials [64,65]. These materials, typically relying on activated  
511 carbons, offer the capability to store targets when sunshine is limited. Subsequently, during  
512 periods of intense sunshine, the targets present in the water can be effectively eliminated  
513 through photocatalysis. In the present work, the goal is to introduce an intermittence  
514 management system at the photoreactor scale by adjusting operational parameters, such as  
515 the feed rate. The objective is to modulate the reactor's feed rate with prevailing sunshine  
516 conditions.

517 In a perspective of application for living organisms such as oysters, it is necessary to be  
518 able to guarantee a constant inactivation rate and seawater quality. We considered that  
519 treated seawater is sufficiently inactivated for aquaculture if the outlet bacterial  
520 concentration is less than  $10 \text{ cfu.mL}^{-1}$  with an input bacterial concentration of  $10^3 \text{ cfu.mL}^{-1}$   
521 [66]. This corresponds to a bacterial inactivation of 99% (2-log inactivation). In the example of

522 a photoreactor of 0.3 L (with an irradiated surface of 0.015 m<sup>2</sup>) fed with a constant flow of  
523 1 mL.min<sup>-1</sup> of a solution at 10<sup>3</sup> cfu.mL<sup>-1</sup>, this configuration will achieve less than 1.8 log  
524 inactivation (i.e. an inactivation of 98% of the income pathogens) at best of the day in July (Fig.  
525 9). But, during cloudy days, the inactivation rate barely surpasses 96%. The treatable volume  
526 of seawater with 99% inactivation of the income bacteria was 0. So, this operation produces  
527 9 L of seawater per week with an inactivation of 90% of incoming bacteria.

528 To achieve higher inactivation rates, the daily treatment volume must be increased while  
529 ensuring consistent quality at the reactor outlet, maintaining a constant bacteria  
530 concentration regardless of irradiation, weather conditions, or day length (Fig. 9a). An  
531 alternative solution consists in the modulation of the flow rate according to the flux density  
532 received in order to respect a certain level of inactivation (Fig. 9b). The adjustable flow rate  
533 allows for the adaptation of the inactivation rate to weather conditions, thus mitigating its  
534 impact. For instance, on sunny days, such as the first day of the week in Fig. 9, it is possible to  
535 produce 200 mL with a *Vibrio* concentration lower than 10<sup>2</sup> cfu.mL<sup>-1</sup>, in contrast to 152 mL on  
536 cloudy days (as indicated in table 3). While the treatable volume is somewhat reduced during  
537 cloudy days, the seawater quality at the photoreactor outlet is maintained during periods of  
538 low light irradiation, which includes cloudy periods, sunrise, and sunset.

539

540 By aligning the flow rate with irradiation conditions throughout the day, a consistent  
541 bacterial inactivation rate of 99% can be sustained from dawn to dusk. This results in a total  
542 volume of 1.3 liters of seawater disinfected at a 99% rate over the course of a week, in  
543 comparison to 0 liters disinfected to 99% when a constant flow rate of 1 mL.min<sup>-1</sup> is used.  
544 Employing a variable flow rate enhances the reactor's performance in terms of daily treatable  
545 volume and outlet seawater quality. However, it is important to note that as the flow rate is



546 significantly reduced to enhance seawater quality, the average inactivation rate is likewise  
 547 reduced (refer to table 2 for the average inactivation rate). Therefore, by adjusting the  
 548 photoreactor flow rate between 1 and 19 mL.h<sup>-1</sup> during the day, the bacterial concentration  
 549 at the photoreactor outlet can be consistently maintained at over 90% of inactivation for one  
 550 week (7 days). Modulating the flow rate enables reaching a more effective inactivation rate,  
 551 even though it may limit the volume that can be treated. Conversely, maintaining a constant  
 552 higher flow rate increases the treated water volume but does not ensure an adequate level of  
 553 disinfection.

554 Table 3 : flow rate modulation effect on reactor performance, with cloudy day corresponding to day 2 of Fig. 9, sunny day to  
 555 day 1 and average day to day 3.

	Unit	Constant flow rate (1 mL.min <sup>-1</sup> )			Modulated flow rate		
		Cloudy day	Sunny day	Average day	Cloudy day	Sunny day	Average day
Cumulative energy received	kJ	756	1 568	1 123	756	1 568	1 123
Average inactivation rate	cfu.h <sup>-1</sup>	4 610	4 124	4 651	737	928	870
Volume of outlet at 99% inactivation	mL	0	0	0	152.4	199.8	185.2

556

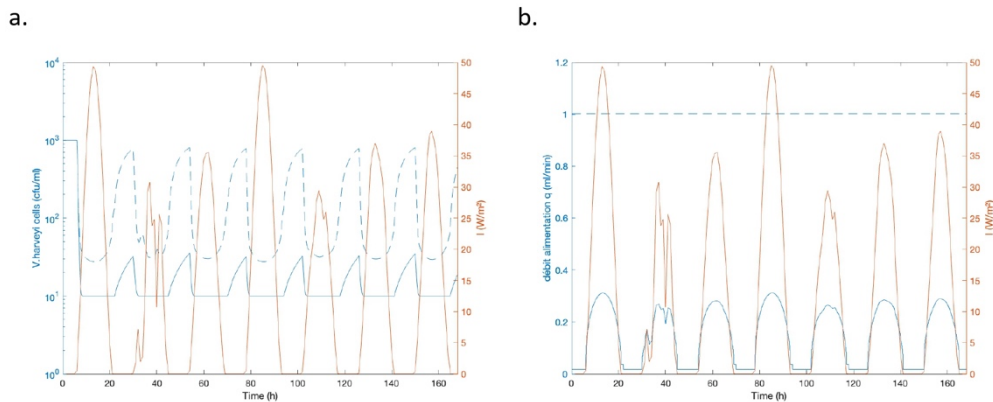


Figure 9: Pathogens inactivation depending of the applied flow rate (a) *Vibrio harveyi* concentration in outlet of the photoreactor depending on the flux density received on 7 days in July at Montpellier with an income pathogen concentration of 10<sup>3</sup> cfu.mL<sup>-1</sup>, and (b) the applied flow rate. (—) with constant flow rate q=1 mL.min<sup>-1</sup>, or (- -) with variable flow rate determined to inactivate 99% of income pathogens

557

## 558 1.2. Photoreactor design for aquaculture facilities

559 This approach can be called up to a solar installation that meets the demands of  
 560 aquaculture facilities. The tools developed previously were applied to forecast the  
 561 performance of a full-scale pilot system. This forecasting was grounded in the kinetic law  
 562 (eq. 4) and mass balance (eq. 8) established to determine the inactivation of *Vibrio harveyi*  
 563 within a continuously operating photoreactor under solar irradiation. A solar photoreactor  
 564 with a surface area of one square meter and a volume of 19.7 liters served as a reference to  
 565 project the treatment capacity of a facility. The predictions were generated with the goal of  
 566 achieving a 99% reduction rate by adjusting the feed rate based on the irradiation levels. For  
 567 each average day representative of the different months of the year in site (based on average  
 568 day, table 2), the flow rate is calculated to achieve 99% inactivation of the income bacteria.  
 569 Then, based on modulated flow rate according to daily irradiation, the outlet bacterial  
 570 concentration was calculated to determine the treatable volume per day (table 4). For all three  
 571 locations, the maximum treatable volume with suitable seawater quality is achieved in  
 572 Summer with 85L disinfected by day. In Winter, due to less favorable irradiation conditions  
 573 (both in terms of duration and quantity), the volume of seawater that can be treated is  
 574 significantly lower, at around 30-40 L, a half the volume of sunny Summer days.

575 Table 4: average daily treatable volume per square meter of photoreactor

	Irradiated surface S (m <sup>2</sup> )	Photoreactor volume (L)	January	February	March	Avril	May	Jun	July	August	September	October	December
			Volume treated by day (L/day)										
Montpellier	1	19.7	38.9	50.2	61.8	72.0	81.1	87.2	86.5	77.4	66.8	52.7	34.7
Bordeaux	1	19.7	35.7	46.1	59.0	69.5	79.0	83.8	82.2	75.5	65.1	51.5	34.8
Nantes	1	19.7	32.4	43.9	57.1	69.5	79.4	84.2	82.4	75.6	64.8	49.2	32.6

576

577 In land-based aquaculture facilities like nurseries, the demand for water is substantial,  
578 often in the order of cubic meters per hour per nursery tank [7]. Typically, oyster nurseries are  
579 generally made up of several large basins, each receiving a continuous supply of sterile  
580 seawater. These basins serve for pre-growth the oyster spat until they reach a weight of  
581 approximately 20 grams [67]. For instance, considering a single nursery tank with a flow rate  
582 of  $2 \text{ m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$  in January, an  $1\,285 \text{ m}^2$  photoreactor with a volume of  $25.3 \text{ m}^3$  would be required  
583 for Montpellier and a  $1\,543 \text{ m}^2$  photoreactor with a volume of  $30.4 \text{ m}^3$  would be required for  
584 Nantes. If this is extrapolated to a real installation with multiple parallel tanks, the reactor size  
585 would need to be scaled up depending on the number of nursery basins, rendering the  
586 required reactor sizes impractical for such installations (more than a thousand square meters  
587 required for the photoreactor).

588 On the other hand, there are other aquaculture installations whose seawater  
589 requirements are lower in terms of quantity, that make them better suited to solar treatment.  
590 For example, during the growth stages of oyster larvae, much less seawater is needed. The  
591 larvae are placed in batch tanks of a few cubic meters. The seawater in these tanks is  
592 occasionally renewed. Considering a hatchery with  $3 \text{ m}^3$  tanks and based on the lowest  
593 treatable volumes (obtained with December irradiation, table 4), an  $86 \text{ m}^2$  photoreactor with  
594 a volume of  $1.7 \text{ m}^3$  would be required for Montpellier and Bordeaux, and a  $92 \text{ m}^2$   
595 photoreactor with a volume of  $1.8 \text{ m}^3$  for Nantes. Such photoreactors would enable seawater  
596 to be disinfected to a sufficiently high quality over a day. Hence, it becomes necessary to  
597 adjust the filling schedule of hatchery tanks in accordance with the availability of solar  
598 resources, such as using treated water during daylight hours to fill the hatchery tanks with  
599 disinfected seawater in the evening. In reality, hatcheries do not have just one tank, but  
600 several parallel ones that also need to be filled. To optimize the use of the photoreactor, it

601 would be possible to fill the different tanks on different days. In addition, many facilities have  
602 seawater reserves of several hundred cubic meters upstream of nurseries and hatcheries.  
603 These seawater reserves are often subjected to natural solar irradiation with a large irradiated  
604 surface area and low seawater thickness, making them an ideal candidate for photocatalysis.  
605 These basins could be easily adapted for pool-type photoreactors which are proving to be  
606 robust and easy to use pilots [68].

607 The process as presented in this study with these treatment capacities and dimensions can  
608 also be adapted for experimental plants. In fact, these plants are scale models of industrial  
609 aquaculture plants and therefore require lower treatment volumes [8]. For example, Ifremer's  
610 marine mollusk platform (near Nantes, in Bouin, France) has a small hatchery for studying  
611 larval rearing, either continuously in small 5 L reactors or batchwise in 30 L tanks [8].  
612 Considering the treatment capacities per square meter demonstrated in our study, it appears  
613 highly suitable to explore applications for this type of experimental facility. Like many  
614 aquaculture facilities, the experimental platform features settling tanks of several hundred  
615 square meters in size, with low water volumes and large irradiated surfaces, facilitating the  
616 use of solar resources for photocatalysis [9]. In the case of experimental platforms, the  
617 effluent leaving the platform also needs to be disinfected before being released into the  
618 environment, to avoid discharging pathogens or other non-endemic biological compounds.

## 619 2. Conclusion

620 This study focused on the production of biosecure seawater for oyster farming and  
621 production applications. The water used must comply with certain constraints in terms of both  
622 biological quality and volumes available per day. In this context, a preliminary study aimed at

623 estimating the daily capacity of a solar photo reactor was proposed using a three-stage  
624 approach.

625 The first part was dedicated to the selection of a kinetic model representative of the  
626 bacterial inactivation process, followed by the identification of the key kinetic parameters. A  
627 kinetic model, established with a number of reduced parameters, has proven to be  
628 representative of the experimental results obtained under different operating conditions. The  
629 experiments carried out for different concentrations of target bacteria and under different  
630 irradiation conditions were well represented by the selected model. This model also enabled  
631 us to highlight the influence of the two key variables, bacterial concentration and flux density.  
632 The focus was then placed on predicting processing capacity under solar irradiation  
633 conditions. Irradiation setpoints representative of daily and monthly sunshine were applied.  
634 Fluctuations in irradiation conditions on a seasonal scale (length of day and daily flux density  
635 cycle), as well as intermittency linked to meteorological conditions, were taken into account  
636 to establish the photoreactor's capacity to treat the bacteria contained in seawater. First of  
637 all, it emerged that the length of the day, which varies according to the season, is a key point  
638 for scaling up the reactor. Optimum daily treatment rates were achieved at low flow densities,  
639 and a concentration plateau, independent of high flux density, was obtained from the first few  
640 hours of sunshine. It has also been shown that the flux densities are insufficient to achieve a  
641 99% inactivation rate, whereas the treatment is very effective in the middle of the day (higher  
642 than 99.99%).

643 In order to manage the intermittency of the solar resource, it was proposed to  
644 modulate the feed rate according to the irradiation conditions. The flow rate for each flux  
645 density received during the day has been adapted to comply with an inactivation rate of 99%.  
646 This alternative makes it possible to manage the intermittency associated with the solar



647 resource, by obtaining volumes of seawater capable of meeting production requirements  
648 while complying with removal constraints for the targeted pathogenic bacterial strain.

649 Finally, based on our results, we proposed to predict the treatment capacities for  
650 different oyster farming applications. Because of the specific nature of the solar resource and  
651 the very high biosecured seawater requirements of oyster farming both in terms of volume  
652 and flow rate, photoreactors are not suitable for large-scale applications. However, this  
653 technological solution could be deployed for more specific uses that consume less water. The  
654 use of seawater for oyster nurseries, or the development of pre-industrial installations,  
655 corresponding to daily volumes of the order of a few m<sup>3</sup>, could be envisaged.

## 656 References

- 657 [1] B. Petton, D. Destoumieux-Garzón, F. Pernet, E. Toulza, J. de Lorgeril, L. Degremont, G.  
658 Mitta, The Pacific Oyster Mortality Syndrome, a Polymicrobial and Multifactorial Disease:  
659 State of Knowledge and Future Directions, *Front. Immunol.* 12 (2021) 630343.  
660 <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.630343>.
- 661 [2] W.L. King, C. Jenkins, J.R. Seymour, M. Labbate, Oyster disease in a changing  
662 environment: Decrypting the link between pathogen, microbiome and environment, *Mar.*  
663 *Environ. Res.* 143 (2019) 124–140. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2018.11.007>.
- 664 [3] J. Go, A. Deutscher, Z. Spiers, K. Dahle, P. Kirkland, C. Jenkins, Mass mortalities of  
665 unknown aetiology in Pacific oysters *Crassostrea gigas* in Port Stephens, New South Wales,  
666 Australia, *Dis. Aquat. Organ.* 125 (2017) 227–242. <https://doi.org/10.3354/dao03146>.
- 667 [4] D. Oyanedel, A. Lagorce, M. Bruto, P. Haffner, A. Morot, Y. Dorant, S. De La Forest  
668 Divonne, F. Delavat, N. Inguibert, C. Montagnani, B. Morga, E. Toulza, C. Chaparro, J.-M.  
669 Escoubas, Y. Labreuche, Y. Gueguen, J. Vidal-Dupiol, J. De Lorgeril, B. Petton, L. Degremont, D.  
670 Tourbiez, L.-L. Pimparé, M. Leroy, O. Romatif, J. Pouzadoux, G. Mitta, F.L. Roux, G.M. Charrière,  
671 M.-A. Travers, D. Destoumieux-Garzón, Cooperation and cheating orchestrate *Vibrio*  
672 assemblages and polymicrobial synergy in oysters infected with OsHV-1 virus, (2023).  
673 <https://doi.org/10.1101/2023.02.11.528104>.
- 674 [5] H. Wang, B. Yang, X. Li, Q. Li, S. Liu, Screening of bacterial pathogens associated with  
675 mass summer mortality of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, in China, *Aquac. Rep.* 20 (2021)  
676 100672. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2021.100672>.
- 677 [6] D. Saulnier, S. De Decker, P. Haffner, L. Cobret, M. Robert, C. Garcia, A Large-Scale  
678 Epidemiological Study to Identify Bacteria Pathogenic to Pacific Oyster *Crassostrea gigas* and  
679 Correlation Between Virulence and Metalloprotease-like Activity, *Microb. Ecol.* 59 (2010) 787–  
680 798. <https://doi.org/10.1007/s00248-009-9620-y>.
- 681 [7] A.L. Bourquet, C. Meneur, G. Oudot, P. Bodin, A. Granet, P. Blanchier, T. Renault, B.  
682 Morga, Mortalités d’huîtres creuse *Crassostrea gigas* : Étude du prégrossissement d’huîtres en

- 683 marais salé en réponse aux mortalités, 2016. <https://creaa.pagesperso->  
684 [orange.fr/Doc%20actualite/RappPr%C3%A9goMaraisDef.pdf](https://creaa.pagesperso-orange.fr/Doc%20actualite/RappPr%C3%A9goMaraisDef.pdf).
- 685 [8] Ifremer, Unité Expérimentale Mollusques Marins Atlantique, Les zones expérimentales  
686 de la Plateforme Molusque Marin de Bouin, EMMA. (2022). <https://emma.ifremer.fr/La->  
687 [PMMB/Les-zones-experimentales/La-plateforme-securisee](https://emma.ifremer.fr/La-PMMB/Les-zones-experimentales/La-plateforme-securisee) (accessed October 10, 2023).
- 688 [9] Ifremer, Présentation de la Plateforme expérimentale Mollusques Marins de La  
689 Tremblade, EMMA. (2022). <https://emma.ifremer.fr/La-PMMLT/Presentation> (accessed  
690 October 10, 2023).
- 691 [10] M. Miguet, V. Goetz, G. Plantard, Y. Jaeger, Removal of a Chlorinated Volatile Organic  
692 Compound (Perchloroethylene) from the Aqueous Phase by Adsorption on Activated Carbon,  
693 *Ind. Eng. Chem. Res.* 54 (2015) 9813–9823. <https://doi.org/10.1021/acs.iecr.5b02364>.
- 694 [11] T. Janin, Traitement d'effluents phytosanitaires par héliocatalyse – Hybridation  
695 sorption/photocatalyse, 2011.
- 696 [12] V. Yangali-Quintanilla, S.K. Maeng, T. Fujioka, M. Kennedy, G. Amy, Proposing  
697 nanofiltration as acceptable barrier for organic contaminants in water reuse, *J. Membr. Sci.*  
698 362 (2010) 334–345. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2010.06.058>.
- 699 [13] C. Bellona, J. Drewes, Viability of a low-pressure nanofilter in treating recycled water  
700 for water reuse applications: A pilot-scale study, *Water Res.* 41 (2007) 3948–3958.  
701 <https://doi.org/10.1016/j.watres.2007.05.027>.
- 702 [14] J. Mendret, A. Azais, T. Favier, S. Brosillon, Urban wastewater reuse using a coupling  
703 between nanofiltration and ozonation: Techno-economic assessment, *Chem. Eng. Res. Des.*  
704 145 (2019) 19–28. <https://doi.org/10.1016/j.cherd.2019.02.034>.
- 705 [15] J.B. Gálvez, S.M. Rodríguez, Solar detoxification; 2003, (n.d.).
- 706 [16] J.-M. Herrmann, Heterogeneous photocatalysis: state of the art and present  
707 applications In honor of Pr. R.L. Burwell Jr. (1912–2003), Former Head of Ipatieff Laboratories,  
708 Northwestern University, Evanston (Ill)., *Top. Catal.* 34 (2005) 49–65.  
709 <https://doi.org/10.1007/s11244-005-3788-2>.
- 710 [17] C. Minero, Kinetic analysis of photoinduced reactions at the water semiconductor  
711 interface, *Catal. Today.* 54 (1999) 205–216. [https://doi.org/10.1016/S0920-5861\(99\)00183-2](https://doi.org/10.1016/S0920-5861(99)00183-2).
- 712 [18] N. Serpone, Relative photonic efficiencies and quantum yields in heterogeneous  
713 photocatalysis, (1997).
- 714 [19] T. Janin, V. Goetz, S. Brosillon, G. Plantard, Solar photocatalytic mineralization of 2,4-  
715 dichlorophenol and mixtures of pesticides: Kinetic model of mineralization, *Sol. Energy.* 87  
716 (2013) 127–135. <https://doi.org/10.1016/j.solener.2012.10.017>.
- 717 [20] brice Reoyo-Prats, J.-C. Claire, H. Mouldi, G. Vincent, C.-B. Carole, P. Gaël, Photo-  
718 oxidation of three major pharmaceuticals in urban wastewater under artificial and solar  
719 irradiations, *J. Photochem. Photobiol. Chem.* 425 (2022) 113673.  
720 <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2021.113673>.
- 721 [21] B. Reoyo-Prats, S. Anastasia, K. Somar, L.G.L. Corinne, W. Karine, G. Vincent, P. Gaël,  
722 Continuous degradation of micropollutants in real world treated wastewaters by  
723 photooxidation in dynamic conditions, *Water Res.* 221 (2022) 118777.  
724 <https://doi.org/10.1016/j.watres.2022.118777>.
- 725 [22] M. Kacem, G. Plantard, M. Brienza, V. Goetz, Continuous-Flow Aqueous System for  
726 Heterogeneous Photocatalytic Disinfection of Gram-Negative *Escherichia coli*, *Ind. Eng. Chem.*  
727 *Res.* 56 (2017) 15001–15007. <https://doi.org/10.1021/acs.iecr.7b03644>.
- 728 [23] M. Kacem, V. Goetz, G. Plantard, N. Wery, Modeling heterogeneous photocatalytic  
729 inactivation of *E. coli* using suspended and immobilized TiO<sub>2</sub> reactors, *AIChE J.* 61 (2015)

- 730 2532–2542. <https://doi.org/10.1002/aic.14834>.
- 731 [24] M. Kacem, G. Plantard, N. Wery, V. Goetz, Kinetics and efficiency displayed by  
732 supported and suspended TiO<sub>2</sub> catalysts applied to the disinfection of *Escherichia coli*, *Chin.*  
733 *J. Catal.* 35 (2014) 1571–1577. [https://doi.org/10.1016/S1872-2067\(14\)60212-6](https://doi.org/10.1016/S1872-2067(14)60212-6).
- 734 [25] M. Becker, M. Böhmer, *Solar Thermal Concentrating Technologies*, in: Vol 1 - 3 Proc.  
735 8th Int. Symp. Sol. Therm. Conc. Technol. Köln Oct. 6 - 11 1996, C.F. Müller, Heidelberg, 1997.  
736 <https://elib.dlr.de/31072/> (accessed October 20, 2023).
- 737 [26] F. Correia, V. Goetz, G. Plantard, D. Sacco, A Model for Solar Photocatalytic  
738 Mineralization, *J. Sol. Energy Eng.* 133 (2011) 031002. <https://doi.org/10.1115/1.4004242>.
- 739 [27] S. Malato, P. Fernández-Ibáñez, M.I. Maldonado, J. Blanco, W. Gernjak,  
740 Decontamination and disinfection of water by solar photocatalysis: Recent overview and  
741 trends, *Catal. Today.* 147 (2009) 1–59. <https://doi.org/10.1016/j.cattod.2009.06.018>.
- 742 [28] V. Goetz, C. Dezani, E. Ribeiro, C. Caliot, G. Plantard, Continuous flow photocatalytic  
743 reactor using TiO<sub>2</sub> -coated foams, modeling and experimental operating mode, *AIChE J.* 69  
744 (2023) e17972. <https://doi.org/10.1002/aic.17972>.
- 745 [29] J. Blanco, S. Malato, P. Fernández-Ibáñez, D. Alarcón, W. Gernjak, M.I. Maldonado,  
746 Review of feasible solar energy applications to water processes, *Renew. Sustain. Energy Rev.*  
747 13 (2009) 1437–1445. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2008.08.016>.
- 748 [30] S. Malato Rodríguez, J. Blanco Gálvez, M.I. Maldonado Rubio, P. Fernández Ibáñez, D.  
749 Alarcón Padilla, M. Collares Pereira, J. Farinha Mendes, J. Correia De Oliveira, Engineering of  
750 solar photocatalytic collectors, *Sol. Energy.* 77 (2004) 513–524.  
751 <https://doi.org/10.1016/j.solener.2004.03.020>.
- 752 [31] G. Plantard, C. Dezani, E. Ribeiro, B. Reoyo-Prats, V. Goetz, Modelling heterogeneous  
753 photocatalytic oxidation using suspended TiO<sub>2</sub> in a photoreactor working in continuous  
754 mode: Application to dynamic irradiation conditions simulating typical days in July and  
755 February, *Can. J. Chem. Eng.* 99 (2021) 142–152. <https://doi.org/10.1002/cjce.23870>.
- 756 [32] A.V. Emeline, V. Ryabchuk, N. Serpone, Factors affecting the efficiency of a  
757 photocatalyzed process in aqueous metal-oxide dispersions Prospect of distinguishing  
758 between two kinetic models, (2000) 9.
- 759 [33] G. Plantard, V. Goetz, Experimental and numerical studies of a solar photocatalytic  
760 process in a dynamic mode applied to three catalyst media, *Chem. Eng. Process. Process*  
761 *Intensif.* 62 (2012) 129–136. <https://doi.org/10.1016/j.cep.2012.08.002>.
- 762 [34] V. Goetz, T. Janin, G. Plantard, S. Brosillon, Hybridation between Heterogeneous  
763 Photocatalysis and Adsorption, *Int. J. Eng. Pract. Res.* 2 (2013).
- 764 [35] P.S.M. Dunlop, C.P. Sheeran, J.A. Byrne, M.A.S. McMahon, M.A. Boyle, K.G. McGuigan,  
765 Inactivation of clinically relevant pathogens by photocatalytic coatings, *J. Photochem.*  
766 *Photobiol. Chem.* 216 (2010) 303–310. <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2010.07.004>.
- 767 [36] S. Kim, K. Ghafoor, J. Lee, M. Feng, J. Hong, D.-U. Lee, J. Park, Bacterial inactivation in  
768 water, DNA strand breaking, and membrane damage induced by ultraviolet-assisted titanium  
769 dioxide photocatalysis, *Water Res.* 47 (2013) 4403–4411.  
770 <https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.05.009>.
- 771 [37] C. Blanchon, Heterogeneous photo-oxidation in microbial inactivation\_ A promising  
772 technology for seawater bio-securing?, (2023).
- 773 [38] H. Chick, An Investigation of the Laws of Disinfection, *J. Hyg. (Lond.)*. 8 (1908) 92–158.  
774 <https://doi.org/10.1017/S0022172400006987>.
- 775 [39] O.K. Dalrymple, E. Stefanakos, M.A. Trotz, D.Y. Goswami, A review of the mechanisms  
776 and modeling of photocatalytic disinfection, (2010) 12.



- 777 [40] O.K. Dalrymple, D.Y. Goswami, Mechanistic Modeling of Photocatalytic Water  
778 Disinfection, in: T. An, H. Zhao, P.K. Wong (Eds.), *Adv. Photocatalytic Disinfect.*, Springer Berlin  
779 Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2011: pp. 273–315. [https://doi.org/10.1007/978-3-662-](https://doi.org/10.1007/978-3-662-53496-0_13)  
780 [53496-0\\_13](https://doi.org/10.1007/978-3-662-53496-0_13).
- 781 [41] P. Ganguly, C. Byrne, A. Breen, S.C. Pillai, Antimicrobial activity of photocatalysts:  
782 Fundamentals, mechanisms, kinetics and recent advances, *Appl. Catal. B Environ.* 225 (2018)  
783 51–75. <https://doi.org/10.1016/j.apcatb.2017.11.018>.
- 784 [42] L.W. Hom, Kinetics of chlorine disinfection in an ecosystem, (1972).  
785 <https://ascelibrary.org/doi/pdf/10.1061/JSEDAI.0001370>.
- 786 [43] R.J.W. Lambert, M.D. Johnston, Disinfection kinetics: a new hypothesis and model for  
787 the tailing of log-survivor/time curves, *J. Appl. Microbiol.* 88 (2000) 907–913.  
788 <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.01060.x>.
- 789 [44] H.E. Watson, A Note on the Variation of the Rate of Disinfection with Change in the  
790 Concentration of the Disinfectant, *Epidemiol. Infect.* 8 (1908) 536–542.  
791 <https://doi.org/10.1017/S0022172400015928>.
- 792 [45] M. Otaki, T. Hirata, S. Ohgaki, Aqueous microorganisms inactivation by photocatalytic  
793 reaction, *Water Sci. Technol.* 42 (2000) 103–108. <https://doi.org/10.2166/wst.2000.0365>.
- 794 [46] C. Sichel, J. Tello, M. de Cara, P. Fernández-Ibáñez, Effect of UV solar intensity and dose  
795 on the photocatalytic disinfection of bacteria and fungi, *Catal. Today.* 129 (2007) 152–160.  
796 <https://doi.org/10.1016/j.cattod.2007.06.061>.
- 797 [47] C. McCullagh, J.M.C. Robertson, D.W. Bahnemann, P.K.J. Robertson, The application of  
798 TiO<sub>2</sub> photocatalysis for disinfection of water contaminated with pathogenic micro-organisms:  
799 a review, *Res. Chem. Intermed.* 33 (2007) 359–375.  
800 <https://doi.org/10.1163/156856707779238775>.
- 801 [48] D. Gumy, C. Morais, P. Bowen, C. Pulgarin, S. Giraldo, R. Hajdu, J. Kiwi, Catalytic activity  
802 of commercial TiO<sub>2</sub> powders for the abatement of the bacteria (*E. coli*) under solar  
803 simulated light: Influence of the isoelectric point, *Appl. Catal. B Environ.* 63 (2006) 76–84.  
804 <https://doi.org/10.1016/j.apcatb.2005.09.013>.
- 805 [49] F. Correia, *Etude expérimentale et modélisation de réacteurs photochimiques*  
806 *solaires : Performances de médias photocatalytiques*, 2011.
- 807 [50] M. Kacem, *Inactivation bactérienne par photocatalyse hétérogène Application à*  
808 *Escherichia coli*, 2015.
- 809 [51] C. Dezani, *Photo catalyse hétérogène en réacteurs ouverts pour la gestion de la*  
810 *ressource solaire : expérimentations sur différents médias et modélisations*, 2021.
- 811 [52] C. Dezani, E. Ribeiro, V. Goetz, G. Plantard, Continuous flow photoreactor undergoing  
812 variable simulated irradiation conditions: Experimentations and modeling, *Chem. Eng. J. Adv.*  
813 12 (2022) 100422. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2022.100422>.
- 814 [53] A. Cibrario, *Diversité génétique et phénotypique de l'espèce Brettanomyces*  
815 *bruxellensis: influence sur son potentiel d'altération des vins rouges*, 2019.
- 816 [54] A.H. Geeraerd, C.H. Herremans, J.F. Van Impe, Structural model requirements to  
817 describe microbial inactivation during a mild heat treatment, *Int. J. Food Microbiol.* 59 (2000)  
818 185–209. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00362-7](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00362-7).
- 819 [55] M.D. Labas, C.A. Martín, A.E. Cassano, Kinetics of bacteria disinfection with UV  
820 radiation in an absorbing and nutritious medium, *Chem. Eng. J.* 114 (2005) 87–97.  
821 <https://doi.org/10.1016/j.cej.2005.09.013>.
- 822 [56] J. Marugán, R. van Grieken, C. Sordo, C. Cruz, Kinetics of the photocatalytic disinfection  
823 of *Escherichia coli* suspensions, *Appl. Catal. B Environ.* 82 (2008) 27–36.

- 824 <https://doi.org/10.1016/j.apcatb.2008.01.002>.
- 825 [57] B.F. Severin, M.T. Suidan, R.S. Engelbrecht, Kinetic modeling of U.V. disinfection of  
826 water, *Water Res.* 17 (1983) 1669–1678. [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(83\)90027-1](https://doi.org/10.1016/0043-1354(83)90027-1).
- 827 [58] H. Baniamerian, M. Safavi, M. Alvarado-Morales, P. Tsapekos, I. Angelidaki, S.  
828 Shokrollahzadeh, Photocatalytic inactivation of *Vibrio fischeri* using Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-TiO<sub>2</sub>-based  
829 nanoparticles, *Environ. Res.* 166 (2018) 497–506.  
830 <https://doi.org/10.1016/j.envres.2018.06.011>.
- 831 [59] D. Rubio, E. Nebot, J.F. Casanueva, C. Pulgarin, Comparative effect of simulated solar  
832 light, UV, UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and photo-Fenton treatment (UV-Vis/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Fe<sup>2+</sup>,<sup>3+</sup>) in the *Escherichia*  
833 *coli* inactivation in artificial seawater, *Water Res.* 47 (2013) 6367–6379.  
834 <https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.08.006>.
- 835 [60] J. Marugán, R. van Grieken, A.E. Cassano, O.M. Alfano, Kinetic modelling of the  
836 photocatalytic inactivation of bacteria, *Water Sci. Technol.* 61 (2010) 1547–1553.  
837 <https://doi.org/10.2166/wst.2010.057>.
- 838 [61] J.C. Lagarias, J.A. Reeds, M.H. Wright, P.E. Wright, Convergence Properties of the  
839 Nelder–Mead Simplex Method in Low Dimensions, *SIAM J. Optim.* 9 (1998) 112–147.  
840 <https://doi.org/10.1137/S1052623496303470>.
- 841 [62] S. Malato, J. Cáceres, A.R. Fernández-Alba, L. Piedra, M.D. Hernando, A. Agüera, J. Vial,  
842 Photocatalytic Treatment of Diuron by Solar Photocatalysis: Evaluation of Main Intermediates  
843 and Toxicity, *Environ. Sci. Technol.* 37 (2003) 2516–2524. <https://doi.org/10.1021/es0261170>.
- 844 [63] S. Malato, J. Blanco, A. Vidal, C. Richter, Photocatalysis with solar energy at a pilot-  
845 plant scale: an overview, *Appl. Catal. B Environ.* 37 (2002) 1–15.  
846 [https://doi.org/10.1016/S0926-3373\(01\)00315-0](https://doi.org/10.1016/S0926-3373(01)00315-0).
- 847 [64] E. Ribeiro, G. Plantard, V. Goetz, TiO<sub>2</sub> grafted activated carbon elaboration by milling:  
848 Composition effect on sorption and photocatalytic properties, *J. Photochem. Photobiol.*  
849 *Chem.* 408 (2021) 113108. <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2020.113108>.
- 850 [65] E. Ribeiro, Composites Charbon-Actif/TiO<sub>2</sub> pour des applications solaires, 2020.
- 851 [66] E.D. Silva, Développement d’outils analytiques innovants pour le suivi des populations  
852 de *Vibrio* dans les environnements aquatiques, 2017.
- 853 [67] France Naissain, Prégrossissement (T8 à 55 unités/kg.), (2023).  
854 <https://www.francenaisain.com/nos-produits/pregrossissement-t8-a-55-unites-kg/>  
855 (accessed October 18, 2023).
- 856 [68] G. Plantard, B. Reoyo-Prats, A. Sellier, S. Khaska, C. Le Gall Lasalle, K. Weiss, V. Goetz,  
857 Performances of a pool-type photoreactor operating in continuous mode under solar  
858 irradiation for the treatment of pollutants contained in wastewater, *Chem. Eng. Sci.* (2023).  
859

860

861



#### IV. Résultats complémentaires : passage en réacteur continu et saturation du catalyseur

##### A. Inactivation par photocatalyse hétérogène, passage à une alimentation continue du photo-réacteur

La partie précédente a permis d'établir un modèle cinétique simple mais suffisamment robuste pour simuler l'inactivation bactérienne en eau de mer. La loi cinétique sélectionnée permet de prendre en compte les deux paramètres clefs de la photocatalyse : les limitations par le transfert de photons et par le transfert de matière. L'objectif est ici de vérifier que le modèle retenu pour des conditions de type batch et utilisé pour simuler une inactivation en continu, permet de prédire de façon satisfaisante l'inactivation bactérienne en régime continu.

