



HAL
open science

Désinfection des rejets de stations d'épuration par acide performique et suivi des communautés microbiennes du milieu récepteur en agglomération parisienne

Sadia Bagagnan

► **To cite this version:**

Sadia Bagagnan. Désinfection des rejets de stations d'épuration par acide performique et suivi des communautés microbiennes du milieu récepteur en agglomération parisienne. Sciences de l'environnement. Université Paris-Est Créteil Val-de-Marne - Paris 12, 2024. Français. NNT : . tel-04902672

HAL Id: tel-04902672

<https://theses.hal.science/tel-04902672v1>

Submitted on 30 Jan 2025

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 UNIVERSITÉ PARIS-EST CRETEIL

École doctorale N° 531, Science et Ingénierie de l'Environnement (SIE)
Spécialité Sciences et Techniques de l'Environnement

Désinfection des rejets de stations d'épuration par l'acide performique et suivi des communautés microbiennes du milieu récepteur en agglomération parisienne

Thèse préparée au **Laboratoire Eau Environnement et Systèmes Urbains (leesu)**

Thèse soutenue à l'université Paris-Est Créteil, le 30 janvier 2024, par

Sadia BAGAGNAN

Composition du Jury

Joana FALCO SALLES	Professeure Université de Groningen	Rapporteur
Julie LELOUP	Maître de conférences HDR, Sorbonne Université	Rapporteur
Thierry PIGOT	Professeur Université de Pau et des Pays de l'Adour	Examineur
Romain PETE	Syndicat mixte du Bassin de Thau	Examineur
Sabrina GUERIN RECHDAOUI	Directrice Innovation, SIAAP	Invitée
Anthony MARCONI	Ingénieur, SIAAP	Invité
Régis MOILLERON	Professeur, Université Paris-Est Créteil	Directeur de thèse
My Dung JUSSELME	Maître de conférences, Université Paris-Est Créteil	Co-encadrante

Table des matières

Liste des figures	5
Liste des tableaux	6
Listes des abréviations	6
Introduction	8
Synthèse bibliographique	12
I. Cadre réglementaire pour la protection des fleuves & rivières.....	12
I.1 Directive 2000/60/CE	12
I.2 Directive 91/271/CE : eaux résiduaires urbaines (DERU).....	13
I.3 Directive 2006/7/CE : eaux de baignade	13
II. Cas du bassin versant de la Seine.....	14
II.1 Réseau hydrographique du bassin de la Seine	14
II.2 Occupation du bassin versant de la Seine	15
III. Communautés microbiennes lotiques	16
III.1 Les protozoaires.....	17
III.2 Les virus	17
III.3 Les champignons	17
III.4 Les bactéries	18
IV. Rôle fonctionnel des microorganismes.....	20
V. Variations spatiotemporelles des communautés microbiennes.....	21
VI. Caractérisation des communautés microbiennes.....	23
VI.1 Abondance des microorganismes	23
VI.2 Diversité bactérienne	25
VI.3 Diversité métabolique	28
VII. Qualité microbiologique des eaux de surface et ses conséquences sur la baignade	29
VII.1 Choix des indicateurs de contamination fécale.....	29
VII.2 Autres microorganismes pathogènes.....	30
VII.3 Baignade en Île-de-France.....	31
VIII. Fonctionnement d'une station d'épuration (STEP).....	33
VIII.1 Prétraitement	34
VIII.2 Traitement primaire	34
VIII.3 Traitement secondaire	34
VIII.4 Traitement tertiaire	35
IX. Mécanisme d'inactivation	35
IX.1 Désinfection par ozonation	36
IX.2 Désinfection par chloration	36
IX.3 Désinfection par UV.....	37
IX.4 Désinfection par l'acide peracétique (APA).....	38

Table des matières

IX.5	Désinfection par l'acide performique (PFA)	39
X.	Conclusion de l'état de l'art	41
	Matériels et méthodes	43
I.	Stratégie expérimentale.....	43
I.1	Caractérisation des communautés bactériennes de la Seine et de ses affluents	43
I.2	Etude des effets potentiels de l'acide performique en conditions contrôlées	45
I.3	Suivi in situ de l'utilisation du PFA comme agent de désinfection des effluents d'une STEP	48
II.	Méthodes d'analyse	51
II.1	Paramètres environnementaux.....	51
II.2	Abondance microbienne : par cytométrie en flux.....	51
II.3	Activités microbiennes	53
II.4	Diversité métabolique avec les microplaques Ecoplate™ de BIOLOG®	55
II.5	Diversité microbienne	56
III.	Stratégies de traitement des données	60
III.1	Analyse de la variance	60
III.2	Corrélations	60
	Résultats.....	62
I.	Caractérisation des communautés microbiennes de la Seine à l'échelle de l'agglomération parisienne	62
I.1	Etude des variabilités spatiales et temporelles des communautés microbiennes de la Seine ...	62
I.2	Evolution des communautés microbiennes de la Seine en réponse au changement climatique et aux activités anthropiques.....	97
II.	Suivi des communautés bactériennes dans les eaux de rejet de STEP désinfectées à l'acide performique avant et après rejet en Seine	135
II.1	Évaluation de l'efficacité de la désinfection des effluents par l'acide performique : abondance et diversité bactériennes	135
II.2	Evaluation de l'effet potentiel de rejets de station d'épuration désinfectés à l'acide performique (PFA) sur les communautés microbiennes du milieu récepteur.....	153
III.	Désinfection à l'acide performique des eaux de rejet d'une STEP alimentant une lagune d'affinage : surveillance des communautés bactériennes de la colonne d'eau et du sédiment	170
	Conclusion et perspectives	192
	Références.....	195
	Annexes.....	207

Liste des figures

Figure 1. Usage de l’eau en France sur la période 2010-2019 (illustration tirée du dossier de presse publié lors du lancement du Plan eau en mars 2023)..... 13

Figure 2. Bassin versant de la Seine et de ses affluents 16

Figure 3. Carte simplifiée de l’occupation des sols, (source : Corine Land Cover), du réseau des Voies navigables et de la Seine et ses affluents 17

Figure 4. Structure de la paroi des bactéries à Gram positif et Gram négatif (Gendrin, 2010) 19

Figure 5. Description de la technique de pyroséquençage (Mardis, 2008)..... 27

Figure 6 Principe de séquençage avec la technologie illumina adapté de (Lu et al., 2016)..... 28

Figure 7. Hydrolyse de la fluorescéine diacétate (FDA) 29

Figure 8. Microplaque Ecoplate de Biolog..... 29

Figure 9. Réduction du tétrazolium en formazan..... 30

Figure 10. Fonctionnement de la file « Eau » de Seine Aval (document interne SIAAP) 34

Figure 11. Distribution des espèces de chlore (HOCl, ClO-) en solution aqueuse en fonction du pH à 25°C . 38

Figure 12 : carte des points de prélèvements en Seine et ses affluents 45

Figure 13 : protocole de synthèse de l'acide performique (adapté de (Rocher and Azimi, 2021)) 47

Figure 14 : dispositif expérimental de mise en contact d’un rejet de STEP avec du le PFA..... 48

Figure 15 : dispositif expérimental de mise en contact entre rejet de STEP traité au PFA et eau de Seine, a) échantillons témoins et b) échantillons tests,..... 48

Figure 16 : présentation de la technologie DesinFix® 49

Figure 17 : descriptif du système de lagunage de la STEP de Mèze 50

Figure 18 : point d’injection du PFA en sortie de clarificateur 50

Figure 19 : points de prélèvement en entrée, centre et sortie des lagunes R1 (dite à forte charge) et F1 (dite de finition) 51

Figure 20 : planning d’échantillonnage sur lors du projet Norovirus..... 51

Figure 21 : échantillonnage des sédiments avec la benne Van Veen..... 52

Figure 22 : conditionnement des échantillons d’eau et sédiment..... 52

Figure 23 : protocole d'extraction des cellules microbiennes des sédiments..... 53

Figure 24 : présentation du BactoSense (bNovate) (A) et du procédé de mesure (B) 54

Figure 25 : microplaque pour l'analyse de l'hydrolyse de la FDA..... 55

Figure 26 : courbe d’étalonnage du PFA 56

Figure 27 : préparation d'échantillons pour le séquençage 58

Figure 28 : pipeline de traitement bioinformatique de FROGS (<http://frogs.toulouse.inra.fr/>)..... 59

Liste des tableaux

Tableau 1. Seuils de contamination fécale pour les eaux intérieures (directive 2006/7/CE)	14
Tableau 2. Principaux microorganismes pathogènes de sources aquatiques.....	31
Tableau 3. Evaluation de l'abattement sur des bactéries suite à un traitement UV (Hijnen et al., 2006).....	38
Tableau 4 : coordonnées GPS des points de prélèvements	44
Tableau 5 : récapitulatif des campagnes d'échantillonnages en Seine et affluents	45

Listes des abréviations

ACP	Analyse en composantes principales
ADN	Acide désoxyribonucléique
APA	Acide peracétique
ARN	Acide ribonucléique
ATP	Adénosine triphosphate,
AWCD	<i>Average well color development</i> ou activité métabolique
BIF	Bactéries indicatrices fécales
BOUG	Bougival
C	Carbone
CAH	Classification ascendante hiérarchique
CLR	Choisy-le-Roi
COD	Carbone organique dissous
COT	Carbone organique total
CSH	Conflans-Sainte-Honorine
CSM	Champigny-sur-Marne
CT	Concentration x Temps
DBO5	Demande biochimique en oxygène à 5 jours
DCC	<i>Damaged cell concentration</i>
DCE	Directive cadre sur l'eau
DCO	Demande chimique en oxygène
DERU	Directive Eaux résiduaires urbaines
DO	Densité optique ou déversoir d'orage
DOC	<i>Dissolved organic carbon</i>
DP	<i>Disinfection by product</i>
EC	<i>Electrical conductivity</i>
EH	Equivalent-habitant
FCM	Cytométrie de flux ou <i>Flow cytometry</i> en anglais
FDA	Fluorescéine diacétate
FROG	<i>Find, Rapidly, OTUs with Galaxy Solution</i>
Gram -	Gram négatif
Gram +	Gram positif
HPLC	Chromatographie liquide haute performance ou <i>High performance liquid chromatography</i> en anglais
ICC	<i>Intact cell concentration</i>
IdF	Île-de-France
JOP	Jeux olympique et paralympiques
JSO	Juvisy-sur-Orge
KEGG	<i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i> en anglais
Leesu	Laboratoire eau environnement et systèmes urbains
MAV	Station d'épuration de Marne aval
MES	Matières en suspension
MO	Matière(s) organique(s)
N	Azote

Table des matières

NBCI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NF	Norme française
NGS	<i>Next-generation sequencing</i>
NPP	Nombre le plus probable
NQE	Norme de qualité environnementale
NTK	Azote total Kjeldahl ou <i>Nitrogen total Kjeldahl</i> en anglais
OTU	Unité taxonomique opérationnelle ou <i>Operational taxonomic unit</i> en anglais
P	Phosphore
PCR	Amplification en chaîne par polymérase ou <i>Polymerease chain reaction</i> en anglais
PFA	Acide performique
PICRUST	<i>Phylogenetic Investigation of Communities by Reconstruction of Unobserved States</i> en anglais
RDA	Analyse de redondance ou <i>Redundancy analysis</i> en anglais
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
SAM	Sète agglomération méditerranée
SAV	Station d'épuration de Seine aval
SAV	Station d'épuration de Seine Valenton
SEC	Station d'épuration de Seine centre
SEG	Station d'épuration de Seine Grésillons
SEM	Station d'épuration de Seine Morée
SIAAP	Syndicat interdépartemental de l'assainissement de l'agglomération parisienne
SMBT	Syndicat mixte du Bassin de Thau
STEP	Station d'épuration
TCC	<i>Total cell concentration</i>
TOC	<i>Total organic carbon</i>
TSS	Triel-sur-Seine
UFC	Unité formant colonie
UV	Ultra-violet
VSS	Vitry-sur-Seine
WWTP	<i>Wastewater treatment plant</i>

Introduction

Contexte général

« *Dans trois ans, j'irai me baigner dans la Seine devant témoins* », cette déclaration faite par Jacques Chirac en tant que maire de Paris en 1988, peut être vue comme un symbole de l'engagement des politiques pour l'amélioration de la qualité de la Seine en vue d'y développer la baignade et un témoin de leur attachement à ce fleuve emblématique occupant une place de choix dans le cœur des Français et des Parisiens en particulier. Cet engagement n'a pas pu être tenu, on peut toutefois imaginer qu'il a constitué un levier pour la mise en place d'actions par les collectivités locales pour restaurer la Seine. Ainsi aujourd'hui la Seine compte une cinquantaine d'espèces de poissons, contre 14 en 1990. Même si sur les espèces de poissons présentes aujourd'hui, seules 32 en sont véritablement originelles. La raison : des introductions volontaires ou invasives d'espèces depuis le XIXe siècle (programme PIREN-Seine, plaquette « 4 p ». *Recherches sur le peuplement de poissons dans le bassin de la Seine*)¹. Depuis le 13 septembre 2017, les actions pour améliorer la qualité de la Seine se sont accélérées avec la désignation de Paris, comme ville hôte des Jeux Olympiques et Paralympiques de 2024 (JOP de 2024), surtout avec la volonté d'organiser certaines épreuves en eaux vives. Il restait toutefois un défi à relever par les pouvoirs publics s'assurer que la qualité microbiologique de la Seine et de la Marne serait compatible avec les critères de qualité requis pour la baignade tels que définis dans la Directive Européenne 2006/7/CE du Parlement européen et du Conseil concernant la gestion de la qualité des eaux de baignade. En effet, la baignade en zone urbaine peut présenter des risques sanitaires en raison de la présence de bactéries indicatrices fécales (BIF) à l'origine de gastroentérites. Ces BIF ont pour origine, par temps sec, des rejets de station d'épuration (STEP), peu voire pas désinfectés, et, par temps de pluie, des déversoirs d'orage, qui rejettent directement dans le milieu récepteur un mélange d'eaux usées et pluviales non traité (Cornelisen et al., 2011; Liao et al., 2019). L'agglomération parisienne ne fait pas exception à la règle, ainsi la Seine et la Marne, en agglomération parisienne sont soumises à des pressions anthropiques fortes se traduisant par la présence de six stations d'épurations gérées par le SIAAP (Syndicat interdépartemental de l'agglomération parisienne) ainsi que la présence de plusieurs déversoirs d'orage, 44 rien que pour la ville de Paris (Carré, 2000). Ainsi, l'impact de l'agglomération parisienne demeure important, il s'exerce sur 100 kilomètres, d'avril jusqu'en octobre : le traitement des effluents urbains reste très insuffisant par rapport à la capacité de dilution et d'autoépuration du fleuve (Lestel et Carré, 2017).

Les autorités sanitaires et les pouvoirs publics pour s'assurer que la qualité microbiologique des eaux de la Seine et la Marne est compatible avec la baignade, depuis 2017 ont mis en œuvre un grand nombre d'actions pour réduire les rejets d'eaux résiduelles urbaines non traitées dans la Seine et la Marne, et depuis les années 2000 pour optimiser la gestion des eaux pluviales : raccordements au réseau d'assainissement de riverains qui rejetaient directement en Marne, des propriétaires de péniches, constructions du bassin d'Austerlitz (d'une capacité de 50 000 m³ pour stocker les eaux usées et pluviales lors des fortes précipitations...). Parallèlement, la désinfection des rejets de STEP est devenue essentielle pour réduire ou éliminer les microorganismes pathogènes (Betancourt and Rose, 2004). De nombreuses techniques de désinfection sont disponibles ; les plus courantes restent la chloration, les UV et l'ozonation. Ces techniques présentent des avantages mais également des inconvénients, notamment, la formation de sous-produits de désinfection toxiques avec la chloration et la reviviscence bactérienne pour la désinfection par UV (Lin et al., 2021; Sinha and Häder, 2002; Stohl et al., 2003; Xu et al., 2022). Pour l'agglomération parisienne, le choix de la désinfection à l'acide performique (PFA) a été décidé par le SIAAP à l'occasion d'un Conseil d'administration en novembre 2019. Ce choix s'explique par son efficacité en STEP sur les bactéries

¹ https://www.piren-seine.fr/sites/default/files/piren_documents/fiches_4_pages/fiche_ps_poissons_web.pdf

indicatrices fécales BIF (*E.coli* et les *Enterocoques intestinaux*) à de faibles concentrations et des temps de contact courts, et l'absence de sous-produits de désinfection toxiques pour la faune et la flore aquatiques (Chhetri et al., 2014; Gehr et al., 2009; Luukkonen et al., 2015; Ragazzo et al., 2013).

Ces études, généralement, se focalisent sur les BIF sans considérer l'ensemble du microbiome du rejet, et, donc, de la présence potentielle d'autres microorganismes pathogènes dans ces rejets tels que *Campylobacter*, *Pseudomonas*, *Shigella*, *Aeromonas*, *Acinetobacter*, *Brevundimonas*, et *Flavobacterium* (Bergogne-Bérézin and Towner, 1996; Liao et al., 2022; Lindquist et al., 2003; Ryan and Pembroke, 2018). Il s'avère nécessaire de s'interroger sur l'innocuité de ces rejets traités au PFA sur les communautés microbiennes de la Seine et la Marne, car ces communautés jouent un rôle clé dans les cycles biogéochimiques (C, N et P) (Delmas et al., 2015; Fenner et al., 2005; Herndl et al., 1987; Silberbach et al., 2005). A l'échelle de l'agglomération parisienne, la connaissance de la nature des communautés microbiennes (composition, abondance et activité métabolique) et leur évolution spatiale et temporelle, de même que les facteurs pouvant influencer leur fonctionnement et composition, est primordiale. Pourtant, peu d'études porte sur ce sujet pour la Seine, la dernière remonte à 2012 (George et al., 2012). C'est pour palier ce manque de connaissances sur (i) les communautés microbiennes de la Seine, (ii) l'efficacité du PFA en considérant l'ensemble du microbiome des rejets et (iii) les impacts potentiels des rejets traités à l'acide performique sur les communautés microbiennes de la Seine que cette thèse a été initiée.

Objectifs de la thèse

Les objectifs de la thèse concernaient la **caractérisation temporelle des communautés microbiennes de la Seine de l'amont à l'aval de l'agglomération parisienne** afin d'établir un état de référence de ces communautés avant la mise en place de la désinfection au PFA des rejets de STEP alors prévue en juin 2023. L'étude des **effets potentiels de rejets de STEP traités au PFA sur les communautés microbiennes du milieu récepteur** a également été investigué selon deux approches : l'une en microcosme (pour laquelle les conditions opératoires étaient maîtrisées et cohérentes avec les conditions utilisées par les gestionnaires de STEP en région parisienne, c'est-à-dire avec une concentration en PFA maximale autorisée par la Préfecture de 2 mg/l), l'autre *in situ* sur la lagune recevant les rejets traités au PFA de la STEP de Mèze (34).

Cadre de la thèse

Cette thèse a été réalisée au Leesu dans le cadre du programme MeSeine Innovation, piloté par le SIAAP, qui vise à :

- Améliorer la connaissance de l'état des rivières franciliennes, appréhendé par le prisme de leur qualité physico-chimique, de leur imprégnation par les micropolluants et de la diversité du biote ;
- Promouvoir l'innovation dans les outils de suivi de la qualité des eaux de surface ;
- Faire évoluer les outils numériques capables notamment de prédire l'évolution de la qualité des eaux de surface.

Le programme MeSeine Innovation est construit autour de trois axes de recherche : Axe 1 - Mieux connaître nos rivières franciliennes, Axe 2 - Regarder autrement les eaux de surface, et Axe 3 - Faire évoluer les outils numériques. Les travaux de cette thèse se sont déroulés dans le bloc 2.2 de l'axe 2 : Innover dans le suivi de la micro-contamination et de ses effets sur le vivant.

Une partie des expérimentations a été effectuée dans le cadre du projet NOROVIRUS, piloté par le Syndicat Mixte du Bassin de Thau (SMBT). Les eaux de la STEP ont été traitées au PFA dans le but d'éliminer les norovirus, responsables d'épidémies de gastroentérites. Il s'agissait d'un projet collaboratif associant plusieurs partenaires dont, entre autres, le Syndicat Mixte du Bassin de Thau (SMBT), Sète agglomération Méditerranée (SAM), le SIAAP et le Leesu. Notre action concernait le suivi de la diversité microbienne du système de lagunage de la station d'épuration de Mèze (34) afin

d'évaluer (i) l'efficacité du procédé de désinfection au PFA et (ii) son innocuité pour le milieu récepteur à savoir le système de lagunage de la STEP de Mèze (12 hectares au bord du bassin de Thau).

Structuration du mémoire

Ce mémoire de thèse s'articulera en trois parties. La première partie est constituée d'un état des connaissances sur les écosystèmes lotiques. Il est constitué de plusieurs chapitres traitant du cadre réglementaire pour la protection des eaux de surface, du bassin versant de la Seine, des communautés microbiennes des eaux de surface, de leur fonction, de leurs variations spatiotemporelles, et des techniques de caractérisation disponibles. Ensuite la qualité microbiologique des eaux de surface et ses conséquences sur la baignade sont évoquées ainsi que les procédés de désinfection des rejets de STEP.

La seconde partie dédiée aux Matériels et méthodes présente (i) les stratégies d'échantillonnage (ii) les analyses et les protocoles expérimentaux qui ont été mis en place pour répondre à nos objectifs, et (iii) la méthodologie de traitement statistique des données acquises.

La troisième partie porte sur les résultats et leurs interprétations, elle est subdivisée en trois chapitres :

- Le premier concerne la caractérisation des communautés microbiennes de la Seine à l'échelle de l'agglomération parisienne, l'objectif était d'établir un état de référence avant la mise en place de la désinfection à l'acide performique en juin 2023. Deux articles, soumis en octobre 2023 à *Heliyon* et *Aquatic Ecology*, constituent le corps de ce chapitre.
 1. Bagagnan S., Guérin S., Rocher V., Alphonse V., Moilleron R. & Jusselme M. D. Spatial and temporal characteristics of microbial communities in the Seine River in the Greater Paris area under anthropogenic perturbation, *Heliyon*, soumis
 2. Bagagnan S., Guérin S., Marconi A., Rocher V., Giusti-Miller S., Moilleron R. & Jusselme M. D. Overview of microbial communities in the surface water of the Seine River to understand their response to climate change and human activities, *Aquatic Ecology*, soumis

- Le deuxième chapitre s'intéresse au suivi des communautés bactériennes dans les eaux de rejet de STEP désinfectées à l'acide performique avant et après rejet en Seine. Deux articles y sont présentés : un soumis à la revue *Technique, Sciences et Méthodes* de l'ASTEE en octobre 2023 et l'autre en cours de finalisation.
 3. Bagagnan S., Jusselme M. D., Alphonse V., Guérin Rechdaoui S., Marconi A., Rocher V. & Moilleron R. Assessing the effectiveness of performic acid disinfection on effluents: focusing on bacterial abundance and diversity, en cours de finalisation.
 4. Bagagnan S., Jusselme M. D., Alphonse V., Livet A., Guérin Rechdaoui S., Marconi A., Rocher V. & Moilleron R. Evaluation de l'effet potentiel de rejets de station d'épuration désinfectés à l'acide performique (PFA) sur les communautés microbiennes du milieu récepteur, *Technique, Sciences et Méthodes*, soumis

- Le troisième et dernier chapitre se concentre sur la lagune de la STEP de Mèze (34), plus précisément sur le suivi des communautés bactériennes de la colonne d'eau et du sédiment avant, pendant et après désinfection à l'acide performique des eaux usées avant rejet dans la lagune. Les résultats obtenus sont présentés sous la forme d'un article prochainement soumis à la revue *Technique, Sciences et Méthodes*.

5. Bagagnan S., Jusselme M. D., Alphonse V., Livet A., Guérin Rechdaoui S., Marconi A., Rocher V. & Moilleron R. Utilisation de l'acide performique dans un système de traitement des eaux par lagunage : surveillance des communautés bactériennes de la colonne d'eau et du sédiment, *Technique, Sciences et Méthodes*

Chaque chapitre s'articule donc autour d'articles soumis ou en cours de finalisation. Il débute par un rappel des objectifs de l'article, suivi d'une synthèse des résultats marquants obtenus puis du papier au format de l'éditeur. Les données complémentaires de chaque article (*Supplementary data*) sont fournies en annexe de ce mémoire.

Le mémoire se termine par une conclusion générale intégrant des nouvelles perspectives de recherche.

Synthèse bibliographique

Les fleuves, les rivières, eaux courantes et lacs constituent les écosystèmes lotiques. Les fleuves sont des systèmes dynamiques aussi bien dans l'espace que dans le temps (Radinger and Wolter, 2014; Ward, 1989). Ils représentent seulement 0,006 % du volume des ressources en eau douce totales et 0,0002 % des 1 400 km³ d'eaux disponibles à l'échelle terrestre (Morel, 2007; UNESCO, 2003). Ces eaux douces ont toujours été utilisées par les hommes notamment pour couvrir leurs besoins dans le cadre des activités domestiques, agricoles et industrielles, la pêche et les activités récréatives comme la baignade. Ces besoins en eau sont de plus en plus importants avec la démographie et l'urbanisation croissantes. En effet, selon le commissariat général du développement durable (mars 2023), sur la période 2010-2019, annuellement en France métropolitaine, un volume moyen de 32,8 milliards de m³ d'eau douce est prélevé et 4,1 milliards de m³ consommés (Figure 1).

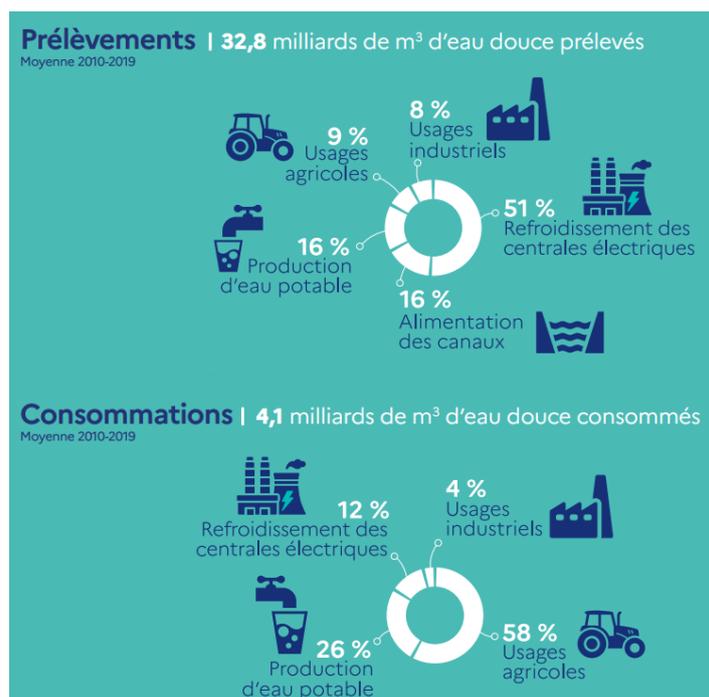


Figure 1. Usage de l'eau en France sur la période 2010-2019 (illustration tirée du dossier de presse publié lors du lancement du Plan eau en mars 2023)

Parmi les activités consommatrices d'eau, l'agriculture se place en tête des utilisations d'eau en consommant 58 % du total, devant la production d'eau potable (26 %), le refroidissement des centrales électriques (12 %) ainsi que les usages industriels (4 %). Malgré leur importance, les fleuves restent majoritairement des milieux ouverts donc plus sensibles aux facteurs environnementaux externes et également aux apports anthropiques. En effet, ils peuvent constituer un milieu récepteur pour des eaux de ruissellement, des rejets domestiques qu'ils soient traités ou non, et des rejets de déversoirs d'orage. Ces différents apports peuvent altérer la qualité des cours d'eau. Il est donc nécessaire de veiller à sa protection pour le maintien de son bon état. Cette protection des milieux récepteurs passe par la mise en place de réglementations régissant les différents apports pouvant l'impacter.

I. Cadre réglementaire pour la protection des fleuves & rivières

I.1 Directive 2000/60/CE

La directive cadre sur l'eau (DCE), a pour objectif, l'atteinte du bon état chimique et écologique des eaux de surface (eaux douces et eaux côtières), et le bon état chimique et quantitatif des eaux souterraines. Le bon état chimique stipule que les concentrations des substances polluantes dans les eaux doivent être inférieures aux normes définies notamment les Normes de Qualité

Environnementale (NQE) pour les substances prioritaires. Le bon état écologique des eaux de surface concerne l'évaluation de la qualité biologique des espèces (faune, flore).

Les objectifs principaux de la DCE étaient initialement de plusieurs ordres :

- l'atteinte du bon état des eaux en 2015,
- la non-détérioration des ressources en eau et des milieux aquatiques,
- la réduction ou la suppression des rejets de substances dangereuses.

Les délais prévus suite à l'adoption en 2000 de DCE étaient les suivants :

- 9 ans pour faire les diagnostics et fixer les objectifs,
- 12 ans pour mettre en place des programmes d'actions opérationnels,
- 15 ans pour parvenir à un bon état des eaux (des dérogations sont possibles s'il y a des circonstances particulières),
- 20 ans pour éliminer les substances dangereuses prioritaires des rejets d'eaux usées.

Cependant, les objectifs n'étant pas encore atteints, les états membres ont une nouvelle échéance fixée au plus tard en 2027 pour l'atteinte de ces objectifs, avec la possibilité des dérogations.

1.2 Directive 91/271/CE : eaux résiduaires urbaines (DERU)

La rivière est le principal récepteur des eaux de rejets (traitées ou non) des agglomérations encore appelées « eaux résiduaires urbaines ». Selon l'article 2 de la DERU, les eaux résiduaires urbaines sont définies comme étant des eaux usées ménagères (eaux produites essentiellement par le métabolisme humain et les activités ménagères) seules ou mélangées avec des eaux usées industrielles (eaux provenant de locaux utilisés à des fins commerciales ou industrielles, autres que les eaux ménagères usées et les eaux de ruissellement) et/ou des eaux de ruissellement. Dans le but de répondre à la problématique des pollutions que peuvent engendrer leur rejet, la DERU a été mise en place et transcrite en droit français dans la loi sur l'eau du 3 janvier 1992. Dans cette directive, les états ont pour obligation la mise en place de système de collecte et de traitement des eaux résiduaires pour toute agglomération de plus de 2000 EH (équivalent habitant). Un EH est défini comme étant une unité utilisée en assainissement pour évaluer la pollution organique représentant, entre autre, la quantité de matière organique rejetée par jour et par habitant (Mercoiret, 2009) via des valeurs de référence. Par exemple, pour la demande chimique en oxygène (DCO) et la demande biochimique en oxygène à 5 jours (DBO5) : 135 g et 60 g, respectivement, mais aussi 15 g d'azote total Kjeldahl (NTK) et 4 g de phosphore total et 120 litres. Chaque agglomération en fonction de sa taille (en EH) et de la zone de rejet, doit mettre place des équipements de collecte et d'assainissement ainsi que les traitements adaptés nécessaires pour que les rejets dans le milieu naturel n'aient pas d'impact sur celui-ci. Ces équipements doivent être continuellement suivis et contrôlés. Cependant, par temps de pluie, en raison de l'augmentation des volumes d'eau collectés et des débits, dans le cas des réseaux unitaires tous les effluents collectés ne peuvent pas être traités. Des volumes d'eaux usées mélangées au ruissellement urbain sont rejetés directement dans le milieu récepteur via les déversoirs d'orage.

1.3 Directive 2006/7/CE : eaux de baignade

Mise en place le 15 février 2006, la directive 2006/7/CE ou directive baignade porte sur la gestion de la qualité des eaux de baignade. Cette directive remplace la directive 76/160/CEE de 1976 qui portait sur la qualité microbiologique et physicochimique des plages. La directive baignade vise à surveiller et améliorer la qualité des eaux de baignade ; elle est entrée en vigueur en 2013 en France. Elle fixe les critères de qualité auxquels doivent répondre les eaux de baignade. Elle vise d'un point de vue microbiologique à limiter les risques sanitaires liés à la baignade dus à la présence de

pathogènes dans ces eaux. Pour l'atteinte de ces objectifs, les gestionnaires doivent mettre en place des actions pour prévenir, réduire ou éliminer les sources de ces pathogènes qui sont d'origine fécale. Dans ce cadre, deux indicateurs de contamination fécale sont considérés à savoir *Escherichia coli* (*E. coli*) et les entérocoques intestinaux. Des seuils ont été établis pour ces deux indicateurs, sur la base desquels sont classées les eaux de baignade : qualité « suffisante », « bonne » ou « excellente » (Tableau 1). Ce classement se base sur un profil de vulnérabilité qui est établi en se basant sur les résultats des analyses des quatre dernières années. Ce profil vise à effectuer un état des lieux, d'identifier les sources potentielles de contamination, et la mise en place de mesures de gestion.

Tableau 1. Seuils de contamination fécale pour les eaux intérieures (directive 2006/7/CE)

Paramètre		Qualité excellente	Qualité bonne	Qualité suffisante
Entérocoques intestinaux (UFC/100 ml)		200	400	330
<i>Escherichia coli</i> (UFC/100 ml)		500	1 000	900
Evaluation		Au 95 ^e percentile	Au 95 ^e percentile	Au 90 ^e percentile

La qualité des eaux de baignade est déterminée sur la base de résultats obtenus pour des échantillons prélevés en un point de surveillance défini conjointement par l'Agence régionale de santé (ARS) et le gestionnaire. Une révision de ce profil est effectuée lorsque la qualité de l'eau est « insuffisante » chaque 2 ans, « suffisante » chaque 3 ans, « bonne » chaque 4 ans. Lorsque la qualité est insuffisante après plusieurs révisions, le maire ou le préfet peuvent interdire la baignade de façon temporaire ou de façon définitive.

II. Cas du bassin versant de la Seine

Le bassin versant de la Seine a une superficie de 78 600 km² avec une topographie plate, peu prononcée dont les pentes varient entre 0,001 et 0,003. Les formations géologiques rencontrées dans le bassin versant sont majoritairement des roches sédimentaires carbonatées.

II.1 Réseau hydrographique du bassin de la Seine

La Seine est le second fleuve le plus long de France avec une longueur de 777 km (Figure 2). Il prend sa source sur le plateau de Langres, dans la commune de Source-Seine en Côte d'Or, à environ 470 m d'altitude. Il se jette dans la Manche entre Le Havre et Honfleur après avoir traversé 12 départements. Il s'écoule du Sud-est vers le Nord-ouest et est doté de 45 affluents dont les principaux sont la Marne (≈ 525 km), l'Oise (≈ 341 km) et l'Yonne (≈ 292 km).

La Seine, la Marne et l'Oise sont des rivières à régime pluvial océanique avec des hautes eaux en saison froide (janvier à mars) et des basses eaux en saison chaude (juillet à août). A l'échelle de l'agglomération parisienne (Ile-de-France (IDF)), les températures moyennes des eaux oscillent entre 25° C en été et 5° C en hiver. En fonction des événements climatiques, ces températures peuvent être soit plus hautes que 25° C (période de canicule) ou inférieures à 5° C. Les précipitations à l'échelle du bassin versant sont variables (van Oldenborgh et al., 2016). Les débits de la Seine sont fortement liés aux saisons. Durant les périodes de crue, généralement entre décembre et février, le débit moyen est d'environ 435 m³.s⁻¹ à Poses (pouvant atteindre lors de certains épisodes 2000 m³.s⁻¹) et de l'ordre de 310 m³.s⁻¹ à Paris Austerlitz (pouvant atteindre 1700 m³.s⁻¹ en période de crue). Les périodes d'étiage quant à elles ont lieu généralement entre juillet et octobre, avec des débits pouvant devenir inférieurs à 100 m³.s⁻¹.

La Marne, affluent le plus long de la Seine, prend sa source sur le plateau de Langres avant de rejoindre la Seine à Alfortville dans le Val-de-Marne. Elle traverse 6 départements dont le Val-de-Marne qui accueille ses 25 derniers kilomètres. L'Oise, second affluent le plus important de la Seine, prend sa source en Belgique à Chimay, dans la commune de Forges à 309 m d'altitude et se jette dans la Seine 341 km plus loin à Conflans-Sainte-Honorine.

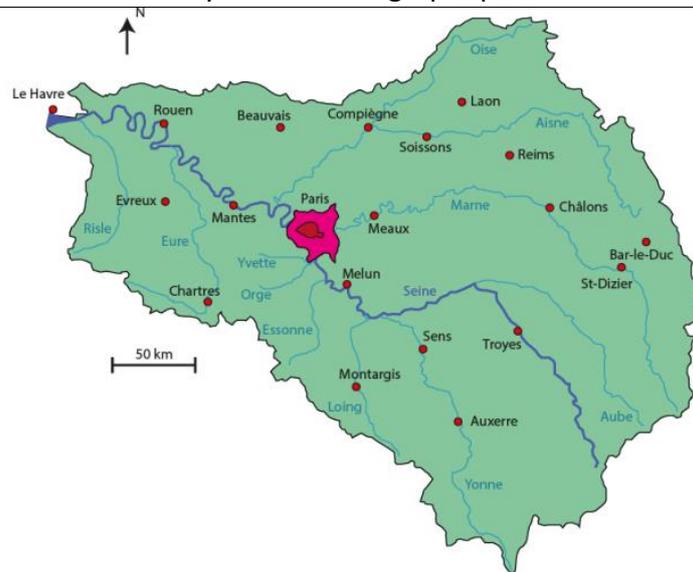


Figure 2. Bassin versant de la Seine et de ses affluents

II.2 Occupation du bassin versant de la Seine

Le bassin versant de la Seine, avec une superficie de 78 600 km², ne présente pas une densité démographique homogène. Selon l'Institut national de la statistique et des études économiques (Insee), la population de l'Île-de-France (IDF), à la date du 1^{er} janvier 2022, est estimée à 12 395 100 habitants soit environ 19 % de la population totale de la France métropolitaine, dont 2 139 900 uniquement à Paris. La densité au km² à Paris est comprise entre 1 000 et 5 000 habitants contre une densité < 20 habitants dans les zones amont du bassin. A l'échelle de Paris et ses alentours, la Seine est donc soumise à une pression anthropique importante. De nombreuses activités sont menées sur le bassin. Cependant, l'occupation des sols y varie également d'amont en aval (Figure 3). Selon le *Corine Land Cover* de 2018², le bassin de la Seine est recouvert d'environ 56,5 % de terres cultivées, 25,6 % de zones forestières, 9,5 % de forêts, 7,6 % de zones urbanisées, de plans d'eau et de zones humides (0,8 %). A l'échelle de l'IDF, 50 % de la surface est constituée de sols agricoles, 26 % de forêts et de milieux semi-naturels, 1 % d'étendues d'eau, les zones urbanisées représentent quant à elles environ 24 % de la surface (Institut Paris Région Mos 2021).

²<https://www.statistiques.developpement-durable.gouv.fr/corine-land-cover-0>

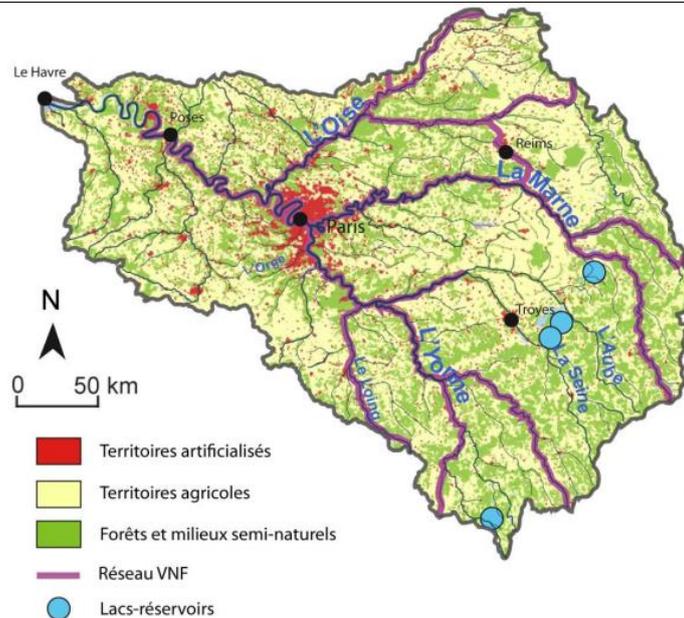


Figure 3. Carte simplifiée de l'occupation des sols, (source : Corine Land Cover), du réseau des Voies navigables et de la Seine et ses affluents

À l'échelle de Paris et sa petite couronne, les sols agricoles ne présentent que 3 % tandis que les espaces urbanisés représentent 86 %. En région parisienne, le tissu industriel est principalement composé d'industries d'assemblages de produits informatiques, électroniques et optiques ; d'industries de production alimentaire et textile. Ces différentes industries engendrent la production d'eaux usées. Dans l'agglomération parisienne, il existe deux types de réseaux de collecte pour les eaux usées : un réseau unitaire qui collecte, par temps de pluie, à la fois les eaux usées et les eaux pluviales, et un réseau séparatif qui lui collectent dans deux réseaux distincts les eaux pluviales et les eaux usées. En agglomération parisienne, le réseau est essentiellement de type unitaire. Les eaux collectées vont transiter vers le réseau d'assainissement géré par le Syndicat Interdépartemental de l'Assainissement de l'Agglomération Parisienne (SIAAP). Il existe six stations d'épuration (STEP) gérées par le SIAAP : Marne Aval (MAV, d'une capacité de traitement par temps sec de 75 000 m³.j⁻¹), Seine Amont (SAM, 600 000 m³.j⁻¹), Seine Morée (SEM, 50 000 m³.j⁻¹), Seine Centre (SEC, 240 000 m³.j⁻¹), Seine Aval (SAV, 1 500 000 m³.j⁻¹) et Seine Grésillons (SEG, 300 000 m³.j⁻¹). Après traitement, par temps sec, les eaux sont rejetées au niveau de la Seine (pour les STEP SAM, SEM, SEG et SAV) et la Marne (pour la STEP MAV). Par temps de pluie, aux rejets de ces STEP, viennent s'ajouter ceux des déversoirs d'orage et des réseaux pluviaux. Lorsque les volumes acheminés dépassent la capacité de traitement des ouvrages, les eaux excédentaires sont rendues au milieu naturel, la plupart du temps après avoir subi une étape de dégrillage / dessablage / déshuilage : on parle de déversoirs d'orage. Les principaux points de déversements du SIAAP sont les déversoirs d'orage de Clichy (Hauts-de-Seine) et de La Briche (Seine-Saint-Denis) et le site de La Frette (Val d'Oise). Par ailleurs, les eaux de lessivage des sols agricoles des zones moins anthropisées sont également rejetées dans le milieu naturel. D'autres activités sont menées sur la Seine et ses affluents, à savoir les activités nautiques, de navigation, de pêche, elles peuvent également avoir un effet sur la qualité de ces cours d'eau.

III. Communautés microbiennes lotiques

Les écosystèmes lotiques, fleuves, rivières et lacs, abritent une grande diversité de microorganismes. Parmi ces microorganismes, on distingue les eucaryotes (unicellulaires), les procaryotes comprenant les bactéries et les archées, et les virus. Les bactéries et archées ne sont dotées ni de noyau, ni d'organites et se différencient des eucaryotes qui possèdent un vrai noyau. Ces microorganismes présents dans les fleuves et rivières, en termes de diversité et variabilité, sont

peu étudiés. Par ailleurs, la majorité des études existantes se sont effectuées sur des petites rivières, ou des tronçons de rivières assez courts (Savio et al., 2015a).

III.1 Les protozoaires

Le terme « protozoaires » introduit par Goldfuss en 1818, signifie « les premiers animaux » (Imam, 2009). Ce sont des microorganismes eucaryotes (dotée d'un noyau cellulaire) pouvant vivre dans de nombreux habitats dont les eaux de fleuves et de rivières. La grande majorité de ces protozoaires ne présentent pas de risques pour la santé humaine. Cependant, certains protozoaires peuvent être parasites, entériques. Ils se reproduisent dans les voies digestives et tout comme les virus peuvent provoquer des infections intestinales. Cependant, certains sont entériques, ils sont présents et se multiplient uniquement dans le tractus gastro-intestinal. Les protozoaires les plus associés aux infections entériques d'origines hydriques sont les flagellés (*Giardia*), les sporozoaires (*Cryptosporidium*), plus particulièrement les *Cryptosporidium parvum* et *Giardia duodenalis* (Helmi, 2016; Hunter, 2003). Ils se retrouvent dans les eaux superficielles via les eaux de ruissellement et les rejets de STEP (Gallas-Lindemann et al., 2013). En effet, ils peuvent présenter une certaine résistance aux traitements effectués en STEP comme la chloration (Helmi, 2016).

III.2 Les virus

Ce sont les plus petites entités biologiques avec une taille comprise entre 20 et 400 nm. Du point de vue structurel, les virus sont constitués d'un matériel génétique (ADN ou ARN) protégé par une enveloppe protéique dite « capsid » (Raoult et al., 2004). Cette capsid peut avoir diverses formes dont les deux plus communes sont la forme hélice et la forme icosaèdre. Le dénombrement et l'identification des virus se font par microscopie électronique, microscopie en épifluorescence, et la cytométrie en flux. Un virus est généralement spécifique d'une cellule hôte donnée, ils ne peuvent pas survivre en dehors de celle-ci. Ainsi, dans le milieu aquatique, les virus ont une influence cruciale dans la survie des communautés microbiennes hôtes par leur infection, on parle alors de lyse virale (Suttle, 2007). Les virus jouent donc le rôle de phage des microorganismes hôtes. Cette lyse traduit le rôle des virus dans le fonctionnement des écosystèmes aquatique par leur implication dans le cycle du carbone : la lyse cellulaire va entraîner la mort des cellules hôtes et la formation de débris qui vont servir de substrat organique, nutriments utilisables pour les autres microorganismes (Fuhrman, 1999). De nombreux virus sont associés à des pathologies d'origine hydrique chez l'homme, de plusieurs ordres, comme des gastroentérites, des infections respiratoires et cutanées pouvant entraîner la mort. Ces virus se transmettent généralement par la voie féco-orale. Une fois excrétés dans les selles, les virus se trouvent dans les eaux douces via les eaux de ruissellement et les rejets des STEP dont ils ne sont pas toujours entièrement éliminés (Aslan et al., 2011; Wright et al., 2009). Ces virus sont transmis à l'homme soit par l'ingestion de produits alimentaires (fruits de mer et les plantes arrosées avec de l'eau contaminée), soit par l'ingestion d'une eau contaminée, soit lors de baignade dans des eaux contaminées ou le contact avec une personne infectée. C'est le cas pour les Norovirus qui sont des virus de petite taille, non enveloppés, dotée d'une capsid à symétrie icosaédrique, d'environ 27 nm de diamètre, à l'origine de gastro-entérite virale épidémique, diarrhée virale, grippe intestinale, etc. Les virus ont la capacité de vivre pendant longtemps dans les eaux superficielles et sont hautement résistants à la désinfection (Helmi, 2016).

III.3 Les champignons

Les champignons sont des microorganismes hétérotrophes qui jouent un rôle dans les écosystèmes aquatiques. Les champignons rencontrés dans les eaux douces appartiennent à l'embranchement des *Ascomycètes*, *Basidiomycètes*, *Chytridiomycètes* et *Gloméromycètes* (Ittner et al., 2018; Shearer et al., 2007). Tout comme les bactéries, ils participent également à la décomposition de la matière organique et jouent donc un rôle dans le cycle des nutriments (Luo et al., 2004). Ils participent à la dégradation de polluants organiques anthropiques (Ittner et al., 2018). Malgré leur importance dans le fonctionnement des écosystèmes, certains champignons sont pathogènes pour l'être humain. Ils

peuvent être responsables de mycoses comme c'est le cas pour les *Candida albicans*, *Acremonium implicatum*, *Chrysosporium keratinophilum*, *Trichosporon cutaneum*, et *Rhodothorula rubra* (Pietryczuk et al., 2018).

III.4 Les bactéries

Les bactéries sont des microorganismes procaryotes (sans véritable noyau) dont la taille est comprise généralement entre 0,2 et 2 μm . Elles sont dotées d'une paroi cellulaire en peptidoglycane (muréine) assurant leur protection mécanique. Cette paroi, polymère de glycosaminopeptide, est composée une structure alternant des molécules de N-acétyl glucosamine et d'acide N-acétyl muramique, de chaînes latérales peptidiques attachées à l'acide N-acétyl muramique et d'un ensemble de ponts inter-peptidiques qui vont relier ces polymères de glycosaminopeptides (Schleifer and Kandler, 1972).

Elles peuvent être regroupées en deux types en fonction de la structure de leur membrane et de la coloration Gram du nom du biologiste danois Hans Christian Gram. Si suite à cette coloration, les bactéries restent violettes, alors elles sont dites Gram positives ou Gram⁺ tandis que si elles sont colorées en rose alors, elles sont dites Gram négatives ou Gram⁻. C'est une technique de coloration qui permet une distinction en fonction de la structure membranaire et de la nature de la paroi des bactéries. L'épaisseur de la couche de peptidoglycane permet de distinguer ces deux groupes de bactéries. Les bactéries à Gram négatif sont dotées d'une structure membranaire composée de 3 parties : une membrane externe (qui sert de protection pour la bactérie), un espace périplasmique contenant le peptidoglycane, et la troisième partie qui est la membrane plasmique. Cependant, cette couche de peptidoglycane est fine. Parmi les bactéries à Gram négatif, on retrouve les *Enterobacteriaceae* (*Salmonella spp*, *Escherichia coli*), les *Vibrionaceae* (*Vibrio cholerae*). Les bactéries à Gram positif, elles, sont dotées d'un peptidoglycane très épais, entourant la membrane cytoplasmique. Comme exemple de bactéries à Gram positif, on peut citer les *Enterococcus* (*Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*).

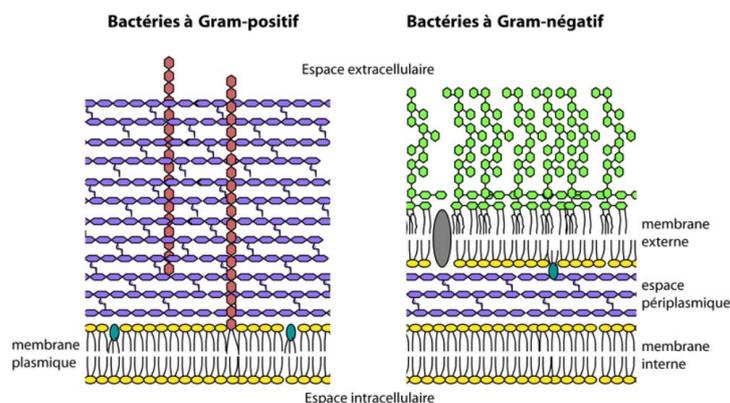


Figure 4. Structure de la paroi des bactéries à Gram positif et Gram négatif (Gendrin, 2010)

L'épaisseur de la paroi joue un rôle dans la résistance et la protection de la bactérie face aux agressions externes comme une désinfection par exemple. En effet dans le cadre de la désinfection électrochimique menée par (Zhang et al., 2023), la structure membranaire a joué un rôle dans la faible efficacité du traitement. Par ailleurs, ces bactéries, qu'elles soient de type Gram⁺ ou Gram⁻, peuvent être de diverses formes : sphérique, cylindrique, spiralées ou incurvées (Prescott et al., 1996). Les bactéries peuvent être également classées en fonction de leur origine en deux grands groupes : celles dites autochtones (naturellement présentes dans les eaux), celles dites allochtones (apportées par des sources externes). Les bactéries allochtones peuvent provenir du lit de la rivière (par une remise en suspension des sédiments hôtes), des effluents urbains (par les rejets de STEP ou les déversoirs d'orage), des eaux de ruissellement et de lessivages des sols agricoles, des déjections fécales... Ces bactéries allochtones, en particulier celles provenant du microbiote,

peuvent être à l'origine de nombreuses maladies, dont des épidémies de gastroentérites et des infections cutanées.

L'abondance bactérienne dans les milieux aquatiques notamment les rivières est généralement comprise entre 10^5 et 10^7 UFC.mL⁻¹ (Bettarel et al., 2003; Kenzaka et al., 2001). Toutes ces bactéries quantifiées ne sont pas toutes vivantes ou viables. Parmi ces bactéries, on distingue une fraction de bactéries non-viables dites « mortes », avec une membrane altérée, une proportion dite « viables, mais non-actives » avec une membrane cellulaire intacte, mais ces bactéries n'interviennent pas dans la production de biomasse, et une troisième partie dite « actives et viables » qui participent métaboliquement au bon fonctionnement de l'écosystème (Helmi, 2016).

Le développement des techniques moléculaires, notamment le séquençage à haut débit, a permis d'étudier la diversité des bactéries et la structure de leurs communautés. L'état de l'art de (Zeglin, 2015) a mis en évidence l'ensemble des bactéries propres aux écosystèmes d'eaux douces (fleuves et rivières). Les phyla bactériens identifiés pour les fleuves sont : les *Proteobacteria*, *Bacteroidota*, *Actinobacteriota*, *Cyanobacteriota*, *Chloroflexi*, *Firmicutes*, *Verrumomicrobiota*, *Campilobacterota*, *Bdellovibrionota*, *Patescibacteria* (Ouyang et al., 2020; Savio et al., 2015b; Staley et al., 2013). L'abondance de ces différents phyla est très variable en fonction de la localisation de ces écosystèmes ; cependant, le phylum le plus abondant identifié est celui des *Proteobacteria* (Goetghebuer, 2019; Zeglin, 2015).

Les *Proteobacteria* présentent une diversité très importante aussi bien taxonomique que fonctionnelle. Selon (Shin et al., 2015), leur abondance relative est d'environ 61,3 % dans les eaux douces, avec une abondance relative maximale quantifiée de l'ordre de 80,8 % (Goetghebuer, 2019) et une abondance médiane d'environ 44,3 %. Les bactéries affiliées à ce phylum sont de type Gram négatif et regroupent de nombreux microorganismes pathogènes dont les *Escherichia*, les *Salmonella* et les *Enterobacter*. Au niveau des écosystèmes aquatiques, les classes de *Proteobacteria* dominantes sont les *Gammaproteobacteria*, les *Alphaproteobacteria* et les *Betaproteobacteria*.

Le phylum des *Bacteroidota*, anciennement « *Bacteroidetes* », constituées de bactéries à Gram négatif, est présent dans divers environnements, dont les sols, les eaux et également le microbiote intestinal. Ce phylum est subdivisé en 4 classes qui sont les *Bacteroidia*, les *Cytophagia*, les *Flavobacteria* et les *Sphingobacteria* (Thomas et al., 2011). Les bactéries affiliées au genre *Bacteroides* sont dominantes dans le microbiote humain et animal et nécessaires à son bon fonctionnement (Snydman et al., 2011).

Les *Actinobacteriota* sont des bactéries à Gram positif qui sont présentes aussi bien dans les écosystèmes terrestres qu'aquatiques (Macagnan et al., 2006). Ce sont des bactéries aérobies, subdivisées en six classes : les *Actinobacteria*, les *Acidimicrobiia*, les *Coriobacteriia*, les *Nitriliruptoria*, les *Rubrobacteria*, et les *Thermoleophilia*. La classe dominante est celle des *Actinobacteria*. Dans le phylum des *Actinobacteriota*, seules les bactéries affiliées au genre *Frankia* sont capables de fixer l'azote (Barka et al., 2015). Ce phylum comporte également de nombreuses bactéries pathogènes dont les genres *Corynebacterium* et *Mycobacterium*.

Les *Cyanobacteriota*, anciennement appelées « algues bleues » sont constituées de bactéries à Gram négatif, capables de photosynthèse (Garcia-Pichel, 2009). Dans les océans, les genres dominants sont les *Synechococcus* et *Prochlorococcus* (Mella-Flores et al., 2012) tandis que dans les rivières, ce sont les *Synechococcus* (Callieri, 2008), *Microcystis*, *Anabaena*, *Cyanobium*. Les *Synechococcus*, en rivières, jouent un rôle important dans le cycle des nutriments et dans la fixation du carbone (Kim et al., 2018).

Les *Firmicutes* sont des bactéries à Gram positif. elles sont généralement identifiées dans des proportions abondantes dans les zones polluées soumises à forte pression anthropique (Su et al., 2018). Les genres dominants de ce phylum sont *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus* et

Ruminococcus (Stojanov et al., 2020). Les *Firmicutes* sont présentes dans le microbiote animal et humain. Avec les *Bacteroidota*, elles représentent environ 90 % du microbiote (Rinninella et al., 2019).