Pour cela, le pilote présenté en Figure 15 a été utilisé en ajoutant une boucle d'alimentation et de soutirage sur la boucle de recirculation. L'alimentation du réacteur se fait au niveau de la boucle de recirculation, en amont du photo-réacteur. Le soutirage est également réalisé au niveau de la boucle de recirculation directement en aval du photo-réacteur. L'alimentation et le soutirage sont tous deux réalisés à l'aide d'une pompe péristaltique (Watson Marlow 205U) permettant d'appliquer un débit entre 0 et 9 mL.min<sup>-1</sup>. Les expériences d'inactivation en réacteur ouvert (système continu) ont été réalisées avec des irradiations constantes comprises entre 20 et 45 W.m<sup>-2</sup> pour des concentrations bactériennes de la solution d'alimentation autour de 10<sup>6</sup> UFC.mL<sup>-1</sup> et avec un débit d'alimentation constant compris entre 2.5 et 9 mL.min<sup>-1</sup> (tableau 4). Chacune des expériences a été réalisée en triplicats de même que les dénombrements bactériens. Pour chaque expérience, la concentration bactérienne dans l'eau de mer a été vérifiée avant enrichissement en *Vibrio* par étalement de 200 µL d'eau sur boîte de Marine agar. La concentration en bactéries dans la solution d'alimentation a également été mesurée tout au long de l'expérience et aucune croissance n'a été observée.

Tableau 4: conditions expérimentales de photocatalyse en fonctionnement continu

	Concentration en <i>Vibrio harveyi</i> dans la solution d'alimentation (UFC.mL <sup>-1</sup> )	Débit d'alimentation et soutirage (mL.min <sup>-1</sup> )	Concentration en TiO <sub>2</sub> aeroperl (g.L <sup>-1</sup> )	Densité de flux appliquée (W.m <sup>-2</sup> )
Condition N°1	10 <sup>6</sup>	2.5	4	45
Condition N°2		5		
Condition N°3		9		
Condition N°4		5		20

Les moyennes des cinétiques d'inactivation des répliquats en continu sont présentées sur la figure 19. Les courbes simulées affichent un profil d'inactivation typique d'un fonctionnement en continu avec deux régimes de fonctionnement : le régime transitoire et le régime permanent. Lorsque le réacteur fonctionne en régime transitoire, l'équilibre entre l'apport en bactéries et l'inactivation bactérienne n'est pas encore atteint, c'est-à-dire que les bactéries contenues dans le photo-réacteur sont dégradées plus rapidement que l'apport de nouvelles bactéries n'a lieu. Une fois le temps de séjour dépassé, le régime permanent est atteint et la quantité de bactéries apportées par l'alimentation est égale à la quantité de bactéries inactivées par la photocatalyse dans le réacteur, il n'y a plus de variation de la concentration dans le réacteur et en sortie, on parle d'équilibre du réacteur. Ce profil

d'inactivation se retrouve bien sur les simulations et ce, quelles que soient les conditions étudiées, avec une valeur de la concentration bactérienne à l'équilibre étant directement corrélée avec le débit d'alimentation appliqué.

La comparaison des cinétiques d'inactivation expérimentales et simulées (figure 19) montre des divergences significatives. En effet, la première partie de la cinétique, jusqu'à 1h30, est bien représentée par les simulations. Cela correspond au fonctionnement en régime transitoire du réacteur ainsi qu'à une partie de régime permanent. Ce dernier est atteint entre 30 et 45 minutes en fonction du débit d'alimentation appliqué. En revanche, après 1h30, un ralentissement de la vitesse d'inactivation a été observé expérimentalement. La concentration en sortie du réacteur remonte jusqu'à atteindre une concentration proche de l'alimentation (figure 19).

Lors des expériences en continu, le photo-réacteur est alimenté avec une suspension bactérienne contenant déjà le dioxyde de titane, il est possible que celui-ci s'encrasse. Cet encrassement pourrait avoir plusieurs origines. Il peut s'agir d'une part d'une saturation du  $TiO_2$  par les bactéries et les débris cellulaires qui pourraient s'adhérer à la surface de celui-ci. D'autre part, un encrassement par les sels dissous pourrait également être la cause de la perte d'activité observée après 1h30 de photocatalyse. En effet, des phénomènes d'encrassement du catalyseur ont déjà été reportés dans la littérature (Rubio et al., 2013a). Ces deux hypothèses seront développées dans la suite du travail.

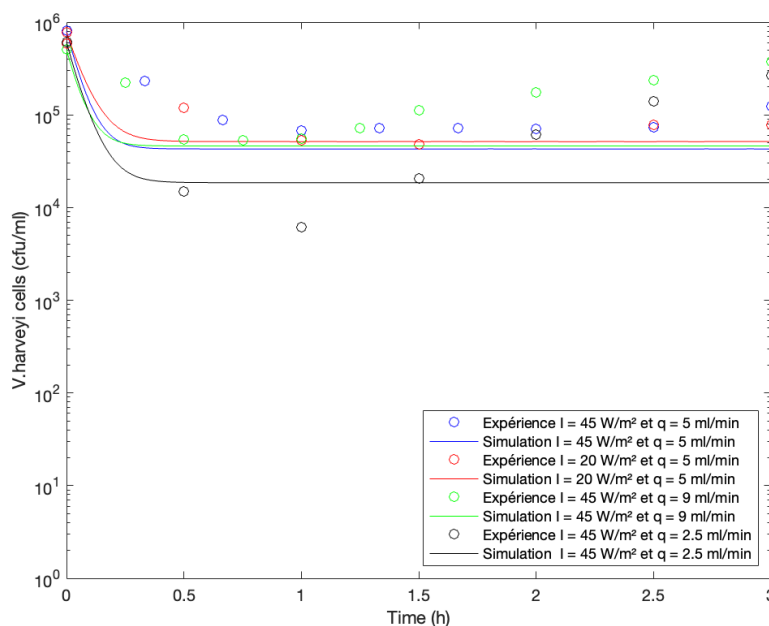


Figure 19 : comparaison des résultats expérimentaux de photocatalyse en système continu avec les simulations pour l'inactivation d'une solution d'eau de mer contenant  $10^4$  UFC.mL<sup>-1</sup> de *Vibrio harveyi* ainsi que  $4$  g.L<sup>-1</sup> de dioxyde de titane aeroperl. Chaque point expérimental représente la valeur moyenne de 3 expérimentations indépendantes avec un coefficient de variation inférieur à 35%.

## B. Saturation de la surface du dioxyde de titane par les bactéries et/ou débris cellulaires

L'objectif étant de vérifier si le catalyseur reste opérationnel sur de longues périodes d'utilisation comme c'est le cas en régime continu, les observations des bactéries à la surface de ce dernier ont été réalisées au cours d'une cinétique d'inactivation bactérienne en régime continu (condition N°2 du tableau 2). Deux approches d'imagerie complémentaires ont été

utilisées pour visualiser, d'une part, les bactéries vivantes à la surface du catalyseur et d'autre part, les bactéries totales qu'elles soient vivantes ou mortes : (i) la microscopie à fluorescence permettant de visualiser les bactéries vivantes, et (ii) la microscopie électronique à balayage (MEB).

La souche de *Vibrio harveyi* utilisée pour les expériences de traitement exprime la GFP, ce qui permet un suivi simple des bactéries vivantes. Les lames ont été obtenues en déposant une goutte d'échantillon (sans décantation préalable du catalyseur) avec une goutte de fixateur Dako Fluorescence Mounting Medium (Agilent, S3023) entre lame et lamelle. Les lames ont ensuite été stockées 72 h à +4°C avant lecture au microscope confocal inversé (LSM 700 Zeiss, de la plateforme Bio-Environnement, Université Perpignan Via Domitia).

Pour l'analyse par microscopie électronique à balayage, les échantillons ont été préparés à partir du protocole de Wang et al. (2021). Brièvement, les bactéries présentes en surface du dioxyde de titane contenu dans 1 mL d'échantillon ont été fixés au glutaraldéhyde 2.5% pendant 2 h (glutaraldéhyde 2.5% dans du tampon phosphate (DPBS, pH 7,4) à 0.1 M dont l'osmolarité a été ajustée à 12 000 mOsm, osmolarité de l'eau de mer). Les bactéries présentes à la surface du dioxyde de titane ont ensuite été rincées 3 fois au tampon phosphate à 0.1 M avant d'être déshydratées à l'éthanol à partir de rinçages successifs dans de l'éthanol à 30, 50, 70, 90 puis 100%. Une fois la déshydratation effectuée, les échantillons ont été séchés au point critique puis métallisés sous flux de platine afin de ne pas avoir de charge en surface (métalliseur SAFEMATIC CCU-010). Enfin, les échantillons ont été analysés en microscopie électronique à balayage (JEOL, IT800 SHL LV).

La présence de bactéries intègres et/ou dégradées à la surface du catalyseur a été analysée par MEB (figures 20a à e). *Vibrio harveyi* est une bactérie Gram négatif avec une forme de bacilles d'un diamètre de 0,5 à 1 µm et d'une longueur de 1,2 à 3,5 µm. Avant que l'opération de désinfection ne commence, le nombre de *Vibrio* observés est limité (figure 20a). Toutes les observations montrent des *Vibrio* avec des parois intègres. Une fois que le traitement a démarré, d'une part, le nombre de bactéries à la surface du catalyseur augmente mais, d'autre part, les bactéries observées présentent des parois altérées (figure 20c et d). L'altération de ces dernières est d'autant plus marquée que le temps de traitement est important.

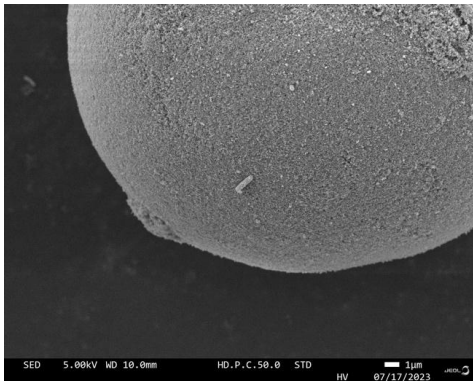
En complément de cette analyse, la présence de bactéries vivantes à la surface du catalyseur a été étudiée par microscopie à fluorescence. La souche de *Vibrio harveyi* utilisée pour l'étude de la photocatalyse est une souche exprimant la GFP. Les bactéries vivantes peuvent donc directement être observées par microscopie à fluorescence (figures 20f à j). Les bactéries apparaissent en vert et les particules de dioxyde de titane en blanc. Ces analyses confirment les résultats déjà obtenus par utilisation du MEB. La concentration de *Vibrio* à la surface du catalyseur augmente au cours du temps de photocatalyse. Pour des temps longs de traitement et en particulier 2h et 5h30 de photocatalyse (figures 20i et j), la concentration en *Vibrio* entre les particules de TiO<sub>2</sub> augmente fortement. Ces résultats apparaissent cohérents avec les dénombrements réalisés sur milieu Marine Agar. Notons que la surface du catalyseur n'est pas saturée par *Vibrio*. Ils apparaissent à la surface en nombre limité et de manière dispersée.

Si nous comparons les deux méthodologies, nous constatons que la quantité de bactéries à la surface du catalyseur détectée avec le MEB est nettement plus faible que celle détectée en fluorescence. Ce résultat semble en contradiction avec la théorie. La fluorescence de la GFP permet de détecter uniquement les bactéries vivantes et non les bactéries

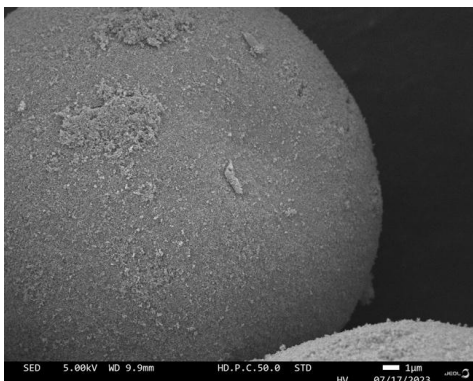
dégradées là où le MEB permet de détecter à la fois les bactéries vivantes et mortes. Il est probable que la méthode appliquée pour la préparation des échantillons au MEB ne soit pas suffisamment adaptée à nos conditions opératoires et qu'il faudrait par conséquent, pratiquer un développement méthodologique plus abouti. La faible quantité de *Vibrio* visualisés en MEB pourrait provenir d'un décrochage d'une partie de ceux-ci lors des nombreuses étapes de lavages. En effet, les interactions entre les bactéries et le catalyseur sont des interactions faibles essentiellement dues aux interactions électrostatiques de type Van der Waals (Dalrymple and Goswami, 2011).

En conclusion, le nombre de bactéries augmente à la surface du  $\text{TiO}_2$ , au cours de l'opération de traitement, mais les microorganismes ne recouvrent *in fine* qu'une faible partie de sa surface. À l'aune de ces résultats, il est difficile de conclure sur l'origine de la perte d'activité photocatalytique et en particulier, le phénomène d'adhérence microbienne n'est pas en mesure d'expliquer à lui seul la perte d'activité photocatalytique observée au cours du temps.

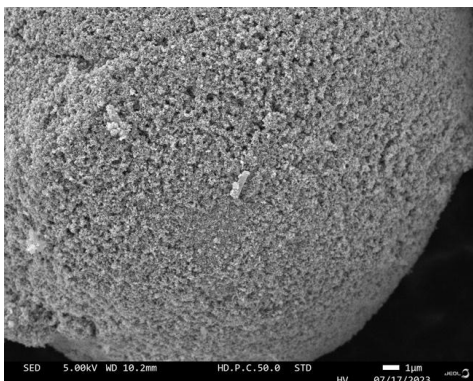
a.



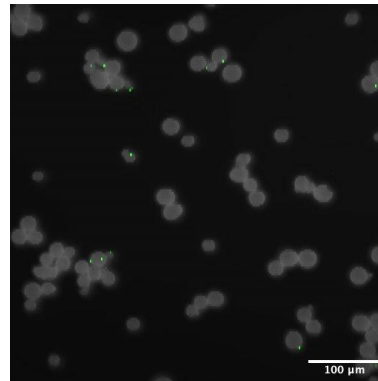
b.



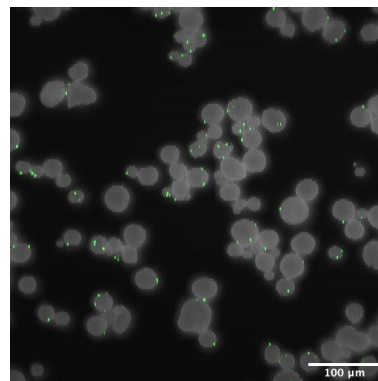
c.



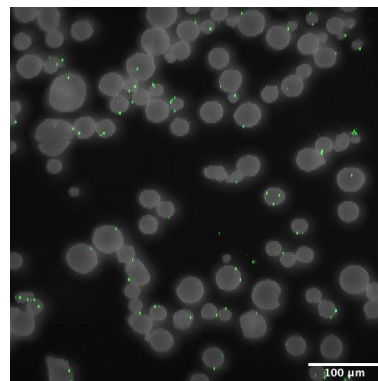
f.



g.



h.



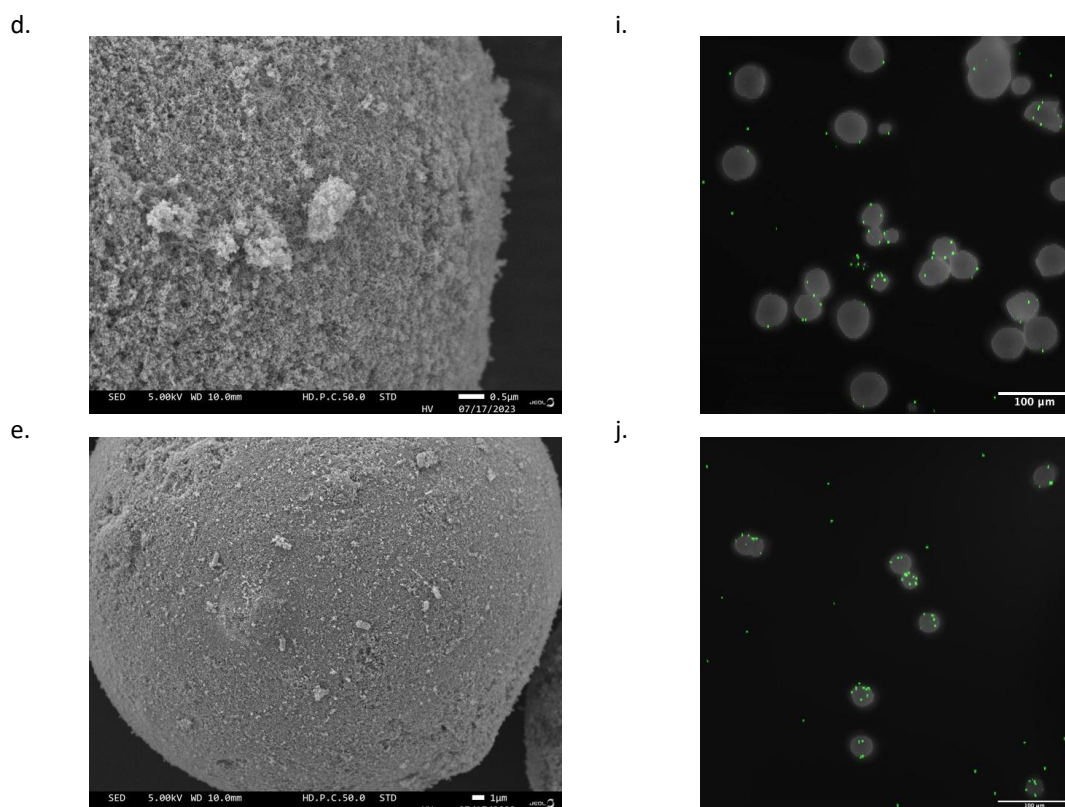


Figure 20 : Observation des *Vibrio harveyi* à la surface du catalyseur au cours d'une cinétique d'inactivation par photocatalyse en réacteur continu. (a) à (e) sont les images obtenues par microscopie électronique à balayage et (f) à (j) les images obtenues par microscopie inversé (grossissement x25 (oil)) avec la GFP des bactéries vivantes en vert, à l'instant initiale (a) et (f), après 20 min (b) et (g), après 40 min (c) et (h), après 2 h (d) et (i), et après 5h30 de photocatalyse (e) et (j).

### C. Recouvrement du dioxyde de titane par les sels

Afin de vérifier si la perte d'activité du catalyseur est causée la présence de sels dans le milieu réactionnel ou par le fonctionnement du réacteur en continu, trois expériences successives de 1 h en réacteur fermé ont été réalisées en conservant le même dioxyde de titane. En effet, avec une utilisation du réacteur en continu, la perte d'activité apparaît après 1h30 de fonctionnement; cela s'avère être un fonctionnement plus long que pour les inactivations en batch. Pour cela, le dioxyde de titane a été récupéré par décantation à la fin de chaque expérience de photocatalyse puis réutilisé pour la suivante. Les conditions opératoires des différentes expériences de photocatalyse étaient les mêmes, à savoir, une concentration initiale en *Vibrio harveyi* de  $3.4 \times 10^4 \pm 2.19 \times 10^4$  UFC.mL<sup>-1</sup>, une concentration en catalyseur de 4 g.L<sup>-1</sup>, une irradiation de 45 W.m<sup>-2</sup> (condition N°5 du tableau 1).

La figure 21 représente les cinétiques d'inactivation de *Vibrio harveyi* pour chacune des expériences de réutilisation du catalyseur. Pour l'expérience N°1, la cinétique est comparable à celle présentée précédemment (figure 18a) et atteint rapidement une inactivation de 99.99%, correspondant à la limite de détection de la méthode, soit une concentration inférieure à 10<sup>2</sup> UFC.mL<sup>-1</sup>. En revanche, nos résultats montrent qu'il n'y a aucune activité catalytique dès la deuxième utilisation du catalyseur (expériences N°2 et 3). La perte d'activité du catalyseur ne semble donc pas provenir du mode de fonctionnement batch ou continu du réacteur, mais bien d'un phénomène de colmatage du TiO<sub>2</sub>. En effet, si le mode de fonctionnement du réacteur avait induit la perte d'activité, les cinétiques



d'inactivations en réacteur fermé auraient été les mêmes pour les trois expériences. La perte d'activité observée ici corrobore donc les phénomènes de recouvrement déjà observés dans la littérature pour des catalyseurs supportés à base de  $\text{TiO}_2$  (Rubio et al., 2013a). En revanche, la perte d'activité observée ici apparaît nettement plus rapidement que celle observée par Rubio et al. (2013). Ceci pourrait provenir de la forme du catalyseur. En effet, l'utilisation d'un catalyseur sous forme de poudre micrométrique augmente la surface de contact comparé à un film. De la même manière que l'utilisation de poudre améliore l'homogénéisation et donc le transfert de matière des cibles vers le catalyseur (Kacem et al., 2014), cela améliore également le transfert des sels vers la surface du catalyseur, ce qui accélère le phénomène de recouvrement de ce dernier.

En conclusion, la perte d'activité photocatalytique semblerait provenir de dépôt de sels à la surface du catalyseur mais des analyses supplémentaires s'avèrent nécessaires pour le confirmer.

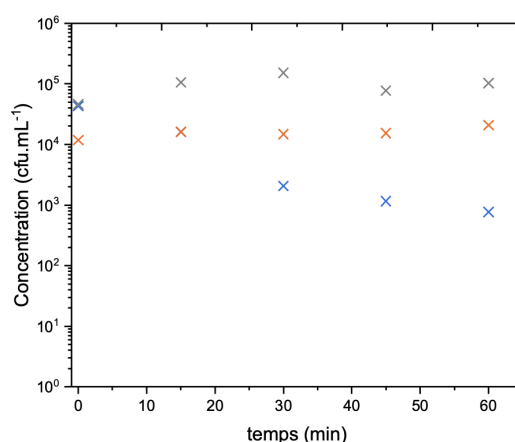


Figure 21 : comparaison des cinétiques d'inactivation de *Vibrio harveyi* en réacteur fermé avec réutilisation du catalyseur entre les expériences d'inactivation d'une solution d'eau de mer contenant  $10^4$  UFC.mL<sup>-1</sup> de *Vibrio harveyi* ainsi que  $4 \text{ g.L}^{-1}$  de dioxyde de titane aeroperl pour une irradiation de  $45 \text{ W.m}^{-2}$ . (·) première, (·) deuxième, et (·) troisième utilisation du  $\text{TiO}_2$

## V. Conclusions et perspectives

Le processus d'inactivation bactérienne par photocatalyse est complexe. Cette complexité est accentuée par l'utilisation d'eau de mer, certainement à cause des fortes concentrations en sels. Il pourrait néanmoins être envisagé d'entrecouper le cycle de photocatalyse avec des cycles de rinçage de catalyseur par exemple la nuit, lorsque la ressource solaire n'est pas disponible. Le développement et l'utilisation de catalyseurs de polarité différents pourrait également être envisagé (Levchuk et al., 2019).

Dans ce chapitre, nous avons également vu que l'utilisation d'un modèle simple pour expliquer et simuler une inactivation en eau de mer était satisfaisant et efficace pour prévoir les expositions de courte durée. Néanmoins, des imprécisions persistent dans l'approche utilisée. En effet, la modélisation a été effectuée à partir de données en système fermé pour lesquelles il est simple et possible de représenter les différents phénomènes visibles au niveau des bactéries. En effet, l'inactivation bactérienne se décompose en plusieurs phases. Il faut plusieurs attaques de ROS pour que les cellules bactériennes perdent leur faculté à se développer et ne plus être considérées comme vivantes lors des suivis. Dans cette étude, et comme dans les études de la littérature, nous avons utilisé l'instruction conditionnelle pour représenter les différents phénomènes, à savoir le plateau initial puis l'inactivation suivant la

loi cinétique définie. Cette méthode est très performante pour représenter ce qui a lieu dans un système fermé, mais se révèle inadéquate pour être appliquée à l'étude d'un système ouvert. Actuellement en système ouvert, la durée du plateau initial est négligée au regard du temps de séjour des bactéries dans le réacteur, ce qui induit un biais expérimental non négligeable dans les prévisions sur la zone transitoire comme cela a été démontré dans notre travail. En effet, même si la simulation nous a permis de bien représenter l'inactivation dans cette phase transitoire, un écart persiste néanmoins entre les données expérimentales et les simulations réalisées.

Pour réduire cet écart, il serait donc intéressant d'appliquer d'autres modèles plus complexes tout en conservant une écriture simple dans laquelle les différents paramètres sont explicables et présentent réellement une signification physique. Un modèle mathématique utilisé en virologie, le modèle SIR (Susceptible, Infecté, Résistant), pourrait être intéressant à tester dans nos conditions opératoires et cela nécessiterait d'être approfondi (Kowalski et al., 2020; Luz et al., 2010). Historiquement, le modèle SIR a été développé pour traduire la propagation virale au sein d'une population, c'est notamment le modèle qui a été fortement utilisé lors de la pandémie de la COVID pour prédire la propagation de l'épidémie (Bacaër, 2020). Ce modèle traduit le passage d'individus sensibles à la maladie à infectés puis résistants comme le montre la figure 22. Ce type de modèle semble donc particulièrement intéressant puisqu'il permettrait de traduire le passage des bactéries d'un état "résistant" caractérisé par le plateau observé en début de traitement batch à un état "sensible" pour lequel on retrouve la cinétique d'inactivation déterminée dans ce travail de thèse. La complexité de l'écriture du modèle pour l'inactivation par photocatalyse réside dans l'évolution constante de la population bactérienne au cours du temps avec l'apport de nouveaux individus par l'alimentation du réacteur et la disparition d'une partie par le soutirage. Il est également important de réussir à traduire un "temps de latence" pour caractériser le passage de l'état "résistant" à "sensible" ce qui complexifie d'autant plus l'écriture mathématique et la résolution des équations différentielles. Ces modèles étant déjà utilisés pour prédire le développement de maladies au sein de population (Lupo et al., 2019), le modèle d'inactivation développé pourrait être couplé à celui de propagation de la maladie pour prédire le comportement d'installation aquacole et prévenir l'apparition de mortalités.

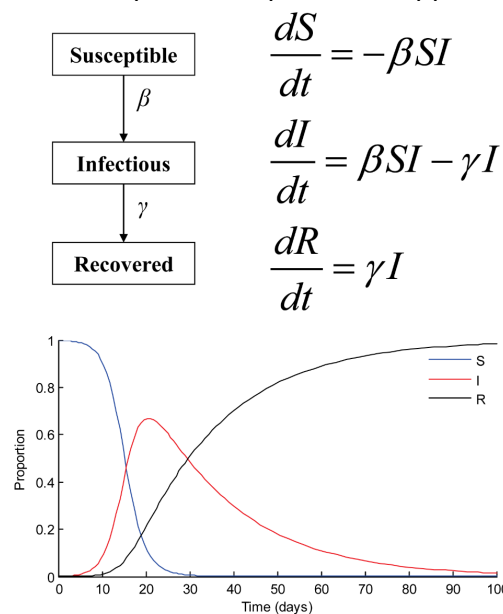


Figure 22 : principe du modèle SIR avec un exemple d'équation utilisé en virologie (Luz et al., 2010)

## **Conclusion générale et perspectives**



En raison d'une augmentation rapide de la demande en produits de la mer couplée à une augmentation des activités humaines, les zones côtières sont soumises à des pressions anthropiques de plus en plus importantes contribuant à modifier les caractéristiques biotiques et abiotiques des eaux. Ces modifications ont de fortes répercussions sur l'écosystème marin, notamment au niveau des communautés microbiennes de l'eau (Hernández-Terrones et al., 2015). Ces communautés microbiennes sont susceptibles d'être modifiées notamment lors de phénomènes d'émergence ou de réémergence d'espèces bactériennes et virales pathogènes pour l'Homme (DePaola et al., 2010; Griffin et al., 2003; Nielsen and Jiang, 2019) ou les animaux (Go et al., 2017; King et al., 2019b; Martenot, 2013; Oyanedel et al., 2023; Petton et al., 2021; Saulnier et al., 2010; Wang et al., 2021).

Parmi les pathogènes émergents, l'*Ostreid Herpes Virus 1  $\mu$ Var* et les bactéries du genre *Virbio*, ubiquistes des écosystèmes marins, ont un réel enjeu socio-économique, notamment illustré à l'échelle française par de fortes mortalités de l'huître creuse *Crassostrea gigas* observées depuis 2008 (Clerissi et al., 2022; De Lorgeril et al., 2018). En plus de l'émergence de pathogènes, les pressions anthropiques sur l'environnement marin, tels que les contaminations chimiques de l'eau par des pesticides peuvent également impacter le développement des huîtres (Abi-Khalil et al., 2016; Bachère et al., 2017; Bayen et al., 2007; Britt et al., 2020; Gagnaire et al., 2007, 2006; Geret et al., 2013; Mottier et al., 2015). La production ostréicole est particulièrement impactée par ces changements lors des premiers stades de croissance des animaux (stade de vie larvaire et juvénile). Lors de ces stades de vie, les animaux sont élevés dans des infrastructures à terre alimentées en eaux naturelles. Il paraît donc d'intérêt de développer des techniques de traitement permettant d'éliminer aussi bien les contaminants biotiques (pathogènes) qu'abiotiques (pesticides, toxines algales etc) de l'eau de mer servant pour l'alimentation de ces installations.

De par leur coût énergétique réduit (utilisation de la ressource solaire), leur action à la fois sur le compartiment biotique et abiotique de l'eau, et l'utilisation d'un catalyseur solide permettant sa réutilisation, la photocatalyse hétérogène apparaît comme un procédé prometteur pour biosécuriser les eaux destinées à l'aquaculture. Pour l'eau de mer, cette technologie de traitement est particulièrement étudiée pour l'élimination des composés abiotiques, mais fait défaut concernant l'élimination de composés biotiques tels que les virus.

Dans ce contexte, le principal objectif de mes travaux de recherche consistait à développer un outil conduisant à l'inactivation de pathogènes d'intérêts ostréicoles par photocatalyse hétérogène en utilisant la ressource solaire. Pour y parvenir, ce travail de thèse a visé à définir l'impact du traitement photocatalytique sur des cibles biologiques d'intérêt ostréicole ainsi que sur la communauté bactérienne dans sa globalité pour ensuite, en se focalisant uniquement sur l'inactivation bactérienne, proposer des outils permettant d'évaluer les capacités journalières de traitement par voie solaire.

Dans un premier temps, le potentiel d'inactivation des pathogènes de l'huître a été démontré à l'échelle du laboratoire sur deux cibles biologiques. La première cible était le virus, *OsHV-1  $\mu$ Var*, impliqué dans le développement du Pacific Oyster Mortality Syndrom (POMS). A notre connaissance, aucune étude n'est présente dans la littérature concernant l'inactivation de cibles virales par photocatalyse hétérogène en eau de mer. L'efficacité de la photocatalyse hétérogène pour l'inactivation d'un pathogène viral d'intérêt ostréicole avec une survie des huîtres totales après une exposition à l'eau traitée (durant 2h par UV/TiO<sub>2</sub>) a



été mise en évidence. En comparaison, les animaux exposés à de l'eau traitée exclusivement aux UV présentaient un taux de mortalité de 60%, tandis que ceux exposés à de l'eau non traitée connaissent une mortalité de 100% en seulement quelques jours.

La seconde cible biologique a été la bactérie marine, *Vibrio havreysi*, également identifiée lors du POMS. De la même manière que pour le virus, le traitement par photocatalyse de l'eau de mer contenant *Vibrio harveyi* induit le meilleur taux d'inactivation en comparaison au traitement photolytique ou à l'absence de traitement. Dans la littérature, l'inactivation en eau de mer de bactéries appartenant au genre des *Vibrio* a déjà été reportée avec des taux d'inactivations similaires ((García-Garay et al., 2020). De même, les nombreuses études réalisées en eau douce mettent en évidence la différence de sensibilité qui existe entre les organismes avec systématiquement une sensibilité accrue des virus en comparaison aux bactéries (Laxma Reddy et al., 2017; Zheng et al., 2018) ce qui a été confirmé lors de ces travaux de thèse.

Cette thèse présente également un aspect innovant dans l'approche méthodologique utilisée pour étudier la faisabilité du procédé de désinfection et comprendre son action. En effet, la majorité des études trouvées dans la littérature se concentrent uniquement sur l'inactivation d'une ou deux cibles microbiennes (le plus souvent des bactéries et/ou des algues) sans jamais s'attarder sur l'effet du traitement sur le microbiote bactérien total de l'eau. Notre approche méthodologique a fait appel à l'écologie microbienne moléculaire; nous avons en effet utilisé le Metabarcoding 16S afin de caractériser avec exactitude la composition du microbiote total. Ce travail a permis de mettre en évidence l'effet marqué de la photocatalyse sur la composition des communautés microbiennes. Nous avons notamment démontré que le microbiote bactérien de l'eau se trouve plus fortement modifié en termes d'abondance de genre bactérien lorsque l'inactivation a été réalisée en présence de catalyseur (traitement UV/TiO<sub>2</sub> vs UV). En revanche, dans l'étude menée ici, les temps de traitement appliqués pour désinfecter l'eau ont soigneusement été choisis afin d'inactiver 100% du virus *OsHV-1*  $\mu$ Var. Toutefois, ces conditions expérimentales n'ont pas permis une désinfection complète de l'eau de mer. En effet, après 2h de traitement photocatalytique, une partie des *Vibrio harveyi*, pathogène cible utilisé comme modèle bactérien pour le suivi de l'inactivation bactérienne, étaient toujours vivants. Ces résultats mettant en évidence qu'une partie du microbiote bactérien demeure viable à la fin du traitement autorisant ainsi une recolonisation de ce dernier une fois le traitement arrêté. Le phénomène de résilience de l'écosystème microbien que nous avons observé est notable puisqu'il s'agit d'un retour vers un microbiote proche de celui de l'eau de mer n'ayant subi aucun traitement, et ce malgré des différences significatives mesurées entre les microbiotes traités et le microbiote non traité.

Dans un second temps, les outils permettant de définir les capacités journalières du procédé de photocatalyse hétérogène pour l'inactivation de pathogènes d'intérêts ostréicoles ont été développés. Ces outils ont permis de proposer une solution innovante pour gérer les discontinuités de la ressource solaire à l'échelle du procédé en modulant les conditions opératoires. Cette piste, nouvellement explorée permet d'envisager le développement d'installations de traitement photocatalytique par voie solaire. L'étude du photo-réacteur pour le traitement des pathogènes d'huître en eaux de mer met en lumière l'insuffisance des capacités de traitement pour les principales applications de biosécurisation en aquaculture. Il est important de rappeler que la technologie étudiée dans cette thèse ne semble toutefois, pas encore assez mature. Les capacités de traitement sont encore inadaptées pour le traitement de volumes journaliers importants comme c'est notamment le cas dans les

installations aquacoles. En effet, comme cela a été montré, les surfaces de captation du rayonnement solaire nécessaires seraient trop importantes. En revanche, cette étude montre l'intérêt de cette technologie pour des applications de niches en ostréiculture tel que la biosécurisation d'installations de recherche. Ces installations sont de tailles plus modestes avec des volumes d'eau/débit nécessaires pour alimenter les bassins de culture compatibles avec un traitement photocatalytique solaire tel que développé dans ce travail de thèse. Il est important de souligner que ces systèmes de traitement durables sont des alternatives technologiques sérieuses. De plus, les bassins/claires en amont des installations, présentant de grandes surfaces exposées au soleil avec de faible profondeur d'eau, pourraient être adaptés pour développer des traitements photocatalytiques par voie solaire.

Aussi, afin de proposer des outils adéquats de dimensionnement, nous nous sommes focalisés sur le processus d'inactivation bactérienne par photocatalyse, avec pour objectif de modéliser et de prédire les capacités du photo-réacteur en fonction des conditions expérimentales. Une loi cinétique simple représentative du processus d'inactivation a été sélectionnée parmi les principales lois disponibles dans la littérature. Les expérimentations réalisées avec le photo-réacteur opérant en mode batch ont montré que la loi sélectionnée décrit de manière fidèle la photo-inactivation de la souche de *V.harveyi* sous différentes conditions opératoires de concentration bactérienne initiale et de densité de flux. Afin de se positionner dans un contexte applicatif, le fonctionnement du photo-réacteur opérant en continu et sous conditions d'irradiations solaires représentatives de site ostréicole français a été simulé. Ces simulations *in silico* ont démontré les limites du procédé pour l'exploitation la ressource solaire. En effet, les fortes variations de la densité de flux en lien avec la météo (passage nuageux) génèrent de fortes variations de concentration en sortie du photo-réacteur. Ce point est décrit dans la littérature comme étant un verrou majeur à l'utilisation de la ressource solaire. Pour des applications en aquaculture, pour de la biosécurisation, la qualité de l'eau doit être maintenue constante pour garantir une survie totale des animaux. Afin de pouvoir respecter les contraintes de qualité de l'eau et garantir un taux d'abattement des pathogènes suffisant sur les périodes de faible irradiation (levé et couché du soleil ou passage nuageux), la modulation du débit d'alimentation du photo-réacteur s'est avéré une option de choix.

Même si la photocatalyse hétérogène se positionne comme une méthode de traitement efficace pour des applications en aquaculture, des verrous persistent toujours. La gestion du vieillissement des matériaux entraînant une diminution de l'activité photocatalytique est une problématique récurrente dans la littérature et particulièrement pour des utilisations en eau de mer (Rubio et al., 2013a). Dans cette thèse, les performances du catalyseur se sont montrées altérées rapidement, induisant une très forte limitation des capacités photo-oxydatives du réacteur à tel point qu'après quelques utilisations successives, la capacité d'inactivation microbienne devient nulle. Deux origines ont été identifiées pour expliquer ce phénomène. Soit les bactéries et les débris cellulaires viennent saturer la surface du catalyseur entraînant une perte d'activité de ce dernier, soit les sels viennent le recouvrir rendant les sites actifs indisponibles pour initier la photocatalyse. Cette deuxième piste semble privilégiée aux vues des résultats obtenus lors de cette thèse et qui sont confortés par la littérature (Rubio et al., 2013a).

Rappelons que cette thèse s'est concentrée uniquement sur l'aspect désinfection, c'est-à-dire, l'élimination de contaminants biotiques de l'eau de mer, sans aborder l'aspect

décontamination, c'est-à-dire l'élimination des contaminants abiotiques, phénomène qui demeure un élément clef de la biosécurisation. Le procédé de photocatalyse hétérogène offrant la possibilité de traiter l'ensemble des contaminants biotiques et abiotiques d'origine organique, une étude plus élargie devrait être menée sur la capacité combinée de désinfection et décontamination. En effet, un travail couplant les deux types de contaminants pourrait potentiellement mettre en évidence des effets de "compétition" entre les différentes classes de contaminants biotiques et abiotiques comme cela a déjà été observé pour les contaminants abiotiques. Par ailleurs, il existe déjà dans la littérature des études faisant état de l'élimination de diverses cibles microbiennes simultanément par photocatalyse (García-Garay et al., 2020) et pour l'élimination des cibles chimiques (Reoyo-Prats et al., 2022). Mais, à notre connaissance aucune étude n'a été réalisée avec les deux types de contaminants présents simultanément dans une matrice eau de mer. Envisager ce type d'approche pourrait notamment permettre de sélectionner les indicateurs de performance du photo-réacteur garantissant une qualité de l'eau suffisante pour tous les pathogènes et résidus chimiques présents dans l'eau.

En conclusion, une caractérisation plus approfondie des phénomènes de compétitions entre contaminants accompagnée d'une analyse plus poussée du vieillissement du catalyseur devrait donc permettre à terme une meilleure compréhension de la photocatalyse en milieu marin. Il sera ainsi possible de compléter les outils de prédiction développés dans cette thèse pour confirmer leur bon fonctionnement et permettre la transposition de l'échelle du laboratoire à l'échelle du pilote test.

## Annexes





## Annexe N°1 : Analyse de la contamination chimique de la lagune de Salses-Leucate

Dans cette annexe, l'analyse de la contamination chimique organique de la lagune de Salses-Leucate est présentée. Cette étude couple les deux méthodes d'échantillonnages existantes : l'échantillonnage ponctuel permettant, dans le cas présent, de cribler un grand nombre de contaminants, et l'échantillonnage cumulatif ou passif permettant une quantification plus fine de la contamination chimique mais avec un nombre plus restreint de polluants. Le contenu de l'annexe 1 sera structuré en plusieurs sections distinctes. Tout d'abord, nous commencerons par une brève revue de la littérature, mettant principalement en avant les résultats de l'étude PEPS-LAG (2012). Ensuite, seront présentées *i)* l'approche théorique des deux méthodologies d'échantillonnage et des méthodes de détection associées et *ii)* les stations d'échantillonnage réparties dans la lagune. Enfin, nous exposerons les différents résultats de la campagne analytique effectuée dans la lagune de Salses-Leucate.

### État de l'art

La principale source d'informations concernant les contaminants chimiques de la lagune de Salses-Leucate provient d'études réalisées par l'Ifremer. En 2013, l'étude PEPS-LAG (Munaron et al., 2012) analyse des contaminants (métaux, composants phytosanitaires et pharmaceutiques, alkyl-phénol, hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) et PolyChloroBiphényles (PCB)). Cette étude a été menée via une approche cumulative sur une vingtaine de jours entre mai et août 2012 par l'utilisation d'échantillonneurs passifs en deux points de la lagune, l'un au nord dans la zone ostréicole (latitude : 42.816673 – longitude : 2.989783) et l'autre au sud (latitude : 42.883280 – longitude : 3.016570). Ce type d'échantillonneur permet de détecter des composés présents dans le milieu même à l'état de traces contrairement aux approches dites ponctuelles puisqu'il concentre les contaminants sur l'échantillonneur exposé sur une longue durée. Les composés retenus par l'échantillonneur dépendent des caractéristiques physico-chimiques du composé et de la phase réceptrice, il existe plusieurs types d'échantillonneurs passifs (Desgranges, 2015; Mazzella, n.d.). Dans l'étude de l'Ifremer, trois échantillonneurs ont été utilisés en fonction de la nature chimique des composés recherchés :

- i. les DGT (Diffusion Gradient in Thin-film) ont été utilisés pour les métaux,
- ii. les SPMD (Semi-Permeable Membrane Device) pour la quantification des molécules organiques apolaires (HAP, PCB et certains insecticides),
  - iii. les POCIS (Polar Organic Chemical Integrative Sampler) pour détection des molécules organiques polaires et moyennement polaires (alkyl-phénols, composés pharmaceutiques et phytosanitaires).

L'étude PEPS-LAG (Munaron et al., 2012), via l'utilisation des échantillonneurs passifs, a mis en évidence la présence de nombreux composés retrouvés (détail Tableau 1) le plus souvent dans les deux points d'échantillonnages (Nord et Sud) :

- **Pesticides :**
  - 18 résidus de pesticides retrouvés dont 17 dans les deux stations de mesure
  - 20 résidus de pesticides organochlorés retrouvés dans la station Nord à l'état de traces (inférieur à la limite de quantification de la méthode (LQ = 0,1 ng/L) sauf pour 2 résidus en concentrations plus importantes)
- **Résidus pharmaceutiques :**
  - 3 résidus pharmaceutiques retrouvés dont 2 dans les deux stations de mesure
- **Alkyl-phénols** (détergents) :

- 5 résidus d'alkyl-phénols retrouvés dont 1 dans les deux stations de mesure
- **HAP** (hydrocarbures aromatiques polycycliques) :
  - 20 résidus d'HAP retrouvés dans la station Nord à l'état de traces (concentration inférieure à la limite de quantification de la méthode, LQ = 0,1 ng/L)
- **PCB(s)** (PolyChloroBiphényles) :
  - 12 résidus de PCB retrouvés dans la station Nord à l'état de traces (concentration inférieure à la limite de quantification de la méthode)

Aucun des composés phytosanitaires retrouvés n'était supérieur aux Normes Qualités Environnementales (NQE) en vigueur (Annexe 1.1) : 1-(2,4-dichlorophenyl)urée (124 DCPU), 2-hydroxy atrazine, acétochlore, aldrine, atrazine, carbendazime, chlorotoluron, N-(3,4 dichlorophényl)-N-(méthyl)-urée (DCPMU), DEA, DIA, diuron, meso-Dimercaptosuccinic acid (DMSA), N,N-Diméthyl-N'-p-tolylsulphamide (DMST), hydroxy simazine, irgarol, métolachlore, simazine, terbuthylazine et terbuthylazine déséthyl. Pour les produits pharmaceutiques : la caféine, la carbamazépine et le paracétamol sont très largement retrouvés avec des concentrations journalières de l'ordre de plusieurs dizaines de ng/L. La station de Leucate Nord entre 2009 et 2010 possédait une source de contamination locale et continue en alkyl-phénol, la teneur en octylphénol (4-OP) était supérieure à la norme. L'octylphénol (4-OP) est un perturbateur endocrinien d'où une concentration maximale acceptable très faible (0,133 µg/L) établie par l'Union Européenne. En revanche, dans l'étude PEPS-LAG, la concentration de 4-OP est de l'ordre du ng comme celle du 4-Nonylphénol (4-NP) donc aucun de ces 2 alkyl phénols ne présentent une concentration supérieure à sa NQE dans la lagune (300 ng/L). En ce qui concerne les PCB et les HAP, aucun des composés recherchés dans l'étude de l'Ifremer sur la Lagune n'est présent en quantité suffisante pour être détecté et/ou quantifié.

Annexe 1.1 : récapitulatif des composés retrouvés dans l'étude PEPS-LAG et les normes en vigueur

Type de composé	Nom du composé	Concentration détectée (ng/L)		Normes en vigueur pour l'eau marine en moyenne annuelle (ng/L)	
		Station Nord de la lagune	Station Sud de la lagune		
Pesticide	DCPMU	2	1	NA	
	124 DCPU	10	13	NA	
	Acetochlor ESA	1	0	NA	
	Atrazine	1	1	600	
	Atrazine hydroxy	7	7	600 (atrazine)	
	Carbensazime	5	5	NA	
	Chlorotoluron	1	1	5 000	
	DEA	1	2	NA	
	DIA	5	6	NA	
	Diuron	7	6	200	
	DMSA	44	48	NA	
	DMST	4	7	NA	
	Hydroxysimazine	10	7	1 000 (simazine)	
	Irgarol	2	4	NA	
	Metolachlor	2	2	NA	
	Pesticide	Simazine	8	12	1 000
1			2	NA	
8			10	NA	
Pesticide organochlorés		Aldrine	7,8	/	5 (Σ pesticides cyclodiènes : aldrine, dieldrine, endrine et isodrine)
		Metazachlore	20,1	/	NA
Pharmaceutiques		Caféine	319	291	NA
		Carbamazépine	2	2	NA
		Paracétamol	5	0	NA
Alkyl phénols		4-NP	5	16	300
		NP1EC	1	0	NA
		NP1EO	0	7	NA
		NP2EO	0	6	NA
		OP	2	0	10
PCB		12 PCB recherchés	Etat de traces	/	NA
HAP		20 HAP recherchés	Etat de traces	/	2 (Σ 20 HAP)

Depuis 2012, d'autres études ont été menées par l'Ifremer (suivi ROCCH) en prenant un certain nombre de contaminants spécifiques et représentatifs. Parmi eux figure :

- Les métaux (plomb, cadmium, mercure, cuivre, zinc et argent)
- Le fluoranthène (représentatif des hydrocarbures aromatiques polycycliques) présent dans le pétrole (15 à 30% du pétrole brut), il est également utilisé comme revêtement

de protection des cuves et tuyaux en acier, dans la fabrication de teintures, d'huiles diélectriques...

- Le polychlorobiphényle 153 (représentatif des PCB totaux) est utilisé comme isolant ou ignifugeant dans l'industrie électrique, comme fluidifiant dans les peintures... Étant rémanents et toxiques, les PCB font l'objet de plusieurs mesures comme par exemple avec la convention de Stockholm qui prévoit l'éradication totale des PCB pour 2025.
- Des pesticides tels que le lindane (insecticide interdit depuis 2007 en France mais encore homologué par certains pays), le dichlorodiphényltrichloroéthane (insecticide organochloré interdit depuis 1970 mais toléré pour la lutte contre le paludisme), et le tributylétain (biocide organostannique, interdit depuis 1981 pour les peintures marines mais toujours utilisé de façon résiduelle dans l'industrie du papier et textile).

Concernant les métaux, le niveau de contamination dans les filtres (moules) est stable depuis une dizaine d'années et bien en deçà des seuils sanitaires. Pour les polluants organiques persistants (HAP et substances organochlorées), les teneurs sont nettement plus faibles qu'au niveau national et sont en nette diminution depuis une vingtaine d'années (Ifremer, 2020).

Récemment, de nouvelles approches de la toxicité/dangerosité des pesticides sur les écosystèmes lagunaires ont été mises en place pour tenter de tenir compte de l'exposition à des mélanges de pesticides plus réalistes d'une exposition à un composé seul. En effet, dans la nature la lagune contient de multiples pesticides et autres polluants chimiques qui peuvent chacun avoir un impact sur l'écosystème lagunaire. Ces impacts pris séparément peuvent être négligeables mais cumulés leur impact est plus flagrant. Pour tenir compte de cet effet, l'Etude OBSLAG (Munaron, 2020) a développé un nouveau modèle prenant en compte le Quotient de Risque (QR) de chaque pesticide retrouvé pour avoir un impact global suivant la théorie d'addition des doses aussi appelé additivité de Loewe (equation 9).

$$QR_{cumulé} = \sum_{i=1}^n QR_i \quad \text{avec } QR_i = \frac{C_i}{NQE_i \text{ ou } PNEC_i} \quad \text{Equation (9) : Quotient de risque}$$
 cumulé de tous les composés retrouvés calculés à partir des quotients de risques individuels de chaque composé (Munaron, 2020) avec  $C_i$  la concentration du composé  $i$  et  $NQE_i$  ou  $PNEC_i$  la concentration donnée par les normes pour ce composé

L'indicateur développé permet donc d'aller au-delà des réglementations (par exemple de la réglementation DCE au travers de l'utilisation des NQE) en prenant compte l'effet chronique d'un mélange de pesticide de l'eau. Cet indicateur permet notamment de mettre en évidence deux types de risque pour l'écosystème permettant de comparer l'état des lagunes entre elles et/ou au cours du temps : (i) le risque lié à la présence d'un seul pesticide retrouvé en quantité supérieurs aux normes ( $QR_i > 1 \rightarrow QR_{cumulé} > 1$ ), et (ii) le risque lié aux cumuls de pesticides ( $QR_i < 1$  mais  $QR_{cumulé} > 1$ ). Les risques liés aux pesticides sont classés en 4 catégories (présentés dans l'Annexe 1.2).

Annexe 1.2 : diagnostic du risque pesticide dans la lagune, risques dus aux pesticides cumulés ou aux pesticides seuls (Munaron, 2020)

Classes de Risque Pesticide	QR <sub>cumulé</sub>	Nbr de subs dont le QR <sub>indiv.</sub> > 1
Faible	< 0,5	aucune
Modéré	entre 0,5 et 1	aucune
Fort (melange seul)	>1	aucune
Fort (melange+effet(s) indiv.)	>1	1 ou +

## Matériels et Méthodes

Il existe deux méthodes pour les échantillonnages d'eau : l'échantillonnage ponctuel et l'échantillonnage cumulatif ou passif. Chaque méthode présente des avantages et des inconvénients. L'échantillonnage ponctuel permet d'analyser un grand nombre de composés mais ne permet souvent pas de quantifier précisément ces derniers. L'échantillonnage cumulatif permet quant à lui de mieux quantifier les résidus présents mais le nombre de résidus analysables est limité par des étapes de mise au point longue.

### 1. Échantillonnage ponctuel

#### a. *Principe*

L'échantillonnage ponctuel consiste à un prélèvement d'eau à l'instant t. Les résidus de cet échantillon d'eau sont ensuite extraits et concentrés pour être analysés. Cet échantillonnage ne nécessite pas de mise au point autre qu'au niveau de l'analyse (mise au point pour la détection des composés par LC MS/MS, GC MS...). L'étape de concentration des échantillons est très importante puisque la majorité des composés présents dans l'eau sont très dilués et sont donc présents uniquement à l'état de traces.

#### b. *Stratégie d'échantillonnage*

Les échantillonnages ont été réalisés en 16 janvier 2020 sur six stations de prélèvement réparties sur toute la lagune de Salses-Leucate (Annexe 1.3) et choisies grâce à leur environnement :

Les stations S3 et S4 sont situées au niveau de sorties de stations d'épurations (STEP), respectivement de Salses le Château et de Saint-Hippolyte et d'exutoires d'agouilles (canaux qui se déversent dans la lagune), respectivement Grosse et Paul Riquet. Cela permet d'avoir un aperçu de la pollution issue des villes avec des composés susceptibles d'être peu dégradés en STEP et de ce fait, potentiellement présents dans l'eau en sortie de STEP. L'emplacement proche des agouilles permet également de prendre en compte la pollution issue de l'agriculture et drainée par les pluies depuis les cours d'eau.

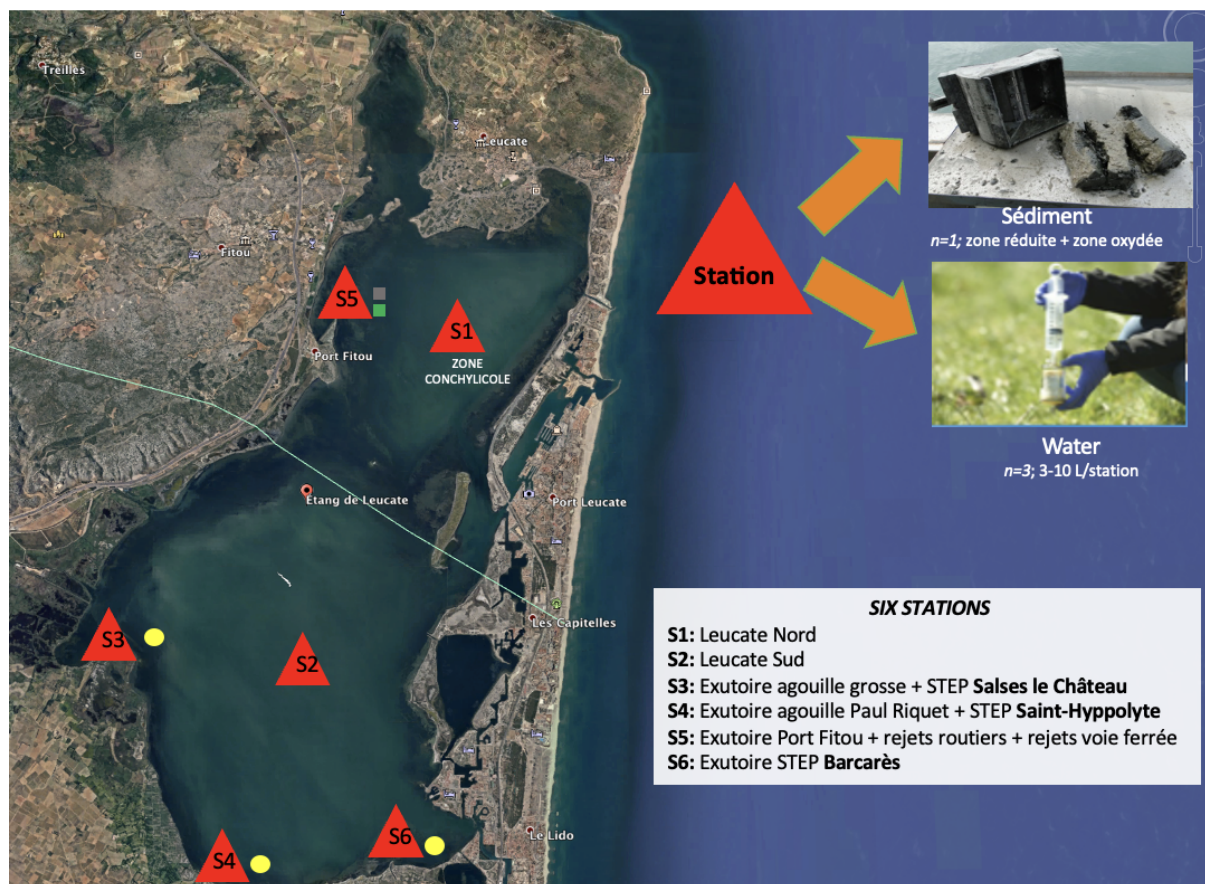
La station S6 est située au niveau de l'exutoire de la STEP de la ville du Barcarès.

La station S5 est située proche des voies de transport (voies ferrées, autoroute, route nationale) ce qui permet d'avoir un aperçu de la pollution issue des transports autour de la lagune.

Les stations S1 et S2 correspondent aux deux stations déjà définies par l'Ifremer avec notamment la station S1 qui est située dans la zone conchylicole permettant d'évaluer le niveau de contamination chimique au sein de la zone de production ostréicole.

Pour chaque station, les composés organiques ont été recherchés dans l'eau et dans le sédiment pour réaliser un état des lieux vis-à-vis des composés hydrophobes et des substances chimiques de nature hydrophile. Lors du prélèvement des échantillons, les paramètres physico-chimiques de l'eau (turbidité, salinité, O<sub>2</sub>, % de saturation, température,

pH, conductivité) ont été mesurés sur site. Pour diminuer les coûts, il a été décidé dans un premier temps par l'équipe de travailler à partir d'échantillons composites de la masse d'eau et du sédiment.



Annexe 1.3: cartographie des points de prélèvement de la lagune de Salses-Leucate

Pour la matrice eau, cinq prélèvements d'1 litre chacun ont été réalisés à partir de chaque station puis regroupés et homogénéisés au laboratoire pour constituer un échantillon composite d'un volume final de 1 litre.

Pour la matrice sédiment, un prélèvement a été réalisé par carottage sur zone en suivant la même méthodologie afin d'obtenir un échantillon composite issu de l'homogénéisation de trois bœaux de 1 litre chacun.

#### c. Analyses chimiques par recherche de résidus organiques dans les matrices

La recherche des résidus dans chaque matrice a été effectuée par deux laboratoires externes. Le nombre de résidus recherchés est donné annexe 1.4 : la recherche des résidus pharmaceutiques et alkyl-phénols a été réalisée par le laboratoire Carso (Lyon, France). La recherche et quantification des résidus phytosanitaires, Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) et PolyChloroBiphényles (PCB) a été effectuée par le Centre d'Analyses Méditerranée Pyrénées (CAMP) à Perpignan.



## Annexe 1.4 : Nombre de composés chimiques recherchés par matrice

<b>Matrice eau</b>	<b>Matrice sédiment</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>● 396 résidus phytosanitaires</li> <li>● 17 résidus d'Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP)</li> <li>● 15 résidus de PCB</li> <li>● 8 résidus d'alkylphénols (détergents)</li> <li>● 3 résidus pharmaceutiques</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 91 résidus phytosanitaires</li> <li>● 11 résidus d'Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP)</li> <li>● 15 résidus de PCB</li> <li>● 8 résidus d'alkylphénols (détergents)</li> </ul>
<b>TOTAL : 439 résidus</b>	<b>TOTAL : 126 résidus</b>

Les analyses ont été réalisées en deux étapes : (i) la préparation de l'échantillon (extraction, purification et concentration des analytes) et (ii) la détection et la quantification des composés a été réalisé par chromatographie.

Le laboratoire Carso a utilisé une extraction ASE (Accelerated solvent extraction) au dichlorométhane ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) pour les Octylphénols (OP) et les Nonylphénol (NP) pour le traitement du sédiment et une extraction ASE pour les Octylphénol Ethoxylate (OPEO) et les Nonylphénol Ethoxylate (NPEO) de cette même matrice. Suite à cette extraction/concentration, les composés ont été détectés et quantifiés par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC/MS) pour les OP et NP, et par chromatographie liquide haute performance (HPLC) couplée à un détecteur à fluorescence pour les OPEO et NPEO. Pour la matrice eau, les alkylphénols (OP, NP, OPEO et NPEO) sont extraits par extraction liquide/liquide puis détectés par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC/MS/MS) pour les OP et NP, ou par chromatographie liquide et détection par fluorescence (LC/FLD) pour les OPEO et NPEO. Les composés pharmaceutiques dans la matrice Eau ont été directement injectés en chromatographie liquide haute performance couplée à de la spectrométrie de masse en tandem (HPLC/MS/MS) sans étape de concentration préalable de l'échantillon.

Le laboratoire du CAMP a utilisé l'extraction sur cartouche SPE (Solid Phase Extraction, extraction de type liquide/solide) pour extraire, purifier et concentrer les composés dans la matrice Eau. Cette extraction utilise le même principe qu'une chromatographie, les composés à extraire sont adsorbés sur la phase stationnaire contenue dans la cartouche puis récupérés lors d'une élution dans un volume faible de solvant à fort pouvoir d'élution ce qui permet la concentration de l'échantillon. Il y a un jeu d'affinité entre les solvants de lavage, la phase stationnaire solide de la cartouche et le solvant d'élution. En ce qui concerne l'extraction des composés dans la matrice sédiment, celle-ci est réalisée comme le laboratoire Carso avec l'utilisation d'une extraction ASE. Les différents composés sont ensuite détectés selon la nature du composé avec une des quatre méthodes suivantes : les résidus de HAP sont détectés par chromatographie liquide avec détection par fluorescence (LC/FLD) sauf pour le Naphtalène qui est détecté par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC/MS). Les PCBs et certains résidus de composés phytosanitaires sont détectés par chromatographie gazeuse couplée à de la spectrométrie de masse en tandem (GC/MS/MS). Pour finir une partie des résidus de composés phytosanitaires dans la matrice eau sont également détectés par chromatographie liquide couplée à de la spectrométrie de masse en tandem (LC/MS/MS).

Les performances analytiques des méthodes de détections utilisées dépendent du composé et varient dans les gammes données dans les tableaux annexes 1.5

*Annexe 1.5 : Performances analytiques des méthodes de détection utilisées (a) pour la matrice "Eau " et (b) pour la matrice "Sédiment "*

a.				b.			
Méthode utilisée	Familles de composés recherchés avec cette méthode	Limite de détection LD (ng/L)	Limite de quantification LQ (ng/L)	Méthode utilisée	Familles de composés recherchés avec cette méthode	Limite de détection LD (ng/L)	Limite de quantification LQ (ng/L)
<b>Matrice "Eau ", analyse par CAMP</b>				<b>Matrice "Sédiment ", analyse par CAMP</b>			
LC/FLD	HAP	0,3 – 7	1 – 20	LC/FLD	HAP	0,03	0,1
GC/MS	HAP	17	50	GC/MS	HAP	0,17	0,5
GC/MS/MS	PCBs	2	5	GC/MS/MS	PCBs	0,17	0,5
GC/MS/MS	Phytosanitaires	2 – 7	5 – 20	GC/MS/MS	Phytosanitaires	0,17 – 0,33	0,5 – 1
LC/MS/MS	Phytosanitaires	7	20	<b>Matrice "Sédiment ", analyse par Carso</b>			
LC/MS/MS	Phytosanitaires	1 – 8	2,5 – 25	GC/MS	Alkylphénols	/	100
<b>Matrice "Eau ", analyse par Carso</b>				HPLC/FLD	Alkylphénols	/	50
GC/MS/MS	Alkylphénols	/	100				
LC/FLD	Alkylphénols	/	100				
HPLC/MS/MS	Pharmaceutiques	/	400 – 500				

## 2. Échantillonnage passif ou cumulatif

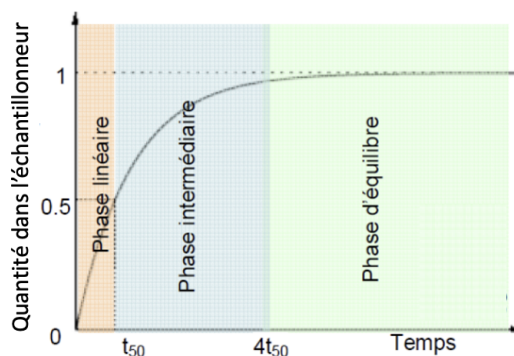
### a. Principe

L'échantillonnage passif permet de cumuler les contaminants sur une phase réceptrice pendant plusieurs jours/semaines. Cette accumulation des composés sur la phase réceptrice dépend des paramètres physico-chimiques du milieu et de la phase (elle a lieu soit à la surface de la phase, adsorption, soit au sein de celle-ci, absorption). Cette accumulation des composés sur une période d'exposition longue permet de prendre en compte de potentiels pics de contamination dus à un apport ponctuel en contaminants (épisode Cévenol, défaillance d'une STEP...) mais également d'améliorer les limites de quantification et de détection en préconcentrant les composés sur la phase réceptrice.

L'accumulation des résidus sur la phase réceptrice dépend du temps d'exposition, du régime d'écoulement du fluide (débit de l'eau dans le milieu), de la composition du milieu (pH, salinité, présence de matière en suspension...), et de l'affinité des composés que l'on souhaite analyser avec la phase réceptrice utilisée.

En pratique, il existe 3 phases d'accumulation distincte lors de l'exposition d'échantillonneur passifs (annexe 1.6) :

- Lorsque le temps d'exposition est relativement court (15 à 20 jours) l'accumulation des composés sur la phase est linéaire ce qui permet d'avoir une information sur la concentration moyenne dans le milieu. Néanmoins, la détermination de la concentration moyenne dans le milieu à partir de la concentration sur l'échantillonneur nécessite une étude de l'accumulation au cours du temps.
- Lorsque le temps d'exposition est long la phase réceptrice est saturée et la compétition entre les composés domine l'accumulation, on parle de phase d'équilibre
- Entre ces deux phases on a une phase curvilinéaire aussi appelée phase intermédiaire dans laquelle les phénomènes de compétition commencent à avoir lieu.



Annexe 1.6: Cinétique d'accumulation de micropolluant sur un échantillonneur passif (Christine FERAY, 2015) avec  $t_{50}$  la durée nécessaire pour avoir une accumulation à 50% du maximum accumulable sur la phase réceptrice.

#### b. Mise en œuvre : exemple des POCIS

Il existe de multiples échantillonneurs passifs permettant chacun d'accumuler une certaine gamme de composés, généralement basés sur le  $\log K_{ow}$  (Annexe 1.7a). Le plus couramment utilisé pour la détection de composés pharmaceutiques et de pesticides polaires ( $\log K_{ow}$  de 0 à 4) est le Polar Organic Chemical Integrative Sampler (POCIS) "pharmaceutique" (Mazzella et al., 2007). Il est composé d'une phase adsorbante Oasis HLB (N-vinylpyrrolidone-divinylbenzene) placée au milieu de deux membranes en polyéthersulfone (0,1  $\mu\text{m}$  de diamètre de pore) et fixés avec deux anneaux en inox (annexe 1.7b et c)

L'accumulation des composés sur le POCIS se fait par diffusion du milieu vers la phase réceptrice au travers des membranes et de la couche limite à l'interface de la membrane (couche limite entre le milieu (liquide) et la membrane).

Afin de pouvoir quantifier les contaminants dans la matrice à partir de ceux récupérés sur la POCIS il faut se placer dans la phase linéaire d'accumulation sur adsorbant. Dans cette phase linéaire l'accumulation est proportionnelle à la concentration dans le milieu :

$$\frac{dC_{POCIS}}{dt} = k_u C_{eau} - k_e C_{POCIS}$$
 Equation (10) : accumulation d'analytes sur la phase adsorbante de POCIS, avec  $k_u$  et  $k_e$  respectivement l'accumulation et la désorption de chaque composé (en  $\text{L}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{j}^{-1}$  et en  $\text{j}^{-1}$ ).