Les fleuves sont des écosystèmes présentant une grande diversité de communautés microbiennes. Ces communautés vont interagir entre elles mais également avec leur environnement, pour lequel elles vont jouer un rôle essentiel à son bon fonctionnement. L'abondance relative de ces différents phyla dépend de plusieurs facteurs externes (conditions météorologiques, pressions anthropiques, etc.), les fleuves et rivières étant des écosystèmes ouverts ils sont particulièrement sensibles aux variations des conditions environnementales.

IV. Rôle fonctionnel des microorganismes

Dans les écosystèmes lotiques, les bactéries jouent un rôle central dans le fonctionnement écosystémique. En effet, elles interviennent dans le fonctionnement des réseaux trophiques via la boucle microbienne. Le carbone libéré par le phytoplancton va générer de la matière organique. Cette matière organique, qui se présente sous forme particulaire ou dissoute, sera assimilée par les bactéries, qui à leur tour sont consommées par des organismes bactérivores faisant partie du niveau trophique supérieur (Jobard-Portas, 2013). Les bactéries constituent ainsi le premier maillon de la boucle microbienne. Elles jouent un rôle primordial dans les processus biogéochimiques en participant aux transferts de matière et d'énergie dans les écosystèmes aquatiques par leurs activités de minéralisation et de production de biomasse. Les microorganismes régissent les cycles locaux et globaux de l'azote, du soufre, du carbone, du phosphore et de nombreux métaux (fer, mercure...) reliés entre eux et sans lesquels la vie végétale ou animale ne pourrait être maintenue (Schmidt, 2006).

Le carbone (C), dans le milieu aquatique peut se trouver sous forme particulaire ou dissoute, ou sous forme de biomasse vivante ou morte. Le cycle du carbone au niveau des écosystèmes se traduit par des alternances de fixations de carbone et de décomposition de la matière organique. Les microorganismes ont un rôle crucial dans ces deux processus (Fenner et al., 2005; Herndl et al., 1987).

L'azote (N) est l'élément le plus abondant dans l'atmosphère sous forme gazeux (environ 78 %) et est indispensable à tous les organismes vivants notamment pour la synthèse des protéines, les acides nucléiques et les composants de la paroi cellulaire (Silberbach et al., 2005). Cependant, l'azote sous sa forme gazeuse n'est pas utilisable pour la majorité des organismes. Différents processus interviennent pour le rendre assimilable. La première phase consiste en une fixation de l'azote gazeux par des bactéries qui le réduisent en azote inorganique. Cette étape est suivie d'une phase de désassimilation et de minéralisation qui va transformer cet azote inorganique en ammonium assimilable. Le second processus consiste en une nitrification qui va convertir cet ammonium en nitrites grâce à des bactéries de type *Nitrosomonas*, puis en nitrates grâce à des bactéries *Nitrobacter* (Grunditz and Dalhammar, 2001). Le dernier volet est la dénitrification qui va transformer les nitrates ou nitrites en composés gazeux tels que les N_2O , le N_2 et le NH_3 grâce à des bactéries dites dénitrifiantes comme les *Pseudomonas denitrificans*. Et le cycle reprend avec ces composés gazeux azotés.

Le phosphore (P) est un élément indispensable aux organismes vivants pour la synthèse des acides nucléiques. Le phosphore provient essentiellement de l'altération des roches et des apports anthropiques car il n'est pas disponible sous forme gazeuse (Delmas et al., 2015). Dans les écosystèmes aquatiques, il est considéré comme un élément limitant, et est généralement assimilable par les microorganismes sous la forme d'orthophosphates PO_4^{3-} (Lamontagne, 2002). Les microorganismes jouent un rôle dans le processus de recyclage de la matière organique phosphatée grâce à leurs activités enzymatiques hydrolases.

Ces différents cycles sont reliés entre eux et permettent le bon fonctionnement des microorganismes. Par ailleurs, les microorganismes peuvent également présenter un potentiel de bioremédiation des eaux polluées par biodégradation (Lucas, 2011). Ce processus se base sur la capacité de dégradation de la matière organique par les exoenzymes des microorganismes. Par exemple, selon (Writer et al., 2011), la biodégradation est capable d'oxyder totalement des produits pharmaceutiques et de soins personnels organiques complexes en matière minérale. L'étude de ces différents cycles peut servir comme outil d'évaluation ou d'accélération de la bio-restauration de sites pollués (Sutherland et al., 2004; Watanabe, 2001). Par ailleurs, l'abondance des microorganismes présents et leur diversité jouent un rôle fondamental pour les rivières. Ce fonctionnement écosystémique se traduit par les différentes interactions qui peuvent exister entre les espèces présentes (Hooper et al., 2005). Ainsi la disparition ou l'extinction d'une espèce peut engendrer un dysfonctionnement au sein de l'écosystème. Inversement, une plus grande biodiversité (en termes d'abondance, de diversité et de traits fonctionnels) entraîne des interactions trophiques plus importantes, une présence accrue de producteurs et de décomposeurs de la matière organique.

V. Variations spatiotemporelles des communautés microbiennes

Les paramètres physicochimiques caractérisant la qualité des eaux superficielles peuvent évoluer dans le temps et l'espace, on parlera alors de variabilité temporelle et spatiale, respectivement. Comme évoqué précédemment, les rivières sont des écosystèmes ouverts, aussi la structuration des communautés microbiennes peut être influencée par ces variabilités spatiale (de l'amont à l'aval d'une agglomération, présence de sources ponctuelles de pollution, etc.) et temporelle (en lien avec des paramètres tels que la température, le débit de la rivière par exemple). Les rivières urbaines illustrent parfaitement cette situation ; elles constituent des écosystèmes particuliers pour lesquels des apports anthropiques se produisent régulièrement, entraînant une modification significative des caractéristiques chimiques et biologiques de l'eau de surface et des sédiments. Cependant, l'impact de l'urbanisation sur la diversité et la structure de la communauté microbienne des rivières demeure peu documenté. Toutefois, pour expliquer comment l'influence amont-aval joue sur la diversité microbienne la notion de coalescence communautaire a été introduite (Rillig et al., 2015) La coalescence décrit les interactions possibles entre les différentes communautés et leur environnement. Elle concerne surtout les microorganismes libres qui ne sont pas fixés à une surface. Elle se base sur le principe que deux communautés distinctes vont se regrouper et former une nouvelle communauté distincte des deux communautés qui la forment. Appliqué aux communautés microbiennes des cours d'eau, il s'agit d'étudier leurs variations en considérant à la fois les interactions entre communautés et celles avec leur milieu environnant.

Le long du continuum d'un cours d'eau, la variation spatiale des communautés peut dépendre de plusieurs facteurs comme la présence de STEP ou de déversoirs d'orage, entre autres. En effet, dans les rejets des STEP, malgré les différents traitements mis en œuvre pour l'abattement des polluants, et encore plus dans les déversoirs d'orage, certaines substances et microorganismes pathogènes peuvent persister et constituer une source de pollution pour les milieux récepteurs. La présence de microorganismes pathogènes (*Entérocoques intestinaux*, *E.Coli*, *Norovirus*...) et autres types de microorganismes a déjà été soulignées. Une fois introduites dans les eaux réceptrices, ces communautés vont se mélanger ou se mettre en compétition avec les communautés autochtones pour donner une nouvelle structuration et une nouvelle diversité (Drury et al., 2013; Mansfeldt et al., 2020).

L'étude menée par (Savio et al., 2015) a montré une baisse de diversité des espèces présentes à l'aval du Danube par rapport à l'amont. En Chine, le suivi de la diversité microbienne de la Jialing River, affluent majeur du Yangtze, a été réalisée dans les eaux de surface et les sédiments de sa partie fortement anthropisée (Wang et al., 2018). Les résultats ont révélé des différences distinctes

dans la composition bactérienne des eaux de surface le long de la rivière notamment pour les protéobactéries, les cyanobactéries, les actinobactéries, les bactéroïdètes et des acidobactéries. Wang et al. (2018) ont montré que la construction d'une centrale hydroélectrique avait eu pour conséquence une augmentation de l'abondance des cyanobactéries en amont (32,2 %) par rapport à l'aval (10,3 %).

De plus, ces apports anthropiques peuvent entraîner une dégradation de la qualité physicochimique des eaux superficielles et modifier la composition des communautés microbiennes. C'est dans cet objectif que la DCE 2000 a dressé une liste de substances (dites substances prioritaires pour lesquelles des NQE ont été définies) dont la finalité est de réduire voire éliminer leurs rejets. Cependant certaines substances en raison de leurs propriétés (hydrophobicité, biodégradabilité) ne sont pas éliminées correctement en STEP et peuvent se retrouver dans les eaux réceptrices. Il peut s'agir de substances présentes dans les produits pharmaceutiques (comme les antibiotiques – projet SIPIBEL, par exemple), de produits de soins corporels (parabènes – projet Cosmet'eau), des hormones (Behera et al., 2011; Luo et al., 2014). Par ailleurs, les rejets entraîneraient le développement de gènes codant une résistance aux antibiotiques et antimicrobiens par les bactéries, et l'inter-transmission de ces gènes à d'autres bactéries (Schwermer and Uhl, 2021; Tang et al., 2016). Ces rejets sont également une source de nutriments (composés azotés) pour le milieu récepteur (Luo et al., 2014). Cependant, en excès, ces nutriments peuvent conduire à une eutrophisation des eaux superficielles et entraîner une prolifération pour certaines algues (bloom algal) et inversement une toxicité pour certaines communautés suite à un déficit en oxygène (Raimonet et al., 2017). Ainsi, les activités anthropiques peuvent avoir une influence sur le fonctionnement de l'écosystème récepteur notamment sur les caractéristiques abiotiques (paramètres physico-chimiques) et biotiques (biodiversité microbienne). D'autres substances, une fois rejetées dans le milieu récepteur, peuvent produire des métabolites (comme l'AMPA pour le glyphosate ou la diéthyl-atrazine (DEA), la désisopropyl-atrazine (DIA) et l'hydroxy-atrazine (HA) pour l'atrazine) qui peuvent s'avérer toxiques pour les organismes aquatiques.

Si l'on considère la variabilité temporelle souvent associée aux variations saisonnières, elle se traduit par un changement de la température, des apports liés aux précipitations et donc *in fine* à une fluctuation des débits. Ces variations peuvent influencer la dynamique du cours d'eau concerné et avoir un impact sur la disponibilité des nutriments et de façon plus globale sur l'ensemble des facteurs abiotiques qui à leur tour peuvent avoir un impact significatif sur la structure et la dynamique des communautés microbiennes. La composition, la densité microbienne et les traits fonctionnels des communautés microbiennes peuvent être influencés, perturbés par une variation des paramètres régissant leur écosystème : température, pH et concentrations en nutriments.

La température joue un rôle crucial dans la croissance et la survie des microorganismes. En effet, une variation de température peut avoir une influence sur la répartition des microorganismes : ceux qui arrivent à s'adapter se développeront tandis que les autres ne survivront pas ou connaîtront une baisse de leur abondance (Pettersson and Baath, 2003). Certaines bactéries se développent beaucoup plus à des températures élevées, on parle de bactéries thermophiles, tandis que certaines ne se développent pas ou peu lorsque la température de l'eau est supérieure à leur température optimale de croissance (Li et al., 2015). La température va donc avoir une influence sur la structure et l'abondance des communautés présentes. Elle joue également un rôle dans le fonctionnement des communautés en catalysant les réactions enzymatiques, accélérant les processus biogéochimiques. Cependant, une augmentation trop importante de la température peut impacter les cellules bactériennes en dénaturant certaines protéines causant leur mortalité pour celles qui sont peu résistantes et une baisse trop importante peut entraîner une modification de la structure lipidique (Pomeroy, 2001). Le pH est connu pour son influence sur l'abondance relative et la composition des communautés bactériennes (Nicol et al., 2008; Rousk et al., 2010). Dans les écosystèmes aquatiques, l'acidité ou l'alcalinité des eaux ont une influence sur certaines capacités

de dégradation des microorganismes (Chamier, 1987). En fonction du pH, on a une variabilité des microorganismes présents : des acidophiles ($3 < \text{pH} < 6$), des neutrophiles ($6,5 < \text{pH} < 7,5$) et des alcalinophiles (pH voisin de 9) (Jin and Kirk, 2018). Ces microorganismes ont un pH optimal de croissance, une variation de pH a un effet sur leur croissance et sur les synthèses d'ATP, les processus biogéochimiques via les réactions d'oxydo-réductions (Jin and Kirk, 2018). Lorsque l'on s'intéresse aux enzymes extracellulaires ou exoenzymes, celles-ci sont directement influencées par la variation du pH, lorsque s'éloigne de pH optimal, on observe une diminution des activités enzymatiques (activité de β -Glucosidase, phosphatase) (Chróst, 1991; Münster, 1991).

Les nutriments en rivières sont constitués essentiellement d'azote ammoniacal (NH_4^+), d'azote nitrique (NO_3^-) d'orthophosphates (PO_4^{3-}). L'ammonium et les nitrates sont les formes biodisponibles de l'azote présent dans les eaux tandis que les orthophosphates représentent la forme biodisponible du phosphore. Les nutriments ont plusieurs sources. Ils peuvent provenir des sédiments de la rivière, des rejets de STEP, du ruissellement depuis des surfaces agricoles ou urbaines. Dans les zones fortement anthropisées, la source principale de ces nutriments est les rejets de STEP tandis que dans les zones rurales avec des zones fortement agricoles, c'est le lessivage des terres agricoles. Selon l'étude menée par (Gao et al., 2017), les nutriments (NO_3^- , NH_4^+ , PO_4^{3-}) jouent un rôle dans la régulation de la diversité bactérienne à chaque saison. L'abondance de certains groupes bactériens comme les *Proteobacteria* est corrélée avec les concentrations en NO_3^- et PO_4^{3-} . Cette observation a été également rapportée pour d'autres études (Behera et al., 2011; Luo et al., 2014; Savio et al., 2015a; Wang et al., 2018, 2021; Yan et al., 2015). Par ailleurs, l'absence tout comme l'excès de nutriments peuvent être une limite au développement bactérien ou, au contraire, entraîner une prolifération pour certains types de bactéries. Les sources des matières organiques dans la rivière sont multiples et assez semblables à celles des nutriments : activités anthropiques, ruissellement, dégradation de microorganismes morts, déjections animales. La quantité de matière organique peut avoir une influence sur les activités et la richesse spécifique bactériennes (Lucas, 2011). En effet, la quantité disponible de carbone organique dissous peut, par exemple, constituer un facteur limitant au développement bactérien (Amblard et al., 2005a) : l'existence d'une relation significative entre le carbone organique total et la répartition des communautés bactériennes sur le segment de rivière considéré a été démontrée. Par exemple, les *Proteobacteria* se développent dans les milieux riches en nutriments et inversement la croissance des *Actinobacteria* au contraire s'effectue plutôt dans des milieux présentant des concentrations faibles en nutriments (Burkert et al., 2003).

Les événements pluvieux intenses s'accompagnant d'une augmentation des débits peuvent également transporter des microorganismes d'amont en aval, ou remettre en suspension les microorganismes des sédiments. La variation des microorganismes présents dans la rivière peut donc dépendre des microorganismes présents dans son lit (Ruiz-González et al., 2015) (Liu et al., 2018). Ces événements intenses peuvent également entraîner une diminution de la composition physicochimique et de la diversité microbienne par simple dilution. Et inversement, par temps sec, lors d'un fort étiage, on a une diminution significative des débits.

VI. Caractérisation des communautés microbiennes

L'étude des communautés bactériennes se fait généralement selon trois axes à savoir leur abondance, leur diversité et leur fonction.

VI.1 Abondance des microorganismes

L'abondance bactérienne peut se définir comme le nombre total de cellules bactériennes présentes dans un échantillon. Son étude vise donc à dénombrer, quantifier le nombre de cellules bactériennes par unité de volume d'eau. Les méthodes de quantification ont connu des évolutions au fil des années allant du comptage manuel à travers un microscope aux techniques de cytométrie en flux automatisées (Amblard et al., 2005b).

La méthode de comptage sur lame par microscopie est l'une des techniques de dénombrement les plus anciennes. Elle consiste à compter manuellement les cellules visibles par l'observation microscopique. Cette technique présente l'avantage d'être peu coûteuse, mais elle est sujette à l'erreur humaine et elle ne permet pas une distinction entre les cellules qui sont vivantes et celles qui sont mortes ; elle ne convient pas lorsque la concentration de cellules est trop importante (Amblard et al., 2005b). Pour pallier la contrainte liée aux concentrations trop importantes, la technique des dilutions en série a été mise en place (Martins, 2012). Puis, nous avons la méthode du Nombre le Plus Probable (NPP) qui se base sur la présence ou l'absence de croissance bactérienne des échantillons dilués (Corre, 2000). Néanmoins, ces méthodes de culture présentent des limites du point de vue représentativité de l'environnement réel des microorganismes. En effet, selon (Staley and Konopka, 1985), la culture *in vitro* limite la croissance des microorganismes. La technique de comptage directe va connaître une révolution avec l'utilisation de la microscopie à épifluorescence. Dans cette technique, on utilise la fluorescence. Certains chromophores, excités à une longueur d'onde donnée (λ_1), ont la propriété de réémettre l'énergie fournie sous forme lumineuse à une autre longueur d'onde (λ_2) supérieure. On parle « d'autofluorescence » naturelle. On peut également utiliser des colorants se fixant sélectivement sur des chromophores. Par exemple, des traceurs peuvent colorier l'ADN (DAPI : 4',6-diamidino-2-phénylindole), l'ARN (l'acridine orange). La fluorescence émise est appelée « fluorescence induite ». Elle a une durée de vie plus ou moins longue que l'autofluorescence. La distinction entre cette fluorescence et l'autofluorescence peut permettre de quantifier séparément les cellules vivantes des cellules mortes (Corre, 2000) (Hara et al., 1991) (Got et al., 1993). Cette technique de comptage est utilisée pour quantifier les bactéries (Got et al., 1993) et les virus (Personnic et al., 2006). Une étude comparative entre la méthode de microscopie électronique et celle à épifluorescence a été menée par (Bettarel et al., 2000) sur le lac Pavin pour les virus. Cette étude conclut que la concentration en virus est plus élevée avec le microscope à fluorescence, ce résultat est en accord avec ceux de (Hennes and Suttle, 1995). Pour avoir des résultats plus précis avec des observations plus poussées, la technique de la cytométrie en flux a été développée. La cytométrie en flux est une technique développée pour l'analyse et la quantification individuelle des particules (cellules) en suspension dans un milieu liquide. Les particules en suspension doivent être séparées les unes des autres pour être analysées individuellement. Pour cela, un flux laminaire est créé au moyen de l'accélération d'un liquide porteur ou « gaine » autour de l'échantillon, sans qu'il n'y ait d'échange entre les deux. Chaque particule ainsi individualisée, passe devant un faisceau laser, il en résulte une diffusion de lumière accompagnée éventuellement d'une émission de fluorescence suite à l'excitation d'un pigment photosynthétique ou d'un marqueur fluorescent (Guiselin, 2010). Lors de l'analyse d'un échantillon, les cellules sont visualisées sous forme de représentations électroniques, appelées événements, en fonction des signaux relatifs à leur forme, structure et fluorescence (Helmi, 2016). C'est une technique qui a été développée dans les années 1980 pour détecter des anomalies dans les cellules animales et analyser le cycle cellulaire. Elle est couramment utilisée pour quantifier les microorganismes en particulier dans les liquides : la taille des cellules, les caractéristiques biochimiques et physiologiques des cellules individuelles révèlent ainsi l'hétérogénéité présente dans une population ou une communauté (Vives-Rego et al., 2000). C'est une technique qui présente de nombreux avantages, notamment pour la rapidité d'acquisition de la donnée. Elle permet également d'analyser un grand nombre de cellules, permettant donc d'obtenir des résultats statistiques représentatifs de l'échantillon. Les cellules présentes dans les différents échantillons sont marquées à l'aide de fluorochromes comme le DAPI, le SYTO 9, le SYBR GREEN et le PI. Ces marqueurs permettront de quantifier les cellules en fonction de leur intégrité physique. La technologie de la cytométrie en flux a connu de nombreuses avancées de nos jours, il existe des cytomètres automatisés dotés du principe du double marquage permettant de quantifier simultanément les cellules ayant des membranes altérées ou non. Récemment la société BNovate a développé un cytomètre en flux automatisé pour la surveillance en ligne des bactéries dans l'eau :

le BactoSense™. Son fonctionnement détaillé est présenté dans le chapitre Matériels et méthodes. Lorsqu'un échantillon d'eau est mesuré, 99,9 % des cellules microbiennes > 0,1 µm peuvent être détectées.

VI.2 Diversité bactérienne

L'étude de la diversité bactérienne permet d'identifier les différentes bactéries présentes, leur abondance relative ainsi que la distribution des différentes communautés. L'étude de la diversité microbienne a débuté avec l'observation microscopique, suivie des techniques d'isolement et de culture sur gélose. Cependant, ces techniques se sont heurtées à de nombreuses contraintes du fait que toutes les bactéries n'étaient pas cultivables. De nouvelles méthodes d'identification des microorganismes ont été développées en se basant sur la fluorescence émise par les microorganismes sous excitation de la lumière (Bonin and Travers, 1992). Cependant, cette technique ne fournit pas d'informations précises sur les communautés bactériennes. L'évolution de cette technique s'est poursuivie par l'utilisation de la Chromatographie Liquide à Haute Performance (HPLC) qui permet la séparation ou la purification d'un ou plusieurs composés d'un mélange plus ou moins complexe, pour ensuite permettre leur identification par fluorimétrie ou spectrométrie. Il existe des groupes bactériens qui synthétisent des pigments qui peuvent être fluorescents ou non. Sa résolution et sa grande sensibilité permettent également une analyse fine de quasiment tous les pigments présents, donc d'identifier les grands groupes taxonomiques. Cependant, elle ne donne pas d'informations précises sur les espèces (Broutin et al., 2011; LAMPERT, 2001; Lemaire, 2002). Ces méthodes ne permettent cependant pas d'avoir des informations précises sur l'ensemble des espèces en termes d'identité ou d'abondance réelle. Le développement des techniques moléculaires a permis une évolution dans l'étude de la diversité des communautés microbiennes et est complémentaire aux techniques d'observation au microscope et celle utilisant la détection de la mesure de pigments photosynthétiques.

Phylogénie moléculaire

La notion de phylogénie moléculaire est introduite dans les années 1960 par (Zuckerandl and Pauling, 1965). Cette approche s'appuie sur le principe selon lequel les ressemblances et les différences observées au niveau moléculaire témoignent des liens de parentés et des évolutions entre les espèces au cours du temps. En se basant sur des comparaisons des séquences d'ADN et de protéines, ils avancent l'idée de les utiliser pour étudier l'évolution des organismes porteurs de ces séquences (Corre, 2000). (Woese and Fox, 1977) ont utilisé cette théorie pour étudier la phylogénie des bactéries avec la séquence de l'ARN ribosomique (ARNr). L'ARNr est une molécule couvrant tout le spectre des êtres vivants existants. Il dispose de sous-unités grandes (L) ou petites (S). La petite sous-unité chez les procaryotes est nommée ARNr16S et chez les eucaryotes ARNr18S. Le choix de l'ARNr16S s'explique par le fait qu'il soit présent et remplit le même rôle chez toutes les espèces. Le gène codant pour l'ARNr16S a également la particularité de n'être soumis à aucun transfert latéral de matériel génétique entre microorganismes (Lehours, 2006). Il existe de nombreuses bases de données permettant de caractériser les espèces, comme la *Ribosomal Database Project* (RDP). Ainsi l'analyse des séquences d'ARNr 16S est devenue une des méthodes les plus utilisées en écologie ou en médecine. Cette analyse permet d'établir des arbres phylogénétiques et de connaître l'évolution des espèces. L'extrémité des branches constitue des taxons. Ces taxons constituent des UTOs (Unité Taxinomique Opérationnelle) (Schloss and Westcott, 2011).

Génomique ou métagénomique

La génomique est une discipline visant à étudier des génomes bactériens (leur structure, leur évolution, la fonction des gènes codés et leur régulation). Elle se base sur l'isolement et la culture d'une bactérie donnée, donc le séquençage d'un génome unique. La métagénomique quant à elle, est une sous-discipline de la génomique qui consiste en l'étude de l'ensemble des séquences d'ADN appartenant aux micro-organismes prélevés directement dans leur environnement (Handelsman,

2004). Cette approche est pertinente dans la mesure où toutes les bactéries ne sont pas cultivables. Que l'analyse soit de la génomique ou de la métagénomique, cette méthode, décrite dans les travaux de (Corre, 2000) et (Digabel, 2013), comprend une phase d'extraction de l'ADN, suivie d'une amplification par PCR et du séquençage. La métagénomique peut être descriptive et également intégrative (traits fonctionnels). En métagénomique, l'une des techniques de séquençage les plus utilisées est la technique du métabarcoding. Elle va permettre d'identifier et de quantifier les espèces présentes dans un échantillon en utilisant une ou plusieurs régions spécifiques de l'ADN : la région V3-V4 de l'ADN. Pour les bactéries présentes dans les échantillons d'eau, le développement des techniques moléculaires avec le séquençage a permis la mise en place du métabarcoding de manière efficace, rapide et économique. Ces méthodes de séquençage ont débuté avec la technologie Sanger, qualifiée de technologie « première génération ». Elle a été mise en place par Frederick Sanger dans les années 1970. Cependant, bien que très précise, c'est une technique qui est coûteuse et lente. Ainsi, pour pallier ces contraintes, le séquençage à haut débit s'est développé (*next-generation sequencing, NGS*).

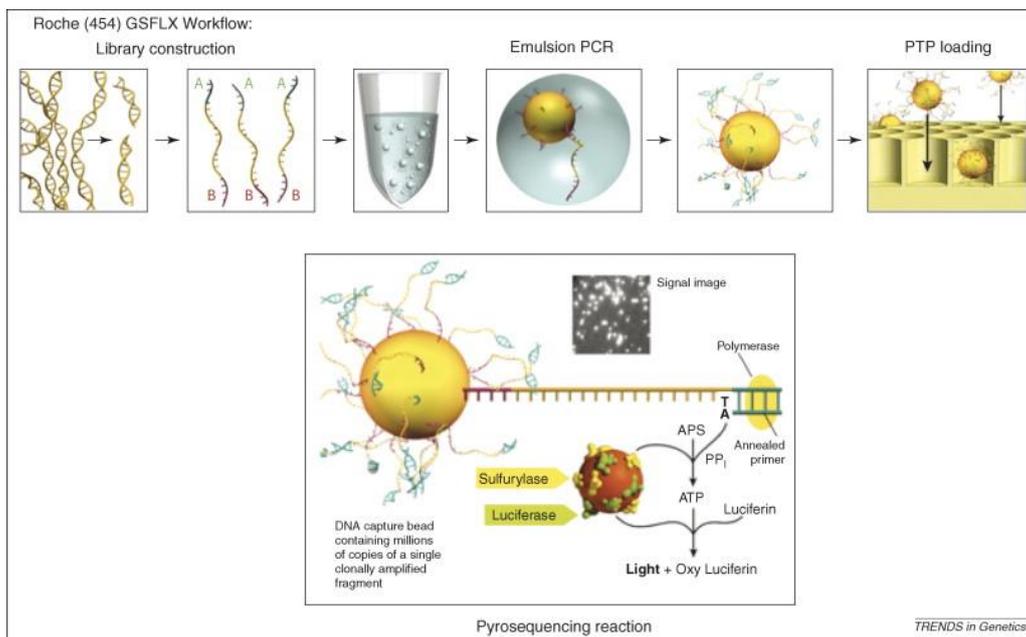


Figure 5. Description de la technique de pyroséquençage (Mardis, 2008)

La technique de pyroséquençage est une technique de séquençage dont le principe a été développé en 1988 (Figure 5). La technologie « 454 » a été présentée en 2005 par l'entreprise 454 Life Science. C'est une technique moléculaire utilisant les fragments d'ADN extraits. Sur chacune des extrémités du brin d'ADN, est fixé un adaptateur. Ensuite, ils sont fixés sur des microbilles de sorte qu'une seule molécule d'ADN se fixe sur une microbille uniquement. Ces microbilles sont ensuite recouvertes d'un film liquide aqueux contenant tous les réactifs nécessaires à l'amplification PCR. La PCR est effectuée par une émulsion des billes avec les réactifs dans un mélange eau-huile. Cette émulsion permettra d'obtenir des microgouttelettes contenant au maximum une microbille et constituant ainsi des microréacteurs. C'est à l'intérieur de ses microréacteurs que se fera l'amplification des fragments. Après l'amplification, on passe au séquençage à proprement dit. Les microbilles sont disposées sur une plaque contenant des micropuits. Dans chaque micropuits, on met une seule microbille transportant les enzymes nécessaires à la réaction de pyroséquençage. Lors de la réaction de polymérisation de l'ADN, du pyrophosphate est libéré. Ce pyrophosphate va grâce à l'ATP sulfurylase présent dans le milieu réactionnel entrainer la production d'ATP. Cet ATP va réagir avec la luciférase pour oxyder la luciférine en oxyluciférine et émettre un faisceau lumineux. C'est ce signal lumineux qui est détecté par une caméra puis traduit en chromatogramme. À la fin du séquençage, on obtient pour chaque puits un pyrogramme qui nous renseignera sur la présence

éventuelle de nucléotides identiques à la séquence (Ona-Nguema et al., 2015; RAOUS, 2013; Ye and Zhang, 2011).