Dans la phase linéaire, le POCIS peut être assimilé à un échantillonneur intégratif (terme  $k_e C_{POCIS} = 0$ ) donc la cinétique d'accumulation en analytes est d'ordre 0 :

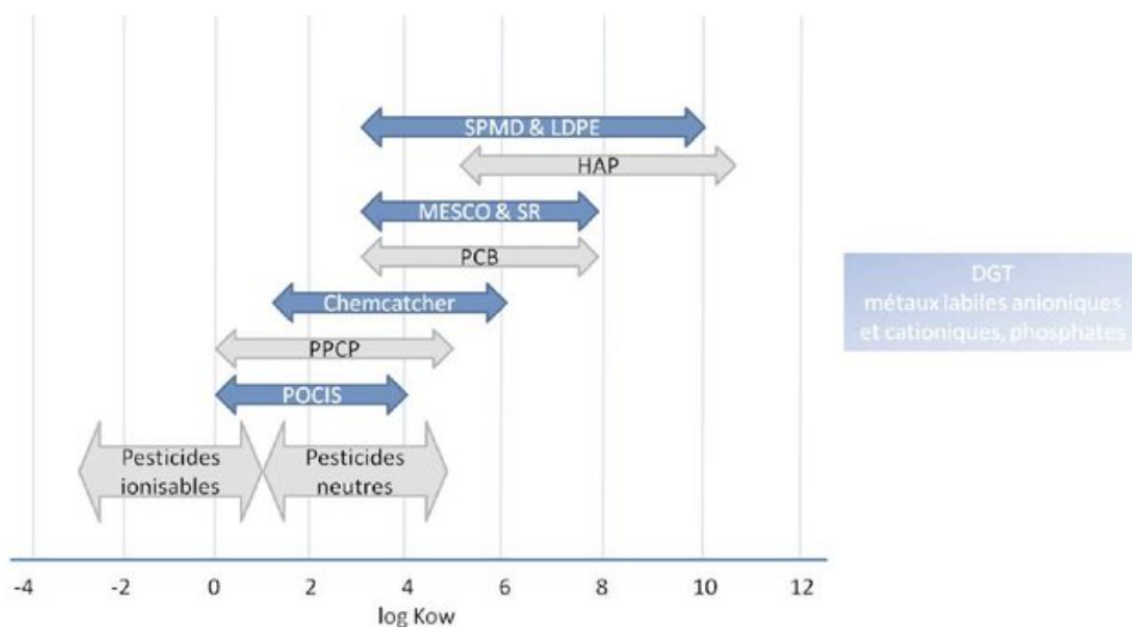
$$C_{POCIS} = k_u C_{eau} t = \frac{C_{eau} R_s t}{M_{POCIS}}$$
 Equation (11) :

Concentration en analyte sur la phase adsorbante de POCIS, avec  $M_{POCIS}$  la masse d'adsorbant de l'échantillonneur et  $R_s$  le taux d'échantillonnage.

Le taux d'échantillonnage  $R_s$  est propre à chaque composé et dépend des conditions environnementales (débit de fluide, salinité, température, pH...) qui ne sont pas forcément connues durant toute la durée d'exposition. En règle générale, ce taux d'échantillonnage est calculé en laboratoire à partir d'études de l'accumulation en conditions contrôlées d'un composé donné au cours du temps (annexe 1.8). Pour pallier l'effet des paramètres environnementaux sur le taux d'échantillonnage, l'utilisation de PRC (composés de références et de performances) a été développée. Cette méthode est basée sur la désorption d'un PRC de concentration initiale sur la phase réceptrice connue. A partir de la concentration finale de ce composé et d'une étude préliminaire en laboratoire (du taux d'échantillonnage  $R_s$  et de la constante d'élimination) les taux d'échantillonnage des autres composés adsorbés pendant

l'expérimentation peuvent être corrigés d'un certain facteur pour tenir compte au mieux des conditions environnementales réelles au cours de l'exposition sur le terrain. Le composé servant de PRC doit être un composé non présent naturellement dans le milieu ou alors un isotope. Le choix du PRC dépend du composé que l'on souhaite étudier, le PRC doit avoir des paramètres proches du composé étudié et ne peut pas être appliqué pour tous les composés (Desgranges, 2015). L'utilisation de tel PRC avec des POCIS peut être controversée. En effet, la quantification à partir de POCIS s'appuie sur une accumulation linéaire des composés sur la phase adsorbante alors que l'utilisation de PRC s'appuie sur les phénomènes de désorption de PRC de cette même phase qui ont majoritairement lieu en phase d'équilibre ou intermédiaire lorsque la phase est saturée en composé et qu'une compétition a lieu entre les composés. Néanmoins, l'utilisation de PRC utilisable avec les POCIS est étudiée (Buzier et al., 2019; Harman, n.d.; Harman et al., 2011).

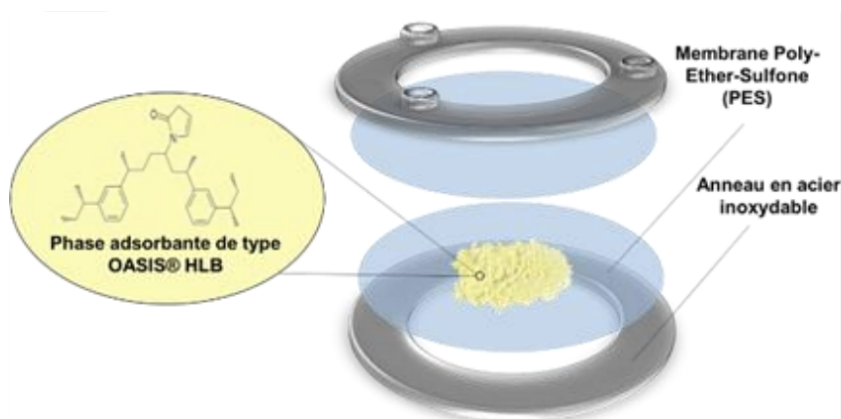
a.



b.



c.



Annexe 1.7: Descriptif des POCIS (Polar Organic Chemical Integrative Sampler) avec (a) la gamme de log Kow accumulée sur des POCIS (Tiam, 2013), (b) la photo d'un POCIS dans son support, et (c) la représentation schématique de la composition des différents composants (Mazellier et al., 2018).

Annexe 1.8 : Tableau récapitulatif des taux d'échantillonnage Rs de la littérature

Molécule	Rs (L/d)	Condition expérimentale	réf
acetochlor	0,195	flux continu dans 2 aquarium de 50L dans eau du robinet, dopage = 3+ 2 µg/L, vitesse = 11cm/s, T=20,7°C, pH=7,6, DOC+10,1mg/L	(Morin et al., 2013)
alachlor	0,192		
atrazine	0,189		
carbamazépine	0,188		
diclofenac	0,225		
diuron	0,198		
sulfaméthoxazole	0,03		
triméthoprime	0,162		
carbamazépine	0,2	Rs déterminé par modélisation	(Bartelt-Hunt et al., 2009)
caféine	0,27		
paracétamol	0,3		
sulfaméthoxazole	0,21		
carbamazépine	0,112	batch fermé dans béciers de 3L dans eau distillée, sans agitation, 3 ajouts d'eau distillée non dopées / 25j, dopage = 1 µg.L-1, T=28°C, pH= 6 - 8	(MacLeod et al., 2007)
diclofenac	0,092		
paracétamol	ND		
sulfaméthoxazole	0,536		
carbamazépine	0,348	batch fermé dans béciers de 3L dans eau distillée, agitation (barreau magnétique) ,vitesse = 3 à 12 cm.s-1, 4 ajouts d'eau distillée non dopées / 29j, dopage = 1 µg.L-1, T=22°C, pH= 6 - 8	
diclofenac	0,166		
paracétamol	ND		
carbamazépine	0,34	batch fermé dans aquarium de 96L dans eau du robinet agitation (hélicoïdale) vitesse = 0,21 - 0,46 m.s-1 dopage = 1 µg.L-1 ajout journalier de 1 - 4 mL solution de dopage (15 µg.g-1) ajout journalier de 400 mL d'eau du robinet T= 20,5°C pH = 7	(Soulier et al., 2016)
diclofenac	0,14		
paracétamol	ND		
carbamazépine	0,36	batch fermé dans béciers de 2L dans eau milli-Q agitation (barreau magnétique) dopage = 5 µg.L-1 renouvellement journalier de l'eau d'exposition T= 21°C salinité = 0 PSU pH = 7,2	(Togola and Budzinski, 2007)
diclofenac	0,15		
paracétamol	0,02		
caféine	0,096	batch fermé dans béciers de 4L dans eau distillée agitation (barreau magnétique) vitesse agitateur = 800-900 rpm dopage = 2 - 10 ng.mL-1 T = 5°C	(Li et al., 2010)
carbamazépine	0,23		
paracétamol	0,139		
sulfaméthoxazole	0,291		
caféine	0,151	batch fermé dans béciers de 4L dans eau distillée agitation (barreau magnétique) vitesse agitateur = 800-900 rpm dopage = 2 - 10 ng.mL-1 T = 15°C	
carbamazépine	0,397		
paracétamol	0,111		
sulfaméthoxazole	0,348	batch fermé dans béciers de 4L dans eau distillée agitation (barreau magnétique) vitesse agitateur = 800-900 rpm dopage = 2 - 10 ng.mL-1 T = 25°C	
caféine	0,127		
carbamazépine	0,561		
paracétamol	0,145		
sulfaméthoxazole	0,339	batch fermé dans béciers de 4L dans eau distillée agitation (barreau magnétique) vitesse agitateur = 60 rpm dopage = 2 - 10 ng.mL-1 T = 25°C	
carbamazépine	0,235		
sulfaméthoxazole	0,202		
paracétamol	ND		



carbamazépine	0,1	in situ dna seu de surface	(Zhang et al., 2008)
diclofenac	0,12		
carbamazépine	0,21	in situ dans eau d'épuration	
diclofenac	0,16		
carbamazépine	0,226	batch fermé dans béciers de 4L dans eau distillée agitation (barreau magnétique) vitesse agitateur = 800-900 rpm dopage = 2 - 10 ng.mL-1 T = 25°C pH = 3	(Li et al., 2011)
carbamazépine	0,354	batch fermé dans béciers de 4L dans eau distillée agitation (barreau magnétique) vitesse agitateur = 800-900 rpm dopage = 2 - 10 ng.mL-1 T = 25°C pH = 7	
carbamazépine	0,372	batch fermé dans béciers de 4L dans eau distillée agitation (barreau magnétique) vitesse agitateur = 800-900 rpm dopage = 2 - 10 ng.mL-1 T = 25°C pH = 9	
carbamazépine	0,36	batch fermé dans béciers de 4L dans eau distillée agitation (barreau magnétique) vitesse agitateur = 800-900 rpm dopage = 2 - 10 ng.mL-1 T = 25°C pH = 7 DOM = 3,33 mg.L-1	
carbamazépine	0,417	batch fermé dans béciers de 4L dans eau distillée agitation (barreau magnétique) vitesse agitateur = 800-900 rpm dopage = 2 - 10 ng.mL-1 T = 25°C pH = 7 DOM = 3,86 mg.L-1	
carbamazépine	0,404	batch fermé dans béciers de 4L dans eau distillée agitation (barreau magnétique) vitesse agitateur = 800-900 rpm dopage = 2 - 10 ng.mL-1 T = 25°C pH = 7 DOM = 4,92 mg.L-1	
acetochlor	0,49	flux continu dans aquarium de 250 L dans eau du robinet agitation (pompe) renouvellement 86 L.j-1 dopage de J0 à J18 = 20 – 100 ng.L-1 de J18 à J23 = pas de contamination de J23 à J30 = 100 – 600 ng.L-1 T = 20°C pH = 7	(Belles et al., 2014)
alachlor	0,48		
atrazine	0,3		
atrazine désétyl (DEA)	0,25		
carbamazépine	0,14		
chlorotoluron	0,23		
diuron	0,33		
metolachlor	0,33		
simazine	0,12		
terbutylazine	0,33		
terbutylazine désétyl	0,54		
carbamazépine	0,09		
diclofenac	0,1		
carbamazépine	0,26	flux continu dans aquarium de 27 L dans eau du robinet agitation (hélicoïdale) vitesse agitation = 80 rpm renouvellement = 13,6 L.j-1 dopage = 500 ng.L-1 T=20°C pH = 7	
diclofenac	0,08		
carbamazépine	0,25 / 0,25 / 0,21	flux continu dans aquarium de 27 L dans eau de mer artificielle agitation (hélicoïdale) vitesse agitation = 120 rpm renouvellement = 13,6 L.j-1 dopage = 200 mL.j-1 d'une solution à ≈ 120 mg.L-1 T=19°C pH = 7 / 5 / 10 salinité = 0 PSU	
diclofenac	0,06 / 0,09 / 0,04		
paracetamol	ND		
carbamazépine	0,22 / 0,23	flux continu dans aquarium de 27 L dans eau de mer artificielle agitation (hélicoïdale) vitesse agitation = 120 rpm renouvellement = 13,6 L.j-1 dopage = 200 mL.j-1 d'une solution à ≈ 120 mg.L-1 T=19°C pH = 7 salinité = 15 PSU / 35 PSU	
diclofenac	0,07 / 0,12		
paracetamol	ND		
atrazine	0,31	batch fermé dans aquarium de 27L dans eau du robinet, agitation (80rpm), renouvellement de l'eau journalié, T= 19°C, concentration dans l'eau ~400ng/L	
chlorotoluron	0,45		
DCPMU	0,29		

DCPU	0,53		
diuron	0,3		
isoproturon	0,36		
linuron	0,18		
simazine	0,47		
terbutylazine	0,31		
atrazine	0,16		
chlorotoluron	0,16	batch fermé dans aquarium de 27L dans eau du robinet, sans agitation, renouvellement de l'eau journalié, T= 19°C, concentration dans l'eau ~400ng/L	
DCPMU	0,09		
DCPU	0,19		
diuron	0,11		
isoproturon	0,15		
linuron	0,06		
simazine	0,21		
terbutylazine	0,19	flux continu dans un aquarium de 86L dans eau du robinet, sans agitation, dopage = 20 à 100 ng/L	
acetochlor	0,35		
alachlor	0,36		
atrazine	0,26		
atrazine désétyl (DEA)	0,21		
carbamazépine	0,14		
carbendazim	0,1		
chlorotoluron	0,17		
DCPMU	0,15		
DCPU	0,18		
DIA	0,16		
diuron	0,3		
epoxiconazole	0,29		
isoproturon	0,11		
linuron	0,22		
penconazole	0,2		
simazine	0,11		
metolachlor	0,34		
tebuconazole	0,3		
terbutylazine	0,28		
tetraconazole	0,19		
acetochlor	0,35	batch fermé dans aquarium de 27L dans eau du robinet,, renouvellement de l'eau tous les 3jours, T= 19°C, dopage continue avec une solution à 100µg/g (10mL/jour)	
alachlor	0,38		
atrazine	0,18		
atrazine désétyl (DEA)	0,15		
carbendazim	0,05		
chlorotoluron	0,13		
DCPMU	0,14		

DCPU	0,23		
DIA	0,11		
diuron	0,21		
isoproturon	0,1		
linuron	0,21		
simazine	0,07		
metolachlor	0,24		
terbutylazine	0,19		
acetochlor	0,36		
alachlor	0,34		
atrazine	0,17		
atrazine désétyl (DEA)	0,15		
carbendazim	0,06		
chlorotoluron	0,11		
DCPMU	0,12		
DCPU	0,19		
DIA	0,12		
diuron	0,16		
isoproturon	0,08		
linuron	0,17		
simazine	0,06		
metolachlor	0,22		
terbutylazine	0,18		
sulfamethoxazole	0,092	eau du robinet dopée à 10µg/L, agité 11cm/s, T=20°C	(Bailly, n.d.)
sulfamethoxazole	0,107	eau du robinet dopée à 10µg/L, agité 29cm/s, T=20°C	
sulfamethoxazole	0,123	eau du robinet dopée à 10µg/L, agité 29cm/s, T=15°C	
sulfamethoxazole	0,085	eau du robinet dopée à 10µg/L, agité 29cm/s, T=25°C	
caféine	0,044	batch fermé dans béciers de 2L dans eau distillée déionisée, agitée 4,5m/s, dopée à 5 µg/l, T=25°C, pH 7 (seulement pour les pesticides)	(Bartelt-Hunt et al., 2011)
carbamazépine	0,288		
sulfamethoxazole	0,118		
alachlor	0,772		
atrazine	0,29		
atrazine désétyl (DEA)	0,236		
metolachlor	0,504		
simazine	0,223	batch fermé dans béciers de 2L dans eau de mer artificielle, eau remplacée tous les jours, agité avec un barreau aimanté, dopée à 0,5µg/L, T=21°C	(Martinezbuena et al., 2009)
atrazine	0,214		
diuron	0,086		
DIA	0,063	batch fermé dans aquarium de 80L dans eau du robinet, agitée, vitesse de 2-3cm/s, dopée 1-2µg/L, pH=7,3, T=17°C,	(Mazzella et al., 2007)
atrazine désétyl (DEA)	0,121		
simazine	0,21		
DCPMU	0,267		
atrazine	0,239		

isoproturon	0,217		
diuron	0,247		
terbutylazine	0,251		
linuron	0,236		
acetochlor	0,225		
acetochlor	0,223		
alachlor	0,256		
atrazine	0,254		
atrazine desethyl	0,133		
carbendazime	0,304		
chlorotoluron	0,252		
DCPMU	0,285		
DCPU	0,333		
DIA	0,068		
dimethomorphe	0,319		
diuron	0,257		
epoxiconazole	0,28		
imidaclopride	0,29		
isoprotoluron	0,237		IMT Alès
linuron	0,141		
metalaxyl	0,264		
metolachlor	0,268		
oxadixyl	0,279		
penconazole	0,08		
prochloraze	0,195		
prosulfocarbe	0,071		
pyrimethanil	0,231		
simazine	0,218		
terbuconazole	0,24		
terbutylazine	0,163		
tetraconazole	0,139		
atrazine	0,57		
atrazine désétyl (DEA)	0,42		
DIA	0,22		
boscalid	0,25		
carbendazim	0,22	batch fermé dans aquarium de 95L dans de l'eau de rivier, agitée 10cm/s, DOC = 17mg/L, T=20°C, dopée à 400ng/L	(Ahrens et al., 2015)
chloridazone	0,44		
diuron	0,18		
epoxiconazole	0,17		
fluroxypyr	0,003		
imidaclopride	0,18		

isoproturon	0,37		
linuron	0,12		
metalaxyl	0,45		
metazachlor	0,5		
penconazole	0,17		
prochloraze	0,01		
propyzamide	0,3		
prosulfocarbe	0,13		
simazine	0,48		
terbutylazine	0,45		
terbutylazine désétyl	0,97		
atrazine	0,013	in situ dans eau de surface (rivier)	(Ahrens et al., 2018)
atrazine désétyl (DEA)	0,035		
chloridazone	0,017		
imidaclopride	0,28		
isoproturon	0,35		
metalaxyl	0,084		
terbutylazine	0,069		
terbutylazine désétyl	0,01		

### c. Stratégie d'échantillonnage

Les échantillonnages ont été réalisés sur les stations S1 et S3 (annexe 1.3) à l'aide d'échantillonneurs passifs de type POCIS (AttractSPE POCIS, Affinissep). Ces derniers ont été exposés du 03 au 18 février 2022 (15 jours) à environ 15-20 cm de profondeur. Lors de la pose et de la récupération des échantillonneurs, des échantillonnages ponctuels d'eau ont également été effectués sur les deux stations (3 x 500 mL). De même, un blanc POCIS a été utilisé comme témoin de contamination lors de la pose et de la récupération des échantillonneurs passifs. Le blanc POCIS consiste en un POCIS laissé sur le bateau lors de la pose des échantillonneurs puis ramené immédiatement ensuite au laboratoire pour être extrait. Les analyses ont été réalisées en deux étapes : (i) la préparation de l'échantillon (extraction, purification et concentration des analytes) dont les protocoles sont exposés en annexe 1.9 et 1.10, et (ii) la détection et la quantification des composés a été réalisé par chromatographie liquide haute performance couplée à de la spectrométrie de masse en tandem (HPLC/MS/MS). L'extraction des eaux prélevées par échantillonnages ponctuels ont été réalisées à l'aide sur cartouche SPE (HLB Oasis).

L'ensemble de la campagne d'échantillonnage de 2022 a été réalisée en collaboration avec le Centre de Recherche et d'Enseignement en Environnement et en Risques (CREER) de l'IMT des Mines d'Alès.

Lors de cette campagne d'échantillonnage, un nombre plus restreint de résidus ont été recherchés. En effet, l'utilisation de POCIS pour la quantification de résidus nécessite une étude préalable de l'adsorption de chaque résidu sur celui-ci. Étant donné nos contraintes de temps, nous avons fait le choix d'utiliser des Rs moyen calculés à partir de la littérature pour 33 résidus phytosanitaires et 7 résidus pharmaceutiques (annexe 1.8).



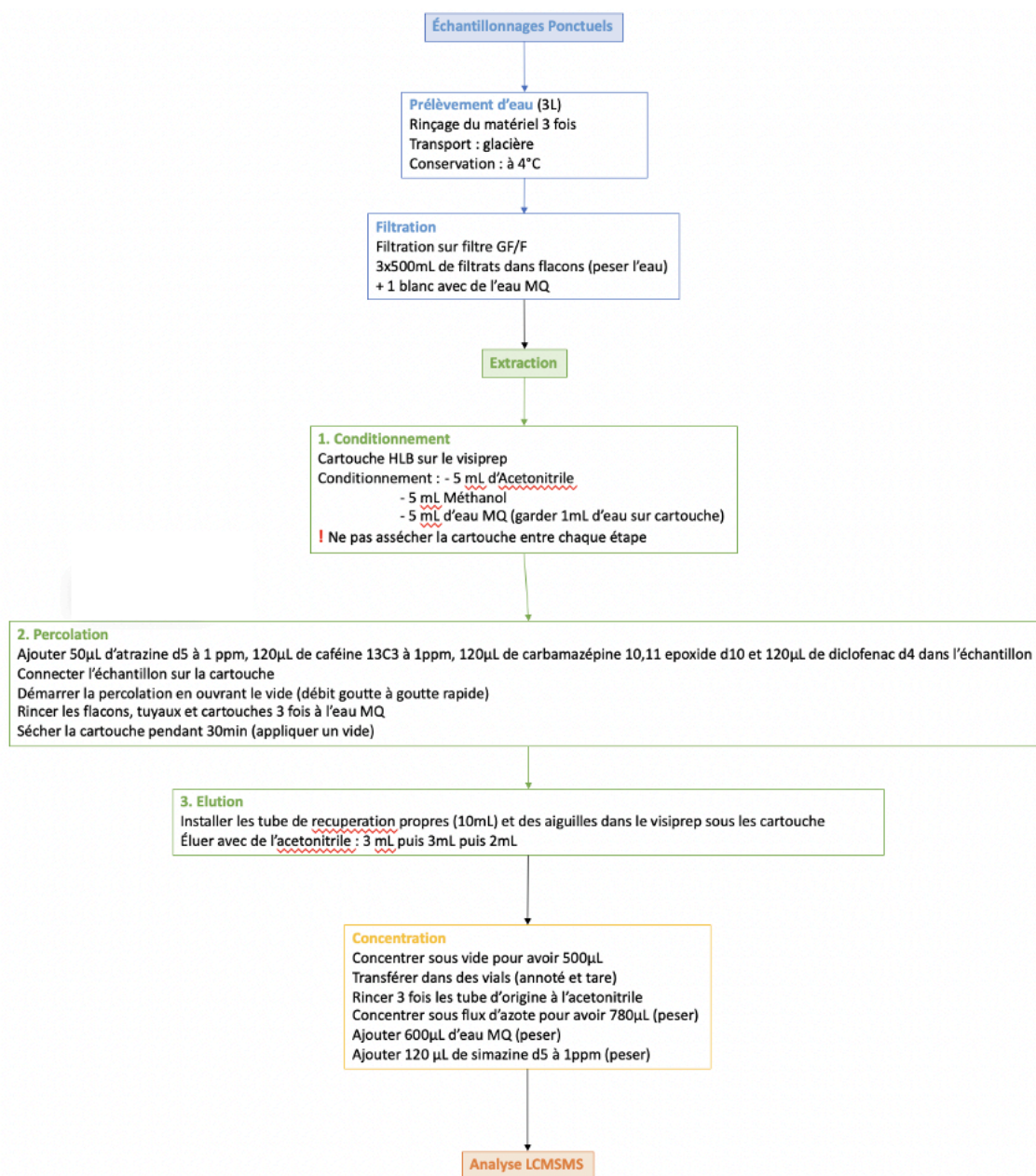
Les performances analytiques des méthodes de détections utilisées dépendent du composé et varient dans les gammes données dans les tableaux annexes 1.11, lors de la cette campagne les limites de détection (LD) et de quantifications (LQ) ont été calculées individuellement pour chaque composé à partir de la courbe d'étalonnage (Equation (12) et (13)).

$$LD = 3. \frac{\sigma}{a} \quad \text{Equation (12)} \quad \text{et} \quad LQ = 10. \frac{\sigma}{a} \quad \text{Equation (13)}$$

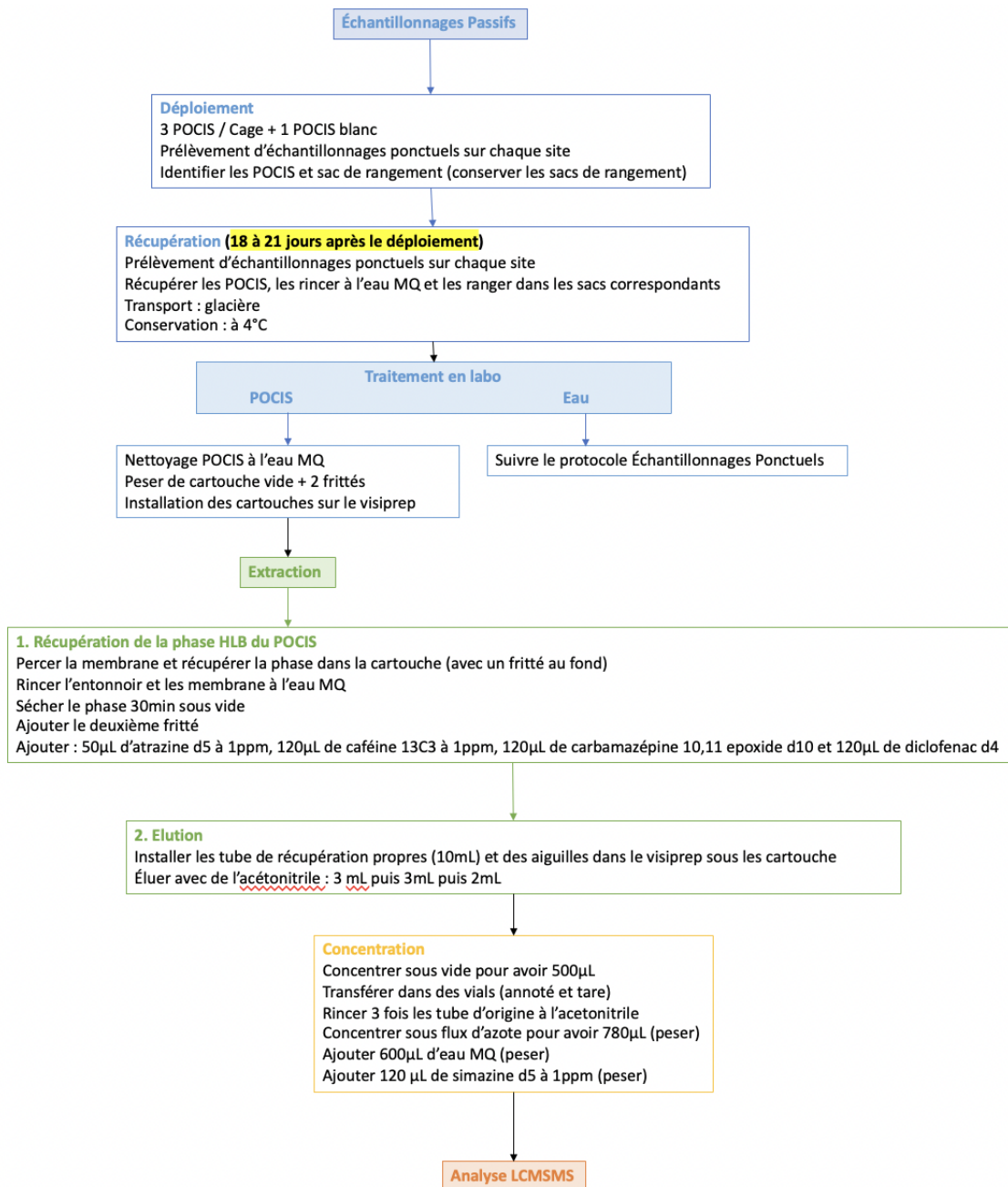
Avec  $\sigma$  l'erreur standard sur la concentration mesurée par chromatographie, et  $a$  la pente de la courbe d'étalonnage concentration mesurée en fonction de la concentration réelle de l'étalon.

*Annexe 1.11 : Performances analytiques des méthodes de détection utilisées (a) pour la matrice "Eau " et (b) pour la matrice POCIS*

a.	Méthode utilisée	Familles de composés recherchés avec cette méthode	Limite de détection LD (ng/L)	Limite de quantification LQ (ng/L)	b.	Méthode utilisée	Familles de composés recherchés avec cette méthode	Limite de détection LD (ng/POCIS)	Limite de quantification LQ (ng/POCIS)
<b>Matrice "Eau ", analyse au CREER de l'IMT Mines d'Alès</b>					<b>Matrice "POCIS ", analyse au CREER de l'IMT Mines d'Alès</b>				
	LC/MS/MS	Phytosanitaires	4 - 310	13 - 1036		LC/MS/MS	Phytosanitaires	2 - 155	7 - 518
	LC/MS/MS	Phytosanitaires	25 - 68	83 - 229		LC/MS/MS	Phytosanitaires	13 - 34	42 - 122



Annexe 1.9: Protocole utilisé pour les extractions des échantillons ponctuels.



Annexe 1.10: Protocole utilisé pour les extractions des POCIS.

## Résultats et Discussions

### 1. Échantillonnage ponctuel

Lors de la campagne de prélèvement réalisée le 16 janvier 2020 dans les 6 stations de la lagune de Salses-Leucate, seule la turbidité a présenté des variations d'une station à l'autre. En revanche, l'ensemble des autres paramètres physico-chimiques mesurés lors de cette campagne (salinité, O<sub>2</sub> dissous, température, conductivité) présentent des valeurs relativement proches les unes des autres.

La recherche systématique des 439 résidus organiques dans la matrice eau (396 résidus de phytosanitaires, 17 résidus d'HAP, 15 résidus de PCB, 3 résidus pharmaceutiques et 8 résidus d'alkylphénols) et des 126 résidus dans le sédiment (91 résidus de phytosanitaires, 11 résidus d'HAP, 15 résidus de PCB et 8 résidus d'alkylphénols) de la lagune ne révèle aucune valeur supérieure aux normes réglementaires en vigueur sauf pour les octylphénols détectés dans le sédiment à l'état de traces mais potentiellement supérieurs aux normes en vigueur (les limites de détection et de quantification de la méthode ne permettent pas de dire avec précision la quantité d'octylphénol ce qui amène à une interprétation délicate). Par ailleurs, il est important de noter que de nombreux composés détectés dans l'eau et/ou le sédiment ne présentent pas de normes réglementaires environnementales en vigueur (exemple le cyantraniliprol, le terbumeton...) ce qui amène à une interprétation délicate des concentrations détectées.

#### • Dans l'eau de la lagune :

- 18 résidus détectés dans au moins 1 des 6 stations :
  - 7 résidus phytosanitaires (chloridazone, cyantraniliprol, fluroxypyr, fluxapyroxad, simazine, terbumeton déséthyl et terbuthylazine déséthyl) dont 5 présents dans toutes les stations (chloridazone, fluxapyroxad, simazine, terbumeton déséthyl et terbuthylazine déséthyl)
  - 3 résidus pharmaceutiques présents dans toutes les stations analysées (carbamazépine, diclofénac et sulfaméthoxazole)
  - 8 résidus d'alkylphénols présents dans toutes les stations analysées (octylphénols, nonylphénols, octylphénol (mono et di)ethoxylate et nonylphénol (mono et di)ethoxylate)
  - 1 résidus phytosanitaires retrouvés à des teneurs supérieures à la limite de quantification (cyantraniliprol)

#### • Dans les sédiments de la lagune :

- 24 résidus détectés dans au moins 1 des 6 stations :
  - 5 résidus d'HAP (benzo(a)anthracène, benzo(a)pyrène, benzo(b+k)fluoranthène, fluoranthène et indénol(1,2,3,-cd)pyrène) dont 1 présents dans toutes les stations (fluoranthène)
  - 3 résidus phytosanitaires présents dans toutes les stations analysées (lindane et permethrine (cis et trans))
  - 8 résidus de PCB présents dans toutes les stations analysées (18, 28, 52, 101, 118, 138, 149, 153)
  - 8 résidus d'alkylphénols présents dans toutes les stations analysées (octylphénol, nonylphénol, octylphénol (mono et di)ethoxylate et nonylphénol (mono et di)ethoxylate)

- 5 résidus d'HAP retrouvés à des teneurs supérieures à la limite de quantification (benzo(a)anthracène, benzo(a)pyrène, benzo(b+k)fluoranthène, fluoranthène et indénol(1,2,3,-cd)pyrène)

Dans la majorité des stations d'échantillonnage, les résidus détectés sont les mêmes (résidus détectés majoritairement dans 100% des prélèvements) ce qui, à ce stade et sous réserve d'analyses complémentaires pour confirmer ou infirmer ces résultats, laissent supposer une pollution diffuse des composés dans la lagune. De plus, tous les composés détectés sont à l'état de traces et beaucoup d'entre eux sont interdits en France (voir aussi en Europe) ou considérés comme substances extrêmement préoccupantes depuis plus ou moins longtemps. L'annexe 1.12a et b récapitulent l'ensemble des composés retrouvés dans l'eau (1.12a) et le sédiment (1.12b) ainsi que leurs utilisations, interdiction ou non, normes en vigueur, et concentration.

L'analyse plus détaillée des composés détectés dans l'eau met en évidence que la majorité des composés sont interdits en France depuis plusieurs années. Pour les produits phytosanitaires, la majorité des composés détectés sont des composés utilisés comme herbicides dans les cultures de vignes, oliviers et dans l'arboriculture ce qui correspond aux paysages de la région des Corbières composés majoritairement de vignes, oliviers et fruitiers.

En comparant nos résultats à ceux obtenus par l'Ifremer en 2013 dans l'étude PEPS-LAG (réalisée elle en fin de printemps, début d'été : entre mai et août, (Munaron et al., 2012)), deux composés phytosanitaires, la simazine et la terbuthylazine déséthyl ressortent comme contaminants fréquents de la lagune puisque présents dans les deux études réalisées à des périodes différentes et avec des méthodes également différentes. En revanche, l'échantillonnage ponctuel réalisé lors de notre campagne met en évidence la présence de composés n'ayant pas été recherchés ou détectés par la méthode de l'échantillonnage passif réalisé dans l'étude PEPS-LAG de 2013. Pour les composés non détectés, il s'agit du cyantraniliprole et du fluroxypyr, et pour ceux non recherchés, il s'agit du chloridazone, du fluxapyroxad et du terbumeton déséthyl. De même, l'accumulation de composés par les échantillonneurs passifs de l'étude PEPS-LAG a permis de détecter des composés à l'état de traces dans l'eau qui n'ont pas été détectés dans la présente étude tel que par exemple l'Aldrine, l'Atrazine, le Diuron ou le DMST..., ou encore d'autres composés n'ayant pas été recherchés ici tel que par exemple la DCPU, le DMSA, l'hydroxy atrazine ou l'hydroxysimazine.

De même, en s'appuyant sur d'autres études réalisées ailleurs en France sur des eaux de surfaces (Ile de France ,programme de surveillance INFO'PHYTO n°10 d'octobre 2018), il en ressort que les composés phytosanitaires retrouvés dans la lagune sont également retrouvés en France mais globalement dans des concentrations beaucoup plus importantes (de l'ordre du µg/L en Ile de France contre du ng/L dans la Lagune de Salses-Leucate).

Concernant les composés retrouvés dans le sédiment, il s'agit de composés hydrophobes tels que les PCB, les HAP ou les alkyl phénols. Tous ces composés sont interdits en France (phytosanitaires et PCBs interdits depuis plus de 20 ans) et/ou sont classés comme étant des substances extrêmement préoccupantes selon la réglementation européenne (ECHA) pour tous les HAP et les alkylphénols car nocives pour l'environnement et/ou la santé et se retrouvant souvent dans notre alimentation par le biais des poissons, crustacés... Mise à part pour les octylphénols, les concentrations de toutes les substances retrouvées dans le sédiment sont inférieures aux normes en vigueur en France. Les octylphénols (4-tert-octylphénol et 4-n-octylphénol) sont des perturbateurs endocriniens classés sur la liste des



substances extrêmement préoccupantes depuis 2011 (ECHA, 2012) et ayant fait l'objet de mesures prioritaires de la convention "*pour la protection de l'environnement marin de l'Atlantique Nord-Est*" (OSPAR Commission, 2019). D'après cette convention, les octylphénols doivent être progressivement éliminés des milieux marins d'ici 2020 or ils sont toujours retrouvés dans la lagune de Salses-Leucate. De plus, d'autres études réalisées précédemment par la Direction régionale de l'Environnement, de l'Aménagement et du Logement Occitanie, Mer Littoral montrent une contamination constante aux alkylphénols dans les sédiments de la lagune. En effet, cette étude réalisée sur les sédiments de Port Leucate et Port Barcarès entre 2010 et 2014 met en évidence la présence de HAP en quantités plus importantes (entre 10 et 100 µg/kg de masse sèche) que celles détectées dans la lagune cette année (de l'ordre du µg/kg de masse sèche) avec l'étude ici présentée (DREAL Occitanie, 2012a, 2012b).

## Annexe 1.12a : Récapitulatif des composés détectés dans la matrice eau (ND = Non détecté)

Famille	Composé	Concentration (en ng/L)						Utilisation	Normes NOE en eau salée <sup>1</sup> (en ng/L)
		S1	S2	S3	S4	S5	S6		
Produits Phytosanitaires	Chloridazone	1,3	2,8	<<1	1,1	1,4	1	Herbicide utilisé pour les betteraves – <b>INTERDIT EN FRANCE DEPUIS 2019<sup>2</sup> (écoulement des stocks avant fin 2020)</b>	Non trouvée
	Cytraniliprol	ND	ND	12	ND	ND	ND	Insecticide utilisé pour les rosiers, arbres, arbustes, fleurs...	Non trouvée
	Fluroxypyr	ND	ND	5,5	ND	ND	ND	Herbicide utilisé pour les céréales (blé, avoine, seigle...)	123 x 10 <sup>3</sup>
	Fluxapyroxad	<<1	<<1	<<1	<<1	<<1	<<1	Fongicide utilisé pour les céréales	Non trouvée
	Simazine	1	1,4	3	1,3	0,9	1,5	Herbicide utilisé dans l'arboriculture et la viticulture – <b>INTERDIT EN FRANCE DEPUIS 2001<sup>3</sup></b>	4,2 x 10 <sup>3</sup>
	Terbumeton déséthyl	1,9	2,5	3,6	3,1	2,1	2,2	Herbicide utilisé pour les agrumes et les vignes – <b>INTERDIT EN FRANCE DEPUIS 1998 (et 2003<sup>4</sup> en Europe)</b>	Non trouvée
	Terbuthylazine déséthyl	1,1	2,1	2,9	1,8	1,2	1,8	Herbicide utilisé pour les agrumes, vignes et oliviers – <b>INTERDIT EN FRANCE DEPUIS 2004<sup>5</sup></b>	32
Produits pharmaceutiques	Carbamazépine	Non recherché	Non recherché	<400	Non recherché	<400	<400	Antiépileptique	31,6 x 10 <sup>3</sup>
	Dicofénac	Non recherché	Non recherché	<500	Non recherché	<500	<500	Anti-inflammatoire non stéroïdiens	6 x 10 <sup>3</sup>
	Sulfaméthoxazole	Non recherché	Non recherché	<500	Non recherché	<500	<500	Antibiotiques sulfamidé	Non trouvée
Alkyl phénols	4-tert-octylphénol	Non recherché	Non recherché	<100	Non recherché	<100	<100	Utilisé dans les protecteurs solaires, les résines phénoliques (encres, vernis...).	133
	4-n octylphénol	Non recherché	Non recherché	<100	Non recherché	<100	<100	Également présent en temps qu'impureté dans le nonylphénol (entre 3 et 10%) – <b>SUBSTANCE EXTRÊMEMENT PREOCCUPANTE par ECHA en 2011, puis sur la liste des produits chimiques devant faire l'objet de mesures prioritaires de la convention "pour la protection de l'environnement marin de l'Atlantique Nord-Est" (OSPAR) et devant être progressivement éliminée des milieux marins d'ici 2020</b>	133
	Octylphénol Monoéthoxylate (OPEO1)	Non recherché	Non recherché	<100	Non recherché	<100	<100	Utilisé comme émulsifiants et agents de dispersion dans des pesticides – <b>SUBSTANCE CANDIDATE à AUTORISATION AVEC UNE PRIORITE "RELATIVEMENT HAUTE" à "HAUTE" dans l'ECHA en 2013<sup>7</sup> car dans l'environnement se décompose en octylphénol</b>	Non trouvée
	Octylphénol Diéthoxylate (OPEO2)	Non recherché	Non recherché	<100	Non recherché	<100	<100		Non trouvée
	Nonylphénol	Non recherché	Non recherché	<100	Non recherché	<100	<100	Utilisé dans les matières plastiques, produits de nettoyages, fabrication de papier, fabrication de produit cosmétiques...mais soumis à réglementation (ne peuvent pas être mis sur le marché ni employés en tant que substances ou constituants de préparations à des concentrations égales ou supérieures à 0,1% en masse <sup>8</sup> ) – <b>SUBSTANCE PRIORITAIRE AU TITRE DE LA DIRECTIVE-CADRE SUR L'EAU en 2010<sup>9</sup> en tant que substance toxique pour la reproduction</b>	2,1 x 10 <sup>3</sup>
	4-n nonylphénol	Non recherché	Non recherché	<100	Non recherché	<100	<100		2,1 x 10 <sup>3</sup>
	Nonylphénol Monoéthoxylate (NPEO1)	Non recherché	Non recherché	<100	Non recherché	<100	<100	Utilisé dans les produits de nettoyage à destination industrielle et domestiques.	Non trouvée
Nonylphénol Diéthoxylate (NPEO2)	Non recherché	Non recherché	<100	Non recherché	<100	<100	Dans l'environnement se dégrade rapidement en nonylphénols	Non trouvée	

<sup>1</sup> Normes 2018 (INERIS, 2018), Concentration Maximale Acceptable (CMA) applicable dans l'eau visant la protection des organismes marins – <sup>2</sup> ANSES N°2019-10 Octobre 2019 (ANSES, 2019a) – <sup>3</sup> JO n°275 du 27 novembre 2001 (Règlementation Française, 2001) – <sup>4</sup> Règlement 2076/2002 (ANSES, 2007) – <sup>5</sup> Règlement 1490/2002 Avis JORF 26/9/2003 (Règlementation Française, 2003) – <sup>6</sup> Article 57 f - substance of very high concern (SVHC), Annexe X de la Directive n°2000/60/EC (Union Européenne, 2000a) – <sup>7</sup> Article 57 f - substance of very high concern (SVHC) (ECHA, 2012) – <sup>8</sup> Directive 2003/53/CE du 18 juin 2003 (Union Européenne, 2003) – <sup>9</sup> Arrêté du 22 novembre 2010 (Règlementation Française, 2010)

**Annexe 1.12b : Récapitulatif des composés détectés dans la matrice sédiment (ND = Non détecté ; PBT = Persistant, Bioaccumulable et Toxique ; vPvB = very Persistant et very Bioaccumulable)**

Famille	Composé	Concentration (en µg/kg Masse Sèche)						Utilisation	Normes NOE pour les sédiments en eau salée <sup>1</sup> (en ng/L)
		S1	S2	S3	S4	S5	S6		
HAP	Benzo(a) anthracène	ND	ND	0,43	ND	ND	Non recherché	Provient de combustions incomplètes (incendie, voiture...) et est aussi présent dans certains goudrons – <b>SUBSTANCE EXTREMEMENT PREOCCUPANTE par ECHA DEPUIS 2018<sup>2</sup> (PBT et vPvB)</b>	Non trouvée
	Benzo(a) pyrène	ND	ND	0,53	ND	ND	Non recherché	Provient de combustions incomplètes (incendie, voiture...) et est aussi présent dans certains goudrons – <b>SUBSTANCE EXTREMEMENT PREOCCUPANTE par ECHA DEPUIS 2016<sup>3</sup> (PBT et vPvB)</b>	91,5
	Benzo(b) fluoranthène	ND	ND	0,51	ND	ND	Non recherché	Provient de combustions incomplètes (incendie, voiture...) et est aussi présent dans certains goudrons – <b>SUBSTANCE EXTREMEMENT PREOCCUPANTE par ECHA DEPUIS 2001<sup>4</sup></b>	70,7
	Benzo(k) fluoranthène	ND	ND	0,27	ND	ND	Non recherché	Provient de combustions incomplètes (incendie, voiture...) et est aussi présent dans certains goudrons – <b>SUBSTANCE EXTREMEMENT PREOCCUPANTE par ECHA DEPUIS 2019<sup>5</sup> (PBT et vPvB)</b>	67,5
	Fluoranthène	0,1	0,2	1	0,3	0,2	Non recherché	Provient de combustions incomplètes (incendie, voiture...) et est aussi présent dans certains goudrons – <b>SUBSTANCE EXTREMEMENT PREOCCUPANTE par ECHA DEPUIS 2019<sup>5</sup> (PBT et vPvB)</b>	2000
	Indénol(1,2,3,-cd) pyrène	ND	ND	0,25	ND	ND	Non recherché	Provient de combustions incomplètes (incendie, voiture...) et est aussi présent dans certains goudrons – <b>SUBSTANCE EXTREMEMENT PREOCCUPANTE par ECHA DEPUIS 2001<sup>4</sup></b>	Non trouvée
Produits phytosanitaires	Lindane	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	Non recherché	Insecticide utilisé pour la démolition et le traitement des semences – <b>INTERDIT EN FRANCE DEPUIS 1998<sup>6</sup></b>	Non trouvée
	Permethrine (cis)	0,14	0,12	0,18	0,18	0,17	Non recherché	Insecticide/ acaricide utilisé pour les céréales – <b>INTERDIT EN FRANCE DEPUIS 2000<sup>7</sup></b>	Non trouvée
	Permethrine (trans)	0,31	0,26	0,14	0,26	0,15	Non recherché		Non trouvée
PCBs	18, 28, 52, 101, 118, 138, 149, 153	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	Non recherché	Utilisé pour comme lubrifiants (turbines, pompes...), dans la fabrication de transformateurs électriques et de condensateurs, et dans certaines peintures, huiles, adhésifs... – <b>INTERDIT EN FRANCE DEPUIS 1987<sup>8</sup> COMME POLLUANTS ORGANIQUES PERSISTANTS</b>	680 pour les PCB totaux
Alkyl phénols	4-tert-octylphénol	Non recherché	Non recherché	<100	Non recherché	<100	<100	Utilisé dans les protecteurs solaires, les résines phénoliques (encres, vernis...). Également présent en temps qu'impureté dans les nonylphénol (entre 3 et 10%) – <b>SUBSTANCE EXTREMEMENT PREOCCUPANTE par ECHA en 2011, puis</b>	3,4
	4-n octylphénol	Non recherché	Non recherché	<100	Non recherché	<100	<100		3,4

								sur la liste des produits chimiques devant faire l'objet de mesures prioritaires de la convention "pour la protection de l'environnement marin de l'Atlantique Nord-Est" (OSPAR) et devant être progressivement éliminée des milieux marins d'ici 2020	
	<b>Octylphénol Monoéthoxylate (OPEO1)</b>	Non recherché	Non recherché	<50	Non recherché	<50	<50	Utilisé comme émulsifiants et agents de dispersion dans des pesticides – <b>SUBSTANCE CANDIDATE à AUTORISATION AVEC UNE PRIORITE "RELATIVEMENT HAUTE" à "HAUTE" dans l'ECHA en 2013<sup>9</sup> car dans l'environnement se décompose en octylphénol</b>	Non trouvée
	<b>Octylphénol Diéthoxylate (OPEO2)</b>	Non recherché	Non recherché	<50	Non recherché	<50	<50		Non trouvée
	<b>Nonylphénol</b>	Non recherché	Non recherché	<100	Non recherché	<100	<100	Utilisé dans les matières plastiques, produits de nettoyages, fabrication de papier, fabrication de produit cosmétiques...mais soumis à réglementation (ne peuvent pas être mis sur le marché ni employés en tant que substances ou constituants de préparations à des concentrations égales ou supérieures à 0,1% en masse <sup>10</sup> ) – <b>SUBSTANCE PRIORITAIRE AU TITRE DE LA DIRECTIVE-CADRE SUR L'EAU en 2010<sup>11</sup> en tant que substance toxique pour la reproduction</b>	180
	<b>4-n nonylphénol</b>	Non recherché	Non recherché	<100	Non recherché	<100	<100		180
	<b>Nonylphénol Monoéthoxylate (NPEO1)</b>	Non recherché	Non recherché	<50	Non recherché	<50	<50	Utilisé dans les produits de nettoyage à destination industrielle et domestiques. Dans l'environnement se dégrade rapidement en nonylphénols	Non trouvée
	<b>Nonylphénol Diéthoxylate (NPEO2)</b>	Non recherché	Non recherché	<50	Non recherché	<50	<50		Non trouvée

<sup>1</sup> Normes 2018 (INERIS, 2018), Concentration Maximale Acceptable (CMA) applicable aux sédiments visant la protection des organismes marins – <sup>2</sup> [ED/01/2018](#) (ECHA, 2018a) – <sup>3</sup> [ED/21/2016](#) (ECHA, 2016) – <sup>4</sup> 2455/2001/CEE (Union Européenne, 2001) – <sup>5</sup> [ED/88/2018](#) (ECHA, 2018b) – <sup>6</sup> *Avis 1997-01-28* – <sup>7</sup> *2000/817/CE* (Union Européenne, 2000b) – <sup>8</sup> *Décret n° 87-59* (Réglementation Française, 1987) – <sup>9</sup> Article 57 f - substance of very high concern (SVHC) (ECHA, 2012) – <sup>10</sup> Directive 2003/53/CE du 18 juin 2003 (Union Européenne, 2003) – <sup>11</sup> Arrêté du 22 novembre 2010 (Réglementation Française, 2010)

### 3. Échantillonnage passif ou cumulatif

Lors de la campagne de prélèvement réalisée en février 2023 dans les 2 stations de la lagune de Salses-Leucate, les paramètres physico-chimiques mesurés lors de cette campagne (salinité, O<sub>2</sub> dissous, température, conductivité, pH et turbidité) présentent des valeurs relativement proches les unes des autres.

La recherche systématique des 40 résidus de contaminants organiques dans la matrice eau (33 résidus de phytosanitaires, 7 résidus pharmaceutiques) de la lagune ne révèle aucune valeur supérieure aux normes réglementaires en vigueur aussi bien pour les échantillonnages ponctuels que cumulatifs (annexe 1.13). Excepté pour le déisopropylatrazine, l'ensemble des résidus recherchés sont présents dans les échantillons avec des concentrations inférieures à la limite de quantification de la méthode. L'atrazine et la simazine sont également détectés à partir de l'extraction des POCIS mais en concentrations inférieures à la limite de quantification pour les deux stations. Le tableaux 3a récapitule l'ensemble des composés retrouvés dans l'eau ainsi que leurs utilisations, interdiction ou non, normes en vigueur, et concentration.

L'analyse plus détaillée des composés détectés dans l'eau met en évidence que la majorité des composés sont interdits en France depuis plusieurs années. Pour les produits phytosanitaires, la majorité des composés détectés sont des composés utilisés comme herbicides dans les cultures de vignes, oliviers et dans l'arboriculture ce qui correspond aux paysages de la région des Corbières composés majoritairement de vignes, oliviers et fruitiers.

En comparant nos résultats à ceux obtenus par l'Ifremer en 2013 dans l'étude PEPS-LAG (réalisée elle en fin de printemps, début d'été : entre mai et août, (Munaron et al., 2012)), certains composés phytosanitaires ressortent comme contaminants fréquents de la lagune puisque présents dans les études réalisées à des périodes différentes et avec des méthodes également différentes. En effet, la simazine ressort en concentration similaire dans les deux campagnes réalisées durant cette thèse ainsi que dans l'étude de l'Ifremer. Il en est de même pour l'atrazine et ces composés de dégradation qui sont systématiquement détectés par les échantillonnages cumulatifs avec des concentrations constantes entre 2013 et 2022. De la même manière le Fluroxypyr et le terbumeton déséthyl ont été détectés dans les deux campagnes réalisées durant cette thèse quelle que soit la méthode d'échantillonnage utilisée mais ne peuvent pas être quantifiés.

Concernant les résidus pharmaceutiques, les composés détectés en 2013 lors de l'étude PEPS-LAG le sont toujours en 2022 mais en concentration nettement plus faible. Il est important de souligner la différence de concentration entre les études pour la caféine (facteur 300). La caféine étant l'un des composés les plus couramment consommés par la population il n'est pas étonnant d'en retrouver en forte concentration dans l'eau or lors de la dernière campagne d'échantillonnage réalisé durant cette thèse (2022) les concentrations détectées sont de l'ordre du ng/L/jour ce qui est très faibles.



## Annexes

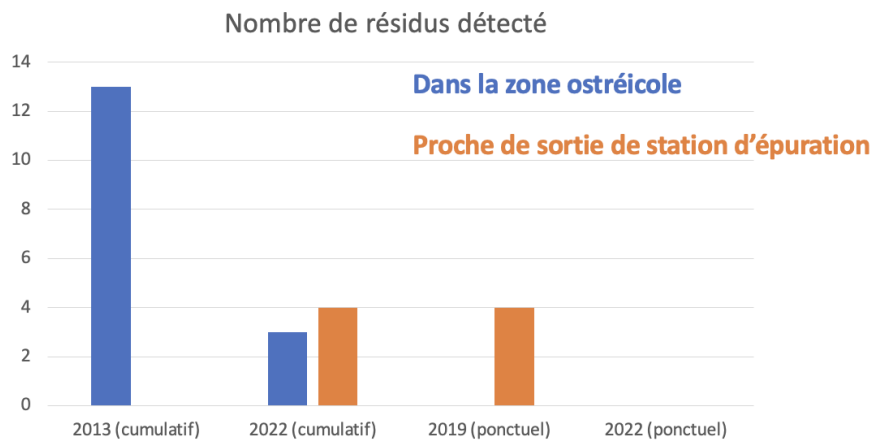
Annexe 1.13 : Récapitulatif des composés détectés dans la matrice eau (ND = Non détecté)

Famille	Composé	Concentration (en ng/L pour l'échantillonnage ponctuel et ng/L/jour pour l'échantillonnage cumulatif)						Utilisation	Normes NQE en eau salée <sup>1</sup> (en ng/L)
		S1 échantillonnage ponctuel (pose des POCIS)	échantillonnage ponctuel (récupération des POCIS)	échantillonnage cumulatif (POCIS)	S3 échantillonnage ponctuel (pose des POCIS)	échantillonnage ponctuel (récupération des POCIS)	échantillonnage cumulatif (POCIS)		
Produits Phytosanitaires	Acetochlore	<<1	0.5	<<1	<<1	0.5	ND	Herbicide utilisé dans les cultures de maïs - <b>INTERDIT EN France DEPUIS 2013</b> <sup>2</sup>	2,6 <sup>2</sup>
	Alachlor	<<1	0.6	<<1	0.7	0.6	<<1	Herbicide utilisé dans la culture d'arbre fruitiers	650
	Atrazine	<<1	0.7	0.6	<<1	<<1	0.6	Herbicide - <b>INTERDIT EN France DEPUIS 2001</b> <sup>3</sup>	200
	Atrazine-desethyl	<<1	<<1	0.9	<<1	<<1	1.1	produit de dégradation de l'atrazine, Herbicide	Non trouvée
	Chlorotoluron	<<1	0.8	<<1	<<1	0.5	0.6	Herbicide	Non trouvée
	DCPMU	<<1	1.2	<<1	1.1	0.6	<<1		
	Déisopropylatrazine (DIA)	1	2.6	14.6	4.8	3.2	14.6	produit de dégradation de l'atrazine, Herbicide	Non trouvée
	Diuron	1	1.1	1.3	0.5	0.8	1.1	Herbicide - <b>INTERDIT EN France</b> <sup>4</sup>	1800
	Epoxiconazole	<<1	0.6	<<1	<<1	<<1	<<1	Fongicide utilisé dans les cultures de céréale et betteraves - <b>INTERDIT EN France DEPUIS 2019</b> <sup>5</sup>	18 (PNEC) <sup>6</sup>
	Flazasulfuron	<<1	0.6	<<1	<<1	0.7	<<1	Herbicide utilisé dans les cultures d'agrumes, de vignes et d'olivier	70 (PNEC eau douce) <sup>16</sup>
	Isoproturon	ND	0.7	<<1	<<1	<<1	<<1	Herbicide	1000
	Linuron	<<1	0.6	<<1	<<1	0.6	<<1	Herbicide	Non trouvée
	Metalaxyl	<<1	1	<<1	0.5	0.6	<<1	Fongicide utilisé dans les cultures de légumes et les vignes	56 000(PNEC eau douce) <sup>7</sup>
	Metolachlor	<<1	1.3	<<1	1.2	1.5	<<1	Herbicide utilisé dans les cultures légumières, tropicales, maïs, soja, tournesol...	6 700 (PNEC eau douce) <sup>7</sup>
	Oxadixyl	<<1	<<1	0.6	<<1	<<1	<<1	Fongicide - <b>INTERDIT DEPUIS 2003</b> <sup>8</sup>	
	Penchloraz	<<1	0.6	<<1	0.6	<<1	<<1		
	Propyzamide	<<1	1.1	1.7	0.7	0.8	1.4	Herbicide utilisé dans les cultures de fruitiers, maïs, colza...	8 000 (PNEC eau douce)
	Simazine	<<1	0.5	<<1	<<1	<<1	<<1	Herbicide utilisé dans l'arboriculture et la viticulture - <b>INTERDIT EN FRANCE DEPUIS 2001</b> <sup>9</sup>	4,2 x 10
Tebuconazole	0.6	0.5	2.7	2.2	1.4	4.8	Fongicide utilisé dans les cultures légumière, fruitière et grande culture (maïs, blé...)	1 000 (eau douce)	
Terbutylazine	<<1	<<1	0.6	<<1	<<1	0.7	Herbicide utilisé pour les agrumes, vignes et oliviers - <b>INTERDIT EN FRANCE DEPUIS 2004</b> <sup>10</sup>	32	
Terbutylazine hydroxul	<<1	0.7	0.7	0.7	0.7	0.6	produit de dégradation de la terbuthylazine		

	<b>Fluroxypyr</b>	11.8	22.8	149.7	40.8	22.4	72.9	Herbicide utilisé pour les céréales (blé, avoine, seigle...)	123 x 10
	<b>Terbumeton desethyl</b>	ND	ND	0.3	ND	ND	0.8	produit de dégradation du terbumeton, Herbicide utilisé pour les agrumes et les vignes – <b>INTERDIT EN FRANCE DEPUIS 1998 (et 2003<sup>11</sup> en Europe)</b>	Non trouvée
<b>Produits pharmaceutiques</b>	<b>Cafeine</b>	ND	<<1	2.4	0.5	1.1	1.8	Stimulant	
	<b>Carbamazepine</b>	ND	ND	1.4	ND	ND	1.1	Antiepileptique	31600

<sup>1</sup> Normes 2018 (INERIS, 2018), Concentration Maximale Acceptable (CMA) applicable dans l'eau visant la protection des organismes marins – <sup>2</sup> Règlement 1107/2009/CE (Union Européenne, 2009) – <sup>3</sup> Rapport n°215, Annexe 47 (Parlement, 2003) – <sup>4</sup> JORF n°204 du 4 septembre 2007 (Reglementation Française, 2007) – <sup>5</sup> ANSES, saisine n°2018-SA-0289 (ANSES, 2019b, 2019c) – <sup>6</sup> Fiche INERIS (INERIS, 2011) – <sup>7</sup> ANSES (ANSES, 2021a, 2021b) – <sup>7</sup> Fiche INSERIS – <sup>8</sup> Règlement 2076/2002 Avis JORF 18/8/2002 (Reglementation Française, 2002) – <sup>9</sup> JO n°275 du 27 novembre 2001 (Reglementation Française, 2001) – <sup>10</sup> Règlement 1490/2002 Avis JORF 26/9/2003 (Reglementation Française, 2003) – <sup>11</sup> Règlement 2076/2002 (ANSES, 2007)

En conclusion, quelle que soit la méthode d'échantillonnage considérée, (ponctuel ou cumulatif), la contamination détectée dans l'eau de la lagune demeure à l'état de traces et est systématiquement inférieure aux normes en vigueur en France. Cette contamination est en constante diminution depuis 2013 avec un nombre de résidus détectés de plus en plus faible (annexe 1.14). Les concentrations relevées au cours des campagnes d'échantillonnage dans la lagune de Salse-Leucate n'ont pas permis d'identifier un ou plusieurs composés candidats, susceptibles d'être intégrés, seuls ou en mélange, à notre étude relative à l'inactivation de contaminants organiques par traitement photocatalytique. À titre informatif, ce travail devait initialement constituer le premier volet de ce travail de thèse.



Annexe 1.14: Évolution du nombre de résidus détecté dans deux zones de la lagune de Salses-Leucate

## Annexe N°2 : Supplementary file de l'article N°1

Fenton-based	O <sub>3</sub> -based	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -based	Electrochemical AOP	Sonochemical AOP	Photolysis (UV)	Heterogenous Photocatalysis
<p><b>Phenolic, compounds containing –COOH and –OH groups</b> Regeneration of the catalyst</p> <p><b>Irons ions</b> Additional source of catalyst</p> <p><b>Inorganic ions</b> Scavenging Iron complexation</p> <p><b>OM</b> Scavenging Light attenuation</p>	<p><b>OM</b> Scavenging Generation of by-products</p> <p><b>Inorganic ions</b> Scavenging Formation of &lt; active radicals</p>	<p><b>Formation of ROS (indirect photolysis)</b></p> <p><b>Temperature</b></p> <p>↑OM↓</p> <p><b>Inorganic ions :</b> Scavenging Light attenuation Scavenging Generation of by-products</p>	<p><b>Chloride ions</b> Improve available chlorine production</p> <p><b>pH</b></p> <p><b>HA</b> Improve precipitation</p>	<p><b>Irons ions</b> Additional sources of radical production (Fenton reaction)</p> <p>↑OM↓ Scavenging Hydrophobic compound &lt; access to cavitation bubbles</p> <p><b>NOM</b> Changing cavitation condition</p>	<p><b>NO<sub>3</sub>-</b></p> <p><b>Formation of ROS (HO• and NO<sub>2</sub>•)</b></p> <p><b>Formation of ROS (indirect photolysis)</b></p> <p>↑OM↓</p> <p>Generation of by-products Light attenuation Scavenging</p>	<p><b>Formation of ROS (indirect photolysis)</b></p> <p>↑OM↓</p> <p><b>Inorganic ions :</b> Scavenging Adsorption to catalyst Formation of &lt; active radicals Light attenuation Scavenging Adsorption to catalyst</p> <p><b>pH / ionic strength</b></p>
<b>Inhibitory effect</b>	<b>Both effect</b>	<b>Promoting effect</b>	<b>Promoting effect</b>	<b>Promoting effect</b>	<b>Promoting effect</b>	<b>Promoting effect</b>
<p>NOM = Non Organic Matter OM = Organic Matter HA = Humic Acid</p>						

Supplementary 1: Inhibitory and promoting effect for each AOP (OM: organic matter) (adapted from Lado Ribeiro et al.[26])

Supplementary 2: Summary of studies dealing with microorganism disinfection in saltwater using AOPs

Used AOP	Matrix	Microorganisms	Degradation efficiency	Ref/authors
UV	Milli-Q water	<i>Escherichia coli</i>	0.1167 s <sup>-1</sup>	[96]
	Natural fresh water	<i>Escherichia coli</i>	0.0149 s <sup>-1</sup>	[96]
	Artificial seawater	<i>Escherichia coli</i>	0.0795 s <sup>-1</sup>	[96]
		<i>Alteromonas sp</i>	0.1790 (cm <sup>2</sup> .m) <sup>-1</sup>	[79]
		<i>Corynebacterium stationis</i>	0.3688 (cm <sup>2</sup> .m) <sup>-1</sup>	[79]
	Natural seawater	<i>Vibrio</i>	0.009 min <sup>-1</sup> (CPC)	[150]
			0.004 min <sup>-1</sup> (RW)	[150]
			97.49% dead organisms	[95]
		<i>Enterococcus</i>	100% dead organisms	[95]
		<i>Escherichia coli</i>	98.45% dead organisms	[95]
<i>Plankton (zooplankton / phytoplankton)</i>	83.73% / 58.41% dead organisms	[95]		
UV/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Milli-Q water	<i>Escherichia coli</i>	0.1517 s <sup>-1</sup>	[96]
	Natural fresh water	<i>Escherichia coli</i>	0.1416 s <sup>-1</sup>	[96]
	Artificial seawater	<i>Escherichia coli</i>	0.1322 s <sup>-1</sup>	[96]
	Natural seawater	<i>Vibrio</i>	0.18 min <sup>-1</sup> (CPC)	[150]
			0.28 min <sup>-1</sup> (RW)	[150]
			0.0023 to 0.05 s <sup>-1</sup> (depend on the UV source)	[151]
			100% dead organisms	[95]
		<i>Enterococcus</i>	100% dead organisms	[95]
		<i>Escherichia coli</i>	99.22%	[95]
	<i>Plankton (zooplankton / phytoplankton)</i>	91.26% / 86.49% dead organisms	[95]	
UV/HSO <sub>5</sub> <sup>-</sup>	Natural seawater	<i>Vibrio</i>	0.0035 to 0.056 s <sup>-1</sup> (depend on the UV source)	[151]
UV/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /Fe <sup>2+</sup>	Milli-Q water	<i>Escherichia coli</i>	0.1986 s <sup>-1</sup>	[96]
	Natural fresh water	<i>Escherichia coli</i>	0.1828 s <sup>-1</sup>	[96]
	Artificial seawater	<i>Escherichia coli</i>	0.1823 s <sup>-1</sup>	[96]
UV/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /Fe <sup>2+</sup> /HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Milli-Q water	<i>Escherichia coli</i>	0.1540 s <sup>-1</sup>	[96]
	Natural fresh water	<i>Escherichia coli</i>	0.1466 s <sup>-1</sup>	[96]
	Artificial seawater	<i>Escherichia coli</i>	0.1376 s <sup>-1</sup>	[96]
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Natural seawater	<i>Vibrio</i>	0.17 min <sup>-1</sup>	[150]
			95.42% dead organisms	[95]

			100% dead organisms (3 log reduction in 40min)	[154]
		<i>Total cultivable bacteria</i>	100% dead organisms (6log reduction in 80min)	[154]
		<i>Escherichia coli</i>	89.77% dead organisms	[95]
		<i>Enterococcus</i>	0% dead organisms	[95]
		<i>Plankton (zooplankton / phytoplankton)</i>	71.81% / 87.76% dead organisms	[95]
UV/TiO <sub>2</sub>	Artificial seawater	<i>Alteromonas sp</i>	0.2666 (cm <sup>2</sup> .m) <sup>-1</sup>	[96]
		<i>Corynebacterium stationis</i>	0.5260 (cm <sup>2</sup> .m) <sup>-1</sup>	[96]
	Natural seawater	<i>Vibrio</i>	98.11% dead organisms	[95]
		<i>Escherichia coli</i>	99.03% dead organisms	[95]
		<i>Enterococcus</i>	100% dead organisms	[95]
		<i>Plankton (zooplankton / phytoplankton)</i>	74.81% / 88.42% dead organisms	[95]
<i>algae</i>	1 to 2 log (1min)	[153]		
UV/TiO <sub>2</sub> /H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Natural seawater	<i>Vibrio</i>	99.99% dead organisms	[95]
		<i>Escherichia coli</i>	98.38% dead organisms	[95]
		<i>Enterococcus</i>	100% dead organisms	[95]
		<i>Plankton (zooplankton / phytoplankton)</i>	83.85% / 96.15% dead organisms	[95]
Visible/Fe <sub>2</sub> -O <sub>3</sub> -TiO <sub>2</sub>	Artificial seawater	<i>Vibrio fischeri</i>	0.0083 s <sup>-1</sup> – 1 log (250min)	[98]
Cn-N-TiO <sub>2</sub> /UV	Natural seawater	<i>algae</i>	5 to 6 log (1min)	[153]
Fe-ACF electro Fenton-like	Natural seawater	<i>Chlorella</i>	10 to 100% dead organisms (depend on the voltage applied)	[164]
		<i>Dunaliella salina</i>	20 to 100% dead organisms (depend on the voltage applied)	[164]
UV/O <sub>3</sub> /H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Natural seawater	<i>Vibrio spp.</i>	100% dead organisms (3 log reduction in 20min)	[154]
		<i>Total culturable bacteria</i>	100% dead organisms (6 log reduction in 80min)	[154]
UV/BDD electrode	Natural seawater	<i>Heterotroph marine bacteria</i>	1082.32 L.Ah <sup>-1</sup>	[101]

### Annexe N°3 : Analyse de la méthode de traitement adéquate pour les résultats de metabarcoding : choix ASV / OTU FROGS

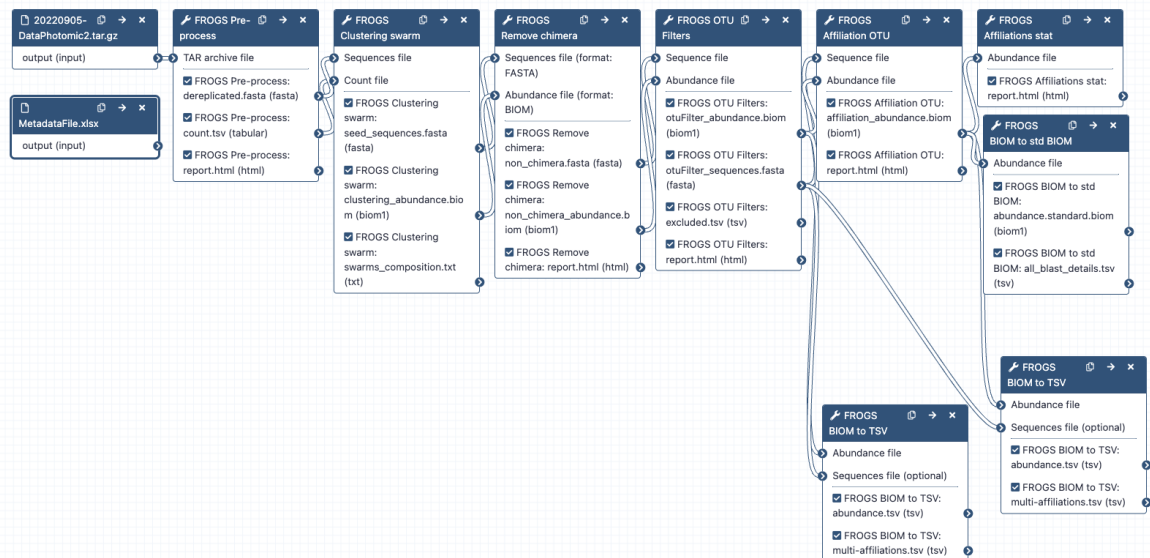
La littérature présente plusieurs méthodes d'analyse des données de séquençage, chacune avec ses avantages et inconvénients. Bien que certaines publications aient déjà comparé ces méthodes (Bernard et al., 2021), cette annexe se propose de les évaluer à partir nos propres données afin de tenter de déterminer la méthodologie la plus adaptée à notre étude. Le traitement des données a été effectué en parallèle, soit via la plateforme bioinformatique FROGS pour générer des OTUs avec l'algorithme SWARM (Annexe 3.1a), soit avec Qiime2 et Dada2 pour créer des ASV (réalisé en ligne de commande, Annexe 3.1b). Dans les deux cas, nous avons utilisé la base de données 16S Silva 138 pour effectuer les affiliations taxonomiques.