La technique de séquençage « illumina », développée par la société « illumina », est une technologie qui remplace celle du pyroséquençage. Elle se base sur une amplification en pont dite « *bridge PCR* ». Dans la PCR en pont, les fragments d'ADN ainsi que les brins simples d'ADN nécessaires à l'initiation la synthèse, sont fixés sur une plaque en verre recouverte d'amorces universelles permettant d'amplifier ces fragments. Les fragments sont fixés grâce à des adaptateurs d'ADN ajoutés à leurs extrémités et contenant des séquences d'ADN spécifiques. L'amplification de l'ADN se fait par la formation de ponts en présence d'ADN-polymérase et de nucléotides grâce à un cycle d'élongation PCR générant un brin complémentaire à la molécule initiale. Cette étape est suivie d'une phase de dénaturation qui va séparer l'ADN formé en deux nouveaux brins ; ce processus va se renouveler plusieurs fois. Cette étape permet d'obtenir une quantité d'ADN suffisante pour le séquençage. Les fragments de séquences identiques vont se regrouper en colonies clonales encore appelées clusters. Le séquençage se fait sur ces clusters. Ensuite, le séquençage à proprement dit débute, 4 nucléotides (A, C, G, T) présentant des caractéristiques spécifiques, vont être incorporés au milieu. L'extrémité 3'OH de ces nucléotides est désactivée, et marquée par des fluorochromes spécifiques à chaque nucléotide. Chaque nucléotide aura donc une couleur spécifique. Une ADN-polymérase va insérer ces nucléotides au brin complémentaire des amplicons. Après excitation par un laser, la fluorescence émise par chaque cluster est détectée par le séquenceur et la première base est lue. Et ainsi de suite, l'opération sera effectuée pour tous les clusters présents sur la plaque séquencée. Ces différentes séquences obtenues seront alignées pour former une séquence complète. Cette technique présente l'avantage d'avoir un faible taux d'erreurs (Ona-Nguema et al., 2015) (RAOUS, 2013).

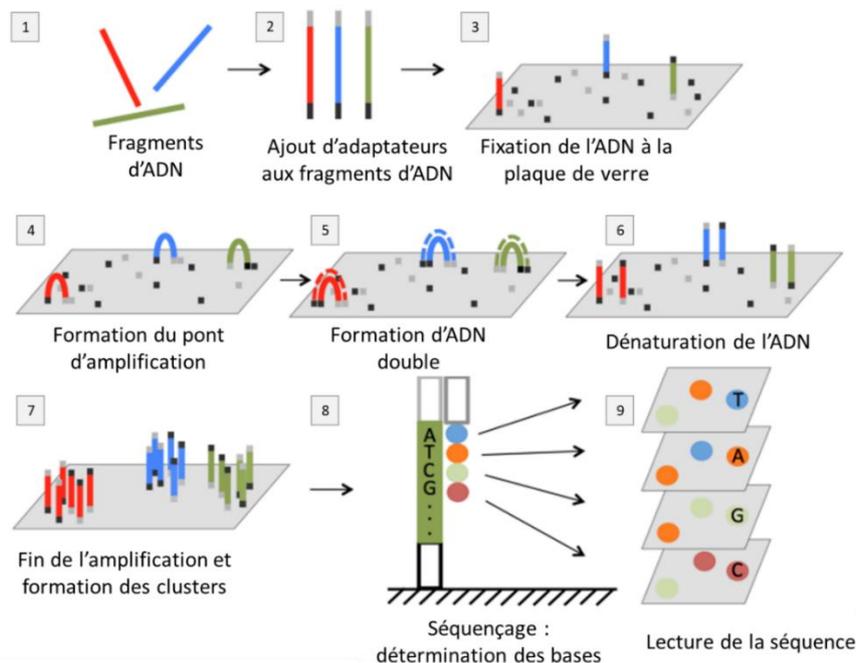


Figure 6 Principe de séquençage avec la technologie illumina adapté de (Lu et al., 2016)

Le séquençage par illumina est l'une des techniques les plus utilisées à l'heure actuelle, parce que la longueur des séquences générée est plus faible que celles des autres technologies. Les techniques de séquençage continuent de connaître des évolutions avec celles dites de troisième génération qui visent à séquencer en temps réel sans étape d'amplification et une identification de l'ADN en temps réel.

VI.3 Diversité métabolique

La diversité métabolique et fonctionnelle englobe l'ensemble des fonctions biologiques que les microorganismes effectuent, ainsi que la diversité des réponses que les espèces présentes fournissent suite un changement donné au sein de l'écosystème. Cette diversité fonctionnelle peut être évaluée par une mesure des activités microbiennes. Ces activités peuvent « spécifiques » si l'on s'intéresse à une fonction précise dont sont dotés certains microorganismes comme par exemple la nitrification, ou « Globale ou totale » lorsqu'elles concernent l'ensemble des microorganismes. La quantification de l'activité microbienne globale peut se faire par l'hydrolyse de la Fluorescéine Diacétate (FDA), molécule hydrolysée par diverses enzymes (Schnurer and Rosswall, 1982). C'est une molécule initialement non fluorescente qui, lorsqu'elle est hydrolysée par les estérases, va former une molécule fluorescente dite Fluorescéine. C'est une molécule qui peut être dégradée en conditions aussi bien aérobiques que anaérobiques (Obst, 1985) et qui peut mesurer l'activité microbienne globale des eaux de surface et souterraines (Garnier, n.d.; Obst, 1985). La réaction d'hydrolyse de la FDA est illustrée Figure 7 (Green et al., 2006). La fluorescéine issue de l'hydrolyse de la FDA présente une coloration jaune dont la densité optique (DO) est mesurée à une longueur d'onde de 490 nm. Grâce à une courbe d'étalonnage préalablement établie, la DO mesurée sera convertie en quantité de fluorescéine équivalente obtenue par unité de temps, représentatif de l'activité microbienne.

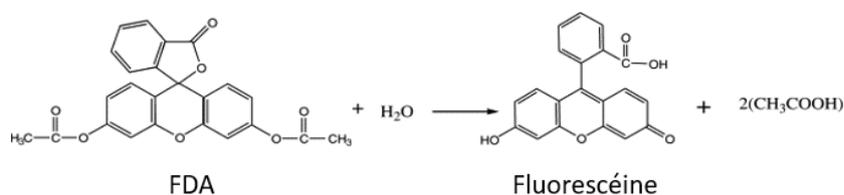


Figure 7. Hydrolyse de la fluorescéine diacétate (FDA)

Une autre méthode de caractérisation de la diversité métabolique est l'étude et le suivi de la capacité de dégradation de certains substrats carbonés par les microorganismes. Ce suivi, en fonction des réponses obtenues, va permettre d'établir un profil catabolique des communautés présentes. Cette évaluation peut se faire grâce aux microplaques Ecoplates™ de Biolog® (Figure 8). Ce sont des microplaques composées de 96 puits contenant 31 sources de carbone et un contrôle en triplicata. Ces 31 sources de carbone sont regroupées en 6 groupes (carbohydrates, acides carboxyliques, acides aminés, amines/amides, polymères, composés phénoliques (Ge et al., 2018)). La liste complète est donnée en Annexe 1.

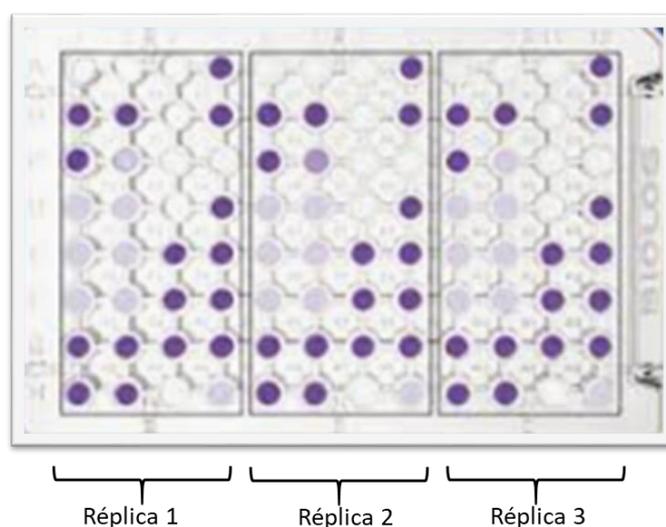


Figure 8. Microplaques Ecoplate de Biolog

Ces micropuits contiennent chacun un substrat carboné et un indicateur coloré qui est tétrazolium. Lorsque le substrat est dégradé par les microorganismes, cela s'accompagne d'une réduction du tétrazolium en formazan, coloration violette de façon irréversible selon la réaction présentée Figure 9.

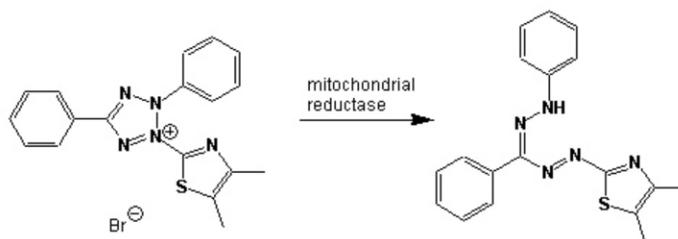


Figure 9. Réduction du tétrazolium en formazan

La DO de cette coloration violette sera quantifiée à l'aide d'un lecteur de microplaques. Cela va permettre de suivre la cinétique de dégradation grâce à la coloration moyenne par puits encore appelée l'AWCD (Average Well Color Development) qui est la coloration moyenne par puits (ref méthodologie). Cet AWCD représente l'activité moyenne.

VII. Qualité microbiologique des eaux de surface et ses conséquences sur la baignade

L'évaluation de la qualité microbiologique des eaux de surface vise à déterminer la présence de microorganismes pathogènes (bactéries, virus et autres microorganismes pathogènes). En France, comme dans de nombreux pays européens, la question de la qualité des eaux de baignade est devenue au cours de ces dernières années, une question de santé publique. En effet, les eaux de surface ont de nombreux usages dont l'approvisionnement en eau potable, la baignade et d'autres activités récréatives, l'irrigation agricole, la pêche... La baignade en eau naturelle connaît une demande de plus en plus croissante au sein des populations locales avec les épisodes caniculaires de ces derniers étés. Il est donc primordial de s'assurer que l'état microbiologique est compatible avec la sécurité des baigneurs. En effet, de nombreuses études dont celle menée par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) (World Health Organization, 2003), ont montré le lien entre la baignade dans des eaux présentant une contamination fécale et le développement chez les baigneurs de gastroentérites, d'affections cutanées et d'otites. L'enjeu est d'autant plus important que ces baignades peuvent être à l'origine d'épidémies causant des pertes en vies humaines. Il est donc important de caractériser ces contaminations par une étude de leurs origines, de leur dynamique dans le but de les circonscrire. Selon (Castro-Hermida et al., 2008; Kistemann et al., 2016; Rhymes et al., 2015), les microorganismes d'origine fécale peuvent provenir de plusieurs sources : les rejets de STEP lorsqu'ils n'ont pas été désinfectés avant rejet dans le milieu récepteur, les lessivages et ruissellements des zones agricoles, le ruissellement des surfaces urbaines avec le lessivage des déjections animales, les déversoirs d'orages ou encore des rejets sauvages individuels. Par ailleurs, selon (García-Aljaro et al., 2017), lors de forts épisodes pluvieux, les microorganismes pathogènes présents dans les sédiments de la rivière peuvent être remis en suspension. La directive Baignade fixe un cadre réglementaire sur la qualité des eaux destinées à la baignade.

VII.1 Choix des indicateurs de contamination fécale

Les microorganismes pathogènes présents dans les milieux aquatiques sont de plusieurs types : virus (Norovirus, entérovirus), bactéries (*E.coli*, entérocoques, salmonelles), champignons (dermatophytes). Cependant, dans le cadre de la directive Baignade, deux indicateurs sont suivis, on parle d'indicateurs de contamination fécale. Ces indicateurs répondent à plusieurs critères : (i) proviennent uniquement du microbiote intestinal, (ii) ne se reproduisent, ni ne se multiplient dans les eaux (lacs, rivières et autres environnements aquatiques), (iii) facile à détecter, à isoler et doser, et (iv) capable de résister longtemps dans le milieu extérieur. Les deux indicateurs « bactéries

indicatrices fécales (BIF) » retenus pour caractériser les zones de baignade sont : (i) *Escherichia coli* (*E. coli*) et (ii) entérocoques intestinaux. Ces BIF sont donc considérées comme des marqueurs microbiologiques pour l'évaluation des contaminations et statuer sur le caractère baignable d'un site.

Les *E. coli* sont des entérobactéries (de la famille des *Enterobacteriaceae*, de la classe des *Gammaproteobacteria*). Ce sont des bactéries Gram négatif résidant dans le tube intestinal des animaux à sang chaud y compris l'être humain. Ce sont généralement des bactéries qui font partie de la flore bactérienne et jouent un rôle dans la digestion. En fonction des souches, les *E. coli* peuvent être pathogènes ou inoffensives. Parmi les groupes pathogènes, nous avons les EPEC (entéropathogènes), les ETEC (entérotoxiques), les EIEC (entéro-invasives), EHEC (entérohémorragiques), EAEC (entéro-agrégatifs) responsables d'infections digestives et LPEC (pathogènes pulmonaires) ; la majorité des souches restant inoffensives. Elles sont également utilisées comme un indicateur de contamination fécale récente car leur durée de survie est comprise entre 1 et 14 jours (Berthe et al., 2013). Leur durée de survie dépend de plusieurs facteurs dont, entre autres, la composition physicochimique de l'eau mais aussi leur origine (eaux traitées ou non) (Berthe et al., 2013; van Elsas et al., 2011).

Les entérocoques sont des entérobactéries comme les *E. coli*, de la famille des *Enterococcaceae*. Ces bactéries Gram positif sont immobiles, non sporulées et se présentent sous forme de coques isolées ou diplocoques (regroupées par deux) ou en chainettes. Elles ont la capacité de vivre dans plusieurs habitats. Généralement présentes dans le microbiote intestinal de l'homme et de certains animaux, elles peuvent également être présentes dans les rivières et lacs (colonne d'eau et sédiments), sols également dans le microbiote de produits laitiers (Beshiru et al., 2017; Mannu et al., 2003; Rathnayake et al., 2012). Les espèces les plus souvent identifiées chez l'homme, donc d'origine fécales et responsables de nombreuses infections, sont les *Enterococcus faecalis* et *E. faecium* (Beshiru et al., 2017). Les entérocoques sont des bactéries thermotolérantes donc qui peuvent survivre à des températures élevées (10 à 60°C). De par la structure de leur paroi, elles présentent une résistance aux désinfectants et antibiotiques, et parviennent à survivre longtemps dans l'eau ; c'est un indicateur de contamination fécale récente comme ancienne. Par ailleurs, leur présence est d'autant plus inquiétante, des études ont prouvé qu'elles sont dotées de la capacité à échanger des informations génétiques et peuvent transmettre leur gène de résistance aux antibiotiques à d'autres microorganismes non pathogènes (Suty, 2010).

VII.2 Autres microorganismes pathogènes

En plus de ces microorganismes indicateurs de contamination fécale pathogènes pour l'homme retenus par les réglementations en vigueur, il existe de nombreux autres microorganismes sources d'infections pour l'homme. Les virus sont ainsi présents dans les eaux de surface. Parmi ces virus, il y a les entérovirus, adénovirus, norovirus, astrovirus, hépatovirus, rotavirus. De nombreux virus présentent une résistance lors de la désinfection des eaux usées en traitement tertiaire (Lodder and de Roda Husman, 2005; McCarthy et al., 1998), c'est le cas des adénovirus plus résistants à l'inactivation par rayons ultraviolets (UV) (Nwachuku and Gerba, 2004). Parmi les bactéries identifiées dans les eaux de rivières, de nombreux genres bactériens sont pathogènes. C'est notamment le cas des *Pseudomonas*, *Legionella*, *Mycobacterium*, *Shigella*, *Salmonella*, *Campylobacter*, *Yersinia*, *Escherichia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Citrobacter* et *Serratia*, *Clostridium* (Hrudey and Hrudey, 2007; van Elsas et al., 2011). Par exemple, les *Shigella* sont un genre bactérien de la famille des *Enterobacteriaceae*, bacilles Gram négatif, présent dans les matières fécales des personnes souffrant de shigellose, maladie intestinale aiguë (Schroeder and Hilbi, 2008). Elles pénètrent dans le corps humain par ingestion d'aliments ou d'eau contaminés (DuPont et al., 1989; Schroeder and Hilbi, 2008). Les *Campylobacter*, quant à eux, sont des genres bactériens Gram

Synthèse bibliographique

négatif, de la famille des *Campylobacteraceae*. Ils sont responsables de campylobactériose, une infection de l'intestin, transmise à l'homme par injection d'aliments contaminés (Pitkänen, 2013).

Tableau 2. Principaux microorganismes pathogènes de sources aquatiques.

Groupe	Pathogènes	Maladies
Virus	Adénovirus	Diarrhées, infections des yeux, maladie respiratoire
	Astrovirus	Diarrhées
	Calicivirus	Diarrhées
	Entérovirus (polio, echo, coxsackie)	Méningite, paralysie, rougeurs, fièvre, myocardite, maladie respiratoire, diarrhées
	Réovirus	Maladie respiratoire, entérite
	Rotavirus	Diarrhées
	Virus hépatite A et E	Hépatite
	Virus de Norwalk	Diarrhées
Bactéries	<i>Campylobacter</i>	Diarrhées
	<i>Escherichia coli</i> (certaines souches)	Diarrhées
	<i>Legionella</i>	Pneumonie, autres infections respiratoires
	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Tuberculose
	<i>Salmonella</i>	Fièvre typhoïde, diarrhées
	<i>Shigella</i>	Diarrhées, dysenteries
	<i>Vibrio cholerae</i>	Diarrhées
	<i>Yersinia enterocolitica</i>	Diarrhées
Cyanobactéries	<i>Anabaena</i>	Diarrhées, carcinogènes
	<i>Aphanizomenon</i>	Diarrhées, carcinogènes
	<i>Microcystis</i>	Diarrhées
Protozoaires	<i>Cryptosporidium</i>	Diarrhées
	<i>Entamoeba histolytica</i>	Dysenterie amibienne
	<i>Giardia intestinalis</i>	Diarrhées
	<i>Naegleria</i>	Méningoencéphalite
Helminthes	<i>Ascaris lumbricoides</i>	Ascariodose
	<i>Necator americanus</i>	Ankylostome
	<i>Schistosoma mansoni</i>	Schistosomiase ou bilharziose
	<i>Taenia saginata</i>	Ténia du boeuf
	<i>Trichuris trichiura</i>	Trichuriasis trichocéphale

Ces différents microorganismes pathogènes proviennent généralement du microbiote humain ou animal via des déjections qui sont riches en virus et bactéries pathogènes. Les sources de contamination fécale des milieux aquatiques sont diverses. Les excréments des animaux sauvages comme les oiseaux aquatiques ou les déjections effectuées à proximité d'un site de baignade ou dans le site de baignade peuvent constituer une source de contamination (Rochelle-Newall et al., 2015). Par ailleurs, dans des zones agricole et d'élevage intensif, les excréments des animaux peuvent être entraînés par lessivage lors d'épisodes pluvieux dans les cours d'eaux avoisinants. En milieu urbain, des déversements depuis des réseaux d'assainissement, quand ceux-ci sont défectueux, les déversoirs d'orages lors de fortes pluies ou encore les rejets de STEP ne disposant pas de traitements adaptés ont été identifiés comme source de ces pathogènes (Bitton, 2005; Yu et al., 2022). Cependant, l'élimination de ces pathogènes peut s'effectuer en STEP lorsque la désinfection est mise en œuvre avant rejet des eaux usées traitées. Il est donc important d'identifier les processus de désinfection existant et leur efficacité vis-à-vis des BIF.

VII.3 Baignade en Île-de-France

La baignade en Seine a longtemps été une activité récréative prisée des Parisiens pendant les périodes estivales pendant les épisodes de fortes chaleurs. La ville de Paris rappelle ainsi que « *Selon les archives, la mode des bains dans la Seine apparaît au milieu du XVIIe siècle le long du quai Sully. [...] Toute une organisation se met alors en place pour répondre à la mode des baignades. Des bateaux, piscines flottantes avant l'heure, proposant des bains froids (bientôt suivis de bateaux à eau chaude) apparaissent sur la Seine. [...] Très vite, les bains dans la Seine sont organisés. Ainsi, c'est en 1801 que la célèbre piscine Deligny - du nom de l'un des premiers maîtres-nageurs qui donnaient des cours le long des quais du 7e arrondissement - est érigée sur une douzaine de barges et alimentée par l'eau de la Seine. À la fin du XIXe siècle, on compte une vingtaine de piscines*

flottantes similaires au bassin Deligny. Puis la capitale s'équipe progressivement de piscines « terrestres » et le nombre de bassins fluviaux diminue. [...] Mais avant cela, des courageux continuent de se baigner directement dans la Seine. Les championnats de France de plongeurs y sont même organisés le 22 juin 1913. En 1923, le couperet tombe : la baignade est désormais interdite dans le fleuve sous peine d'amende, en raison des dangers causés par la navigation fluviale et la pollution. »

Au cours de ces dernières années, l'envie de baignade en Seine connaît un nouvel engouement en raison des canicules de plus en plus intenses que nous connaissons. A cela s'ajoute l'opportunité d'accueillir des épreuves des Jeux olympiques et paralympiques de 2024 (JOP 2024) en eaux vives dans la Seine avec toute la symbolique que cela représente. Il incombe aux autorités sanitaires et aux pouvoirs publics de s'assurer d'une qualité microbiologique des eaux de la Seine et la Marne compatible avec la baignade, afin de veiller à la sécurité et à la santé des baigneurs et les préserver d'épidémies de gastroentérites et autres infections. Depuis la désignation de Paris comme ville hôte des JOP 2024, un grand nombre d'actions ont été mises en œuvre pour réduire les rejets d'eaux résiduelles urbaines non traitées dans le Seine et la Marne, et depuis les années 2000 pour optimiser la gestion des eaux pluviales, : raccordements au réseau d'assainissement de riverains qui rejetaient directement en Marne, des propriétaires de péniches, constructions du bassin d'Austerlitz (d'une capacité de 50 000 m³ pour stocker les eaux usées et pluviales lors des fortes précipitations et éviter leur rejets direct en Seine et en Marne), du tunnel de stockage des eaux de pluie Ivry-Masséna, dit TIMA, d'une capacité de stockage de 80 000 m³ d'eau, portant la capacité totale de stockage du SIAAP à 580 000 m³ évitant des rejets directs en Seine.

Il existe de nombreux sites de baignade en IDF. Cependant à Paris, le bassin de la Villette, est le plus récent des sites de baignade, il est localisé dans le Nord-Est parisien dans le 19^e arrondissement. Il est long de 700 m et large de 70 m (Angelotti, 2022), sa mise en eau a été effectuée en 1808 et la présence de baigneurs identifiés en 1822 (Flipo et al., 2021). Il est alimenté par le canal de l'Ourcq et est ouvert chaque été à la baignade depuis 2017 en raison de l'amélioration de sa qualité bactériologique. Dans le cadre de la phase 8 du programme PIREN-Seine, des campagnes de quantification des BIF ont été effectuées dans le bassin de la Villette de juin à septembre 2021. Il en ressort que par temps sec, les concentrations étaient en moyenne de 136 NPP/100 ml pour E. coli et de 75 NPP/100 ml pour les entérocoques intestinaux. Ces concentrations sont dessous des valeurs seuil pour la baignade. À l'horizon 2025, trois nouveaux sites de baignade sont programmés : Bras Marie (Parc des Rives de Seine, rive droite), Bras de Grenelle, entre le port de Grenelle et les rives de l'île aux Cygnes (15e), à Bercy, au niveau de la Passerelle Simone de Beauvoir, en contrebas du parc de Bercy (12e). À l'été 2023, selon la Mairie de Paris, « la baignade dans la Seine était possible en moyenne 7 jours sur 10, avec des variations selon les sites analysés (84 % au bras Marie, 71 % au pont Alexandre III, 58 % au pont du Garigliano). Ces chiffres tiennent compte des seuils de qualité de l'eau en vigueur définis par la directive européenne sur les eaux de baignade ».

Tout comme la Seine, la Marne présente un attrait important pour la baignade avec plus d'une vingtaine de sites de baignade. Le développement urbain, la croissance démographique et économique ont eu pour conséquence la dégradation de la qualité des eaux entraînant une fermeture des sites de baignade. Cependant, la reconquête de la Marne en vue de la baignade durant les épisodes de forte chaleur est de nouveau d'actualité. Tout comme pour la Seine, un suivi de la qualité microbiologique a été effectué pour une évaluation de sa qualité. Un des sites qui a longtemps été prisé comme site de baignade récréative et de compétitions sportives sur la Marne est celui de Joinville-le-Pont dans le Val-de-Marne. Le suivi effectué de 1995 à 2009 sur ce site montre que la concentration médiane en E. coli est 2940 NPP/100mL alors que la médiane des Entérocoques est de 645 NPP/100ML (Eymard, 2010). Un suivi de la concentration de ces bactéries est aussi effectué au niveau des STEP du SIAAP. De 2012 à 2015, les E. coli présentaient une concentration moyenne comprise entre 5 et 50.10³ NPP/100 ml (NPP : nombre plus probable) tandis que pour les entérocoques, la concentration était comprise entre 0,4 et 5.10³ NPP/100 ml. Un suivi

similaire a été également effectué au niveau des déversoirs d'orage car ils contribuent significativement aux rejets par temps de pluie. Les concentrations en *E. coli* et entérocoques quantifiées se sont avérées plus élevées que dans les rejets de STEP comprises entre $5,2$ et $5,9 \cdot 10^6$ NPP/100 ml et de l'ordre de $1,1 \cdot 10^6$ NPP/100 ml, respectivement. Les suivis effectués par le SIAAP montrent une dynamique saisonnière au niveau de la Seine. Les concentrations de ces deux indicateurs sont plus élevées en hiver qu'en été, et plus importantes par temps de pluie que par temps sec. L'une des voies de contamination de la Seine reste les rejets de STEP ; il est donc primordial d'envisager leur abattement avant le rejet dans le milieu naturel. Les nombreux traitements effectués en STEP permettent un abattement avec des rendements différents selon les techniques mises en œuvre. Par exemple, dans le cadre d'une décantation primaire, l'abattement pour *E. coli* est compris entre 0,2 et 0,4 log pour une décantation classique, et entre 0,3 et 0,4 log pour une décantation physicochimique contre 2 à 2,5 log dans le cadre d'un traitement secondaire biologique comme la nitrification, et de 1 à 4 log durant un traitement par UV. L'abattement observé durant la phase de décantation provient de l'élimination des pathogènes qui sont piégés dans les MES. Ces résultats de suivi sur la Seine sont issus de (Rocher and Azimi, 2016). Le type de traitement appliqué en station d'épuration a donc un effet sur la quantité de pathogènes présents dans les rejets. Par ailleurs, les concentrations de ces indicateurs de contamination fécale (*E. coli* et entérocoques) présentent une corrélation significative avec celles d'autres microorganismes pathogènes ainsi que les infections gastroentériques (Borrego et al., 1987; Kay et al., 1994). Ainsi la mise en œuvre de la désinfection des rejets de STEP avant transfert vers le milieu récepteur conduira à un abattement non seulement pour les cibles règlementaires mais aussi pour d'autres microorganismes potentiellement pathogènes.