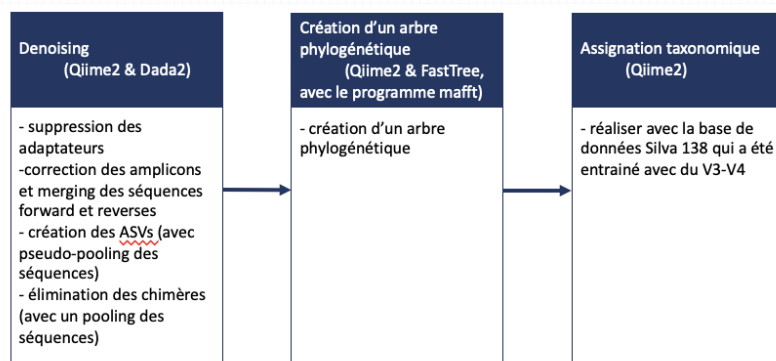
Une comparaison des méthodes utilisées à chaque étape (Annexe 3.2) révèle des différences importantes dans les outils bioinformatiques employés. La méthode utilisée dans FROGS pour la génération des OTUs souligne l'importance du choix de la séquence graine par l'algorithme dans le processus de clustering. En modifiant cette séquence graine, les clusters et donc les OTUs peuvent varier. De même, lors de la création des ASVs, des biais peuvent apparaître. En l'absence de "pseudo-pooling" des données lors de l'étape de dé-bruitage, les variants rares risquent d'être éliminés. En effet, avec Dada2, la création des ASVs est réalisée de manière indépendante pour chaque échantillon, ce qui signifie qu'un variant apparaissant seulement une fois dans un échantillon, même s'il est plus abondant dans d'autres, peut être considéré comme du bruit et être exclu de l'échantillon où il est moins représenté. Cependant, cela peut être corrigé en ajoutant un paramètre de pseudo-pooling, qui permet de réaliser le dé-bruitage en considérant l'ensemble des séquences de tous les échantillons, au lieu de les traiter individuellement.

a.

## 20220905-Photomic-F14V



b.



Annexe 3.1: Pipeline utilisé pour le traitement des données de barcoding (a) pour générer les OTUs avec FROGS (sur Galaxy) ou (b) pour générer les ASVs.

Annexe 3.2: comparaison étape par étape des méthodes utilisées pour la création d'ASV et d'OTU

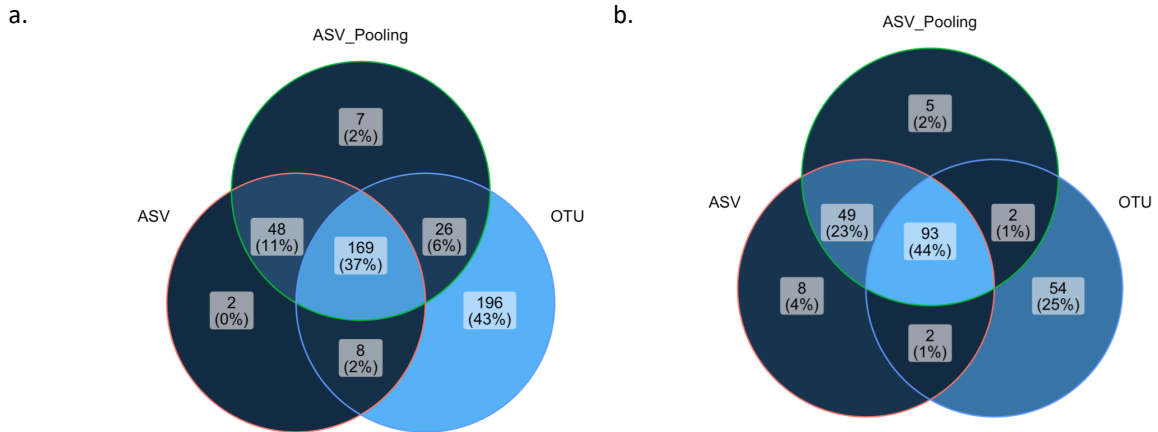
	OTUs FROGS	ASV
<b>Méthode de nettoyage</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Cutadapt</li> <li>- Taille des séquences</li> <li>- Élimination des bases ambiguës et des séquences ne contenant pas la séquence des amorces</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Choix manuellement en fonction de la qualité des séquences (possibilité d'utiliser cutadapt en amont)</li> <li>- Élimination des bases ambiguës (débruitage réalisé sur les 2 reads séparément, correction d'erreur de Golay)</li> </ul>
<b>Merge des Reads</b>	VSEARCH et Flash (avec un taux de mismatch de 0.1)	
<b>Méthode de clustering, création des OTUs / Création des ASVs</b>	Swarm (FROGS version 3.2) avec une distance d'agrégation de 1 (clustering itératif avec une différence de 1 avec la séquence précédente, PUIS vérification des abondances en fonction de la distance avec la séquence graine)	Création des ASV réalisée indépendamment entre chaque échantillon (ne tient pas compte des séquences des autres échantillons ou répliques) ce qui induit une perte des variants rares. Pour pallier à cela, le "pseudo-pooling" des données est utilisé pour le débruitage
<b>Élimination des chimères</b>	<i>De Novo</i> indépendamment sur chaque échantillon (VSEARCH avec la méthode UCHIME) puis élimination des séquences chimériques dans tous les échantillons (lorsqu'elles sont présentes)	<i>De Novo</i> indépendamment sur chaque échantillon (VSEARCH avec la méthode UCHIME) puis élimination des séquences chimériques par échantillon <b>SAUF</b> si ajout d'un paramètre de Pooling
<b>Affiliation taxonomique</b>	Blastn+ sur la base de données Silva138.1	Base de données Silva138

Une fois les ASVs et les OTUs générés, l'analyse statistique a été réalisée à l'aide du package "phyloseq" dans R. Pour comparer les deux méthodes de traitement, l'analyse statistique a été menée en parallèle pour les OTUs et les ASVs générés à partir des échantillons d'eau (comme présenté dans l'article N°2).

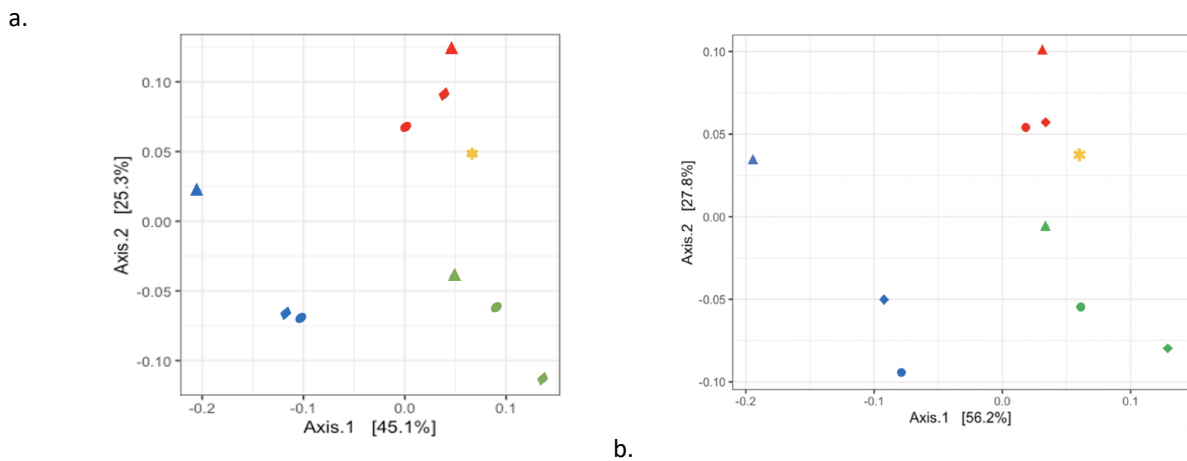
Dans un premier temps, les chloroplastes et les archées ont été exclus de l'analyse pour ne conserver que la communauté bactérienne. Ensuite, les séquences ont été normalisées entre tous les échantillons par raréfaction. Pour faciliter l'analyse des données, lorsque le genre bactérien était inconnu, la famille a été utilisée sous la forme "unknown\_genus\_family".

Une fois les données préparées, une analyse classique de la diversité alpha et de la dissimilarité bêta a été effectuée. L'Annexe 3.3 présente le nombre de genres bactériens détectés à la fois dans les analyses en ASV (avec et sans regroupement des échantillons pour la création des ASV) et en OTU, ou uniquement avec l'une des méthodes. Cette analyse met en évidence un plus grand nombre de genres bactériens détectés avec les OTUs lorsque aucune normalisation n'est appliquée (Annexe 3.3a). En revanche, le nombre de genres bactériens détectés est identique entre les ASVs (149) et les OTUs (151) lorsque seuls les genres bactériens représentant plus de 0,1% de l'abondance sont pris en compte. Cela signifie qu'une grande partie des genres bactériens détectés avec les OTUs sont présents en très faible abondance dans les échantillons.

Ces différences ont peu d'influence sur les analyses statistiques ultérieures, comme le montre l'Annexe 3.4, où les échantillons d'eau forment des groupes distincts en fonction du type de traitement de désinfection utilisé.

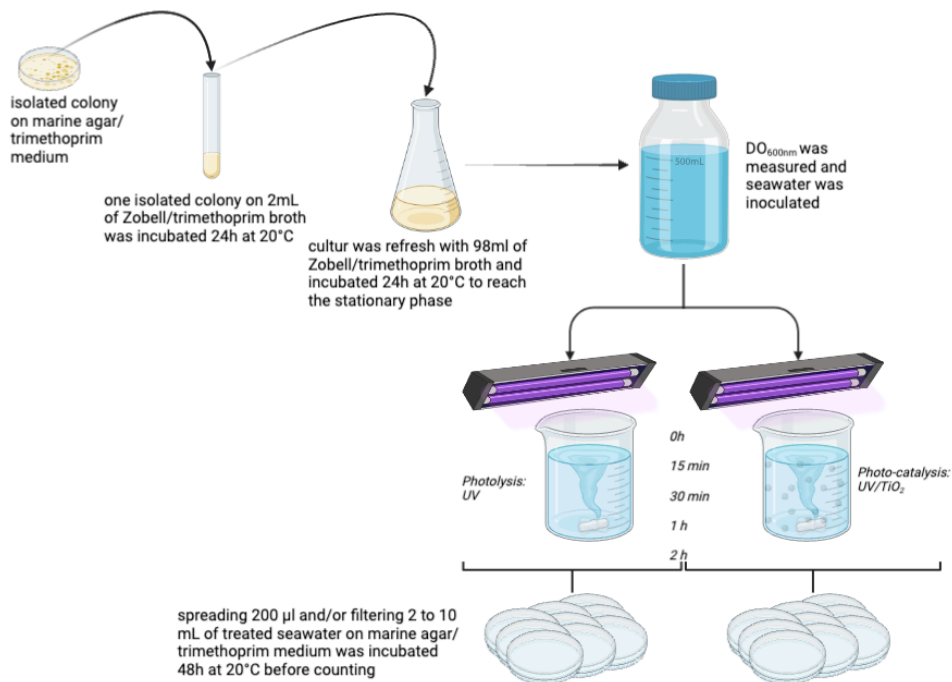


Annexe 3.3: Diagramme de Venn des genres bactériens retrouvés en fonction de la méthode d'analyse utilisée, (a) en prenant tous les ASV et OTU quel que soit leur abondance après avoir normalisé les données avec une raréfaction de 10 000, et (b) en prenant en compte uniquement les genres bactériens ayant une abondance supérieure à 0,1% après avoir normalisé les données avec une raréfaction de 10 000

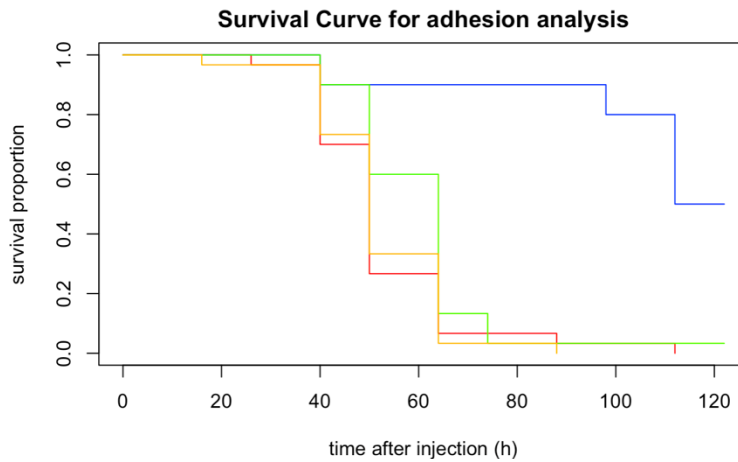


Annexe 3.3: Effet des traitements de désinfection sur le microbiote de l'eau, représentation en PCoA de la dissimilarité de Bray-Curtis (●) eau de mer n'ayant subi aucun traitement (contrôle), (●) eau de mer traitée par photocatalyse, et (●) eau de mer traitée par photolyse. Pour un traitement de (\*) 0h (microbiote de l'eau avant traitement), (·) 30 minutes, (♦) 1h, et (▲) 2h.

Annexe N°4 : Supplementary file de l'article N°2



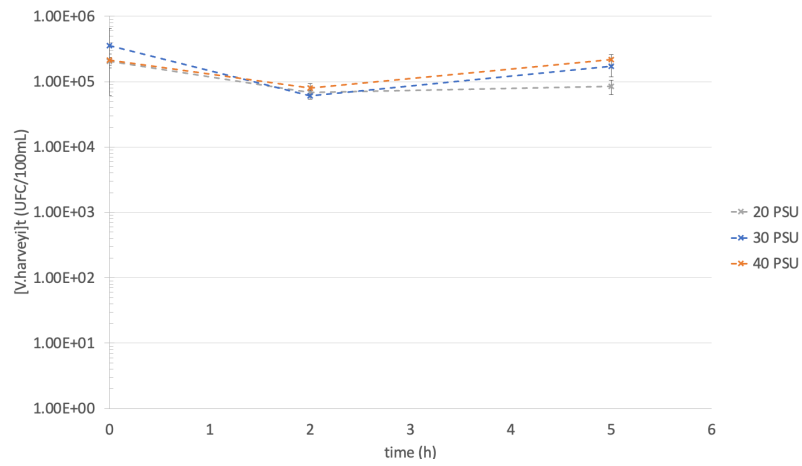
Supplementary 1: experimental design for the *Vibrio harveyi* inactivation.



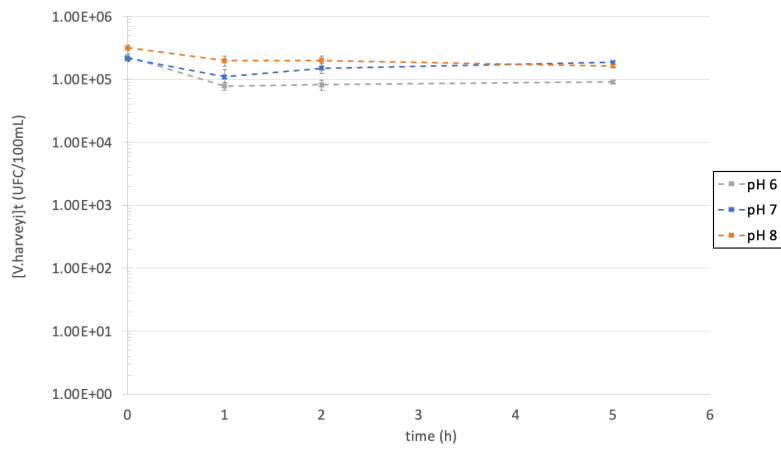
Supplementary 2: Survival curve of oyster for *OshV-1* adhesion experiments. — CSW after 30 min of UV/TiO<sub>2</sub> treatment, — CSW after 30 min of UV treatment, — CSW without treatment, — CSW after 30 min of adhesion onto 5 g/L of TiO<sub>2</sub> under agitation and kept out of any UV (dark control assay).

Supplementary 3: barcoding analysis pipeline.  
<https://github.com/CecileBlanchon/Article>

a.



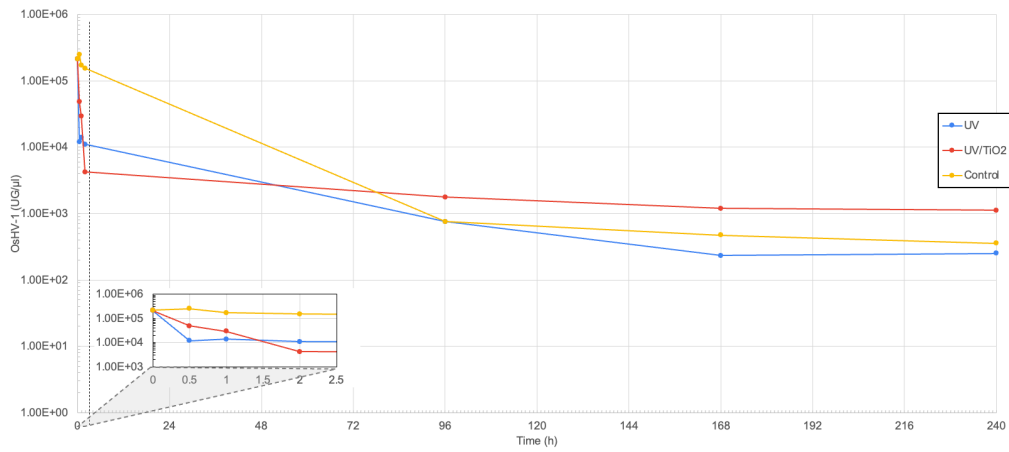
b.



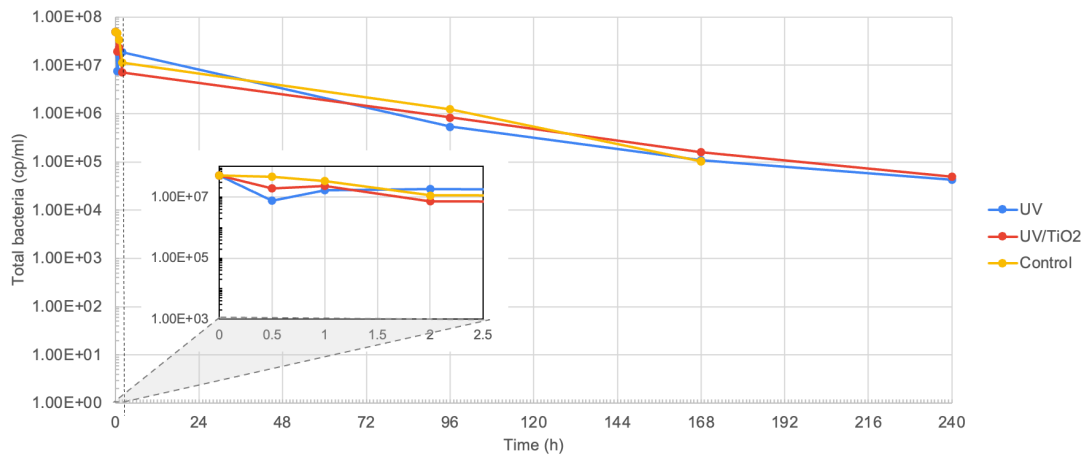
Supplementary 4 : *Vibrio harveyi* adhesion experiment (a) at various salinity, and (b) at various pH. Experiments were performed with artificial seawater (Lewis water) at 5 g/L of  $\text{TiO}_2$  under agitating and kept out of any UV for 5 hours, corresponding to dark control assays.



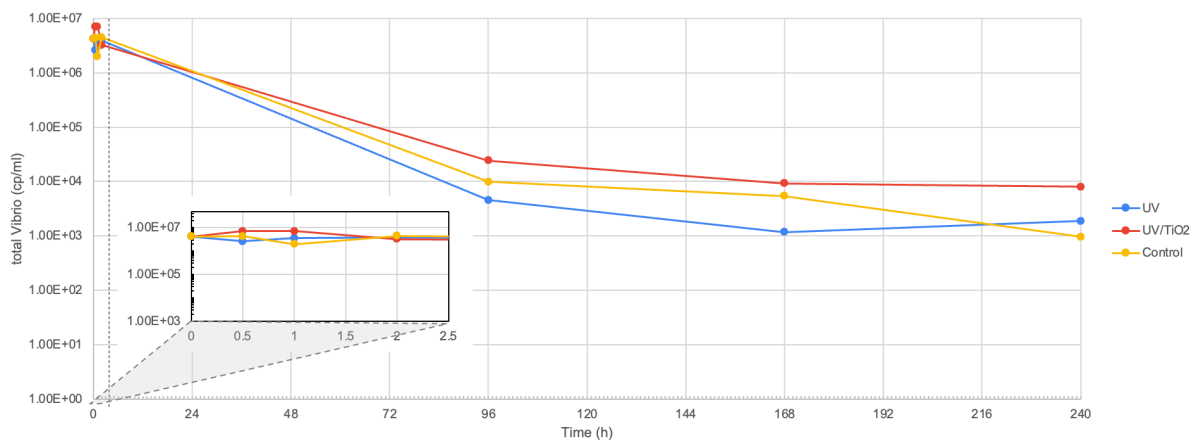
a.



b.



c.

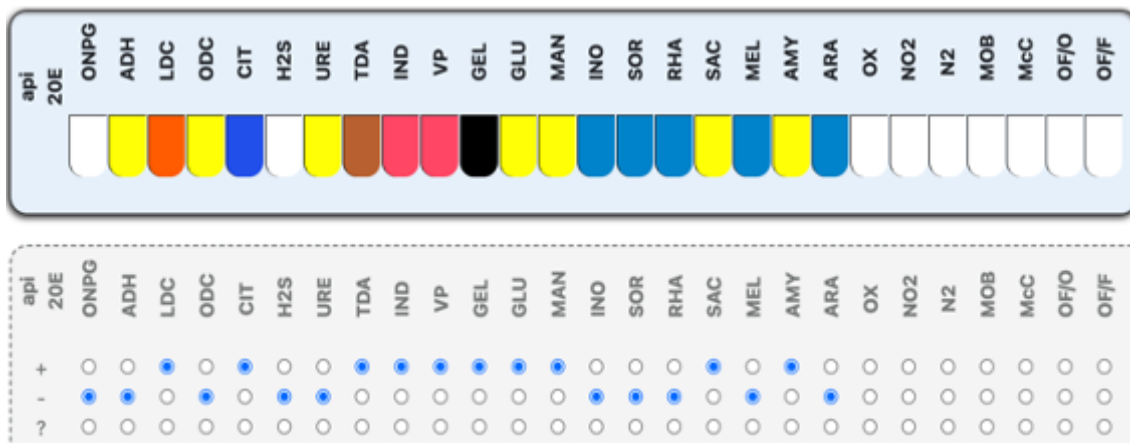


Supplementary 5: *Vibrio* and bacterial concentration in seawater during and after photo-oxidative treatment (a) *OsHV-1*  $\mu$ Var was quantified by qPCR and expressed as genomic unit per  $\mu$ l (b) total bacteria, and (c) total *Vibrio* were quantified by qPCR and expressed as copies of 16S rDNA per mL. (●) seawater treated by  $UV_{365}/TiO_2$ , (●) seawater treated by  $UV_{365}$  alone, and (●) reference seawater (kept away of UV).

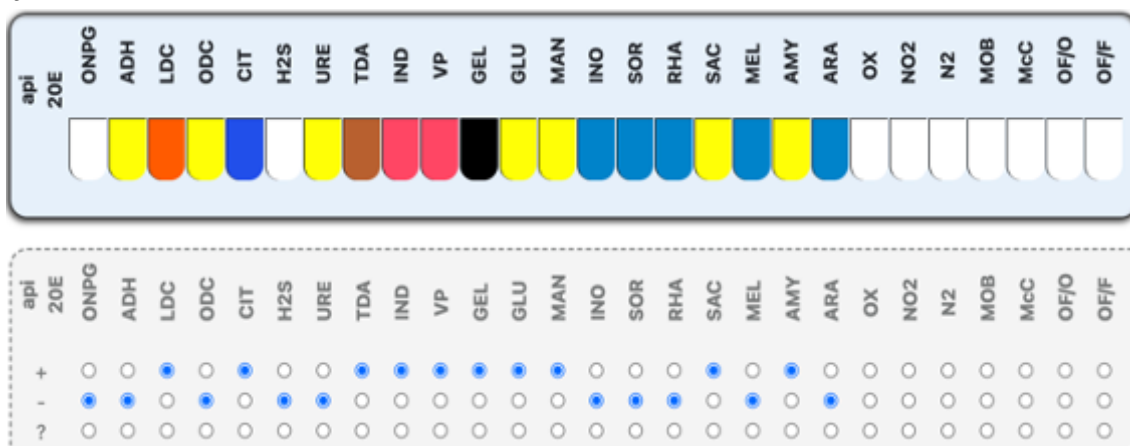
### Annexe N°5 : Typage biochimique de la souche de *Vibrio harveyi*

Le typage biochimique de la souche de *Vibrio harveyi* a été réalisé en triplicats à l'aide de Galerie API 20E (Biomérieux) à partir de la souche sauvage et la souche exprimant le plasmide pFD086 (GFP, TrimR) (Oyanedel et al., 2023). Pour ces deux isolats, le typage biochimique permet bien d'identifier une souche appartenant au genre des *Vibrio* et appartenant au milieu marin (*Vibrio alginolyticus*) mais le genre *Vibrio harveyi* n'étant pas dans la base de données celui-ci n'est pas identifié avec la lecture de galerie. De plus, le typage biochimique est identique entre la souche sauvage et modifiée avec le plasmide ce qui est cohérent puisqu'il s'agit de la même souche.

a.



b.



Annexe 5: Résultats du typage biochimique pour la souche de *Vibrio harveyi* sauvage (a) et pour la souche modifiée avec le plasmide pFD086 (GFP, TrimR) (b). Les typages ont été réalisés 3 fois pour chaque souche avec le même résultat.

### Annexe N°6 : Code matlab utilisé pour la simulation Chapitre 3, article N°3

<https://github.com/CecileBlanchon/SimulationPhotocatalysis.git>

## Référence :

- Abi-Khalil, C., Lopez-Joven, C., Abadie, E., Savar, V., Amzil, Z., Laabir, M., Rolland, J.-L., 2016. Exposure to the Paralytic Shellfish Toxin Producer *Alexandrium catenella* Increases the Susceptibility of the Oyster *Crassostrea gigas* to Pathogenic Vibrios. *Toxins* 8, 24. <https://doi.org/10.3390/toxins8010024>
- Adamson, 2006. Mapping the proteins of herpes simplex virus type 1 capsid.
- Aguilar, S., Rosado, D., Moreno-Andrés, J., Cartuche, L., Cruz, D., Acevedo-Merino, A., Nebot, E., 2018. Inactivation of a wild isolated *Klebsiella pneumoniae* by photo-chemical processes: UV-C, UV-C/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and UV-C/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Fe<sup>3+</sup>. *Catal. Today* 313, 94–99. <https://doi.org/10.1016/j.cattod.2017.10.043>
- Ahrens, L., Daneshvar, A., Lau, A.E., Kreuger, J., 2018. Concentrations, fluxes and field calibration of passive water samplers for pesticides and hazard-based risk assessment. *Sci. Total Environ.* 637–638, 835–843. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.05.039>
- Ahrens, L., Daneshvar, A., Lau, A.E., Kreuger, J., 2015. Characterization of five passive sampling devices for monitoring of pesticides in water. *J. Chromatogr. A* 1405, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.05.044>
- ANSES, 2021a. Phytopharmacovigilance, Synthèse des données de surveillance : Metalaxyl.
- ANSES, 2021b. Non-conformités dans les eaux destinées à la consommation humaine dues aux métabolites du métolachlore : signalement n°82.
- ANSES, 2019a. Bulletin des autorisations de mise sur le marché des produits phytopharmaceutiques et adjuvants.
- ANSES, 2019b. AVIS de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail relatif au caractère perturbateur endocrinien de l'époxiconazole - Saisine n° 2018-SA-0289.
- ANSES, 2019c. Produits phytopharmaceutiques fongicides à base d'époxiconazole : l'Anses annonce le retrait des autorisations de mise sur le marché en France [WWW Document]. Anses - Agence Natl. Sécurité Sanit. L'alimentation L'environnement Trav. URL <https://www.anses.fr/fr/content/produits-phytopharmaceutiques-fongicides-%C3%A0-base-d%E2%80%99%C3%A9poxiconazole-l%E2%80%99anses-annonce-le-retrait> (accessed 10.21.23).
- ANSES, 2007. AVIS de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments relatif à l'évaluation des risques sanitaires liés au dépassement de la limite de qualité des pesticides dans les eaux destinées à la consommation humaine - Saisine n°2004-SA-0069.
- Aubertot, 2011. Pesticides, agriculture et environnement. Editions Quæ. <https://doi.org/10.3917/quae.exper.2011.01>
- Auguste, M., Lasa, A., Pallavicini, A., Gualdi, S., Vezzulli, L., Canesi, L., 2019. Exposure to TiO<sub>2</sub> nanoparticles induces shifts in the microbiota composition of *Mytilus galloprovincialis* hemolymph. *Sci. Total Environ.* 670, 129–137. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.03.133>
- Azéma, P., Lamy, J.-B., Boudry, P., Renault, T., Travers, M.-A., Dégremont, L., 2017. Genetic parameters of resistance to *Vibrio aestuarianus*, and OsHV-1 infections in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, at three different life stages. *Genet. Sel. Evol.* 49, 23. <https://doi.org/10.1186/s12711-017-0297-2>
- Bacaër, N., 2020. Un modèle mathématique des débuts de l'épidémie de coronavirus en France. *Math. Model. Nat. Phenom.* 15, 29. <https://doi.org/10.1051/mmnp/2020015>

Bachère, E., Barranger, A., Bruno, R., Rouxel, J., Menard, D., Piquemal, D., Akcha, F., 2017. Parental diuron-exposure alters offspring transcriptome and fitness in Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 142, 51–58. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.03.030>

Bailly, E., n.d. Étude de l'applicabilité des POCIS (Polar Organic Chemical Integrative Sampler) au dosage des résidus de médicaments dans les effluents hospitaliers 266.

Barbosa Solomieu, V., Renault, T., Travers, M.-A., 2015. Mass mortality in bivalves and the intricate case of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *J. Invertebr. Pathol.* 131, 2–10. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2015.07.011>

Bartelt-Hunt, S.L., Snow, D.D., Damon, T., Shockley, J., Hoagland, K., 2009. The occurrence of illicit and therapeutic pharmaceuticals in wastewater effluent and surface waters in Nebraska. *Environ. Pollut.* 157, 786–791. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2008.11.025>

Bartelt-Hunt, S.L., Snow, D.D., Damon-Powell, T., Brown, D.L., Prasai, G., Schwarz, M., Kolok, A.S., 2011. Quantitative evaluation of laboratory uptake rates for pesticides, pharmaceuticals, and steroid hormones using POCIS. *Environ. Toxicol. Chem.* 30, 1412–1420. <https://doi.org/10.1002/etc.514>

Bayen, S., Kee Lee, H., Philip Obbard, J., 2007. Exposure and response of aquacultured oysters, *Crassostrea gigas*, to marine contaminants. *Environ. Res.* 103, 375–382. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2006.06.012>

Belles, A., 2012. DEVELOPPEMENT ET APPLICATIONS ENVIRONNEMENTALES DES ECHANTILLONNEURS PASSIFS POUR LA SURVEILLANCE DES ECOSYSTEMES AQUATIQUES.

Belles, A., Pardon, P., Budzinski, H., 2014. Development of an adapted version of polar organic chemical integrative samplers (POCIS-Nylon). *Anal. Bioanal. Chem.* 406, 1099–1110. <https://doi.org/10.1007/s00216-013-7286-2>

Benabbou, A.K., Derriche, Z., Felix, C., Lejeune, P., Guillard, C., 2007. Photocatalytic inactivation of *Escherichia coli*. *Appl. Catal. B Environ.* 76, 257–263. <https://doi.org/10.1016/j.apcatb.2007.05.026>

Bibi, F., Yasir, M., Al-Sofyani, A., Naseer, M.I., Azhar, E.I., 2020. Antimicrobial activity of bacteria from marine sponge *Suberea mollis* and bioactive metabolites of *Vibrio* sp. EA348. *Saudi J. Biol. Sci.* 27, 1139–1147. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.02.002>

Bolyen, E., Rideout, J.R., Dillon, M.R., Bokulich, N.A., Abnet, C.C., Al-Ghalith, G.A., Alexander, H., Alm, E.J., Arumugam, M., Asnicar, F., Bai, Y., Bisanz, J.E., Bittinger, K., Brejnrod, A., Brislawn, C.J., Brown, C.T., Callahan, B.J., Caraballo-Rodríguez, A.M., Chase, J., Cope, E.K., Da Silva, R., Diener, C., Dorrestein, P.C., Douglas, G.M., Durall, D.M., Duvallet, C., Edwardson, C.F., Ernst, M., Estaki, M., Fouquier, J., Gauglitz, J.M., Gibbons, S.M., Gibson, D.L., Gonzalez, A., Gorlick, K., Guo, J., Hillmann, B., Holmes, S., Holste, H., Huttenhower, C., Huttley, G.A., Janssen, S., Jarmusch, A.K., Jiang, L., Kaehler, B.D., Kang, K.B., Keefe, C.R., Keim, P., Kelley, S.T., Knights, D., Koester, I., Kosciulek, T., Kreps, J., Langille, M.G.I., Lee, J., Ley, R., Liu, Y.-X., Loftfield, E., Lozupone, C., Maher, M., Marotz, C., Martin, B.D., McDonald, D., McIver, L.J., Melnik, A.V., Metcalf, J.L., Morgan, S.C., Morton, J.T., Naimey, A.T., Navas-Molina, J.A., Nothias, L.F., Orchanian, S.B., Pearson, T., Peoples, S.L., Petras, D., Preuss, M.L., Pruesse, E., Rasmussen, L.B., Rivers, A., Robeson, M.S., Rosenthal, P., Segata, N., Shaffer, M., Shiffer, A., Sinha, R., Song, S.J., Spear, J.R., Swafford, A.D., Thompson, L.R., Torres, P.J., Trinh, P., Tripathi, A., Turnbaugh, P.J., Ul-Hasan, S., van der Hooft, J.J.J., Vargas, F., Vázquez-Baeza, Y., Vogtmann, E., von Hippel, M., Walters, W., Wan, Y., Wang, M., Warren, J., Weber, K.C., Williamson, C.H.D., Willis, A.D., Xu, Z.Z., Zaneveld, J.R., Zhang, Y., Zhu, Q., Knight, R., Caporaso, J.G., 2019. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nat. Biotechnol.*

37, 852–857. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0209-9>

Britt, A., Bernini, M., McSweeney, B., Dalapati, S., Duchin, S., Cavanna, K., Santos, N., Donovan, G., O’Byrne, K., Noyes, S., Romero, M., Poonacha, K.N.T., Scully, T., 2020. The effects of atrazine on the microbiome of the eastern oyster: *Crassostrea virginica*. *Sci. Rep.* 10, 11088. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-67851-4>

Bruto, M., James, A., Petton, B., Labreuche, Y., Chenivresse, S., Alunno-Bruscia, M., Polz, M.F., Le Roux, F., 2017. *Vibrio crassostreae*, a benign oyster colonizer turned into a pathogen after plasmid acquisition. *ISME J.* 11, 1043–1052. <https://doi.org/10.1038/ismej.2016.162>

Buzier, R., Guibal, R., Lissalde, S., Guibaud, G., 2019. Limitation of flow effect on passive sampling accuracy using POCIS with the PRC approach or o-DGT: A pilot-scale evaluation for pharmaceutical compounds. *Chemosphere* 222, 628–636. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.01.181>

Camara, M.D., Yen, S., Kaspar, H.F., Kesarcodi-Watson, A., King, N., Jeffs, A.G., Tremblay, L.A., 2017. Assessment of heat shock and laboratory virus challenges to selectively breed for ostreid herpesvirus 1 (OsHV-1) resistance in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Aquaculture* 469, 50–58. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.11.031>

Cao, R., Liu, Y., Wang, Q., Zhang, Q., Yang, D., Liu, H., Qu, Y., Zhao, J., 2018. The impact of ocean acidification and cadmium on the immune responses of Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Fish Shellfish Immunol.* 81, 456–462. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.07.055>

Chambre d’Agriculture Pyrénées-Orientales, 2020. L’AGRICULTURE DU DÉPARTEMENT [WWW Document]. URL <https://po.chambre-agriculture.fr/votre-chambre-dagriculture/lagriculture-du-departement/> (accessed 3.1.20).

Chick, H., 1908. An Investigation of the Laws of Disinfection. *J. Hyg. (Lond.)* 8, 92–158. <https://doi.org/10.1017/S0022172400006987>

Chong, M.N., Jin, B., Chow, C.W.K., Saint, C., 2010. Recent developments in photocatalytic water treatment technology: A review. *W T E R R E E R C H* 31.

Christine FERAY, 2015. AQUAREF - RAPPORT D’ACTIVITE 2014.

Cibrario, A., 2019. Diversité génétique et phénotypique de l’espèce *Brettanomyces bruxellensis*: influence sur son potentiel d’altération des vins rouges.

Clerissi, C., Luo, X., Lucasson, A., mortaza, shogofa, De Lorgeril, J., Toulza, E., Petton, B., Escoubas, J.-M., Dégremont, L., Gueguen, Y., Destoumieux-Garzon, D., jacq, annick, Mitta, G., 2022. A core of functional complementary bacteria infects oysters in Pacific Oyster Mortality Syndrom. <https://doi.org/10.1101/2020.11.16.384644>

CNC, n.d. Comité National de la Conchyliculture (CNC) - La production des coquillages, Les Chiffres Clés [WWW Document]. URL <http://coquillages.com/les-statistiques/> (accessed 3.1.20).

Coquillé, N., 2017. Influence de la matière organique dissoute naturelle et d’herbicides, seuls et combinés, sur des microalgues marines et d’eau douce (phdthesis). Université de Bordeaux.

Cordier, C., Stavrakakis, C., monnot, mathias, garry, P., chenier, F., Moulin, P., 2023. Nouvelles applications de l’ultrafiltration pour la biosecurisation des établissements conchycoles. *Eau Ind. Nuis., L’Eau, l’Industrie, les nuisances* 0755–5016, p34-39.

Cordier, C., Stavrakakis, C., Morga, B., Dégremont, L., Voulgaris, A., Bacchi, A., Sauvade, P., Coelho, F., Moulin, P., 2020. Removal of pathogens by ultrafiltration from sea water. *Environ. Int.* 142, 105809. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.105809>

Crandall, G., Elliott Thompson, R., Eudeline, B., Vadopalas, B., Timmins-Schiffman, E., Roberts, S., 2022. Proteomic response of early juvenile Pacific oysters ( *Crassostrea gigas* ) to temperature. *PeerJ* 10, e14158. <https://doi.org/10.7717/peerj.14158>

Dalrymple, O.K., Goswami, D.Y., 2011. Mechanistic Modeling of Photocatalytic Water Disinfection, in: An, T., Zhao, H., Wong, P.K. (Eds.), *Advances in Photocatalytic Disinfection, Green Chemistry and Sustainable Technology*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 273–315. [https://doi.org/10.1007/978-3-662-53496-0\\_13](https://doi.org/10.1007/978-3-662-53496-0_13)

Dalrymple, O.K., Stefanakos, E., Trotz, M.A., Goswami, D.Y., 2010. A review of the mechanisms and modeling of photocatalytic disinfection 12.

Davies, M.J., 2003. Singlet oxygen-mediated damage to proteins and its consequences. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 305, 761–770. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(03\)00817-9](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(03)00817-9)

Davison, A.J., Trus, B.L., Cheng, N., Steven, A.C., Watson, M.S., Cunningham, C., Deuff, R.-M.L., Renault, T., 2005. A novel class of herpesvirus with bivalve hosts. *J. Gen. Virol.* 86, 41–53. <https://doi.org/10.1099/vir.0.80382-0>

De Lorgeril, J., Lucasson, A., Petton, B., Toulza, E., Montagnani, C., Clerissi, C., Vidal-Dupiol, J., Chaparro, C., Galinier, R., Escoubas, J.-M., Haffner, P., Dégremont, L., Charrière, G.M., Lafont, M., Delort, A., Vergnes, A., Chiarello, M., Faury, N., Rubio, T., Leroy, M.A., Pérignon, A., Régler, D., Morga, B., Alunno-Bruscia, M., Boudry, P., Le Roux, F., Destoumieux-Garzón, D., Gueguen, Y., Mitta, G., 2018. Immune-suppression by OsHV-1 viral infection causes fatal bacteraemia in Pacific oysters. *Nat. Commun.* 9, 4215. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06659-3>

De Lorgeril, J., Petton, B., Lucasson, A., Perez, V., Stenger, P.-L., Dégremont, L., Montagnani, C., Escoubas, J.-M., Haffner, P., Allienne, J.-F., Leroy, M., Lagarde, F., Vidal-Dupiol, J., Gueguen, Y., Mitta, G., 2020. Differential basal expression of immune genes confers *Crassostrea gigas* resistance to Pacific oyster mortality syndrome. *BMC Genomics* 21, 63. <https://doi.org/10.1186/s12864-020-6471-x>

De Marchi, L., Coppola, F., Soares, A.M.V.M., Pretti, C., Monserrat, J.M., Torre, C. della, Freitas, R., 2019. Engineered nanomaterials: From their properties and applications, to their toxicity towards marine bivalves in a changing environment. *Environ. Res.* 178, 108683. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2019.108683>

De Pasquale, I., Lo Porto, C., Dell'Edera, M., Petronella, F., Agostiano, A., Curri, M.L., Comparelli, R., 2020. Photocatalytic TiO<sub>2</sub>-Based Nanostructured Materials for Microbial Inactivation. *Catalysts* 10, 1382. <https://doi.org/10.3390/catal10121382>

Dégremont, L., Nourry, M., Maurouard, E., 2015. Mass selection for survival and resistance to OsHV-1 infection in *Crassostrea gigas* spat in field conditions: response to selection after four generations. *Aquaculture* 446, 111–121. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.04.029>

Delisle, L., Pauletto, M., Vidal-Dupiol, J., Petton, B., Bargelloni, L., Montagnani, C., Pernet, F., Corporeau, C., Fleury, E., 2020. High temperature induces transcriptomic changes in *Crassostrea gigas* that hinders progress of Ostreid herpesvirus (OsHV-1) and promotes survival. *J. Exp. Biol.* jeb.226233. <https://doi.org/10.1242/jeb.226233>

DePaola, A., Jones, J.L., Woods, J., Burkhardt, W., Calci, K.R., Krantz, J.A., Bowers, J.C., Kasturi, K., Byars, R.H., Jacobs, E., Williams-Hill, D., Nabe, K., 2010. Bacterial and Viral Pathogens in Live Oysters: 2007 United States Market Survey. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 2754–2768. <https://doi.org/10.1128/AEM.02590-09>

Desgranges, N., 2015. Développement d'échantillonneurs passifs de type POCIS pour l'évaluation de la contamination en pesticides des eaux de bassins versants languedociens 362.

Desriac, F., El Harras, A., Simon, M., Bondon, A., Brillet, B., Le Chevalier, P., Pugnère, M., Got, P., Destoumieux-Garzón, D., Fleury, Y., 2020. Alterins Produced by Oyster-Associated Pseudoalteromonas Are Antibacterial Cyclolipopeptides with LPS-Binding Activity. *Mar. Drugs*



18, 630. <https://doi.org/10.3390/md18120630>

Dezani, C., 2021. Photo catalyse hétérogène en réacteurs ouverts pour la gestion de la ressource solaire : expérimentations sur différents médias et modélisations.

Diao, H.F., Li, X.Y., Gu, J.D., Shi, H.C., Xie, Z.M., 2004. Electron microscopic investigation of the bactericidal action of electrochemical disinfection in comparison with chlorination, ozonation and Fenton reaction. *Process Biochem.* 39, 1421–1426. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(03\)00274-7](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(03)00274-7)

Direction Départementale des Territoires et de la Mer, 2017. Plan d’Action Opérationnel Territorialisé, 2016-2021.

Directive Européenne, 2006. Directive 2006/88/CE, Directive Européenne.

Divilov, K., Schoolfield, B., Morga, B., Dégremont, L., Burge, C.A., Mancilla Cortez, D., Friedman, C.S., Fleener, G.B., Dumbauld, B.R., Langdon, C., 2019. First evaluation of resistance to both a California OsHV-1 variant and a French OsHV-1 microvariant in Pacific oysters. *BMC Genet.* 20, 96. <https://doi.org/10.1186/s12863-019-0791-3>

Doyle, J.J., Ward, J.E., Mason, R., 2015. An examination of the ingestion, bioaccumulation, and depuration of titanium dioxide nanoparticles by the blue mussel (*Mytilus edulis*) and the eastern oyster (*Crassostrea virginica*). *Mar. Environ. Res.* 110, 45–52. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2015.07.020>

Doyle, J.J., Ward, J.E., Wikfors, G.H., 2018. Acute exposure to TiO<sub>2</sub> nanoparticles produces minimal apparent effects on oyster, *Crassostrea virginica* (Gmelin), hemocytes. *Mar. Pollut. Bull.* 127, 512–523. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.12.039>

DREAL Occitanie, 2012a. Réseau national de surveillance de la qualité des sédiments des Ports Maritimes (REPOM) - Port Leucate [WWW Document]. Dir. Régionale L’Environnement L’Aménagement Logement D’Occitanie. URL <https://www.occitanie.developpement-durable.gouv.fr/port-leucate-a3251.html> (accessed 10.23.23).

DREAL Occitanie, 2012b. Réseau national de surveillance de la qualité des sédiments des Ports Maritimes (REPOM) - Port Barcares [WWW Document]. Dir. Régionale L’Environnement L’Aménagement Logement D’Occitanie. URL <https://www.occitanie.developpement-durable.gouv.fr/port-barcares-a3270.html> (accessed 10.23.23).

ECHA, 2018a. Inclusion of substances of very high concern in the Candidate List for eventual inclusion in Annex XIV (Decision of the European Chemicals Agency) - ED/01/2018.

ECHA, 2018b. Inclusion of substances of very high concern in the Candidate List for eventual inclusion in Annex XIV (Decision of the European Chemicals Agency) - ED/88/2018.

ECHA, 2016. Inclusion of substances of very high concern in the Candidate List for eventual inclusion in Annex XIV (Decision of the European Chemicals Agency) - ED/21/2016.

ECHA, 2012. Article 57f - substance of very high concern (SHVC).

ECOSCOPA, 2020. Réseau d’Observations Conchylicoles (Ifremer) [WWW Document]. URL [https://www.ifremer.fr/observatoire\\_conchylicole/](https://www.ifremer.fr/observatoire_conchylicole/)

Eljaddi, T., Ragueneau, S., Cordier, C., Lange, A., Rabiller, M., Stavrakakis, C., Moulin, P., 2021. Ultrafiltration to secure shellfish industrial activities: Culture of microalgae and oyster fertilization. *Aquac. Eng.* 95, 102204. <https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2021.102204>

European Environment Agency, 2021a. The map reflects the most recent available information at the EU-level on implementation of the Urban Waste Water Treatment Directive (UWWTD) in EU 28 plus Iceland based on data reported by the Member States (for reference year 2018) in 2020. [WWW Document]. URL <https://www.eea.europa.eu/themes/water/european-waters/water-use-and-environmental-pressures/uwwtd/interactive-maps/urban-waste-water-treatment-maps-3>

(accessed 1.11.22).

European Environment Agency, 2021b. The Water Framework Directive aims to achieve good status for all rivers, lakes and transitional and coastal waters in the EU. Achieving good ecological status for surface waters is critical to this. According to countries' second river basin management plans, good ecological status had been achieved for around 40% of surface waters (rivers, lakes and transitional and coastal waters) by 2015. However, these plans show only limited improvement in ecological status since the first plans were published in 2009, with ecological status remaining similar for most water bodies. [WWW Document]. URL <https://www.eea.europa.eu/ims/ecological-status-of-surface-waters> (accessed 1.11.22).

European Environmental Agency, n.d. Ocean acidification [WWW Document]. URL <https://www.eea.europa.eu/ims/ocean-acidification> (accessed 6.23.22).

Fallet, M., 2019. Etude de la réponse environnementale et transgénérationnelle chez l'huitre creuse *Crassostrea gigas*: focus sur les mécanismes épigénétiques.

Fallet, M., Montagnani, C., Petton, B., Dantan, L., De Lorgeril, J., Comarmond, S., Chaparro, C., Toulza, E., Boitard, S., Escoubas, J.-M., Vergnes, A., Le Grand, J., Bulla, I., Gueguen, Y., Vidal-Dupiol, J., Grunau, C., Mitta, G., Cosseau, C., 2022. Early life microbial exposures shape the *Crassostrea gigas* immune system for lifelong and intergenerational disease protection. *Microbiome* 10, 85. <https://doi.org/10.1186/s40168-022-01280-5>

FAO, 2022. FAO Fisheries & Aquaculture - Global aquaculture production Quantity (1950 - 2021) [WWW Document]. URL [https://www.fao.org/fishery/statistics-query/en/aquaculture/aquaculture\\_quantity](https://www.fao.org/fishery/statistics-query/en/aquaculture/aquaculture_quantity) (accessed 8.31.23).

Feng, C., 2004. Water disinfection by electrochemical treatment. *Bioresour. Technol.* 94, 21–25. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2003.11.021>

fenton, 1894. Oxidation of tartaric acid in presence of iron.

France Naissain, 2023. L'huitre à travers l'histoire [WWW Document]. URL <https://www.francenaisain.com/l-huitre/l-huitre-et-ses-origines/l-huitre-a-travers-l-histoire/> (accessed 8.31.23).

France Naissain, 2022. L'anatomie de l'huitre [WWW Document]. URL <https://www.francenaisain.com/l-huitre/l-huitre-et-ses-origines/l-anatomie-de-l-huitre/> (accessed 8.31.23).

Gadelha, J.R., Rocha, A.C., Camacho, C., Eljarrat, E., Peris, A., Aminot, Y., Readman, J.W., Boti, V., Nannou, C., Kapsi, M., Albanis, T., Rocha, F., Machado, A., Bordalo, A., Valente, L.M.P., Nunes, M.L., Marques, A., Almeida, C.M.R., 2019. Persistent and emerging pollutants assessment on aquaculture oysters (*Crassostrea gigas*) from NW Portuguese coast (Ria De Aveiro). *Sci. Total Environ.* 666, 731–742. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.02.280>

Gagnaire, B., Gay, M., Huvet, A., Daniel, J.-Y., Saulnier, D., Renault, T., 2007. Combination of a pesticide exposure and a bacterial challenge: In vivo effects on immune response of Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Aquat. Toxicol.* 84, 92–102. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2007.06.002>

Gagnaire, B., Thomas-Guyon, H., Burgeot, Th., Renault, T., 2006. Pollutant effects on Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), hemocytes: Screening of 23 molecules using flow cytometry. *Cell Biol. Toxicol.* 22, 1–14. <https://doi.org/10.1007/s10565-006-0011-6>

Galtsoff, P.S., 1964. The American Oyster, *Crassostrea Virginica* Gmelin. U.S. Government Printing Office.

Ganguly, P., Byrne, C., Breen, A., Pillai, S.C., 2018. Antimicrobial activity of photocatalysts: Fundamentals, mechanisms, kinetics and recent advances. *Appl. Catal. B Environ.* 225, 51–75. <https://doi.org/10.1016/j.apcatb.2017.11.018>

García-Garay, J., Franco-Herera, A., Machuca-Martínez, F., 2020. Wild microorganism and plankton decay in ballast water treatments by solar disinfection (SODIS) and advanced oxidation processes. *Mar. Pollut. Bull.* 154, 111060. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2020.111060>

Geret, F., Burgeot, T., Haure, J., Gagnaire, B., Renault, T., Communal, P.Y., Samain, J.F., 2013. Effects of low-dose exposure to pesticide mixture on physiological responses of the pacific oyster, *Crassostrea gigas*: Effects of Pesticide Mixture on the Pacific Oyster. *Environ. Toxicol.* 28, 689–699. <https://doi.org/10.1002/tox.20764>

Giannakis, S., Androulaki, B., Comninellis, C., Pulgarin, C., 2018. Wastewater and urine treatment by UVC-based advanced oxidation processes: Implications from the interactions of bacteria, viruses, and chemical contaminants. *Chem. Eng. J.* 343, 270–282. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2018.03.019>

Giese, B., Klaessig, F., Park, B., Kaegi, R., Steinfeldt, M., Wigger, H., Von Gleich, A., Gottschalk, F., 2018. Risks, Release and Concentrations of Engineered Nanomaterial in the Environment. *Sci. Rep.* 8, 1565. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-19275-4>

Glaze, W.H., Kang, J.-W., Chapin, D.H., 1987. The Chemistry of Water Treatment Processes Involving Ozone, Hydrogen Peroxide and Ultraviolet Radiation. *Ozone Sci. Eng.* 9, 335–352. <https://doi.org/10.1080/01919518708552148>

Go, J., Deutscher, A., Spiers, Z., Dahle, K., Kirkland, P., Jenkins, C., 2017. Mass mortalities of unknown aetiology in Pacific oysters *Crassostrea gigas* in Port Stephens, New South Wales, Australia. *Dis. Aquat. Organ.* 125, 227–242. <https://doi.org/10.3354/dao03146>

Gomes, J., Frasson, D., Quinta-Ferreira, R., Matos, A., Martins, R., 2019. Removal of Enteric Pathogens from Real Wastewater Using Single and Catalytic Ozonation. *Water* 11, 127. <https://doi.org/10.3390/w11010127>

Green, T.J., Montagnani, C., 2013. Poly I:C induces a protective antiviral immune response in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) against subsequent challenge with Ostreid herpesvirus (OsHV-1  $\mu$ var). *Fish Shellfish Immunol.* 35, 382–388. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.04.051>

Griffin, D.W., Donaldson, K.A., Paul, J.H., Rose, J.B., 2003. Pathogenic Human Viruses in Coastal Waters. *Clin. Microbiol. Rev.* 16, 129–143. <https://doi.org/10.1128/CMR.16.1.129-143.2003>

Grimes, D.J., Johnson, C.N., Dillon, K.S., Flowers, A.R., Noriega, N.F., Berutti, T., 2009. What Genomic Sequence Information Has Revealed About *Vibrio* Ecology in the Ocean—A Review. *Microb. Ecol.* 58, 447–460. <https://doi.org/10.1007/s00248-009-9578-9>

Guo, X., Hedgecock, D., Hershberger, W.K., Cooper, K., Jr., S.K.A., 1998. GENETIC DETERMINANTS OF PROTANDRIC SEX IN THE PACIFIC OYSTER, *CRASSOSTREA GIGAS* THUNBERG. *Evolution* 52, 394–402. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1998.tb01640.x>

Gutierrez, A.P., 2018. A Genome-Wide Association Study for Host Resistance to Ostreid Herpesvirus in Pacific Oysters (*Crassostrea gigas*). G3 Bethesda. <https://doi.org/10.1534/g3.118.200113>

Hájek, M., Jiménez-Alfaro, B., Hájek, O., Brancaloni, L., Cantonati, M., Carbognani, M., Dedić, A., Dítě, D., Gerdol, R., Hájková, P., Horsáková, V., Jansen, F., Kamberović, J., Kapfer, J., Kolari, T.H.M., Lamentowicz, M., Lazarević, P., Mašić, E., Moeslund, J.E., Pérez-Haase, A., Peterka, T., Petraglia, A., Pladevall-Izard, E., Plesková, Z., Segadelli, S., Semeniuk, Y., Singh, P., Šímová, A., Šmerdová, E., Tahvanainen, T., Tomaselli, M., Vystavna, Y., Biță-Nicolae, C., Horsák, M., 2021. A European map of groundwater pH and calcium. *Earth Syst. Sci. Data* 13, 1089–1105. <https://doi.org/10.5194/essd-13-1089-2021>

Harman, C., n.d. Calibration and use of the polar organic chemical integrative sampler: a critical review. *Crit. Rev.* 15.

Harman, C., Allan, I.J., Bäuerlein, P.S., 2011. The Challenge of Exposure Correction for Polar Passive Samplers—The PRC and the POCIS. *Environ. Sci. Technol.* 45, 9120–9121. <https://doi.org/10.1021/es2033789>

Hendrie, M.S., Hodgkiss, W., Shewan, J.M., 1970. The Identification, Taxonomy and Classification of Luminous Bacteria. *J. Gen. Microbiol.* 64, 151–169. <https://doi.org/10.1099/00221287-64-2-151>

Hernández-Terrones, L.M., Null, K.A., Ortega-Camacho, D., Paytan, A., 2015. Water quality assessment in the Mexican Caribbean: Impacts on the coastal ecosystem. *Cont. Shelf Res.* 102, 62–72. <https://doi.org/10.1016/j.csr.2015.04.015>

Herrmann, J.-M., 1999. Heterogeneous photocatalysis: fundamentals and applications to the removal of various types of aqueous pollutants. *Catal. Today* 53, 115–129. [https://doi.org/10.1016/S0920-5861\(99\)00107-8](https://doi.org/10.1016/S0920-5861(99)00107-8)

Herve, M., 2023. RVAideMemoire: Testing and Plotting Procedures for Biostatistics.

Heydari, G., 2018. Passive or Semi-Passive Photocatalytic Treatment of Organic Pollutants in Water. <https://doi.org/10.11575/PRISM/33048>

Hoffmann, M.R., Martin, S.T., Choi, W., Bahnemann, D.W., 1995. Environmental Applications of Semiconductor Photocatalysis. *Chem. Rev.* 95, 69–96. <https://doi.org/10.1021/cr00033a004>

Hom, L.W., 1972. Kinetics of chlorine disinfection in an ecosystem.

Huang, X., Jiang, X., Sun, M., Dupont, S., Huang, W., Hu, M., Li, Q., Wang, Y., 2018. Effects of copper on hemocyte parameters in the estuarine oyster *Crassostrea rivularis* under low pH conditions. *Aquat. Toxicol.* 203, 61–68. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2018.08.003>

Ifremer, 2020. Qualité du milieu marin littoral - bulletin de la surveillance 2019.

INERIS, 2018. Environnement, Normes de Qualité Environnementale (NQE) et Valeurs Guides Environnementales (VGE) [WWW Document]. URL <https://substances.ineris.fr/fr/page/9> (accessed 6.14.21).

INERIS, 2011. INERIS - Epoxiconazole [WWW Document]. URL <https://substances.ineris.fr/fr/substance/2218> (accessed 10.21.23).

Jeganathan, P., Rajasekaran, K.M., Asha Devi, N.K., Karuppusamy, S., 2013. Antimicrobial activity and Characterization of Marine bacteria. *Indian J. Pharm. Biol. Res.* 1, 38–44. <https://doi.org/10.30750/ijpbr.1.4.8>

Johnson, B.D., Gilbert, S.L., Khan, B., Carroll, D.L., Ringwood, A.H., 2015. Cellular responses of eastern oysters, *Crassostrea virginica*, to titanium dioxide nanoparticles. *Mar. Environ. Res.* 111, 135–143. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2015.06.019>

Johnson, F.H., Shunk, I.V., 1936. An Interesting New Species of Luminous Bacteria. *J. Bacteriol.* 31, 585–593. <https://doi.org/10.1128/jb.31.6.585-593.1936>

Kacem, M., 2015. Inactivation bactérienne par photocatalyse hétérogène Application à *Escherichia coli*.

Kacem, M., Goetz, V., Plantard, G., Wery, N., 2015. Modeling heterogeneous photocatalytic inactivation of *E. coli* using suspended and immobilized TiO<sub>2</sub> reactors. *AIChE J.* 61, 2532–2542. <https://doi.org/10.1002/aic.14834>

Kacem, M., Plantard, G., Wery, N., Goetz, V., 2014. Kinetics and efficiency displayed by supported and suspended TiO<sub>2</sub> catalysts applied to the disinfection of *Escherichia coli*. *Chin. J. Catal.* 35, 1571–1577. [https://doi.org/10.1016/S1872-2067\(14\)60212-6](https://doi.org/10.1016/S1872-2067(14)60212-6)

Kheder, R.B., Moal, J., Robert, R., 2010. Impact of temperature on larval development and evolution of physiological indices in *Crassostrea gigas*. *Aquaculture* 309, 286–289. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.09.005>

King, N., Smale, D., Thorpe, J., McKeown, N., Andrews, A., Browne, R., Malham, S., 2022. Core community persistence despite dynamic spatiotemporal responses in the associated bacterial communities of farmed Pacific oysters (preprint). In Review. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-1593866/v1>

King, W.L., Jenkins, C., Go, J., Siboni, N., Seymour, J.R., Labbate, M., 2019a. Characterisation of the Pacific Oyster Microbiome During a Summer Mortality Event. *Microb. Ecol.* 77, 502–512. <https://doi.org/10.1007/s00248-018-1226-9>

King, W.L., Jenkins, C., Seymour, J.R., Labbate, M., 2019b. Oyster disease in a changing environment: Decrypting the link between pathogen, microbiome and environment. *Mar. Environ. Res.* 143, 124–140. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2018.11.007>

King, W.L., Siboni, N., Williams, N.L.R., Kahlke, T., Nguyen, K.V., Jenkins, C., Dove, M., O'Connor, W., Seymour, J.R., Labbate, M., 2019c. Variability in the Composition of Pacific Oyster Microbiomes Across Oyster Families Exhibiting Different Levels of Susceptibility to OsHV-1  $\mu$ var Disease. *Front. Microbiol.* 10, 473. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00473>

Klindworth, A., Pruesse, E., Schweer, T., Peplies, J., Quast, C., Horn, M., Glöckner, F.O., 2013. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Res.* 41, e1–e1. <https://doi.org/10.1093/nar/gks808>

Kormann, C., Bahnemann, D.W., Hoffmann, M.R., 1991. Photolysis of chloroform and other organic molecules in aqueous titanium dioxide suspensions. *Environ. Sci. Technol.* 25, 494–500. <https://doi.org/10.1021/es00015a018>

Kowalski, W.J., Bahnfleth, W.P., Raguse, M., Moeller, R., 2020. The cluster model of ultraviolet disinfection explains tailing kinetics. *J. Appl. Microbiol.* 128, 1003–1014. <https://doi.org/10.1111/jam.14527>

Lado Ribeiro, A.R., Moreira, N.F.F., Li Puma, G., Silva, A.M.T., 2019. Impact of water matrix on the removal of micropollutants by advanced oxidation technologies. *Chem. Eng. J.* 363, 155–173. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2019.01.080>

Lafont, 2021. Contrat de Filière Conchylicole - Occitanie 2021-2023.

Lahti, léo, Corrada Bravo, H., Huang, R., Braccia, D.J., Borman, T., Shetty, S., Ernst, F.G.M., 2019. Microbiome R package.

Lambert, R.J.W., Johnston, M.D., 2000. Disinfection kinetics: a new hypothesis and model for the tailing of log-survivor/time curves. *J. Appl. Microbiol.* 88, 907–913. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.01060.x>

Lasa, A., Di Cesare, A., Tassistro, G., Borello, A., Gualdi, S., Furones, D., Carrasco, N., Cheslett, D., Brechon, A., Paillard, C., Bidault, A., Pernet, F., Canesi, L., Edomi, P., Pallavicini, A., Pruzzo, C., Vezzulli, L., 2019. Dynamics of the Pacific oyster pathobiota during mortality episodes in Europe assessed by 16S rRNA gene profiling and a new target enrichment next-generation sequencing strategy. *Environ. Microbiol.* 21, 4548–4562. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14750>

Laxma Reddy, P.V., Kavitha, B., Kumar Reddy, P.A., Kim, K.-H., 2017. TiO<sub>2</sub>-based photocatalytic disinfection of microbes in aqueous media: A review. *Environ. Res.* 154, 296–303. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2017.01.018>

Le Deuff, R.M., Renault, T., 1999. Purification and partial genome characterization of a herpes-like virus infecting the Japanese oyster, *Crassostrea gigas*. *J. Gen. Virol.* 80, 1317–1322. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-80-5-1317>

Le Moullac, G., Quéau, I., Le Souchu, P., Pouvreau, S., Moal, J., René Le Coz, J., François Samain, J., 2007. Metabolic adjustments in the oyster *Crassostrea gigas* according to oxygen level and

temperature. *Mar. Biol. Res.* 3, 357–366. <https://doi.org/10.1080/17451000701635128>

leem, 2021. LA PART DE MARCHÉ DE L'EUROPE EN CROISSANCE [WWW Document]. Leem Entrep. Médicam. URL <https://www.leem.org/marche-Mondial>

Legrini, O., Oliveros, E., Braun, A.M., 1993. Photochemical processes for water treatment. *Chem. Rev.* 93, 671–698. <https://doi.org/10.1021/cr00018a003>

Lemire, A., Goudenège, D., Versigny, T., Petton, B., Calteau, A., Labreuche, Y., Le Roux, F., 2015. Populations, not clones, are the unit of vibrio pathogenesis in naturally infected oysters. *ISME J.* 9, 1523–1531. <https://doi.org/10.1038/ismej.2014.233>

Lesueur, T., 2019. L'environnement en France - Rapport de Synthèse.