VIII. Fonctionnement d'une station d'épuration (STEP)

La STEP vise à éliminer les contaminants des eaux résiduaires urbaines afin d'atteindre les seuils imposés par la DERU pour permettre leurs rejets dans les eaux de surface. Le traitement comprend plusieurs étapes pour la file « eau » : prétraitement, traitement primaire (décantation primaire), traitement secondaire (traitement biologique) et traitement tertiaire pour affiner la qualité de l'eau avant rejet comme illustré Figure 10 afin de pouvoir répondre aux exigences croissantes de la réglementation.

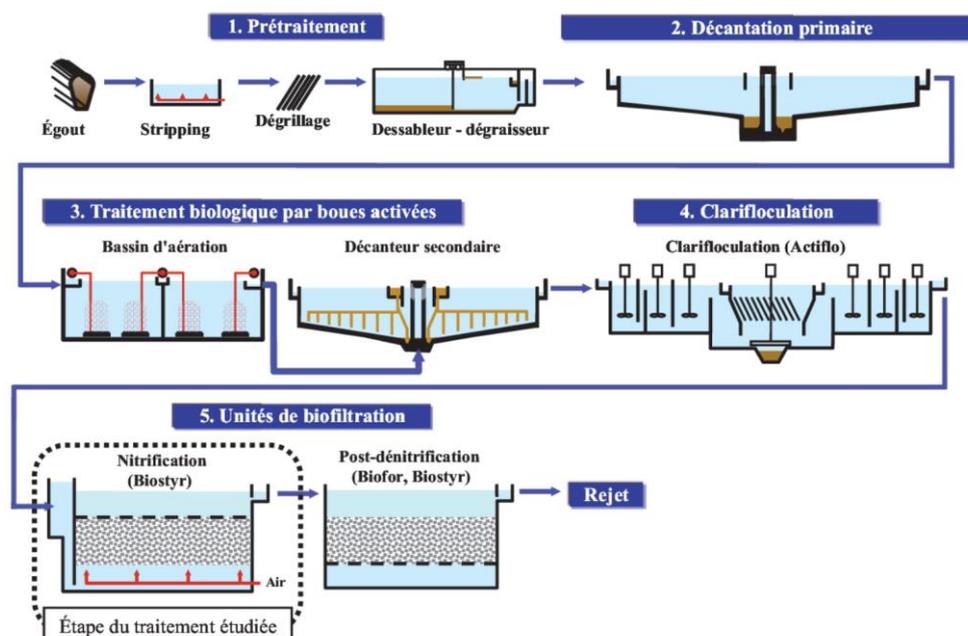


Figure 10. Fonctionnement de la file « Eau » de Seine Aval (document interne SIAAP)

VIII.1 Prétraitement

L'épuration des eaux usées débute par une étape de prétraitement, consistant en une élimination des particules grossières, des huiles et autres graisses, c'est-à-dire tous les éléments de nature ou de dimension telles qu'ils pourraient gêner le bon fonctionnement des traitements qui suivront. Le prétraitement est généralement constitué de 3 étapes : dégrillage, dessablage et dégraissage/déshuilage (Degrémont, 1989, Chocat, 1997, Le Hyaric, 2009). La première étape comprend une phase de dégrillage/tamissage. Le dégrillage permet d'éliminer les débris flottants volumineux grâce à des grilles de dimensions variables. Les effluents vont passer par des tamis de tailles de plus en plus fines pour éliminer les déchets de tailles plus petites. En fonction des éléments à intercepter, différentes tailles d'écartements entre les barreaux des grilles existent allant de supérieur à 40 mm jusqu'à inférieur à 10 mm. Il est très fréquent de voir des stations équipées d'un premier système de grilles (> 40 mm) puis d'un second plus fin. Cette phase est suivie du dessablage, qui a pour but d'extraire les graviers, sables et tout solide ayant une granulométrie > 200 µm. Les particules de sables vont déposer au fond du bassin suite à une réduction de la vitesse d'écoulement des eaux traitées généralement par augmentation de la section d'écoulement. La phase de prétraitement se termine par une étape de dégraissage-déshuilage qui consiste à récupérer les composés ayant une densité inférieure à celle de l'eau. Les huiles et graisses récupérées sont par la suite orientées dans des filières de valorisation.

VIII.2 Traitement primaire

C'est la deuxième étape du traitement. Elle consiste à une décantation des matières en suspension (MES). Le traitement primaire en fonction du procédé utilisé est dénommé traitement physique ou physico-chimique. Ainsi un décanteur primaire élimine les MES par gravité dans les décanteurs physiques classiques ou par clarifloculation dans les décanteurs physicochimiques. Ces derniers sont caractérisés par un décanteur lamellaire précédé d'une étape de coagulation-floculation. Ils comprennent trois étapes : la coagulation (avec ajouts de chlorures ferriques), la floculation (avec ajout d'un agent floculant de type polymères à haut poids moléculaire) et, enfin, la décantation par sédimentation des floccs dans un décanteur lamellaire. Les rendements d'abattement des MES oscillent entre 50 et 65 % dans les décanteurs physiques classiques (Gilbert-Pawlik, 2011). La clarifloculation améliore l'élimination des MES pour atteindre des abattements en MES de l'ordre de 90 % (Gilbert-Pawlik, 2011). Le traitement primaire, qu'il soit une décantation physique ou physicochimique, permet d'abattre en plus des MES, les polluants organiques et inorganiques qui y sont associés (Zolfaghari et al., 2014).

VIII.3 Traitement secondaire

Le traitement secondaire, ou traitement biologique, fait appel à des procédés existant dans le milieu naturel en les orientant vers des objectifs de dépollution (Deshayes, 2015). Il vise à éliminer les pollutions carbonée, azotée et phosphorée et donc de réduire la charge en matière organique et nutriments. Leur élimination est importante car leur excès en milieu naturel peut conduire à de l'eutrophisation. La première étape se déroule dans un bassin aéré et contribue à l'abattement de la matière carbonée et à la nitrification de la matière azotée. Toutefois, pour optimiser le traitement de la pollution azotée, l'effluent doit transiter dans un bassin sans oxygène (zone anoxie) permettant ainsi la transformation des nitrates en N₂. Enfin, si l'objectif est de traiter aussi le phosphore, une alternance de zones anoxie et aérobie est nécessaire (Chocat, 1997, Le Hyaric, 2009, Gilbert-Pawlik, 2011, Pétavy, 2011).

Il existe deux types de traitement secondaire : les traitements à cultures libres et ceux à cultures fixées (Degrémont, 1989, Chocat, 1997, Le Hyaric, 2009, Picard, 2011). Les boues activées sont le procédé le plus répandu pour les cultures libres. Avec les boues activées, il est nécessaire de mettre en place un clarificateur juste après le bassin du traitement biologique pour intercepter les boues activées en sortie du traitement biologique (Degrémont, 1989, Chocat, 1997, Gilbert-Pawlik, 2011,

Pétavy, 2011). En ce qui concerne les traitements à cultures fixées, c'est la biofiltration qui est privilégiée. L'effluent s'écoule au travers de matériaux possédant une granulométrie comprise entre 2 et 6 μm , à la surface desquels un biofilm, hôte des bactéries, se développe. Là encore, l'alternance de zones aérée et anoxique coexistent, pour cela trois étages sont généralement utilisés dans les biofiltres (Deshayes S. 2015). Le traitement secondaire avec biofiltration abat de l'ordre de 75 % des MES (Gilbert-Pawlik, 2011).

VIII.4 Traitement tertiaire

Une fois, les eaux sorties du clarificateur, elles peuvent être rejetées dans le milieu naturel. Cependant, lorsque le milieu récepteur est un écosystème fragile ou lorsque les eaux de rejets doivent être réutilisées, un traitement tertiaire peut être mis en place. Cette étape vise à éliminer les polluants non-biodégradables persistants après les précédentes phases de traitement et les microorganismes pathogènes. Il existe plusieurs types de traitement tertiaires à savoir des étapes de dénitrification/nitrification pour éliminer les nitrates résiduels, de déphosphatation pour diluer la charge en phosphore des effluents, d'élimination des micropolluants sur charbon actif, et la désinfection pour éliminer les cibles pathogènes. Cette dernière est effectuée lorsque les eaux en sortie de stations sont rejetées à proximité d'une zone sensibles ou à activités récréatives comme la baignade ou dans une zone où l'eau est réutilisée pour des activités agricoles comme les cultures maraichères. Il existe différentes techniques de désinfection : chimiques (ozonation, chloration, utilisation de peracides) ou physiques (par UV ou ultrafiltration).

IX. Mécanisme d'inactivation

L'inactivation microbienne se définit comme l'arrêt temporaire ou définitif du métabolisme ou de l'activité fonctionnelle de celui-ci. Un microorganisme inactivé n'est pas forcément un microorganisme mort. Les mécanismes d'inactivation peuvent se faire de plusieurs manières :

- Action sur la membrane de la cellule : cela se traduit par une perméabilisation de la membrane cellulaire qui joue un rôle de barrière pour maintenir les métabolites et autres composants à l'intérieur du cytoplasme. Une perméabilisation entraînera une libération de ces composants dans le milieu extracellulaire ou inversement. Cette étape constitue la première étape pour l'inactivation (Cho et al., 2010). L'action sur la membrane peut se faire également par une inhibition du mécanisme de synthèse de la paroi cellulaire. Dans le cadre de la désinfection par chloration, la membrane cellulaire est attaquée (Young and Setlow, 2003).
- Action sur l'ADN : l'inactivation peut se faire par une altération et/ou une désactivation de l'ADN par formation d'un dimère de pyrimidine qui va perturber la structure de l'ADN et empêcher sa réplication normale (Friedberg and Friedberg, 2006). Cette méthode d'inactivation peut s'effectuer sans altérer la membrane cellulaire et se produit lorsque la désinfection est effectuée par irradiation UV (Cho et al., 2010; Oguma et al., 2001). Les autres techniques de désinfection peuvent altérer également l'ADN.
- Action sur la synthèse des protéines : l'inactivation va se traduire par un arrêt ou une perturbation des processus conduisant à la synthèse de nouvelles protéines essentielles à la survie et la reproduction des microorganismes. Ce type d'inactivation se produit avec l'utilisation de produits chimiques lors de la désinfection. L'agent de désinfection va agir sur les ribosomes, responsables de la synthèse protéique et perturber la traduction de l'ARN messager en protéine. Selon (Benarde et al., 1967), lors de la désinfection au dioxyde de chlore, l'abattement des *E. coli* serait dû à une altération du mécanisme de synthèse des protéines.

Bien qu'inactivés, certains microorganismes peuvent se réactiver par une réparation des fonctions altérées ou endommagées par le processus de désinfection. Ce processus biologique va permettre

une reprise des activités métaboliques de ces microorganismes, on parle alors de « *reviviscence* ». C'est un processus qui témoigne de la résistance des microorganismes aux traitements. L'ozone agit en endommageant la paroi cellulaire des microorganismes, en oxydant leurs constituants cellulaires et en perturbant leurs processus métaboliques. Il détruit ainsi les bactéries, les virus et les autres agents pathogènes.

IX.1 Désinfection par ozonation

L'ozonation est une technique de désinfection utilisant l'ozone (O_3), une molécule instable (Di Paolo et al., 2004). L'ozone présente un pouvoir oxydant important avec un potentiel d'oxydation de 2,07 V plus élevé que celui du chlore (1,37 V) ou du peroxyde d'hydrogène (1,78 V) (Caniani et al., 2021; Gardoni et al., 2012). En raison de son pouvoir oxydant, l'ozone a la capacité d'endommager la structure cellulaire des microorganismes et d'oxyder leurs constituants cellulaires perturbant ainsi leurs processus métaboliques (Cataldo, 2006; Sazhina et al., 2018). Cette propriété lui confère un attrait dans le domaine médical pour la désinfection. Cet intérêt a été accru avec la mise en place, dès 1893 de la première STEP utilisant la technique d'ozonation aux Pays-Bas dans la ville d'Ousbaden. C'est un procédé efficace, rapide pour l'élimination des pathogènes, dont les bactéries, les virus et les spores (Cai et al., 2023). Pour les virus, l'ozone va endommager l'enveloppe du virus en s'attaquant aux protéines et lipides qui la composent (Cataldo, 2006; Roy et al., 1981). Cependant, comme tous les désinfectants, l'une des craintes des opérateurs concerne la formation des sous-produits de désinfections. Crainte fondée car la formation de sous-produits en présence de micropolluants ou de matière organique est bien documentée (von Sonntag and von Gunten, 2012). La stabilité de l'ozone et son efficacité dépendent des caractéristiques de l'effluent à traiter : pH, présence de matière organique, concentration en MES (Cai et al., 2023). En effet, les MES tendent à piéger les microorganismes dans les particules diminuant ainsi l'efficacité de la désinfection ; la matière organique oxydable entre en compétition avec les microorganismes pour la mobilisation de l'ozone (Kong et al., 2021). L'ozone présente l'avantage de se dégrader rapidement et, après désinfection, il n'y a pas de reviviscence des microorganismes altérés (Chelkowska et al., 1992; von Gunten, 2003). Cependant, la mise en place de la désinfection à l'ozone est coûteuse car sa production doit se faire *in situ* en raison de son instabilité à pression atmosphérique. De plus, il nécessite une surveillance constante car l'ozone est toxique à des concentrations élevées et qui plus est c'est un gaz à effet de serre. Enfin, trois processus peuvent intervenir pour réduire les niveaux d'ozone après son introduction dans l'eau à traiter : sa décomposition, sa capacité à réagir avec les impuretés de l'eau et son stripping dans l'atmosphère (Sassi et al., 2005).

IX.2 Désinfection par chloration

Les produits utilisés pour la désinfection par chloration sont le chlore gazeux (Cl_2), les hypochlorites de sodium ($NaClO$) et de calcium ($Ca(ClO)_2$), et le dioxyde de chlore (ClO_2). La désinfection s'effectue fréquemment avec du chlore gazeux ou de l'hypochlorite de sodium (eau de Javel) sous forme liquide et avec de l'hypochlorite de calcium sous forme solide. Le chlore gazeux a été découvert en 1774 par Carl Wilhelm Scheele (West, 2014) utilisé au départ pour le blanchiment du papier. Le pouvoir oxydant du Chlore est de 1,37 V. Une fois dans l'eau, le dichlore va se dismuter en acide hypochloreux ($HOCl$) et acide chlorhydrique (HCl). $HOCl$ se dissocie ensuite en ion hypochlorite (ClO^-). L'action désinfectante des composés chlorés repose sur l'action oxydante de ces deux formes de chlore libre (acide hypochloreux et ion hypochlorite). La prédominance de l'une de ces formes dépend du pH de l'effluent à traiter (Figure 11).

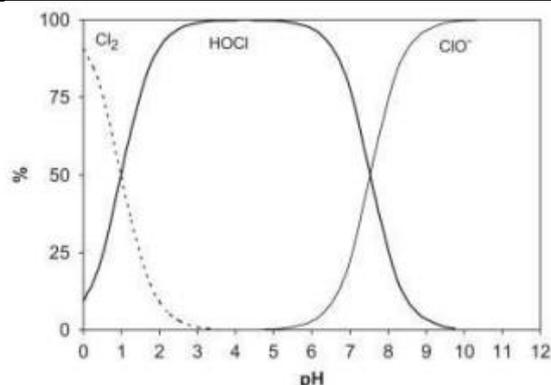


Figure 11. Distribution des espèces de chlore (HOCl, ClO⁻) en solution aqueuse en fonction du pH à 25°C

Son action porte aussi bien sur les molécules présentes dans l'effluent que sur les microorganismes cibles. Les molécules présentes dans les effluents peuvent être des composés minéraux ou des composés organiques : matière organique ou micropolluants. Le chlore va d'abord réagir avec les minéraux, puis les composés organiques avant d'agir sur les microorganismes. Si l'effluent à traiter est très chargé en matière organique, l'action du chlore s'en trouvera réduite sur les microorganismes, pour lesquels le besoin en chlore est plus important. Le chlore agit sur les microorganismes en altérant le métabolisme par une inhibition des activités enzymatiques et en provoquant des lésions au niveau de l'ADN. Cependant, les caractéristiques de l'effluent (turbidité, pH, température) peuvent avoir un effet sur l'efficacité du traitement (Crump et al., 2004; World Health Organization, 2019). Un paramètre joue sur l'efficacité du traitement au chlore : le C.T (concentration x temps), qui est la prise en compte de la combinaison du temps de contact (en minutes) et de la concentration (en mg/l). On peut avoir un effet important avec un temps de contact court et une concentration forte, ou un temps de contact long avec une concentration plus importante. Par exemple avec un C.T de 20 mg/l.min, on peut utiliser une concentration 2 mg/l pendant 10 min ou une concentration de 10 mg/l pendant 2 min. Le traitement au chlore présente l'avantage d'avoir un coût relativement faible et une mise en place facile (Sedlak and von Gunten, 2011).

Cependant, malgré ces avantages, cette méthode de désinfection génère des sous-produits généralement toxiques pour la faune et la flore aquatiques. En interagissant avec les molécules organiques présentes dans l'effluent à traiter, le chlore peut générer des sous-produits tels que les trihalométhanes et les acides haloacétiques qui sont cancérigènes, tératogènes et mutagènes (Lin et al., 2021; Xu et al., 2022). Le caractère cancérigène des sous-produits de désinfection fait de la désinfection par chloration une technique de moins en moins utilisée. Une des solutions proposées pour réduire l'impact des effets de ces sous-produits toxiques est la mise en place d'une étape de déchloration avec l'ajout, par exemple, de dioxyde de soufre qui va réagir avec le chlore résiduel pour limiter ses effets. Cette technique, bien qu'efficace, présente des coûts élevés.

IX.3 Désinfection par UV

Elle repose sur l'utilisation des rayonnements Ultraviolets (UV) pour l'élimination des microorganismes pathogènes. Les lampes UV utilisées dans le domaine du traitement des eaux ont une longueur d'onde de 254 nm. Les acides nucléiques absorbent bien les rayonnements avec un pic proche de 260 nm. Une fois absorbés, ces rayonnements conduisent à la formation de dimères pyrimidiques entraînant une inhibition de la capacité de réplication et de transcription de l'ADN, et donc de la division cellulaire (Kruithof et al., 2007; von Sonntag and von Gunten, 2012). La première utilisation des UV pour la désinfection des eaux date de 1910 à Marseille (Hijnen et al., 2006). Elle a prouvé depuis son effet germicide sur de nombreux microorganismes pathogènes (Tableau 3). L'action du traitement UV varie en fonction des microorganismes traités. Par exemple, *Clostridium perfringens* est plus résistante au traitement UV que *E. coli* (Hijnen et al., 2004; Zimmer and Slawson,

2002) : il faut une intensité plus forte 48-64 mJ/cm² contre 1 à 15 mJ/cm² pour une efficacité plus faible avec un abattement de 3 log contre 5 à 6 log.

Tableau 3. Evaluation de l'abattement sur des bactéries suite à un traitement UV (Hijnen et al., 2006)

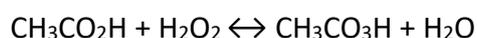
Bactéries	Doses (mJ/cm ²)	Abattement (log)
<i>Salmonella typhi</i>	2–10	5,6
<i>Campylobacter jejuni</i>	0,5–6	5,3
<i>Yersinia enterocolitica</i>	0,6–5	5
<i>Shigella dysenteriae</i>	1–5	5,9
<i>Shigella sonnei</i>	3–8	4,7
<i>Vibrio cholerae</i>	0,6–4	5,8
<i>Legionella pneumophila</i>	1–12	4,4
<i>Legionella pneumophila</i>	0,5–3	3
<i>Escherichia coli</i> O157	1–7	5,5
<i>Escherichia coli</i>	1–15	6
<i>Escherichia coli</i>	1,5–9	5,2
<i>Streptococcus faecalis</i>	2,5–16	4,6
<i>Bacillus subtilis</i>	5–78	4
<i>Clostridium perfringens</i>	48–64	3

La désinfection UV présente de nombreux avantages ; elle ne produit pas de sous-produits de désinfection pouvant être nocifs au milieu récepteur avec un temps de contact plus court que les autres techniques de désinfection. Elle présente néanmoins des limites, les lampes UV peuvent être défaillantes et nécessitent des maintenances régulières. Le coût initial d'achat et d'installation des lampes UV est élevé. Enfin, la principale limite de cette technique de désinfection est la reviviscence des cellules qui peut se produire. En effet, certains microorganismes se réactivent en réparant leurs membranes endommagées selon deux principaux mécanismes : la « photo-réactivation » et la « *dark repair* ». La reviviscence par « *dark repair* » est régulée par l'expression du gène *recA* qui intervient dans de nombreux processus cellulaires : division cellulaire, réparation d'ADN endommagé ou encore induction de la réponse SOS lorsque la cellule est attaquée par divers agents extérieurs (Sinha and Häder, 2002; Stohl et al., 2003). Ce gène est activé en cas d'utilisation de rayonnement UV. La photo-réactivation, contrairement à la « *dark repair* », se produit lorsque les cellules endommagées sont longuement exposées à la lumière (Oguma et al., 2004). Ce processus de réparation va cibler les dimères de pyrimidine formées suite l'action des UV en les éliminant (Hijnen et al., 2006).

IX.4 rocher Désinfection par l'acide peracétique (APA)

Les peracides sont des composés chimiques, généralement formés par la réaction entre un acide organique et le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). Ils constituent de bons agents oxydants pouvant être utilisés pour la désinfection des eaux usées. Parmi ces peracides, on retrouve l'acide peracétique (CH₃CO₃H) et l'acide performique (HCO₃H).

L'acide peracétique (APA) est synthétisé à partir de la réaction entre l'acide acétique (CH₃CO₂H) et le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) en présence de l'acide sulfurique comme catalyseur, selon la réaction ci-dessous.



L'APA se présente sous forme de liquide incolore avec une forte odeur, désagréable et irritante. Il a un pouvoir oxydant de 1,81 V, supérieur à celui du chlore (Pechacek et al., 2015). Il a été utilisé dans

de nombreux domaines : alimentaire pour la désinfection des installations de transformation, médical pour l'élimination des microbes pour le matériel médical, et également dans le domaine du traitement des eaux usées (Jolivet-Gougeon et al., 1996) (Falsanisi et al., 2006).

Il a montré son efficacité pour de nombreux microorganismes pathogènes allant des bactéries aux protozoaires. L'action germicide de l'APA se présente selon l'ordre d'efficacité décroissant suivant : bactéries > virus > spores > kystes (Acosta et al., 2022; Gehr and Cochrane, 2002; Gesto et al., 2018; Wessels and Ingmer, 2013). L'APA inactive les microorganismes selon plusieurs processus. Il peut agir sur la structure membranaire des microorganismes en les rendant perméables perturbant ainsi leur contenu cytoplasmique, ce qui va entraîner la mort cellulaire (Kitis, 2004). Il peut également oxyder les ponts disulfures des protéines des microorganismes (Block, 1983) et sur les enzymes entrant dans le métabolisme de la cellule (Kitis, 2004). L'efficacité de l'APA dépend, comme pour les autres techniques de désinfection, des caractéristiques de l'effluent à traiter : température, pH, matière organique et MES (Zhang et al., 2022). L'impact du pH est négligeable lorsque le pH est compris entre 5 et 8, et une baisse de l'efficacité est constatée lorsque le pH est > 9 (Baldry et al., 1991; Zhang et al., 2022). Lorsque l'effluent a une teneur en matière organique élevée, l'APA va réagir avec celle-ci diminuant ainsi l'efficacité du traitement vis-à-vis des pathogènes. Cette efficacité diminue également lorsque l'effluent est chargé en MES (Gehr and Cochrane, 2002). Contre les microorganismes pathogènes, l'APA a montré son efficacité avec un abattement de 3 log avec un CT > 60 mg/l.min pour E. coli en phase de traitement secondaire (Luukkonen et al., 2015). Les effluents tertiaires traités biologiquement et filtrés peuvent être désinfectés avec une dose de 1,5 à 2 mg/l et un temps de contact de 10 à 15 minutes pour atteindre la qualité de la directive Baignade pour E. coli (Luukkonen et al., 2015). De même, une dose de 25 mg/l avec un temps de contact de 5 min est suffisant pour atteindre un abattement de 5 log en E. coli (Baldry, 1983). L'inactivation par l'acide peracétique est importante dès les premières minutes de la mise en contact et la cinétique associée rapide (Luukkonen et al., 2015). Toutefois un inconvénient lié à l'utilisation de l'APA est qu'il se dégrade en acide acétique et en peroxyde d'hydrogène (Chhetri et al., 2014). Ces sous-produits de dégradation ne sont pas toxiques pour la flore et la faune du milieu récepteur (Monarca et al., 2002). Cependant l'un des inconvénients majeurs de cette technologie est la potentielle reviviscence et la prolifération microbienne. En effet, l'acide acétique, issu de la dégradation de l'APA, va constituer une source de carbone pour les microorganismes entraînant leur prolifération (da Silva et al., 2020).

IX.5 Désinfection par l'acide performique (PFA)

L'acide performique (PFA) est un agent oxydant utilisé dans le blanchiment dans le cadre de la production de pâte à papier en remplacement des produits chimiques de blanchiment chlorés (Brasileiro et al., 2001; LANG et al., 2018; Schmidt and Ruecker, 1967). Il est également utilisé comme désinfectant dans le domaine médical, à cause de son efficacité contre les microorganismes pathogènes. En se dégradant, un des sous-produits de dégradation est l'acide formique qui est un agent de conservation et est utilisé comme agent de conservation dans le domaine alimentaire. Au vu de ses propriétés biocides (virucide, fongicide, sporicide et bactéricide), son utilisation en STEP pour le traitement des eaux usées se développe (Gehr et al., 2009; Heinonen-Tanski and Miettinen, 2010).

Synthèse de l'acide performique

L'acide performique (HCOOOH) est un peroxyde organique, avec un pouvoir oxydant élevé. Il est synthétisé à partir de l'acide formique (HCOOH) et du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) selon la réaction ci-dessous.



Cette réaction de synthèse, réversible, peut être catalysée avec de l'acide sulfurique (H_2SO_4) (Gehr et al., 2009) ou de l'acide phosphorique (H_3PO_4) (Santacesaria et al., 2017). C'est une réaction exothermique, un dispositif de refroidissement doit donc être utilisé pour maintenir la température en dessous de 20° C. Une fois synthétisé, le PFA doit être utilisé rapidement à cause de son instabilité. L'acide performique a été testé à différentes phases du traitement en STEP : en traitement primaire (Gehr et al., 2009), secondaire (Ragazzo et al., 2013) ou tertiaire (Luukkonen et al., 2015) et également sur des effluents provenant de déversoirs d'orage (Chhetri et al., 2014). Il ressort de ces études que la dégradation du PFA dépend de plusieurs facteurs. Il a ainsi été montré pour des eaux usées que le pourcentage de dégradation est compris entre 29 et 35 % en 15 min, à des concentrations initiales de 1 et 2 mg/l en PFA (Campo et al., 2020). Ces tendances à la dégradation dans des eaux usées ont été comparées à celles observées dans de l'eau physiologique. Dans l'eau physiologique, le PFA se dégrade moins fortement, de l'ordre de 20 % pour une concentration initiale de 1 mg/L contre 29 % pour l'effluent traité après 15 min de contact. La dégradation plus rapide dans les eaux usées s'explique par les différentes réactions dans lesquelles est impliqué le PFA avec les différents éléments présents dans l'effluent (Campo et al., 2020).

Effet de l'acide performique sur les microorganismes

Le PFA, tout comme les autres peracides, doit son action désinfectante à la formation de radicaux au fort potentiel oxydant comme les radicaux hydroxyles (OH^*). Ces radicaux attaquent la plupart des molécules organiques (Kaur et al., 2019). Les superoxydes (O_2^{*-}), indirectement (via l'action des radicaux hydroxyles), participent à la dégradation des membranes cellulaires, il est en de même pour les radicaux peroxydes (ROO^*) (Fridovich, 2022). Les peracides agissent sur la membrane cytoplasmique des lipoprotéines en perturbant leur fonction chimiosmotique (Kitis, 2004). Ils agissent également sur les liaisons disulfuriques et sulfhydriques des protéines (Luukkonen and Pehkonen, 2017). Selon (Fraser et al., 1985; Kitis, 2004), les peracides peuvent oxyder les enzymes essentielles des cellules et dénaturer les protéines. Le PFA aurait le même mécanisme d'action sur les microorganismes que l'APA (Luukkonen and Pehkonen, 2017). Cette hypothèse a été confirmée par une étude récente sur les spores fongiques (Lin et al., 2023) qui a mise en évidence que le PFA éliminait les spores fongiques en s'attaquant à la membrane cellulaire qui passe d'une surface lisse à une surface rugueuse, craquelée. Ce mécanisme d'inactivation a également été observé pour *E. coli* et *Staphylococcus aureus* qui sont des bactéries Gram- et Gram+ respectivement (Ding et al., 2023).

Le PFA a récemment été testé à la fois à l'échelle du laboratoire (Chhetri et al., 2014 ; Gehr et al., 2009 ; Karpova et al., 2013 ; Luukkonen et al., 2015) et à l'échelle industrielle (Chhetri et al., 2015 ; Ragazzo et al., 2013, 2017) en STEP. Ces études ont montré l'efficacité du PFA vis-à-vis des BIF (Chhetri et al., 2014; Gehr et al., 2009; Luukkonen et al., 2015; Ragazzo et al., 2013). En effet, pour *E. coli*, un abattement compris entre 2,2 et 4 log a été observé pour des doses de PFA allant de 0,9 à 1,2 mg/L et un temps de contact inférieur à 10 min (Ragazzo et al., 2013). Dans les mêmes conditions, l'abattement des entérocoques était compris entre 0,7 et 3,2 log. Toutes les études convergent pour indiquer une meilleure efficacité du PFA vis-à-vis de *E. coli* que pour les entérocoques (Chhetri et al., 2014; Gehr et al., 2009; Luukkonen et al., 2015; Ragazzo et al., 2013). Des expérimentations ont également été conduites sur d'autres microorganismes pathogènes : *Clostridium*, *Aeromonas*, *Salmonella*, sur des bactéries sporulées comme les *Cryptosporidium* ou encore les kystes comme les *Giardia*. Bien que plus résistantes que *E. coli* à l'action du PFA, les entérocoques sont plus sensibles que les *Clostridium*. (Gehr et al., 2009) ont montré qu'une concentration de PFA comprise entre 5 et 6 mg/l avec temps de contact de 90 min entraînait un abattement de 4 à 6 log pour les entérocoques contre 1 à 2 log pour *Clostridium*. Les *Giardia*, font partie des bactéries les plus résistantes à l'action du PFA (Karpova et al., 2013). Dans des travaux portant sur la désinfection de déversoirs d'orage (Tondera et al., 2016), avec une concentration comprise entre 12 et 24 mg/L et un temps de contact maximum de 30 min, aucun effet du PFA n'a

été constaté sur *Giardia*. Ces observations contredisent cependant celles d'une autre étude (Karpova et al., 2013), dans laquelle l'abattement de *Giardia* était de l'ordre de 2 log pour une concentration initiale en PFA de 10 mg/L avec un temps de contact de 5 min.

La cinétique de l'action biocide du PFA a été également étudiée (Luukkonen et al., 2015). Le PFA a une action germicide rapide dès le début de la mise en contact avec l'effluent traité, puis son action diminue au fil du temps. (Luukkonen et al., 2015) ont ainsi observé une réduction de 2,9 log pour *E. coli* après une minute de temps de contact pour finalement atteindre 3,5 log au bout de 60 min de temps de contact. Cette diminution de l'action du PFA dans le temps s'expliquerait par la diminution de la concentration résiduelle en PFA. Une autre étude sur 30 souches de *Clostridium* a montré l'efficacité du PFA (Mora et al., 2018).

Comme pour les autres agents désinfectants, la composition de l'eau à traiter aura un effet sur l'efficacité. Par exemple, pour un même temps de contact, pour atteindre un log d'abattement pour les entérocoques, il a été nécessaire de travailler avec une concentration de 1 mg/l en PFA pour des effluents primaires alors qu'une concentration de 0,5 mg/l a suffi pour les effluents secondaires (Gehr et al., 2009). Il apparaît que le C.T est un paramètre particulièrement pris en compte pour la désinfection au PFA (Karpova et al., 2013). Il permet d'optimiser le traitement en limitant l'utilisation de réactifs. En effet le PFA doit être produit juste avant son utilisation.

L'efficacité du PFA en STEP sur les BIF a été démontrée. Récemment Wang et al. (2023) se sont intéressés à l'évolution des communautés microbiennes des eaux usées en fonction du procédé de désinfection mis en œuvre. L'étude a été réalisée à partir d'eaux usées provenant de trois stations d'épuration municipales (STEP) traitées par boues activées, lagunage et lits plantés de roseaux, et biofiltre. Les auteurs se sont particulièrement intéressés aux effets sur la désinfection des microorganismes pathogènes en comparant chloration, UV et traitement au PFA. Ils ont d'ailleurs confirmé que l'origine des eaux usées était le principal facteur déterminant la diversité et la composition de la communauté microbienne ainsi que l'efficacité du traitement. Cette étude a confirmé que les microorganismes pathogènes étaient plus sensibles au PFA qu'aux autres traitements, soulignant son potentiel pour la mise en œuvre d'une réutilisation sûre des eaux usées. La désinfection au PFA offrirait donc plusieurs avantages opérationnels, par exemple l'efficacité à un dosage relativement faible, l'absence de sous-produits nocifs, une production sur site juste avant l'injection et l'instabilité post-injection (Karpova et al., 2013 ; Luukkonen et al., 2015 ; Ragazzo et al., 2013). Il reste toutefois primordial de s'assurer de son innocuité pour le milieu récepteur notamment sur les communautés microbiennes des eaux superficielles après déversement de rejets traités au PFA. Peu d'études se sont emparées de ce questionnement.

X. Conclusion de l'état de l'art

Les rivières et les fleuves sont des ressources en eau douce qui jouent un rôle primordial pour les besoins des activités de l'homme. Le réchauffement climatique modifie en profondeur le cycle de l'eau. Il modifie la pluviométrie avec des épisodes pluvieux moins fréquents mais plus intenses, qui se traduisent par des crues et des inondations. Le réchauffement climatique contribue également à l'augmentation d'épisodes caniculaires plus intenses. Dans les deux cas, les ressources en eau et leur disponibilité s'en trouvent impactées. Une façon de lutter contre les épisodes caniculaires est de multiplier les zones de baignades en eaux vives. Toutefois pour cela, il faut s'assurer que la qualité de l'eau des sites envisagés respecte la réglementation en vigueur, et plus particulièrement, la directive Baignade. Aussi, parmi les enjeux que doivent relever les collectivités au XXI^e siècle, il y a la préservation de la qualité de la ressource. Pour relever ce défi, les collectivités doivent limiter les rejets des déversoirs d'orage et améliorer la qualité des rejets de station d'épuration. La mise en place de la désinfection des eaux usées traitées avant leur rejet y contribue. Pour l'agglomération parisienne, le choix de la désinfection à l'acide performique a été décidé par le SIAAP à l'occasion d'un Conseil d'administration en novembre 2019 car l'efficacité de l'acide performique en STEP sur

les BIF a été démontrée comme nous l'avons vu. Toutefois, il subsiste une interrogation sur son innocuité pour le milieu récepteur notamment sur les communautés microbiennes des eaux superficielles après déversement de rejets traités au PFA. Peu d'études voire pas se sont emparées de ce questionnement. Dans le cadre de cette thèse, il a donc été décidé d'apporter des éléments de réponse pour le cas de la Seine dans l'agglomération parisienne. Au préalable, les communautés bactériennes de la Seine et de la Marne seront étudiées avant le déploiement opérationnel de la désinfection à l'acide performique prévu en juin 2023 ; les variabilités spatiales (en amont et en aval de l'agglomération parisienne) et temporelles (les communautés seront caractérisées durant les quatre saisons) seront considérées pour appréhender les facteurs influençant la composition des communautés bactériennes. Cela permettra d'avoir un niveau de référence pour définir si oui ou non la désinfection à l'acide performique pourrait modifier significativement les communautés bactériennes. L'influence directe de la désinfection au PFA sur les communautés bactériennes d'eaux usées traitées sera regardée avant rejet. Les communautés bactériennes seront caractérisées en termes d'abondance, d'activité et de diversité.

Matériels et méthodes

L'objectif de ce chapitre vise à présenter la méthodologie générale utilisée dans le cadre de ces travaux de recherche. Ce chapitre comprend une première partie décrivant et expliquant la zone d'étude, la sélection des sites, ainsi que les saisons choisies pour la collecte des échantillons. La seconde partie est relative aux différentes techniques d'analyse des paramètres biologiques étudiés ainsi que les traitements statistiques des résultats obtenus.

I. Stratégie expérimentale

La stratégie expérimentale mise en place dans cette thèse vise à répondre à deux objectifs principaux. Le premier objectif est d'étudier la variation spatiotemporelle des microorganismes sur le continuum Seine de l'amont à l'aval de l'agglomération parisienne. Le second objectif porte sur l'effet de la désinfection des eaux usées par l'acide performique (PFA), traitement tertiaire qui devrait se développer dans les années à venir, sur l'écologie de la Seine : deux approches ont été suivies pour ce second objectif. La première approche a consisté en une expérimentation « grandeur nature » réalisée dans le cadre du projet NOROVIRUS, piloté par le Syndicat Mixte du Bassin de Thau. La seconde concerne l'étude en microcosme de l'effet que les eaux de STEP traitées par le PFA pourraient avoir sur l'abondance, l'activité et la diversité des microorganismes de la Seine.

1.1 Caractérisation des communautés bactériennes de la Seine et de ses affluents

Sélection des sites d'échantillonnage et campagnes associées

Afin d'étudier la variation spatiotemporelle des microorganismes sur le continuum Seine de l'amont à l'aval de l'agglomération parisienne, sept points d'échantillonnage ont été sélectionnés : 5 points sur la Seine allant de l'amont à l'aval de Paris, 1 point sur la Marne avant la confluence avec la Seine (Champigny-sur-Marne) et 1 point sur l'Oise (Conflans-Sainte-Honorine). Ces sites ont été retenus sur la base de différentes caractéristiques qui en font des sites d'intérêt (Figure 12) :

- Juvisy-sur-Orge (JSO) : situé en amont de Paris, la mesure au niveau de ce point nous permet d'avoir des données sur la qualité des eaux de la Seine dans une zone éloignée de Paris.
- Choisy-le-Roi (CLR) : en amont de Paris et du rejet de la station SEV, il est non impacté par le système d'assainissement du SIAAP.
- Vitry-sur-Seine (VSS) : situé en amont de la confluence entre la Seine et la Marne ; ce point permet d'évaluer la qualité des eaux de la Seine avant les apports de la Marne.
- Champigny-sur-Marne (CSM) : situé sur la Marne à l'aval de la station Marne aval (MAV). Il permet d'obtenir les caractéristiques de ces eaux avant leur confluence avec la Seine.
- Bougival (BOUG) : situé en amont de la station Seine Aval et en aval des deux principaux déversoirs d'orage du SIAAP (Clichy, La Briche).
- Conflans-Sainte-Honorine (CSH) : situé sur l'Oise, le prélèvement s'effectuera en amont de la confluence Oise-Seine. La mesure à ce point nous permet d'avoir une évaluation de la qualité de l'Oise.
- Triel-sur-Seine (TSS) : à l'aval de la station Seine Grésillons, ce site est le point le plus en aval de l'agglomération parisienne dans notre étude.



Figure 12 : carte des points de prélèvements en Seine et ses affluents

Ces différents points ont été sélectionnés pour évaluer l'impact de la pression anthropique de l'agglomération parisienne sur la qualité microbiologique de la Seine (Tableau 4). Ils permettent également d'évaluer l'effet des apports (i) des principaux affluents de la Seine et (ii) des rejets des STEP et déversoirs d'orage sur la diversité microbienne rencontrée en Seine.

Tableau 4 : coordonnées GPS des points de prélèvements

Site	Rivière	Adresse	Latitude	Longitude
Juvisy-sur-Orge	Seine	Pont D931 (91260)	48°68'90''N	2°38'80''E
Choisy-le-Roi	Seine	Pont D86 (94600)	48°76'62''N	2°41'19''E
Vitry-sur-Seine	Seine	Pont du port à l'anglais D148 (94400)	48°79'75''N	2°41'91''E
Champigny-sur-Marne	Marne	Pont de la D 130 (94210)	48°80'97''N	2°50'97''E
Bougival	Seine	Pont D 321 (78380)	48°87'01''N	2°13'72''E
Conflans-Sainte-Honorine	Oise	Pont D 48 (78700)	48°98'89''N	2°07'18''E
Triel-sur-Seine	Seine	Pont D2 (78510)	48°97'84''N	2°00'13''E

Afin de mieux appréhender les variations temporelles auxquelles sont soumises les communautés microbiennes, sept campagnes ont été entreprises durant la période s'étendant de 2020 à 2022 (Tableau 5). Ces campagnes avaient pour but d'effectuer un suivi des communautés microbiennes au sein une même saison (automne et été) sur deux années successives (2020 et 2021) et d'observer leur évolution au cours de quatre saisons consécutives (printemps-été-automne-hiver 2021-2022).

Matériels et méthodes

Tableau 5 : récapitulatif des campagnes d'échantillonnages en Seine et affluents

Année	Date	Saison
2020	16/09/2020	Eté_2020
	23/11/2020	Automne_2020
2021	21/04/2021	Printemps_2021
	06/07/2021	Eté_2021
	23/11/2021	Automne_2021
2022	25/01/2022	Hiver 2022

Méthodologie d'échantillonnage

Avant l'échantillonnage, les flacons en polyéthylène, stériles, sont étiquetés (lieu de prélèvement-heure-date). Les eaux de la Seine et de ses affluents sont échantillonnées de façon similaire en collaboration avec l'équipe de prélèvement du SIAAP. Le prélèvement est effectué à partir d'un pont approximativement au milieu de la rivière à environ 50 cm de profondeur. Les échantillons, d'un volume total de 4 litres, sont conditionnés dans les flacons préalablement rincés trois fois avec l'eau à prélever pour limiter les risques de contaminations. Les flacons remplis à ras bord, sont conservés dans une glacière réfrigérée à environ 5° C et acheminés au laboratoire le plus rapidement possible, c'est-à-dire dans les six heures. Tous les prélèvements ont été effectués en début de matinée. Certains paramètres physicochimiques comme le pH, la température (°C) et la conductivité ($\mu\text{S}/\text{cm}$) sont mesurés sur site à l'aide d'une sonde multiparamétrique HACH.

Une fois au laboratoire, les échantillons sont stockés à la température adaptée aux analyses prévues. Les échantillons destinés à l'analyse physico-chimiques sont stockés à 4° C et ceux destinés à l'analyse des paramètres biologiques à -20°C.

Ces échantillons vont nous permettre d'avoir une connaissance de la diversité microbienne des eaux de la Seine et de ses affluents, et de son évolution au fil des saisons. Cela nous permettra d'avoir un état de référence avant la mise en place de la désinfection au PFA comme traitement quaternaire, programmée en juin 2023.

1.2 Etude des effets potentiels de l'acide performique en conditions contrôlées

Site de prélèvement : STEP Seine Centre

Les expériences ont été menées au laboratoire pour évaluer l'effet des rejets de station d'épuration traitées au PFA sur les communautés microbiennes du milieu récepteur. Pour cela, les rejets de station Seine Centre (SEC), à Colombes (92) en Ile-de-France, ont échantillonnés. La station SEC traite en moyenne un volume quotidien d'eaux usées de 240 000 m³, ce volume pouvant atteindre 404 800 m³ lors de périodes de précipitations. Différents traitements y sont mis en place avant le rejet dans la Seine. Une première étape de prétraitement est suivie d'une décantation physicochimique laminaire, puis d'un traitement biologique par une unité de bio-filtration qui permet d'éliminer la pollution carbonée et azotée. A la fin de de ces différents traitements, les effluents qui vont être rejetés dans la Seine, ont été collectés. Ces rejets ont ensuite été mis en contact avec le PFA en vue d'évaluer les effets potentiels sur les communautés bactériennes.

Synthèse de l'acide performique

Le PFA a été synthétisé selon le protocole établi par la société Kemira (KemConnect™ DEX) et détaillé dans (Rocher and Azimi, 2021). La synthèse est effectuée sous une hotte SPM en laboratoire et comprend deux étapes principales (Figure 13). La première partie consiste à préparer de l'acide formique catalysé. Dans un erlenmeyer maintenu dans un bain froid, cette préparation s'effectue

en ajoutant à 0,3 g d'eau milliQ froide, 7,49 g d'acide formique pur (99 %) et 0,96 g d'acide sulfurique (≥ 98 %). Le mélange est mis sous agitation pendant 5 minutes. La solution d'acide formique catalysée peut être conservée à température ambiante pendant 1 an.

La seconde étape consiste à ajouter à 3,5 g d'acide formique catalysé, 4,1 g de H_2O_2 (50 %) pour produire l'acide performique (PFA) selon la réaction suivante :



Ce mélange est mis sous agitation pendant 90 minutes tout en maintenant le mélange au froid, en-dessous de 20 °C, pour limiter une potentielle dégradation du PFA (Figure 13). Après 90 minutes, on obtient un mélange contenant à la fois de l'eau, de l'acide formique, du peroxyde d'hydrogène et de l'acide performique.

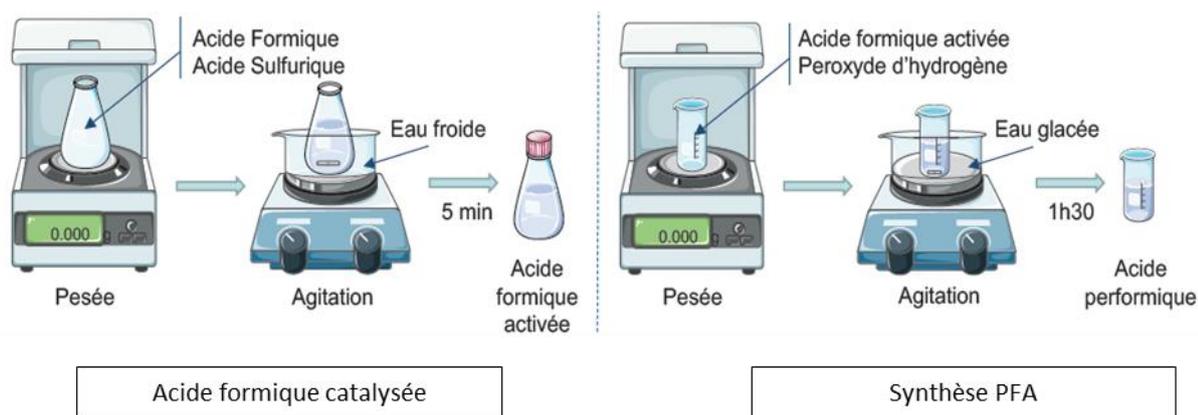
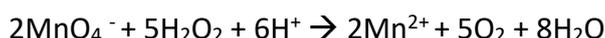


Figure 13 : protocole de synthèse de l'acide performique (adapté de (Rocher and Azimi, 2021))

Titrage du PFA

La concentration en PFA a ensuite été déterminée en deux étapes successives. Pour cela, il faut d'abord mélanger 83,4 μL de la solution d'acide performique préparée à 25 ml d'acide sulfurique dilué (1 M). La première étape consiste à doser le peroxyde d'hydrogène résiduel contenu dans la solution de PFA préparée par une solution de permanganate de potassium ($KMnO_4$) à 0,02 M :



La solution de solution de permanganate de potassium, initialement violette, devient incolore en contact avec le peroxyde d'hydrogène suite à une réaction d'oxydation. Une fois tout le peroxyde d'hydrogène contenu dans la solution est oxydé, la coloration violette devient persistante due à l'excès d'ions MnO_4^- .

La seconde étape consiste à rajouter de l'iodure de potassium (KI) qui va entraîner une coloration brune (voire orangée) du mélange. L'ajout du KI va transformer le PFA en acide carboxylique ($HCOOH$) avec une formation d'iode (I_2) en quantité stœchiométrique.

L'iode produit sera titré par ajout de thiosulfate de sodium ($Na_2S_2O_3$) à 0,02 M selon la réaction :



Une fois, le point d'équivalence atteint, le mélange va virer du jaune clair à l'incolore. Pour mieux apprécier ce virage, on rajoute de l'empois d'amidon qui va donner une coloration bleue au mélange ; qui deviendra incolore lorsque l'équivalence sera atteinte. Le volume de thiosulfate de sodium utilisé permet de quantifier la concentration en PFA.

Les concentrations massiques de PFA obtenues sont comprises entre 8 et 11 %. Ainsi, avant chaque essai de désinfection en laboratoire, le PFA est dosé en triplicata pour confirmer la concentration du PFA.

Design expérimental de l'étude des effets potentiels du PFA en conditions contrôlées

Matériels et méthodes

Dans cette partie, nous avons étudié dans un premier temps (i), les effets de l'utilisation de l'acide performique sur les communautés bactériennes présentes dans les eaux de rejets et dans un second temps (ii), sur les eaux de Seine recevant des eaux de STEP traitées au PFA. Les expérimentations ont été effectuées en conditions contrôlées au laboratoire en microcosme. Ainsi de l'eau de rejets en sortie de la STEP de Seine Centre à Colombes (92) et de l'eau de Seine (à Bougival) ont été échantillonnées. En tout, 20 litres d'échantillon d'eau de Seine et 20 litres de rejet de STEP ont été prélevés. Le microcosme a été mis en place grâce à un fermenteur de laboratoire (Minfor2). Ce dispositif nous a permis d'effectuer un suivi in situ de certains paramètres physicochimiques comme la T(°C), le pH, et l'oxygénation (mgO₂/l).

Pour évaluer l'effet de l'acide performique sur les communautés bactériennes présentes dans le rejet de STEP, des échantillons d'eau de rejet ont été mis en contact avec une solution de PFA à trois concentrations (0,8, 2 et 4 mg/l) à différents temps de contact (5, 10, 15, 30, 45 et 60 min) (Figure 14). Un suivi de l'abondance, des activités microbiennes et de la diversité microbienne a alors été effectué sur ces échantillons.

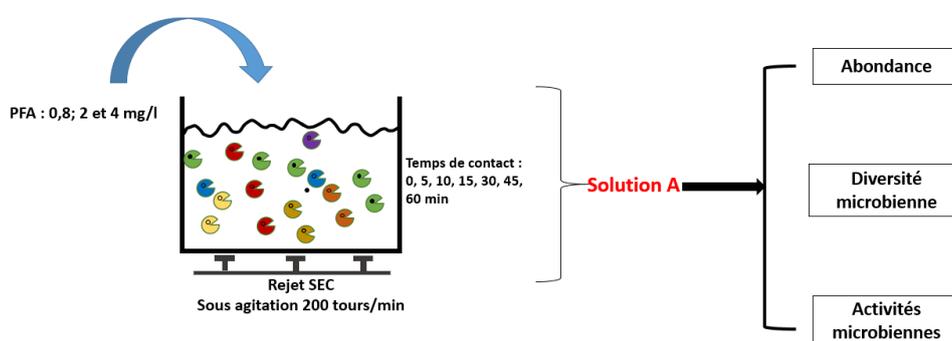


Figure 14 : dispositif expérimental de mise en contact d'un rejet de STEP avec du le PFA

La seconde étape de notre design expérimental visait à suivre les communautés microbiennes de la Seine (prélevée à Bougival) recevant des rejets de STEP traités au PFA. Ainsi des rejets traités au PFA à 0,8, 2 et 4 mg/l pendant 10 min ont été mélangés avec de l'eau de Seine dans des proportions de 10 % en rejet de STEP traité et 90 % en eau de Seine (v/v), correspondant à une composition d'étiage sévère. Un suivi cinétique du mélange a été ensuite effectué à différents temps de contact (5, 10, 15, 30, 45 et 60 min) comme l'illustre la (Figure 15).

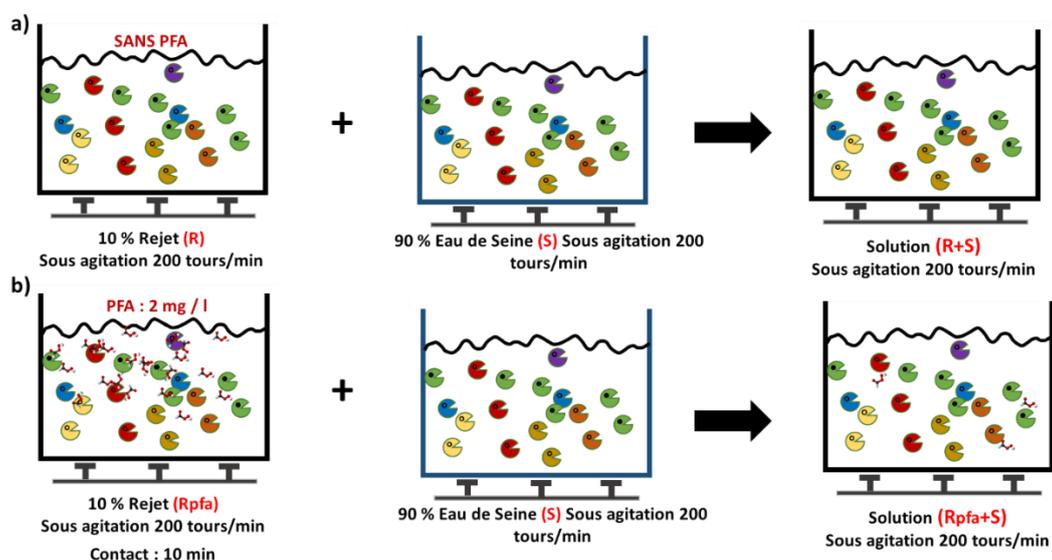


Figure 15 : dispositif expérimental de mise en contact entre rejet de STEP traité au PFA et eau de Seine, a) échantillons témoins et b) échantillons tests,

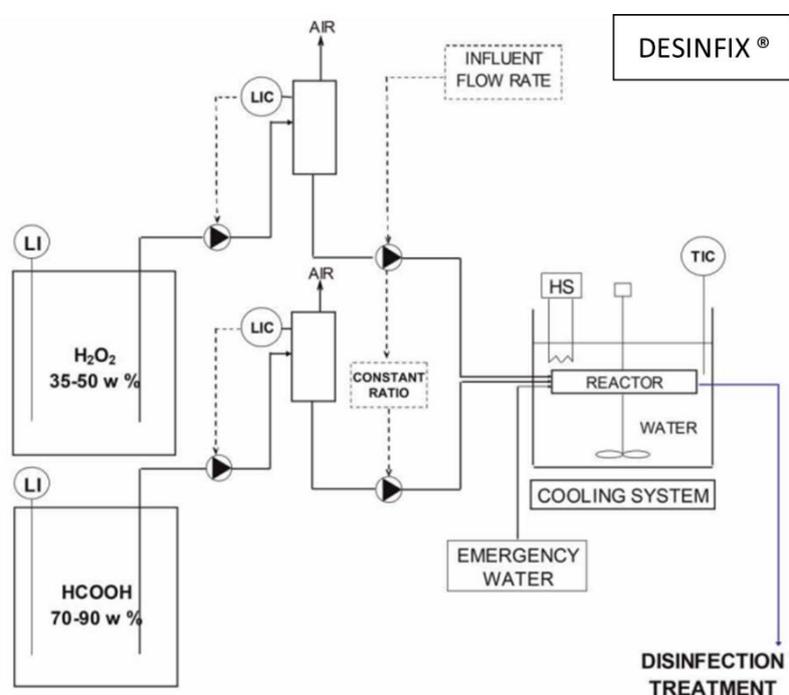
1.3 *Suivi in situ de l'utilisation du PFA comme agent de désinfection des effluents d'une STEP*

Projet NOROVIRUS (en collaboration avec le Syndicat Mixte du Bassin de Thau (SMBT))

Le projet Norovirus piloté par le Syndicat Mixte du Bassin de Thau (SMBT) est un projet collaboratif associant plusieurs partenaires dont, entre autres, le Syndicat Mixte du Bassin de Thau (SMBT), Sète agglomération Méditerranée (SAM), le SIAAP et le Leesu. Le projet visait à suivre la diversité microbienne du système de lagunage de la station d'épuration de Mèze (34). Dans le cadre de ce projet, les eaux de la STEP ont été traitées au PFA dans le but d'éliminer les norovirus, responsables d'épidémies de gastroentérites. L'objectif de ce projet était donc d'évaluer (i) l'efficacité du procédé de désinfection au PFA et (ii) son innocuité pour le milieu récepteur à savoir le système de lagunage de la STEP de Mèze (12 hectares au bord du bassin de Thau).