Levchuk, I., Homola, T., Moreno-Andrés, J., Rueda-Márquez, J.J., Dzik, P., Moríñigo, M.Á., Sillanpää, M., Manzano, M.A., Vahala, R., 2019. Solar photocatalytic disinfection using ink-jet printed composite TiO<sub>2</sub>/SiO<sub>2</sub> thin films on flexible substrate: Applicability to drinking and marine water. *Sol. Energy* 191, 518–529. <https://doi.org/10.1016/j.solener.2019.09.038>

Li, H., Helm, P.A., Metcalfe, C.D., 2010. Sampling in the Great Lakes for pharmaceuticals, personal care products, and endocrine-disrupting substances using the passive polar organic chemical integrative sampler. *Environ. Toxicol. Chem.* 29, 751–762. <https://doi.org/10.1002/etc.104>

Li, H., Helm, P.A., Paterson, G., Metcalfe, C.D., 2011. The effects of dissolved organic matter and pH on sampling rates for polar organic chemical integrative samplers (POCIS). *Chemosphere* 83, 271–280. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.12.071>

Li, X., Shi, C., Yang, B., Li, Q., Liu, S., 2023. High temperature aggravates mortalities of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) infected with *Vibrio*: A perspective from homeostasis of digestive microbiota and immune response. *Aquaculture* 568, 739309. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2023.739309>

Li, Z., Hu, M., Song, H., Lin, D., Wang, Y., 2021. Toxic effects of nano-TiO<sub>2</sub> in bivalves—A synthesis of meta-analysis and bibliometric analysis. *J. Environ. Sci.* 104, 188–203. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2020.11.013>

Li, Z., Nicolae, V., Akileh, R., Liu, T., 2017. A Brief Review of Oyster-associated Microbiota. *Microbiol. Res. J. Int.* 20, 1–14. <https://doi.org/10.9734/MRJI/2017/33842>

Linley, E., Denyer, S.P., McDonnell, G., Simons, C., Maillard, J.-Y., 2012. Use of hydrogen peroxide as a biocide: new consideration of its mechanisms of biocidal action. *J. Antimicrob. Chemother.* 67, 1589–1596. <https://doi.org/10.1093/jac/dks129>

Liu, N., Zhu, Q., Zhang, N., Zhang, C., Kawazoe, N., Chen, G., Negishi, N., Yang, Y., 2019. Superior disinfection effect of *Escherichia coli* by hydrothermal synthesized TiO<sub>2</sub>-based composite photocatalyst under LED irradiation: Influence of environmental factors and disinfection mechanism. *Environ. Pollut.* 247, 847–856. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.01.082>

Longeon, A., Peduzzi, J., Barthelemy, M., Corre, S., Nicolas, J.-L., Guyot, M., 2004. Purification and Partial Identification of Novel Antimicrobial Protein from Marine Bacterium *Pseudoalteromonas* Species Strain X153. *Mar. Biotechnol.* 6, 633–641. <https://doi.org/10.1007/s10126-004-3009-1>

Lopez-Joven, C., Rolland, J.-L., Haffner, P., Caro, A., Roques, C., Carré, C., Travers, M.-A., Abadie, E., Laabir, M., Bonnet, D., Destoumieux-Garzón, D., 2018. Oyster Farming, Temperature, and Plankton Influence the Dynamics of Pathogenic *Vibrios* in the Thau Lagoon. *Front. Microbiol.* 9, 2530. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02530>

Love, M.I., Huber, W., Anders, S., 2014. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* 15, 550.



- Luna-Acosta, A., Renault, T., Thomas-Guyon, H., Faury, N., Saulnier, D., Budzinski, H., Le Menach, K., Pardon, P., Fruitier-Arnaudin, I., Bustamante, P., 2012. Detection of early effects of a single herbicide (diuron) and a mix of herbicides and pharmaceuticals (diuron, isoproturon, ibuprofen) on immunological parameters of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) spat. *Chemosphere* 87, 1335–1340. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.02.022>
- Lupo, C., Travers, M.-A., Tourbiez, D., Barthélémy, C.F., Beaunée, G., Ezanno, P., 2019. Modeling the Transmission of *Vibrio aestuarianus* in Pacific Oysters Using Experimental Infection Data. *Front. Vet. Sci.* 6, 142. <https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00142>
- Luz, P.M., Struchiner, C.J., Galvani, A.P., 2010. Modeling Transmission Dynamics and Control of Vector-Borne Neglected Tropical Diseases. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 4, e761. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000761>
- MacLeod, S.L., McClure, E.L., Wong, C.S., 2007. LABORATORY CALIBRATION AND FIELD DEPLOYMENT OF THE POLAR ORGANIC CHEMICAL INTEGRATIVE SAMPLER FOR PHARMACEUTICALS AND PERSONAL CARE PRODUCTS IN WASTEWATER AND SURFACE WATER. *Environ. Toxicol. Chem.* 26, 2517. <https://doi.org/10.1897/07-238.1>
- Malato, S., Fernández-Ibáñez, P., Maldonado, M.I., Blanco, J., Gernjak, W., 2009. Decontamination and disinfection of water by solar photocatalysis: Recent overview and trends. *Catal. Today* 147, 1–59. <https://doi.org/10.1016/j.cattod.2009.06.018>
- Malham, S.K., Cotter, E., O’Keeffe, S., Lynch, S., Culloty, S.C., King, J.W., Latchford, J.W., Beaumont, A.R., 2009. Summer mortality of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, in the Irish Sea: The influence of temperature and nutrients on health and survival. *Aquaculture* 287, 128–138. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.10.006>
- Mamane, 2007. Inactivation of *E. coli*, *B. subtilis* spores, and MS2, T4, and T7 phage using UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> advanced oxidation. 2007. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2007.04.050>
- Margot, J., Rossi, L., Barry, D.A., Holliger, C., 2015. A review of the fate of micropollutants in wastewater treatment plants: Micropollutants in wastewater treatment plants. *Wiley Interdiscip. Rev. Water* 2, 457–487. <https://doi.org/10.1002/wat2.1090>
- Martenot, C., 2013. Variants of herpetic virus ostreid herpesvirus-1 (OsHV-1) in young Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Virol. Montrouge Fr.* 17, 81–87. <https://doi.org/10.1684/vir.2013.0481>
- Martenot, C., Gervais, O., Chollet, B., Houssin, M., Renault, T., 2017. Haemocytes collected from experimentally infected Pacific oysters, *Crassostrea gigas*: Detection of ostreid herpesvirus 1 DNA, RNA, and proteins in relation with inhibition of apoptosis. *PLOS ONE* 12, e0177448. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177448>
- Martinezbuena, M., Hernando, M., Agüera, A., Fernandezalba, A., 2009. Application of passive sampling devices for screening of micro-pollutants in marine aquaculture using LC–MS/MS. *Talanta* 77, 1518–1527. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2008.09.047>
- Marugán, J., van Grieken, R., Sordo, C., Cruz, C., 2008. Kinetics of the photocatalytic disinfection of *Escherichia coli* suspensions. *Appl. Catal. B Environ.* 82, 27–36. <https://doi.org/10.1016/j.apcatb.2008.01.002>
- Matheson, I.B.C., Lee, J., 1979. CHEMICAL REACTION RATES OF AMINO ACIDS WITH SINGLET OXYGEN. *Photochem. Photobiol.* 29, 879–881. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1979.tb07786.x>
- Mazellier, P., Fuster, L., Budzinski, H., Garric, J., Couteau, J., Aït-Aïssa, S., 2018. Projet Seine-Aval 5 CRAPPSE : « Contamination et RéActivité de Pesticides et de Pharmaceutiques dans l’estuaire de Seine ».

Mazzella, N., n.d. État de l'art sur l'échantillonnage passif des composés organiques ionisables 38.

Mazzella, N., Dubernet, J.-F., Delmas, F., 2007. Determination of kinetic and equilibrium regimes in the operation of polar organic chemical integrative samplers. *J. Chromatogr. A* 1154, 42–51. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.03.087>

McMurdie, P.J., Holmes, S., 2013. phyloseq: An R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data.

Mills, A., Le Hunte, S., 1997. An overview of semiconductor photocatalysis. *J. Photochem. Photobiol. Chem.* 108, 1–35. [https://doi.org/10.1016/S1010-6030\(97\)00118-4](https://doi.org/10.1016/S1010-6030(97)00118-4)

Minero, C., 1999. Kinetic analysis of photoinduced reactions at the water semiconductor interface. *Catal. Today* 54, 205–216. [https://doi.org/10.1016/S0920-5861\(99\)00183-2](https://doi.org/10.1016/S0920-5861(99)00183-2)

Ministère de l'Agriculture et de la souveraineté alimentaire, 2022. Les huîtres, trésors des bassins [WWW Document]. Ministère Agric. Souveraineté Aliment. URL <https://agriculture.gouv.fr/les-huitres-tresors-des-bassins> (accessed 8.31.23).

Ministère de l'Agriculture et de l'Alimentation, 2019. La conchyliculture : production et élevages [WWW Document]. URL <https://agriculture.gouv.fr/la-conchyliculture-production-et-elevages> (accessed 3.1.20).

Ministère de l'Ecologie et du Développement Durable, 2006. NANOTECHNOLOGIES, NANOPARTICULES QUELS DANGERS, QUELS RISQUES ? MINISTÈRE DE L'ÉCOLOGIE ET DU DÉVELOPPEMENT DURABLE.

Montánchez, I., Kaberdin, V.R., 2020. *Vibrio harveyi*: A brief survey of general characteristics and recent epidemiological traits associated with climate change. *Mar. Environ. Res.* 154, 104850. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2019.104850>

Montánchez, I., Ogayar, E., Plágaro, A.H., Esteve-Codina, A., Gómez-Garrido, J., Orruño, M., Arana, I., Kaberdin, V.R., 2019. Analysis of *Vibrio harveyi* adaptation in sea water microcosms at elevated temperature provides insights into the putative mechanisms of its persistence and spread in the time of global warming. *Sci. Rep.* 9, 289. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-36483-0>

Morelli, E., Gabellieri, E., Bonomini, A., Tognotti, D., Grassi, G., Corsi, I., 2018. TiO<sub>2</sub> nanoparticles in seawater: Aggregation and interactions with the green alga *Dunaliella tertiolecta*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 148, 184–193. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.10.024>

Moreno-Andrés, J., Ambauen, N., Vadstein, O., Hallé, C., Acevedo-Merino, A., Nebot, E., Meyn, T., 2018. Inactivation of marine heterotrophic bacteria in ballast water by an Electrochemical Advanced Oxidation Process. *Water Res.* 140, 377–386. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.04.061>

Moreno-Andrés, J., Rueda-Márquez, J.J., Homola, T., Vielma, J., Moríñigo, M.Á., Mikola, A., Sillanpää, M., Acevedo-Merino, A., Nebot, E., Levchuk, I., 2020. A comparison of photolytic, photochemical and photocatalytic processes for disinfection of recirculation aquaculture systems (RAS) streams. *Water Res.* 181, 115928. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.115928>

Morin, N., Camilleri, J., Cren-Olivé, C., Coquery, M., Miège, C., 2013. Determination of uptake kinetics and sampling rates for 56 organic micropollutants using “pharmaceutical” POCIS. *Talanta* 109, 61–73. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2013.01.058>

Mottier, A., Séguin, A., Devos, A., Pabic, C.L., Voiseux, C., Lebel, J.M., Serpentine, A., Fievet, B., Costil, K., 2015. Effects of subchronic exposure to glyphosate in juvenile oysters (*Crassostrea gigas*): From molecular to individual levels. *Mar. Pollut. Bull.* 95, 665–677.

<https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2014.10.026>

Munaron, D., 2020. OBSLAG - Volet Pesticides Bilan 2017-2019 du suivi des lagunes méditerranéennes (Rapport d'analyse).

Munaron, D., Tapie, N., Budzinski, H., Andral, B., Gonzalez, J.-L., 2012. Pharmaceuticals, alkylphenols and pesticides in Mediterranean coastal waters: Results from a pilot survey using passive samplers. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 114, 82–92.

<https://doi.org/10.1016/j.ecss.2011.09.009>

National Oceanic and Atmospheric Administration, n.d. Sea Water [WWW Document]. URL <https://www.noaa.gov/jetstream/ocean/sea-water> (accessed 10.22.23).

Nielsen, M.C., Jiang, S.C., 2019. Alterations of the human skin microbiome after ocean water exposure. *Mar. Pollut. Bull.* 145, 595–603. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2019.06.047>

OASU, 2018. Visualisation des données | Somlit. URL <https://www.somlit.fr/visualisation-des-donnees/> (accessed 10.18.23).

Oksanen, J., Simpson, G.L., Blanchet, F.G., Kindt, R., Legendre, P., Minchin, P.R., O'Hara, R.B., Solymos, P., Stevens, M.H.H., Szoecs, E., Wagner, H., Barbour, M., Bedward, M., Bolker, B., Borcard, D., Carvalho, G., Chirico, M., Caceres, M.D., Durand, S., Evangelista, H.B.A., FitzJohn, R., Friendly, M., Furneaux, B., Hannigan, G., Hill, M.O., Lahti, L., McGlenn, D., Ouellette, M.-H., Cunha, E.R., Smith, T., Stier, A., Braak, C.J.F.T., Weedon, J., 2022. *vegan: Community Ecology Package*.

OSPAR Commission, 2019. The OSPAR list of chemicals for priority action, Suggestions for future actions.

Oyanedel, D., Lagorce, A., Bruto, M., Haffner, P., Morot, A., Dorant, Y., De La Forest Divonne, S., Delavat, F., Inguibert, N., Montagnani, C., Morga, B., Toulza, E., Chaparro, C., Escoubas, J.-M., Labreuche, Y., Gueguen, Y., Vidal-Dupiol, J., De Lorgeril, J., Petton, B., Degremont, L., Tourbiez, D., Pimparé, L.-L., Leroy, M., Romatif, O., Pouzadoux, J., Mitta, G., Roux, F.L., Charrière, G.M., Travers, M.-A., Destoumieux-Garzón, D., 2023. Cooperation and cheating orchestrate *Vibrio* assemblages and polymicrobial synergy in oysters infected with OsHV-1 virus. <https://doi.org/10.1101/2023.02.11.528104>

Pajerski, W., Ochonska, D., Brzychczy-Wloch, M., Indyka, P., Jarosz, M., Golda-Cepa, M., Sojka, Z., Kotarba, A., 2019. Attachment efficiency of gold nanoparticles by Gram-positive and Gram-negative bacterial strains governed by surface charges. *J. Nanoparticle Res.* 21, 186. <https://doi.org/10.1007/s11051-019-4617-z>

Parlement, 2003. Qualité de l'eau et assainissement en France (annexe 47 - L'atrazine) - Rapport n°215 (2002-2003°, tome II, déposé le 18 mars 2003 [WWW Document]. Sénat. URL <https://www.senat.fr/rap/l02-215-2/l02-215-2.html> (accessed 10.23.23).

Pernet, F., Barret, J., Le Gall, P., Corporeau, C., Degremont, L., Lagarde, F., Pépin, J., Keck, N., 2012. Mass mortalities of Pacific oysters *Crassostrea gigas* reflect infectious diseases and vary with farming practices in the Mediterranean Thau lagoon, France. *Aquac. Environ. Interact.* 2, 215–237. <https://doi.org/10.3354/aei00041>

Pernet, F., Gachelin, S., Stanisière, J.-Y., Petton, B., Fleury, E., Mazurié, J., 2019. Farmer monitoring reveals the effect of tidal height on mortality risk of oysters during a herpesvirus outbreak. *ICES J. Mar. Sci.* 76, 1816–1824. <https://doi.org/10.1093/icesjms/fsz074>

Petton, B., Destoumieux-Garzón, D., Pernet, F., Toulza, E., de Lorgeril, J., Degremont, L., Mitta, G., 2021. The Pacific Oyster Mortality Syndrome, a Polymicrobial and Multifactorial Disease: State of Knowledge and Future Directions. *Front. Immunol.* 12, 630343. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.630343>

Petton, B., Pernet, F., Robert, R., Boudry, P., 2013. Temperature influence on pathogen

transmission and subsequent mortalities in juvenile Pacific oysters *Crassostrea gigas*. *Aquac. Environ. Interact.* 3, 257–273. <https://doi.org/10.3354/aei00070>

Plantard, G., Goetz, V., 2014. Correlations between optical, specific surface and photocatalytic properties of media integrated in a photo-reactor. *Chem. Eng. J.* 252, 194–201. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2014.04.055>

Plantard, G., Goetz, V., 2012. Experimental and numerical studies of a solar photocatalytic process in a dynamic mode applied to three catalyst media. *Chem. Eng. Process. Process Intensif.* 62, 129–136. <https://doi.org/10.1016/j.cep.2012.08.002>

Qu, T., Hou, C., Guan, C., Zhao, X., Chen, J., Zhong, Y., Xu, J., Lin, Z., Xu, Y., Tang, X., Wang, Y., 2022. Phycospheric bacterial community structure and function succession during the typical harmful macroalgal blooms. *Front. Mar. Sci.* 9, 1101378. <https://doi.org/10.3389/fmars.2022.1101378>

Reglementation Française, 2010. Arrêté du 22 novembre 2010 établissant la liste des substances définies à l'article L. 213-10-8 du code de l'environnement relatif à la redevance pour pollutions diffuses [WWW Document]. URL (accessed 10.23.23).

Reglementation Française, 2007. Avis aux fabricants, distributeurs et utilisateurs de produits phytopharmaceutiques contenant les substances carbosulfan, carbofuran, diuron, cadusafos, haloxyfop-R - JORF n°204 du 4 septembre 2007 [WWW Document]. URL (accessed 10.23.23).

Reglementation Française, 2003. JORF n° 0223 du 26 septembre 2003 - Légifrance [WWW Document]. URL <https://www.legifrance.gouv.fr/jorf/jo/2003/09/26/0223> (accessed 10.23.23).

Reglementation Française, 2002. Annexe 2 - Fiche 17 : Evaluation des risques sanitaires liés au dépassement de la limite de qualité des pesticides dans les eaux destinées à la consommation humaine.

Reglementation Française, 2001. JORF n° 0275 du 27 novembre 2001 - Légifrance [WWW Document]. URL <https://www.legifrance.gouv.fr/jorf/jo/2001/11/27/0275> (accessed 10.23.23).

Reglementation Française, 1987. Décret n° 87-59 du 02/02/87 relatif à la mise sur le marché, à l'utilisation et à l'élimination des polychlorobiphényles et polychloroterphényles | AIDA [WWW Document]. URL <https://aida.ineris.fr/reglementation/decret-ndeg-87-59-020287-relatif-a-mise-marche-a-lutilisation-a-lelimination> (accessed 10.23.23).

Reichelt, J.L., Baumann, P., 1973. Taxonomy of the marine, luminous bacteria. *Arch. Für Mikrobiol.* 94, 283–330. <https://doi.org/10.1007/BF00769027>

Renault, T., Deuff, R.M.L., Cochenec, N., Maffart, P., 1994. Herpesviruses associated with mortalities among Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, in France · Comparative study 8.

Reoyo-Prats, brice, Claire, J.-C., Mouldi, H., Vincent, G., Carole, C.-B., Gaël, P., 2022. Photo-oxidation of three major pharmaceuticals in urban wastewater under artificial and solar irradiations. *J. Photochem. Photobiol. Chem.* 425, 113673. <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2021.113673>

Richard, M., Bec, B., Vanhuysse, C., Mas, S., Parin, D., Chantalat, C., Le Gall, P., Fiandrino, A., Lagarde, F., Mortreux, S., Ouisse, V., Rolland, J.L., Degut, A., Hatey, E., Fortune, M., Roque d'Orbcastel, E., Messiaen, G., Munaron, D., Callier, M., Oheix, J., Derolez, V., Mostajir, B., 2019. Changes in planktonic microbial components in interaction with juvenile oysters during a mortality episode in the Thau lagoon (France). *Aquaculture* 503, 231–241. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.12.082>

Richards, G.P., Watson, M.A., Needleman, D.S., Uknalis, J., Boyd, E.F., Fay, J.P., 2017. Mechanisms for *Pseudoalteromonas piscicida*-Induced Killing of *Vibrios* and Other Bacterial

Pathogens. *Appl. Environ. Microbiol.* 83, e00175-17. <https://doi.org/10.1128/AEM.00175-17>

Rincón, A.-G., Pulgarin, C., 2004. Bactericidal action of illuminated TiO<sub>2</sub> on pure *Escherichia coli* and natural bacterial consortia: post-irradiation events in the dark and assessment of the effective disinfection time. *Appl. Catal. B Environ.* 49, 99–112. <https://doi.org/10.1016/j.apcatb.2003.11.013>

Rubio, D., Casanueva, J.F., Nebot, E., 2013a. Improving UV seawater disinfection with immobilized TiO<sub>2</sub>: Study of the viability of photocatalysis (UV254/TiO<sub>2</sub>) as seawater disinfection technology. *J. Photochem. Photobiol. Chem.* 271, 16–23. <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2013.08.002>

Rubio, D., Nebot, E., Casanueva, J.F., Pulgarin, C., 2013b. Comparative effect of simulated solar light, UV, UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and photo-Fenton treatment (UV-Vis/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Fe<sup>2+</sup>,<sup>3+</sup>) in the *Escherichia coli* inactivation in artificial seawater. *Water Res.* 47, 6367–6379. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.08.006>

Sampaio, A., Silva, V., Poeta, P., Aonofriesei, F., 2022. *Vibrio* spp.: Life Strategies, Ecology, and Risks in a Changing Environment.

Saulnier, D., De Decker, S., Haffner, P., Cobret, L., Robert, M., Garcia, C., 2010. A Large-Scale Epidemiological Study to Identify Bacteria Pathogenic to Pacific Oyster *Crassostrea gigas* and Correlation Between Virulence and Metalloprotease-like Activity. *Microb. Ecol.* 59, 787–798. <https://doi.org/10.1007/s00248-009-9620-y>

Schulz, A., 2022. Analyse de l'impact du cycle de vie des NPs TiO<sub>2</sub> manufacturées à l'échelle du site spécifique: cas de la vallée de la Thur, 68, France.

Schwegmann, H., Ruppert, J., Frimmel, F.H., 2013. Influence of the pH-value on the photocatalytic disinfection of bacteria with TiO<sub>2</sub> – Explanation by DLVO and XDLVO theory. *Water Res.* 47, 1503–1511. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.11.030>

Segarra, A., Mauduit, F., Faury, N., Trancart, S., Dégremont, L., Tourbiez, D., Haffner, P., Barbosa-Solomieu, V., Pépin, J.-F., Travers, M.-A., Renault, T., 2014. Dual transcriptomics of virus-host interactions: comparing two Pacific oyster families presenting contrasted susceptibility to ostreid herpesvirus 13.

service public d'information sur l'eau, n.d. Les substances polluantes des milieux aquatiques [WWW Document]. URL <https://www.eaufrance.fr/les-substances-polluantes-des-milieux-aquatiques> (accessed 2.1.20).

Shang, Y., Wu, F., Wei, S., Guo, W., Chen, J., Huang, W., Hu, M., Wang, Y., 2020. Specific dynamic action of mussels exposed to TiO<sub>2</sub> nanoparticles and seawater acidification. *Chemosphere* 241, 125104. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.125104>

Sharrer, M.J., Summerfelt, S.T., Bullock, G.L., Gleason, L.E., Taeuber, J., 2005. Inactivation of bacteria using ultraviolet irradiation in a recirculating salmonid culture system. *Aquac. Eng.* 33, 135–149. <https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2004.12.001>

Soler de la Vega, A.C., Cruz-Alcalde, A., Sans Mazón, C., Barata Martí, C., Diaz-Cruz, M.S., 2020. Nano-TiO<sub>2</sub> Phototoxicity in Fresh and Seawater: *Daphnia magna* and *Artemia* sp. as Proxies. *Water* 13, 55. <https://doi.org/10.3390/w13010055>

Soulier, C., Coureau, C., Togola, A., 2016. Environmental forensics in groundwater coupling passive sampling and high resolution mass spectrometry for screening. *Sci. Total Environ.* 563–564, 845–854. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.01.056>

Spuhler, D., Andrés Rengifo-Herrera, J., Pulgarin, C., 2010. The effect of Fe<sup>2+</sup>, Fe<sup>3+</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and the photo-Fenton reagent at near neutral pH on the solar disinfection (SODIS) at low temperatures of water containing *Escherichia coli* K12. *Appl. Catal. B Environ.* 96, 126–141. <https://doi.org/10.1016/j.apcatb.2010.02.010>

Stavarakakis, C., Girardin, F., buchet, V., morin, dimitri, 2020. Manuel Qualité des Plateformes Expérimentales Mollusques Marins de Bouin et La Tremblade.

Suquet, M., 2009. Anesthesia in Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Aquat Living Resour* 6.

Syndicat Mixte Rivage, 2015. Schéma d'Aménagement et de Gestion de l'Eau de l'étang de Salses-Leucate - Etat des Lieux.

The European Space Agency, 2010. Surface ocean pH [WWW Document]. URL [https://www.esa.int/ESA\\_Multimedia/Images/2015/01/Surface\\_ocean\\_pH](https://www.esa.int/ESA_Multimedia/Images/2015/01/Surface_ocean_pH) (accessed 10.22.23).

Thompson, F.L., Iida, T., Swings, J., 2004. Biodiversity of Vibrios. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 68, 403–431. <https://doi.org/10.1128/MMBR.68.3.403-431.2004>

Tiam, S.K., 2013. EFFETS DE MELANGES DE PESTICIDES SUR LES BIOFILMS PERIPHYTIQUES D'EAU DOUCE 274.

Togola, A., Budzinski, H., 2007. Development of Polar Organic Integrative Samplers for Analysis of Pharmaceuticals in Aquatic Systems. *Anal. Chem.* 79, 6734–6741. <https://doi.org/10.1021/ac070559i>

Tristan Gaudiaut, 2019. Le marché juteux des pesticides [WWW Document]. Statista. URL <https://fr.statista.com/infographie/11599/chiffre-affaires-pesticides-produits-phytosanitaires-dans-le-monde-et-par-region/>

Union Européenne, 2009. Règlement (CE) no 1107/2009 du Parlement européen et du Conseil du 21 octobre 2009 concernant la mise sur le marché des produits phytopharmaceutiques et abrogeant les directives 79/117/CEE et 91/414/CEE du Conseil.

Union Européenne, 2003. Directive Européenne n°2003-53 du 18 juin 2003 DU PARLEMENT EUROPEEN ET DU CONSEIL portant vingt-sixième modification de la directive 76/769/CEE du Conseil concernant la limitation de la mise sur le marché et de l'emploi de certaines substances et préparations dangereuses (nonylphénol, éthoxylate de nonylphénol et ciment) (texte présentant de l'intérêt pour l'EEE) - Légifrance [WWW Document]. URL <https://www.legifrance.gouv.fr/jorf/id/JORFTEXT000000513112> (accessed 10.23.23).

Union Européenne, 2001. Décision n° 2455/2001/CE du Parlement européen et du Conseil du 20 novembre 2001 établissant la liste des substances prioritaires dans le domaine de l'eau et modifiant la directive 2000/60/CE [WWW Document]. *Publ. Off. EU.* URL <https://op.europa.eu/fr/publication-detail/-/publication/309e2a94-6831-4bac-b15b-a9cac54cbae0> (accessed 10.23.23).

Union Européenne, 2000a. Directive 2000/60/CE du Parlement européen et du Conseil du 23 octobre 2000 établissant un cadre pour une politique communautaire dans le domaine de l'eau [WWW Document]. URL (accessed 10.23.23).

Union Européenne, 2000b. Décision n° 2000/817/CE du 27/12/00 concernant la non-inscription de la perméthrine dans l'annexe I de la directive 91/414/CEE du Conseil et le retrait des autorisations accordées aux produits phytopharmaceutiques contenant cette substance active | AIDA [WWW Document]. URL <https://aida.ineris.fr/reglementation/decision-ndeg-2000817ce-271200-concernant-non-inscription-permethrine-lannexe-i> (accessed 10.23.23).

Urbanczyk, H., Ogura, Y., Hayashi, T., 2013. Taxonomic revision of Harveyi clade bacteria (family Vibrionaceae) based on analysis of whole genome sequences. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 63, 2742–2751. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.051110-0>

von Gunten, Urs., Hoigne, Juerg., 1994. Bromate Formation during Ozonation of Bromide-Containing Waters: Interaction of Ozone and Hydroxyl Radical Reactions. *Environ. Sci. Technol.* 28, 1234–1242. <https://doi.org/10.1021/es00056a009>

Voutchkov, N., 2010. Introduction to Reverse Osmosis Desalination 49.



- Wang, H., Yang, B., Li, X., Li, Q., Liu, S., 2021. Screening of bacterial pathogens associated with mass summer mortality of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, in China. *Aquac. Rep.* 20, 100672. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2021.100672>
- Wang, Z., Hervey, W.J., Kim, S., Lin, B., Vora, G.J., 2015. Complete Genome Sequence of the Bioluminescent Marine Bacterium *Vibrio harveyi* ATCC 33843 (392 [MAV]). *Genome Announc.* 3, e01493-14. <https://doi.org/10.1128/genomeA.01493-14>
- Watson, H.E., 1908. A Note on the Variation of the Rate of Disinfection with Change in the Concentration of the Disinfectant. *Epidemiol. Infect.* 8, 536–542. <https://doi.org/10.1017/S0022172400015928>
- Whittington, R.J., Hick, P., Fuhrmann, M., Liu, O., Paul-Pont, I., 2021. Removal of oyster pathogens from seawater. *Environ. Int.* 150, 106258. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.106258>
- Wilkinson, F., Brummer, J.G., 1981. Rate constants for the decay and reactions of the lowest electronically excited singlet state of molecular oxygen in solution. *J. Phys. Chem. Ref. Data* 10, 809–999. <https://doi.org/10.1063/1.555655>
- Wilson, W.W., Wade, M.M., Holman, S.C., Champlin, F.R., 2001. Status of methods for assessing bacterial cell surface charge properties based on zeta potential measurementsq. *J. Microbiol. Methods.*
- Zhang, Z., Hibberd, A., Zhou, J.L., 2008. Analysis of emerging contaminants in sewage effluent and river water: Comparison between spot and passive sampling. *Anal. Chim. Acta* 607, 37–44. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2007.11.024>
- Zheng, X., Shen, Z., Cheng, C., Shi, L., Cheng, R., Yuan, D., 2018. Photocatalytic disinfection performance in virus and virus/bacteria system by Cu-TiO<sub>2</sub> nanofibers under visible light. *Environ. Pollut.* 237, 452–459. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.02.074>



## Résumé

Au cours des dernières années, les changements environnementaux ont eu un impact significatif sur la santé des organismes marins, entraînant des pertes économiques considérables et en particulier pour les mollusques. Un exemple frappant de cette problématique est le "*Pacific Oyster Mortality Syndrome*" (POMS), une maladie causant des pertes de production d'huîtres *Crassostrea gigas* atteignant jusqu'à 80%. Cette maladie est complexe et implique à la fois une infection virale par l'*Ostreid Herpes Virus 1* (*OsHV-1*  $\mu$ Var) couplée à plusieurs infections bactériennes, principalement par des bactéries du genre *Vibrio*. Afin d'améliorer la qualité de l'eau, les installations aquacoles utilisent des méthodes de désinfection, comme l'irradiation par rayonnements UVC ou la filtration. Cependant, aucun de ces procédés ne permet de traiter à la fois les agents biologiques pathogènes et les polluants abiotiques qui peuvent affecter la santé des huîtres. Mon projet de doctorat se concentre sur l'étude d'un procédé appelé photocatalyse hétérogène utilisant la ressource solaire. Ce procédé a le potentiel de traiter efficacement l'eau de mer en éliminant à la fois les agents biotiques (comme les virus ou les bactéries pathogènes) et abiotiques (pesticides, toxines). Il repose sur l'utilisation du dioxyde de titane (TiO<sub>2</sub>) comme catalyseur. Ce travail de recherche a été divisé en plusieurs parties. Tout d'abord, la capacité d'inactivation des pathogènes cibles par photocatalyse a été étudiée en utilisant comme modèles d'étude le virus *OsHV-1*  $\mu$ Var et la bactérie *Vibrio harveyi*. L'impact du procédé sur la santé des huîtres et les communautés microbiennes de l'eau a été caractérisé. Dans un deuxième temps, l'inactivation bactérienne a été modélisée afin de comprendre comment les conditions météorologiques et l'emplacement géographique impactent les performances des photo-réacteurs solaires. Enfin, la faisabilité de la photocatalyse en eau de mer pour la désinfection de pathogènes ostréicoles a été démontrée. Ce travail devrait permettre à terme de développer une solution écoresponsable et innovante pour sécuriser les installations aquacoles.

**Mots clefs :** Photocatalyse hétérogène, *Vibrio harveyi*, *Ostreid Herpes Virus 1*, Modélisation, Désinfection d'eau de mer, *Crassostrea gigas*, communautés microbiennes

## Abstract

In recent years, environmental changes have had a significant impact on the health of marine organisms, resulting in considerable economic losses, particularly for molluscs. A striking example of this problem is the *Pacific Oyster Mortality Syndrome* (POMS), a disease causing production losses of *Crassostrea gigas* oysters of up to 80%. The disease is complex, involving both a viral infection by *Ostreid Herpes Virus 1* (*OsHV-1*  $\mu$ Var) and several bacterial infections, mainly by bacteria of the *Vibrio* genus. To improve water quality, aquaculture facilities use disinfection methods such as UVC irradiation or filtration. However, none of these processes can treat both pathogens and abiotic pollutants that can affect oyster health. My thesis focuses on the study of a process called heterogeneous photocatalysis that uses the solar resource. This process has the potential to effectively treat seawater by eliminating both biotic (viruses, bacteria) and abiotic contaminants (organic compounds). It is based on the use of titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>) as a catalyst. This research work was divided into several stages. Firstly, the ability of photocatalysis to inactivate target pathogens was investigated, using *OsHV-1*  $\mu$ Var virus and *Vibrio harveyi* bacteria as study models. The impact of the process on oyster health and water microbial communities was characterized. Next, bacterial inactivation was modeled to understand how weather conditions and geographic location could influence its efficiency. Finally, the feasibility of photocatalysis in seawater for the disinfection of oyster pathogens was demonstrated. This work offers new avenues for developing an innovative and eco-responsible solution for securing aquaculture facilities.

**Keywords:** Heterogeneous photocatalysis, *Vibrio harveyi*, *Ostreid Herpes Virus 1*, Modeling, Seawater disinfection, *Crassostrea gigas*, Microbial communities