Présentation de la technologie Desinfix de Kemira

Dans le cadre de ce projet, le PFA était produit sur-site grâce au procédé Desinfix selon le protocole établi par Kemira, société finlandaise commercialisant le Kemira KemConnect™ DEX (Figure 16). En raison de son instabilité, le PFA pour être utilisé en station d'épuration doit être produit sur site, c'est l'objet du procédé Desinfix (Ragazzo et al., 2013). Le système comprend deux fûts de stockages des réactifs (l'un avec de l'acide formique catalysé et le second contenant le peroxyde d'hydrogène) ; des pompes qui vont permettre le prélèvement automatique des réactifs, un réacteur équipé d'un système de refroidissement au sein duquel l'acide performique sera synthétisé. Les réactifs sont pompés en continu selon un ratio prédéfini, mélangés au sein d'un réacteur thermostaté. Les paramètres comme la température, les pressions, les niveaux et les débits sont mesurés automatiquement. Un système d'alarme est mis en place lorsqu'une anomalie est constatée, pouvant aller jusqu'à l'arrêt de la production. Le PFA produit, a des concentrations massiques comprises entre 12 et 15 %.



(TIC : contrôle de température ; LI : indicateur de niveau ; LIC : contrôle de niveau des réactifs ; HS : système de chauffage)

Figure 16 : présentation de la technologie DesinFix®

Descriptif du site et des points d'échantillonnage

L'étude a donc été menée sur la STEP de Mèze (34) et son système de lagunage entre décembre 2020 et juin 2021. Cette STEP s'étend sur 12 hectares au bord du bassin de Thau et traite les eaux des communes de Mèze et de Loupian. Son système de lagunage est constitué de plusieurs lagunes

à savoir celles dites anaérobies, à fortes charges, de maturation et celles de finition. La Figure 17 montre l'organisation et les caractéristiques de ces différentes lagunes.

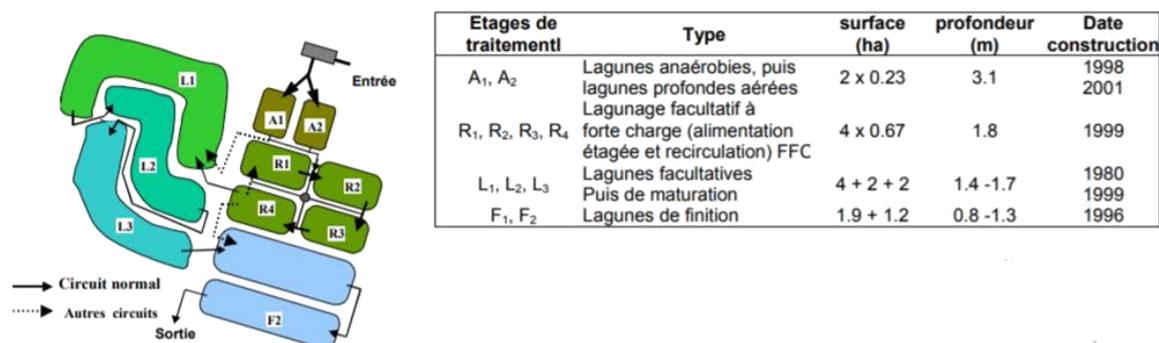


Figure 17 : descriptif du système de lagunage de la STEP de Mèze

Une stratégie d'échantillonnage a été mise en place pour répondre aux objectifs de notre étude à savoir le suivi des communautés microbiennes de l'écosystème de lagunage suite à la désinfection au PFA des rejets de la STEP. Deux matrices ont été prises en compte par l'échantillonnage : la matrice eau et la matrice sédiment. Les échantillons d'eau permettront d'évaluer une potentielle toxicité aiguë, c'est-à-dire à court terme, sur les microorganismes des eaux du système de lagunage ; tandis que ceux des sédiments permettront d'évaluer une potentielle toxicité chronique c'est-à-dire sur le long terme.

Les points de prélèvement des échantillons d'eau retenus se situaient au niveau de :

- la bêche en sortie du clarificateur avant injection de l'acide performique (Figure 18),
- la sortie de la bêche UV (après injection du PFA) et avant envoi en lagune R1 (Figure 18),
- la lagune R1 (Figure 19) en trois points (entrée (E), centre (C) et sortie (S)),
- la lagune F1 (Figure 19) en trois points comme pour la lagune R1.

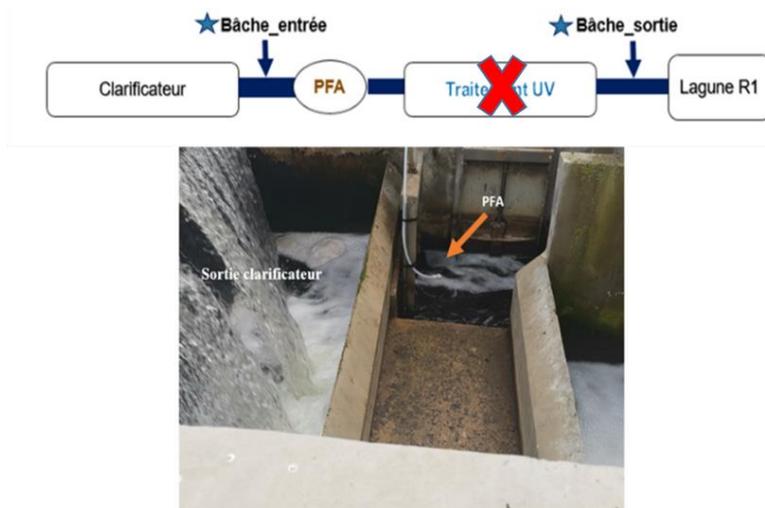


Figure 18 : point d'injection du PFA en sortie de clarificateur

Dans les lagunes R1 et F1, les échantillons d'eau et de sédiments ont été prélevés en diagonale dans le sens d'écoulement de l'eau (Figure 19) : en entrée de lagune (E), au milieu de la lagune (C) et en sortie de lagune (S).

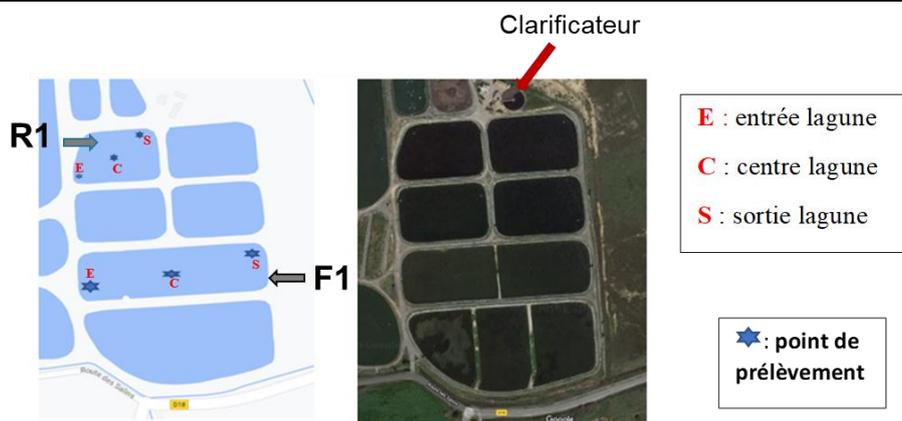
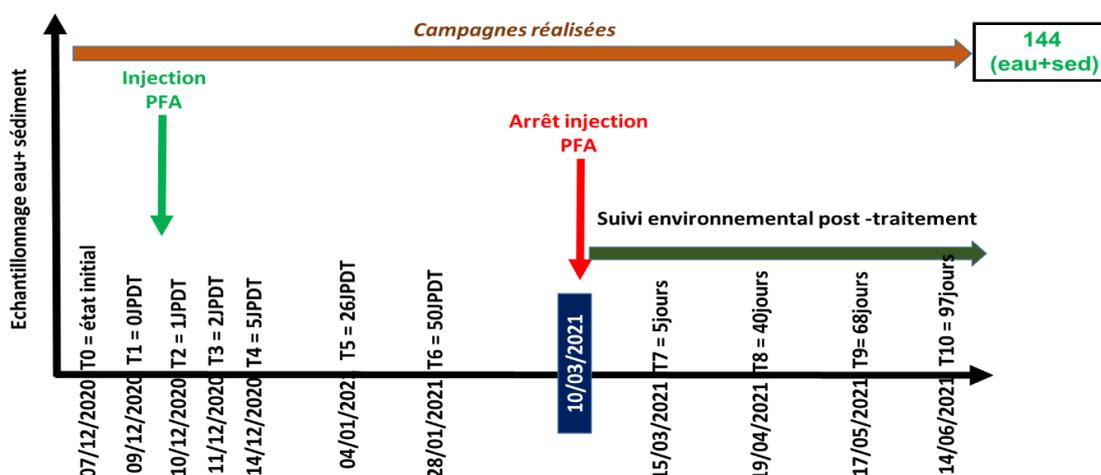


Figure 19 : points de prélèvement en entrée, centre et sortie des lagunes R1 (dite à forte charge) et F1 (dite de finition)

Planning d'échantillonnage

Les échantillons d'eau et de sédiments ont été prélevés durant sept mois. Ainsi onze campagnes d'échantillonnages ont été réalisées : deux prélèvements avant le début de l'injection du PFA (dite phase pré-injection), cinq prélèvements pendant la phase de traitement au PFA (dite phase d'injection) et quatre durant la phase post-injection. Le premier échantillonnage a été effectué le 07/12/2020, 24 h avant la mise en route du module de désinfection au PFA. Ce premier échantillonnage constitue l'état initial ou de référence (T0). Les injections de PFA ont débuté le 09/12/2020 et se sont arrêtées le 10/03/2021. Le suivi s'est poursuivi sur une période de trois mois après l'arrêt de la désinfection au PFA jusqu'au 14/06/2021. Au total, 144 échantillons de sédiments et d'eau ont été collectés (Figure 20).



JPDT : jour post début du traitement au PFA

Figure 20 : planning d'échantillonnage sur lors du projet Norovirus

Méthode d'échantillonnage

Les échantillons d'eau ont été prélevés à environ 80 cm de profondeur. Le déplacement sur la lagune s'est fait grâce à une barque mise à disposition par les responsables de la STEP. Le système de prélèvement a été systématiquement rincé avant échantillonnage. Les flacons de prélèvement stériles ont également été rincés trois fois avant prélèvement. Différents paramètres physicochimiques à savoir température, oxygène dissous, conductivité et pH ont été mesurés *in situ*. La fraction de sédiments qui nous intéresse est la partie superficielle des dépôts dont nous avons prélevé la fraction fine. Le prélèvement a été réalisé au moyen d'une benne « Van Veen » (SDEC) reliée à une corde (Figure 21). Du sédiment est prélevé trois fois, puis homogénéisé pour constituer

un échantillon moyen représentatif avant d'être réparti dans les différents flacons. Avant et après chaque échantillonnage, le préleveur et le bac d'homogénéisation sont nettoyés.



Figure 21 : échantillonnage des sédiments avec la benne Van Veen



Figure 22 : conditionnement des échantillons d'eau et sédiment

Comme pour la matrice eau, tous les échantillons sont ensuite conservés à -20°C avant leur transfert vers le Leesu par transporteur (Figure 22).

II. Méthodes d'analyse

II.1 Paramètres environnementaux

Paramètres hydrométéorologiques

Le paramètre hydrométéorologique qui a été pris en compte dans le cadre de cette étude est le débit de la Seine. Ce dernier est issu des relevés des stations de suivi du site Vigicrues (<https://www.vigicrues.gouv.fr/>). Les débits retenus sont ceux enregistrés aux heures auxquelles les prélèvements ont été réalisés. La température de l'eau a été mesurée sur site à l'aide d'une sonde multiparamétrique HACH. La température ambiante de l'air, l'humidité relative, le rayonnement solaire ont été obtenus grâce aux stations d'Infoclimat (<https://www.infoclimat.fr/>).

Paramètres physico-chimiques

Des paramètres physicochimiques globaux ont été analysés pour chaque échantillon. Il s'agit du pH, de la conductivité, de la demande biochimique en oxygène à 5 jours (DBO5), de la demande chimique en oxygène (DCO), des concentrations en ammonium (NH_4^+), en nitrites (NO_2^-), en nitrates (NO_3^-) et en orthophosphates (PO_4^{3-}). Ces paramètres ont été mesurés par le laboratoire interne accrédité COFRACdu SIAAP selon les normes AFNOR habituelles : $[\text{NH}_4^+]$ selon la norme NF EN ISO 11732 d'août 2005 par analyse en flux (CFA et FIA) et détection spectrométrique, $[\text{NO}_2^-]$ et $[\text{NO}_3^-]$ selon la norme NF EN ISO 10304-1 de juillet 2009 par dosage par chromatographie ionique, $[\text{PO}_4^{3-}]$ selon la norme NF EN ISO 15681-2 de juin 2005 par dosage spectrométrique au molybdate d'ammonium. La DBO5 et la DCO sont mesurées respectivement selon les normes NF EN 1899-2 de mai 1998 et NF T 90-101 de février 2020. Des données physicochimiques ont également été obtenues par le programme d'autosurveillance du SIAAP à travers le réseau de mesures MeSeine. C'est un réseau de mesures en Seine, en Marne et en Oise qui vise un suivi de la qualité physico-chimique des eaux du milieu naturel. Ce réseau comprend 12 points de surveillance dont 1 sur la Marne et 1 sur l'Oise. Les paramètres suivis sont identiques à ceux suivis dans le cadre cette thèse et permettront d'effectuer une comparaison entre notre suivi et la base de données des 10 précédentes années de suivi de l'observatoire MeSeine.

II.2 Abondance microbienne : par cytométrie en flux

Dans le cadre de nos travaux, les mesures ont été réalisées au moyen d'un cytomètre en flux automatique BactoSense (bNovate, Suisse). C'est un cytomètre qui utilise la technique du double marquage des acides nucléiques permettant de quantifier les cellules intactes et les cellules

endommagées séparément. Les deux fluorochromes utilisés pour le marquage des cellules présentes dans les échantillons sont : le SYBR GREEN I et le PI. Ils permettent de quantifier les cellules en fonction de leur intégrité physique. En effet, le SYBR GREEN I est un marqueur capable de pénétrer dans toutes les cellules peu importe l'intégrité des membranes de celles-ci. Ce marquage permet donc de quantifier toutes les cellules qu'elles soient intactes ou présentant des membranes altérées. Le PI, quant à lui, ne pénètre que dans les cellules aux membranes altérées. Ce marqueur permet de quantifier les cellules endommagées (Grégori et al., 2003). Ce marquage simultané avec deux marqueurs sur le même échantillon présente l'avantage de quantifier la proportion de cellules vivantes et de cellules endommagées ou altérées.

La technique de quantification par la cytométrie en flux ne se fait que sur des suspensions liquides. Pour les échantillons de sédiments, une phase de préparation des échantillons s'est avérée nécessaire pour la mise en suspension des cellules microbiennes.

Homogénéisation des échantillons de sédiments

La phase de préparation des échantillons de sédiments débute par une étape d'homogénéisation ou de dispersion en fines particules d'une masse d'environ 200 g. Cette homogénéisation est effectuée grâce à un disperseur à haute vitesse Ultra-Turrax T25. Selon le principe de fonctionnement de l'Ultra-Turrax, sous l'action de la vitesse du rotor, les sédiments sont aspirés automatiquement dans le sens axial dans la tête de dispersion et sont ensuite comprimés dans le sens radial à travers les fentes du système rotor/stator. Ils y sont soumis à des forces de cisaillement entraînant un mélange de la suspension. La vitesse a été fixée à 13 400 tr/min. L'échantillon, maintenu dans de l'eau froide, est soumis à 4 phases d'homogénéisation de 30 secondes intercalées de 30 secondes de repos. Une fois l'homogénéisation/mixage terminé, la tête du mixeur est nettoyée afin de ne pas contaminer le prochain échantillon. Les échantillons ainsi obtenus ont été utilisés pour l'ensemble des analyses relatives aux sédiments.

Extraction des cellules microbiennes

Pour l'extraction des cellules microbiennes, Les échantillons sont dilués 100 fois dans de l'eau physiologique préalablement stérilisée. Cette dilution s'effectue avec une eau physiologique de NaCl (0.9 %) stérilisée. Dans un falcon de 15 ml, on pèse 0,1 g d'échantillon de sédiment homogénéisé précédemment, auquel on rajoute 9,9 g d'eau physiologique et des microbilles de verres. Ce mélange est ensuite mis sous agitation à 300 rpm pendant 30 min, cette étape est nécessaire pour détacher les cellules. Puis, les falcons sont centrifugés à 500 g pendant 5 min. Cette phase d'extraction s'achève avec une récupération du surnageant contenant les cellules microbiennes détachées dans de nouveaux falcons. Ce surnageant permet de quantifier l'abondance des microorganismes (Figure 23).

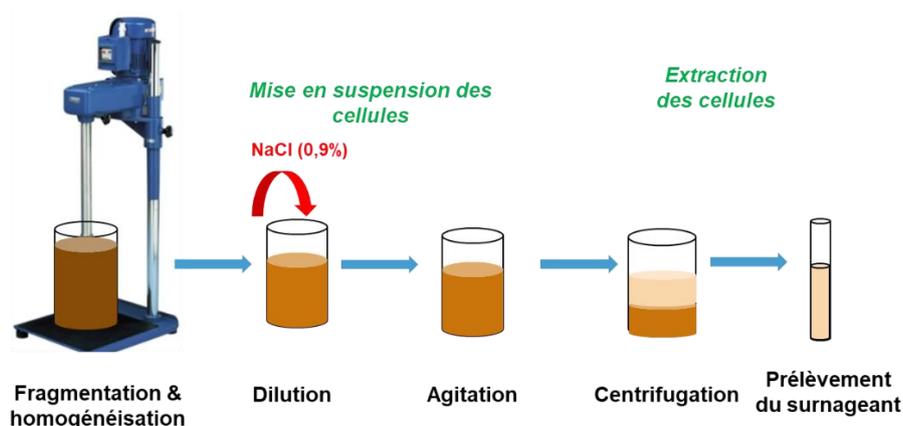


Figure 23 : protocole d'extraction des cellules microbiennes des sédiments.

Mesure de l'échantillon

Pour cette analyse, un volume de 2 ml d'échantillon est nécessaire (Figure 24). Cette méthode de mesure est applicable aux échantillons d'eau et aux surnageants issus des échantillons de sédiment. L'échantillon est homogénéisé par agitation avant analyse. Ce volume est transvasé dans un tube vissé au cytomètre. Ensuite, un aliquote de 260 μ l est prélevé dont uniquement 90 μ l sont analysés, le volume restant sert à rincer la cellule de mesure avant et après analyse. L'aliquote prélevé est marqué par les deux fluorochromes (SYBR GREEN I et PI) puis incubé à 37°C pendant 10 min avant le dénombrement des cellules vivantes et altérées. L'automatisation du processus assure la reproductibilité des mesures pour tous les échantillons. Tous les échantillons ont été mesurés en triplicat.

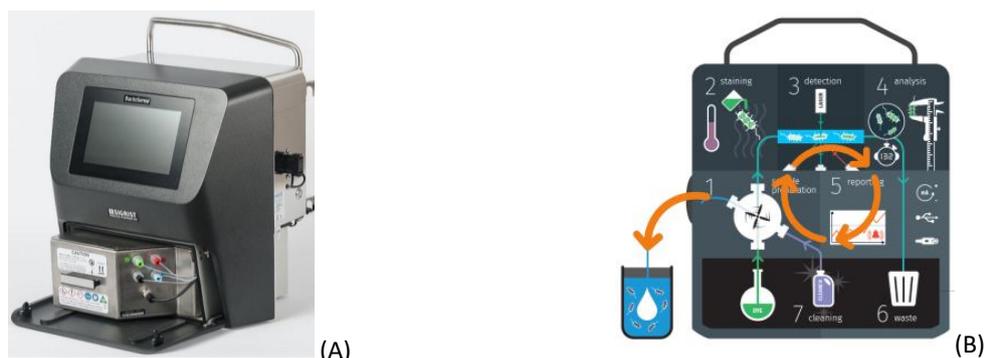


Figure 24 : présentation du BactoSense (bNovate) (A) et du procédé de mesure (B)

Les résultats issus de ces analyses d'abondance se présentent sous forme de cryptogramme avec différentes fenêtres. Ces fenêtres permettent de visualiser les signaux relatifs aux cellules endommagées (fluorescence d'iodure de propidium) et les cellules totales (fluorescence de SYBR Green I). Le BactoSense produit également un fichier de sortie au format Excel avec le nombre total de cellules quantifiées, intactes et altérées. Ainsi, un suivi de la proportion des cellules intactes ou/et endommagées peut être effectué pour l'ensemble des échantillons.

II.3 Activités microbiennes

Hydrolyse de la fluorescéine diacétate (FDA)

L'activité enzymatique globale des microorganismes a été mesurée par dosage colorimétrique, basé sur l'hydrolyse de la fluorescéine diacétate (FDA). Cette hydrolyse est effectuée par de multiples enzymes (estérases, lipases et protéases) produites par de nombreux types de microorganismes (Adam and Duncan, 2001; Schnurer and Rosswall, 1982) et elle entraîne la libération de fluorescéine. L'intensité de la fluorescéine libérée sera quantifiée par la mesure de son absorbance à 490 nm. Plus l'intensité est élevée, plus la quantité de FDA hydrolysée est élevée, et donc plus l'activité microbienne est importante. Le dosage a été effectué selon la méthode modifiée de Taylor et al. (2002) en microplaques. Sur cette microplaque, nous avons le « Blanc », les « témoins enzymes », les « témoins substrats » et l'analyse des « échantillons » à proprement dite. Les témoins enzymes permettent de soustraire l'absorbance du substrat étudié et les témoins substrats de soustraire l'absorbance de la FDA non hydrolysée. Une étape de préparation des échantillons est nécessaire aussi bien pour les échantillons de sédiments que pour les échantillons d'eau.

Préparation des échantillons de sédiment

Les échantillons de sédiments utilisés pour quantifier l'hydrolyse de la FDA sont issus de la phase d'homogénéisation. Préalablement les sédiments sont séchés en étuve. Pour cela, 5 mg de sédiments frais sont placés dans une coupelle vide, tarée. L'ensemble est ensuite placé dans une étuve à 105° C pendant 24 h. Ensuite on laisse refroidir à température ambiante dans un

Matériels et méthodes

dessiccateur. Le poids sec se calcule en faisant la différence entre la masse du sédiment frais et le résidu sec. Cette mesure a été effectuée en triplicat. La mesure du pH au laboratoire est nécessaire pour la caractérisation des échantillons de sédiments et pour la mesure de l'hydrolyse de la FDA. Elle est effectuée selon la norme NF ISO 10 390. Dans un bécher, on ajoute 10 g de sédiments secs et 50 g d'eau distillée mis sous agitation à la température ambiante. La suspension obtenue est mise au repos pendant 2 h ; la lecture du pH est effectuée à l'aide d'un pHmètre HANNA hi211.

Préparation des échantillons d'eau

La préparation des échantillons d'eau consiste en une concentration afin d'augmenter le nombre de cellules par ml via des concentrateurs Vivaspin 20 10KD. Une prise d'essai de 20 ml d'eau a été insérée à l'intérieur du concentrateur, centrifugée à 3300 g pendant 15 min à 4°C. Le concentrat a été récupéré dans un cône stérilisé grâce à une pipette. La détermination du volume permettait de calculer le facteur de concentration.

Protocole de mesure

Un échantillon d'eau ou de sédiment (100 µl) est déposé dans chaque puits. 50 µl du tampon Mac Ilvain (0,1 M d'acide citrique et 0,2 M de Na₂HPO₄) et 50 µl de FDA sont ajoutés. Les puits des « témoins enzymes » sont composés de 50 µl d'eau distillée, 50 µl de tampon, 100 µl d'échantillon. Ceux des témoins substrat contiennent 100 µl d'eau distillée, 50 µl de FDA et 50 µl du tampon (Figure 25).

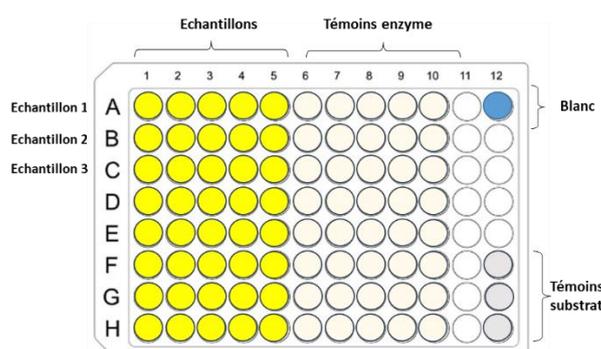


Figure 25 : microplaque pour l'analyse de l'hydrolyse de la FDA

La plaque est ensuite incubée sous agitation à l'obscurité, à 37°C pendant 2 h. Après la période d'incubation, la plaque est ensuite centrifugée à 4°C à 15000 rpm pendant 10 min. 100 µl du surnageant sont transférés dans une nouvelle plaque contenant au préalable 100 µl de tampon Mac Ilvain. La lecture de la densité optique (DO) est alors effectuée au spectrophotomètre (Xenius, Safas, Monaco) à une longueur d'onde de 490 nm. L'activité enzymatique est exprimée en µg de fluorescéine par ml et par h (pour les échantillons d'eau) ou par g et par h (pour les échantillons de sédiment) selon la gamme étalon établie au préalable. La gamme étalon a été préparée partir d'une série de dilutions d'une solution de fluorescéine (pour atteindre des concentrations finales comprises entre 0 et 3.5 µg/µl), les DO correspondant à ces concentrations sont mesurées et une courbe d'étalonnage tracée (Figure 26).

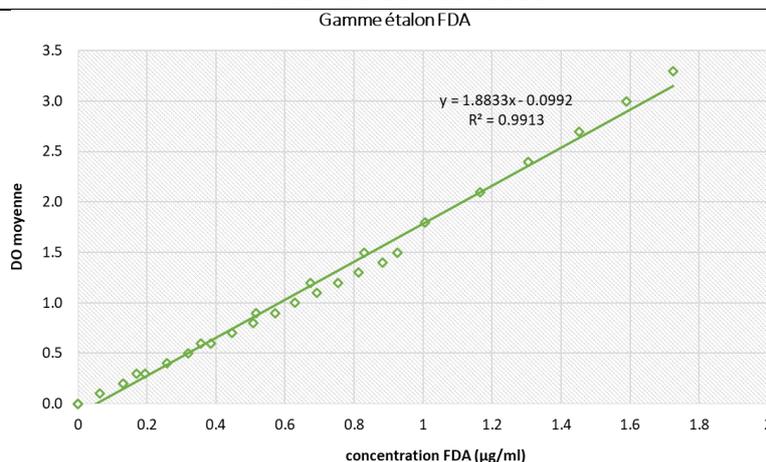


Figure 26 : courbe d'étalonnage du PFA

II.4 Diversité métabolique avec les microplaques EcoPlate™ de BIOLOG®

L'étude des communautés microbiennes passe par une caractérisation de leurs capacités fonctionnelles et métaboliques. L'objectif est d'évaluer la capacité des communautés à dégrader certains substrats. La technique de BIOLOG® (Schmidt, 2006b) a été utilisée avec l'utilisation des microplaques EcoPlate™ pour les microorganismes lotiques. Les microplaques EcoPlates™ sont composées de 96 puits contenant 31 sources de carbone (C) et un blanc pour le contrôle, tous en triplicat. Ces 31 sources de C sont réparties en six groupes : les hydrates de carbone, les acides carboxyliques, les acides aminés, les amines/amides, les polymères de carbone, les composés phénoliques (Ge et al., 2018). En plus de ces 31 sources de C, chaque puits contient un indicateur coloré, le tétrazolium, qui est un témoin de la dégradation des substrats. Lorsque le substrat est dégradé, le tétrazolium incolore se réduit en formazan qui est un composé violet insoluble (Wu et al., 2020). Cette réaction de réduction, irréversible, donne une coloration violette mesurée à une longueur d'onde de 595 nm à l'aide d'un lecteur de plaques (Multiskan FC, France). A partir des intensités mesurées dans chaque puits on accède à un paramètre l'*Average Well Colour Development* (AWCD).

Echantillons de sédiments

Les communautés microbiennes ont été extraites des sédiments : à 5 g de sédiment ont été ajoutés 45 ml d'eau physiologique (NaCl, 0.9 %) stérilisée. Le mélange obtenu a été agité à 250 rpm pendant 30 min puis les suspensions centrifugées à 500 g pendant 5 min à 4°C. Les surnageants obtenus ont été transférés dans de nouveaux falcons et centrifugés de nouveau à 500 g pendant 5 min à 4°C. Les surnageants ainsi obtenus étaient ensuite transférés dans de nouveaux falcons et la DO mesurée à 600 nm. Si la DO obtenue est > 0,05, une dilution est effectuée avec une solution de sérum physiologique pour obtenir une DO finale de 0,05. Sous la hotte, les puits d'une microplaque EcoPlate™ sont ensuite inoculés avec 150 µl de ce surnageant. Le puits contenant le blanc contient lui 150 µl d'eau physiologique.

Les microplaques sont ensuite lues au spectromètre à une longueur d'onde de 595 nm pour avoir les DO initiales. Les microplaques EcoPlate™ fermées sont ensuite incubées à 25°C ou à la température initiale de l'eau. Un suivi de la DO a été effectué pour chaque puits des microplaques toutes les 24 h pendant 7 jours avec le lecteur de plaques ThermoScientific Multiskan FC.

Echantillons d'eau

Pour les échantillons d'eau, la DO initiale des échantillons est mesurée à 600 nm. Si cette DO est supérieure à 0,05, une dilution est effectuée avec de l'eau physiologique stérilisée. Le protocole expérimental est le même que celui appliqué pour les surnageants des échantillons de sédiments. La DO obtenue était utilisée pour calculer l'AWCD.

Traitement statistique

Le paramètre AWCD représente la capacité métabolique des microorganismes pour chaque substrat permettant ainsi de quantifier l'activité globale. Plus la coloration est importante, plus les microorganismes présents ont une capacité de dégradation importante.

$$AWCD = \sum_{i=1}^n \frac{DO_i - R}{n}$$

Avec AWCD : la capacité moyenne de dégradation des substrats,

n : nombre de puits de la microplaque (31),

DO_i : DO mesurée dans le puits i (i allant de 1 à n) à 595 nm,

R : DO mesurée dans le blanc (puits de contrôle) à 595 nm.

Un autre traitement des données issues de la détermination de l'AWCD a été réalisé. Il concernait la consommation des différents substrats, de nouveaux indices en ont découlé : la richesse fonctionnelle (S), l'indice de Shannon (H) et l'indice de régularité (EH). La richesse fonctionnelle (S), liée à la capacité de dégradation de chaque échantillon, permet d'estimer la proportion des sources de C non utilisées par les communautés microbiennes. Elle se calcule comme étant la somme des DO des puits « positifs », à savoir ceux ayant une DO > 0,25 après 72 h d'incubation.

$$S = \sum(DO_i > 0,25)$$

L'indice de Shannon (H), calculé sur la base de l'AWCD après 72 h d'incubation, est représentatif de la diversité fonctionnelle de la communauté microbienne (Muñiz et al., 2014 ; Wei et al., 2021). Il définit la capacité des microorganismes à dégrader plus ou moins de types de sources de carbone : plus H est élevé plus la diversité des substrats dégradée par les microorganismes est élevée. Il se calcule comme suit :

$$H = - \sum_{i=1}^n p_i \times \ln(p_i)$$

Avec p_i étant le rapport de l'AWCD d'un substrat particulier sur l'AWCD total de l'ensemble des substrats (Feigl et al., 2017; Muñiz et al., 2014).

Le dernier indice, dit de régularité ou d'équitabilité (EH) s'intéresse à la variation de l'intensité de la couleur entre les puits. Il se calcule comme suit :

$$EH = H/\ln S$$

H : indice de Shannon

S : richesse fonctionnelle soit le nombre de puits positifs (avec une DO > 0,25)

II.5 Diversité microbienneExtraction d'ADN et séquençage

Les échantillons (500 ml) ont été filtrés à 0,22 µm sous vide sous une hotte PSM (poste de sécurité microbiologique). Le système de pompage sous vide a été préalablement autoclavé à 121°C pendant 21 minutes pour éliminer toutes traces potentielles de contamination. Les filtres (0,22 µm) sont également stériles. Après filtration, les filtres ont été placés dans des boîtes de Petri stériles pour être séchés à température ambiante sous hotte. L'ADN est extrait à partir de ces filtres (Figure 27). L'extraction a été effectuée en utilisant le kit DNeasy PowerWater (QIAGEN) conformément aux instructions du fabricant. La qualité d'ADN génomique a été évaluée sur un gel d'agarose à 1% et

quantifiée avec le kit ADNdb Quant-iT™ PicoGreen™ selon le protocole du fabricant, puis rapidement stockée à -20°C en vue d'analyses ultérieures.

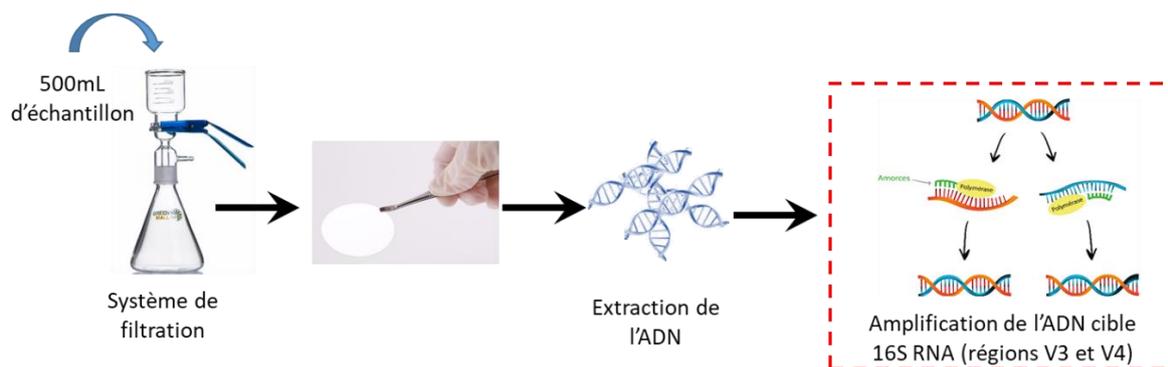


Figure 27 : préparation d'échantillons pour le séquençage

Après l'extraction d'ADN, la première étape consiste à « préparer » les bibliothèques. L'ADN extrait est ensuite fragmenté. Des adaptateurs ont été fixés sur les extrémités de ces fragments. Une fois la bibliothèque prête, une double PCR est effectuée de façon successive avec les amorces spécifiques fwd-5'-TACGGGAGGCAGCAG-3' et rev-5'-CCAGGGTATCTAATCC-3' (Kisand et al., 2002; Turner et al., 1999) pour les régions d'intérêt V3-V4 du gène de l'ARN 16S des bactéries. Les fragments préparés sont ensuite fixés sur une plaque de verre « *flowcell* » à micropuits.

Les conditions de la réalisation de la PCR se présentaient comme suit : 94°C pendant 5 min, 30 cycles à 94°C pendant 30 s, 54°C pendant 30 s, 72°C pendant 45 s, et finalement 72°C pendant 10 min. La vérification de l'amplification de l'ADN a été effectuée par électrophorèse sur gel d'agarose (1,5 %). L'ADN amplifié a été purifié en utilisant le kit de purification PCR QIAquick96 (Qiagen, CA) conformément aux instructions du fabricant. Le spectrophotomètre Nanodrop ND-1000 (Thermo-Fisher Scientific) a été utilisé pour évaluer la pureté et la concentration de l'ADN. Par la suite, les amplicons purifiés ont été normalisés à 120 ng/μl et transférés dans de nouveaux microtubes à faible rétention en vue du séquençage. Le processus de séquençage a été réalisé sur la plateforme Illumina MiSeq d'Eurofins Genomics (Allemagne), suivant les protocoles standards sur la plateforme Illumina MiSeq. A la fin du séquençage, les données obtenues se présentent sous forme de « *reads* » qui sont de deux types. Les *reads* qui s'alignent sur le brin sens de référence (5'→3') c'est-à-dire la direction normale de lecture de l'ADN, sont appelés « *reads forward* » ou (*read1*), alors que ceux qui s'alignent sur la direction inverse (dans la direction 3'→5') par rapport au brin sens sont appelés « *reads reverse* » ou (*read2*). Ces données de séquençage obtenues sont ensuite soumises à un traitement bio-informatique.

Traitement bio-informatique

Les données de séquençages ont été traitées à l'aide du *pipeline* d'analyse FROGS (*Find Rapidly Otu with Galaxy solution*) disponible sur la plateforme Galaxy Genotoul (INRAE). Ce traitement informatique comprend plusieurs étapes (Figure 28).

Pré-traitement des données « *Data Pre-processing tool* ». Cette première étape consiste à assembler les séquences *read1* et *read2* avec un taux d'erreur prédéterminé par l'opérateur dans la zone de superposition des deux *reads*. Ensuite, à l'aide du logiciel CutAdapt, les séquences sont nettoyées en éliminant celles ne respectant pas les critères ou ayant trop de bases ambiguës (erreurs) dans leurs séquences (Martin, 2011).

Clustering tool. Cette deuxième étape permet d'assembler par la méthode *Swarm*, les séquences similaires en unités taxonomiques opérationnelles ou UTO (*OTUs* en anglais). A la fin de cette étape, on obtient des fichiers contenant l'abondance de chaque cluster pour chaque échantillon étudié.

Chimera removal tool. La troisième étape est la suppression des chimères générées suite à des biais de séquençage. Les chimères sont des sous-produits de PCR pouvant entraîner la création d'UTO chimériques. Les chimères sont détectées grâce à l'outil *VSEARCH*. Cette étape permet d'obtenir des séquences débarrassées de toute chimère et un fichier d'abondance est alors généré.

Filtering and taxonomic affiliation tool. Une étape de filtration d'abondance est effectuée sur ces séquences. Pour ce filtrage, on choisit de ne conserver que les clusters contenant plus de 0,0005 % des séquences. Après cette filtration, les séquences obtenues sont alignées et leur affiliation taxonomique est effectuée via BLAST en utilisant la banque de données 16-SILVA-138. A la fin du *pipeline*, une matrice d'abondance est obtenue, c'est-à-dire que pour chaque échantillon nous obtenons un nombre de séquences par UTO ainsi que son affiliation.

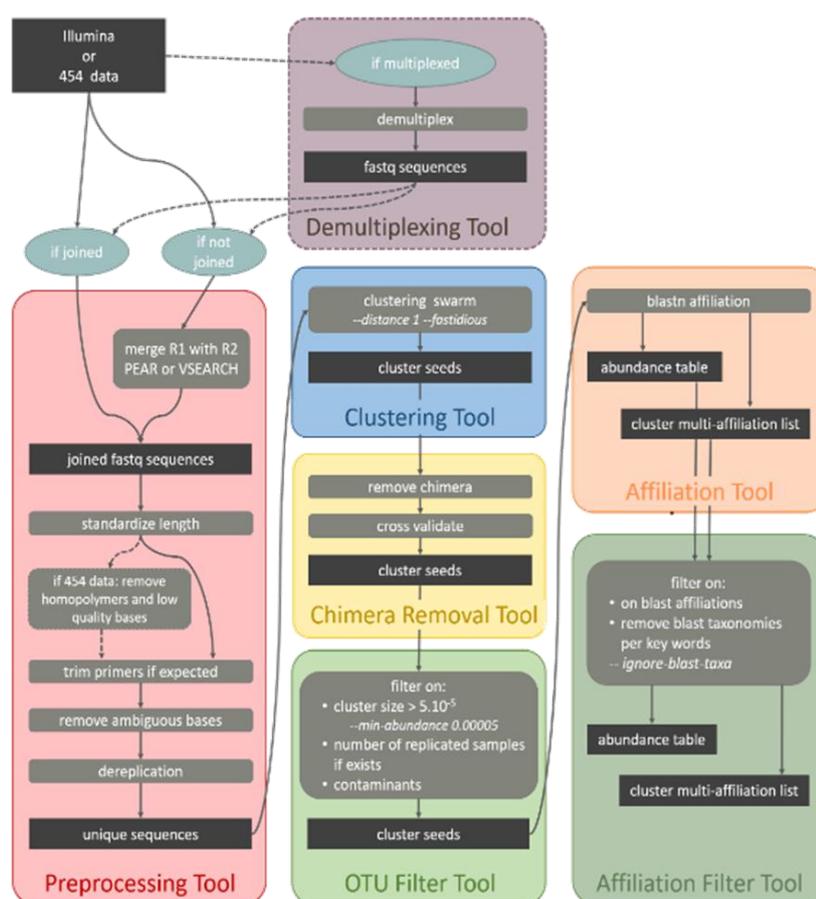


Figure 28 : pipeline de traitement bioinformatique de FROGS (<http://frogs.toulouse.inra.fr/>)

Traitements statistiques

La matrice d'abondance obtenue est ensuite utilisée pour calculer les indices de diversités à savoir ceux de richesse (Chao1), de diversité (Indice de Shannon) et d'équitabilité (indice de Simpson). Le calcul de ces différents indices de diversité permet d'étudier la structure des communautés bactériennes. Pour cela, ces communautés sont explorées pour deux types de diversités grâce à des outils informatiques intégrés dans FROGS : α -diversité et β -diversité.

α -diversité

L' α -diversité est relative à la diversité des espèces présentes au sein d'un échantillon, à savoir la distribution de l'abondance des espèces dans l'échantillon étudié. Elle est étudiée grâce aux indices de diversité de Shannon, de richesse, de Simpson.

Indice de richesse

La notion de richesse est un terme alternatif qui a été introduit pour remplacer la notion de « nombre d'espèces » ; le nombre total d'espèces étant difficile à estimer (Peet, 1974). On parle ainsi de richesse spécifique pour quantifier le nombre total ou moyen d'espèces recensées. Dans le cadre de notre étude, la richesse est mesurée en considérant le nombre d'UTO de Chao1 et le nombre d'UTO observées.

Indice de Shannon-Wiener

Selon le (Ministère de la Transition écologique et solidaire, 2018), l'indice de Shannon (H) est un indice qui permet d'expliquer la diversité d'une communauté en fonction du nombre d'espèces récoltées et du nombre d'individus par espèce. Elle est liée à la fréquence relative des différentes espèces. Par exemple, plus H' augmente, plus le nombre d'espèces présentes est important.

$$H = - \sum_{i=1}^{S'} \frac{n_i}{N} \ln \frac{n_i}{N}$$

Avec :

n_i le nombre d'individus d'une espèce dans l'échantillon,
 N le nombre total d'individus de toutes les espèces dans l'échantillon,
 S' le nombre total d'espèces.

Indice de Simpson (D)

Il permet de mesurer la probabilité que deux individus sélectionnés au hasard appartiennent à la même espèce (Wilsey et al., 2005). Cependant c'est un indice qui donne plus de poids aux espèces abondantes qu'aux espèces rares. Il est compris entre 0 et 1. Lorsqu'il tend vers 0, nous avons un maximum de diversité et lorsqu'il tend vers 1, on a un manque de diversité.

$$D = \sum_{i=1}^S n_i (n_i - 1) / N (N - 1)$$

Avec

n_i : le nombre d'individus d'une espèce dans l'échantillon,
 N : le nombre total d'individus de toutes les espèces dans l'échantillon.
 S : nombre total d'espèces dans le jeu de données

Ces indices ont permis d'analyser statistiquement la structure des communautés.

β-diversité

Contrairement à l' α -diversité, la β -diversité, elle, compare la diversité entre plusieurs échantillons. Elle permet de voir la similitude ou, au contraire, la dissimilarité entre plusieurs échantillons. Elle sera calculée en utilisant les indices de Jaccard et de Bray-Curtis :

- **Indice de Jaccard** : il permet une comparaison entre deux sites en évaluant leur similitude en termes d'abondance des taxons. Il s'obtient en calculant le rapport entre les espèces communes aux deux échantillons sur celles propres à chaque échantillon. Il reflète les présence/absence des différentes espèces ;
- **Indice de Bray-Curtis** : il permet d'évaluer la dissimilarité entre deux échantillons donnés. Il reflète, quant à lui, l'abondance des différentes espèces.

Prédictions fonctionnelles du métagénome

A partir des données issues du séquençage de l'ARN 16S, il est possible de prédire les différentes fonctions des bactéries identifiées dans chacun des échantillons. Cette prédiction est possible grâce au logiciel PICRUSt (*Phylogenetic Investigation of Communities by Reconstruction of Unobserved States*), présente sur la plateforme de Genotoul-bioinfo (INRAE). La base de données de référence utilisée est celle de KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*). Ainsi, une association entre les taxons bactériens et les gènes fonctionnels est établie à l'aide de PICRUSt. Dans le cadre de cette étude, la base de données KEGG PATHWAY, représentant les voies métaboliques, a été utilisée. Les voies métaboliques sont un ensemble de réactions chimiques aboutissant soit à la synthèse d'une molécule (on parle alors d'anabolisme) ou à sa dégradation (catabolisme). Les enzymes intervenant dans chaque voie métabolique sont rassemblées sous forme de groupes dans l'outil KEGG PATHWAY. Ces voies métaboliques sont organisées en 7 grands groupes (dits niveau 1) : le métabolisme (des sucres, lipides, glucides...), le traitement de l'information génétique (transcription, traduction, réparation de l'ADN), le traitement de l'information environnementale (transport membranaire), les processus cellulaires (cycle et mobilité cellulaires), les systèmes organiques (systèmes immunitaire ou endocrinien, par exemple) et les maladies humaines (Dupont, 2019) et le développement des drogues. Ces groupes de niveau 1 sont subdivisés en sous-groupes dits de niveau 2 subdivisés à leur tour, en sous-catégories de niveau 3 (*Annexes*). A la fin de traitement avec PICRUSt, on obtient l'abondance relative pour chacune des voies métaboliques considérées.

III. Stratégies de traitement des données

Les données collectées quelle que soit l'analyse réalisée ont été préalablement mises en forme. Les données ont ainsi été regroupées dans des fichiers Excel pour chaque type de paramètre suivi : les paramètres physicochimiques, les données d'abondance bactérienne, d'activités et de diversité microbienne. Ils ont ensuite été soumis à des analyses statistiques descriptives pour *a minima* calculer les moyennes et les écart-types pour les analyses effectuées en triplicat. Différents tests de corrélations et comparaisons entre les différentes données ont été effectués grâce au logiciel XLSTAT (Addinsoft, USA).

III.1 Analyse de la variance

L'analyse de la variance ou encore ANOVA peut s'appliquer à un ou plusieurs facteurs de variabilité. Lorsque l'on souhaite prendre en compte un seul facteur de variabilité, on applique une ANOVA à un facteur, on parle alors d'ANOVA *one-way*, et s'il s'agit de deux facteurs, on parle d'ANOVA *two-way*. Par exemple, dans le cadre de l'évaluation de l'impact du PFA sur les microorganismes, les résultats obtenus ont été comparés en effectuant une ANOVA *two-way* en tenant compte de la variable « concentration du PFA » et de la variable « temps de contact ». Par ailleurs, avant d'appliquer l'analyse de variance, le test de normalité « Shapiro-Wilk » est effectué. L'analyse de la variance est suivie du test de Tukey (HSD : différence significative honnête) ; il a pour but de déterminer parmi les échantillons ceux qui se distinguent significativement des autres.

III.2 Corrélations

Une analyse en composantes principales (ACP) a également été réalisée sur R, elle a permis une visualisation globale des données et d'effectuer différents types de comparaison. Par exemple, les corrélations entre les différents facteurs biotiques et abiotiques ont été analysées en effectuant une analyse de la redondance (RDA) avec la matrice de Spearman. Le test de Spearman va permettre de mettre en évidence l'existence d'une corrélation entre deux variables quantitatives et d'en évaluer l'intensité à travers un coefficient.

Les données ont également été traitées par une classification ascendante hiérarchique (CAH). La CAH est une méthode de classification qui permet de regrouper des échantillons en fonction de leurs ressemblances ou de leurs différences. Par exemple, la CAH devait nous permettre d'identifier

s'il existe ou pas une similarité entre les échantillons traités ou non au PFA et de visualiser les variations spatiotemporelles des communautés microbiennes de la Seine. Enfin, la régression linéaire a également été utilisée. Elle consiste en une méthode de modélisation permettant d'établir une relation linéaire entre une variable continue (dite variable expliquée) et un ensemble d'autres variables continues dites « variables explicatives » ou indépendantes.

Résultats

I. Caractérisation des communautés microbiennes de la Seine à l'échelle de l'agglomération parisienne

I.1 Etude des variabilités spatiales et temporelles des communautés microbiennes de la Seine

L'étude des variabilités spatiales et temporelles des communautés microbiennes de la Seine a donné lieu à un article qui a été soumis en **septembre 2023** à la revue **Heliyon** :

Bagagnan S., Guérin S., Rocher V., Alphonse V., Moilleron R. & Jusselme M. D. Spatial and temporal characteristics of microbial communities in the Seine River in the Greater Paris area under anthropogenic perturbation, *Heliyon*, soumis

Les données supplémentaires de l'article sont disponibles Annexe 2.

Objectifs

A notre connaissance, il existe très peu d'informations sur les communautés microbiennes dans les eaux de surface de la Seine en dehors de travaux qui ont été réalisés dans le cadre du programme PIREN-Seine (George et al., 2012) bien que la Seine soit l'un des fleuves sous forte pression anthropique en raison d'un faible effet de dilution qui résulte d'une forte concentration de population et d'un faible débit comparé à la situation d'autres fleuves en France et en Europe (Flipo et al., 2021). Apporter de nouvelles connaissances sur la dynamique des communautés microbiennes de la Seine était devenu nécessaire afin d'établir un niveau de référence avant la mise en place de la désinfection au PFA à Seine Valenton en juin 2023 et ainsi de pouvoir statuer sur le rôle de ces rejets traités au PFA sur les communautés en place. Dans ce cadre, les communautés microbiennes des eaux de surface de la Seine ont été suivies, pour la première fois, sur sept stations afin de prendre en compte la variabilité spatiale et sur une année pour appréhender la variabilité temporelle. Les sites ont été choisis pour considérer différents cas de figure qui pourraient influencer la diversité microbienne : amont-aval de l'agglomération parisienne (sur un linéaire de 110 km), amont-aval d'un rejet de STEP, amont-aval de la confluence avec les principaux affluents de la Seine (Marne et Oise). Les données brutes du séquençage ont été déposées dans la *NCBI Sequence Read Archive* sous le nom BioProject PRJNA996616.

Principaux résultats

Les résultats ont montré que le microbiome de l'eau est très diversifié et impliqué dans de nombreuses fonctions. Les principaux phyla composant le microbiome des eaux de surface sont les *Proteobacteria*, *Actinobacteriota*, *Firmicutes*, *Bacteroidota*, tandis que les autres phyla mineurs sont les *Deinococcota*, *Patescibacteria*, *Gemmatimonadota*, *Cyanobacteria*, *Bdellovibrionota*, *Acidobacteriota*, *Campilobacterota*, *Myxococcota* et *Desulfobacterota*. Aucune variabilité spatiale significative n'a été observée, les communautés bactériennes évoluent peu d'un site à un autre (à l'exception de quelques différences mineures entre l'amont et l'aval de l'agglomération parisienne) ; la variabilité temporelle était plus marquée. Les principaux facteurs explicatifs étaient la température et les concentrations en nutriments (nitrates et orthophosphates) et en carbone organique. Nos résultats confirment que notre premier site d'expérimentation (Juvisy-sur-Orge) reflète déjà une forte pression anthropique que subit la Seine. Il serait intéressant de caractériser les communautés microbiennes sur des sites plus amont, en tête de bassin, zone plus rurale. Cependant les résultats de la présente étude fourniront une base de données de référence sur la diversité microbienne de la Seine pour l'agglomération parisienne avant la mise en œuvre de la désinfection au PFA.

Spatial and temporal characteristics of microbial communities in the Seine River in the Greater Paris area under anthropogenic perturbation

Sadia Bagagnan¹, Sabrina Guérin², Vincent Rocher², Vanessa Alphonse¹,
Régis Moilleron¹ and My Dung Jusselme^{1,*}

¹Leesu, Univ Paris Est Creteil, F-94010 Creteil, France

²SIAAP, Direction de l'Innovation, F-92700 Colombes, France

*Corresponding author:

Email: jusselme@u-pec.fr

Full postale address:

Laboratory of Water, Environment and Urban Systems (Leesu)

Univ Paris Est Creteil

61 avenue du Général de Gaulle, 94000-Créteil, France

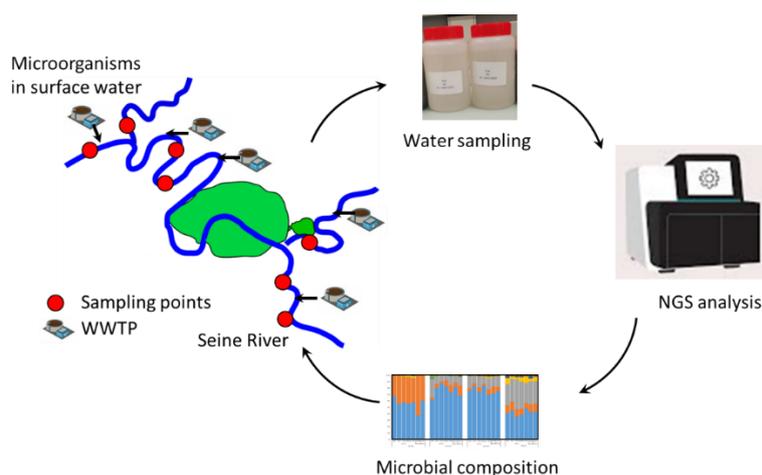
ABSTRACT

Microorganisms play an important role in maintaining the proper functioning of river ecosystems and are promising candidates for environmental indicators. They are also highly sensitive to environmental changes. It is necessary to have basic knowledge about them in order to know the ecological status of river ecosystem. To our knowlege, there is very little information on the status of microorganisms in surface water of the Seine River, although the Seine is one of the rivers that suffer the greatest impact from humain activities in the world due to a weak dilution effect. It is therefore necessary to carry out a microbial analysis to assess the health status of the Seine and to use it as a reference to compare with the future state when, for instance, new disinfection technologies are implemented.

To this end, the microbial communities of the Seine surface water were analysed, taking into account the spatial effect, including the tributaries, and from upstream to downstream of the Paris conurbation and the temporal aspect, with a monitoring over the 4 seasons. The results showed that the microbiome of the water is highly diverse and involved in a variety of functions. The main phyla making up the surface water microbiome were *Proteobacteria*, *Actinobacteriota*, *Firmicutes*, *Bacteroidota*, while other minor phyla were *Deinococcota*, *Patescibacteria*, *Gemmatimonadota*, *Cyanobacteria*, *Bdellovibrionota*, *Acidobacteriota*, *Campilobacterota*, *Myxococcota*, and *Desulfobacterota*. Overall, the microbial community did not change spatially (with the exception of some minor differences between upstream and downstream), but did vary seasonally. The main factors influencing this microbiome were temperature, nitrate and orthophosphate concentrations. The main predicted functions were related to cell metabolism, in particular carbohydrates, amino acids, lipids, energy, vitamins and cofactors, and cell mobility. The microbial compositions showed a strong balance between microbial groups and were involved in the degradation of recalcitrant compounds.

Key words: Seine river; spatial impact; temporal impact; microbial diversity; predicted function

GRAPHICAL ABSTRACT



HIGHLIGHTS

- First report on the microbiome of the Seine River over 110 km in the Greater Paris area
- High diversity of the Seine water microbiome varied seasonally due to temperature, nitrate and orthophosphate concentrations.
- Main microbial metabolic processes were carbohydrates, amino acids, lipids, and energy.
- Strong balance between microbial groups in the Seine River.

1. Introduction

The Seine River is the most important river in France and the second longest, with a total length of 776 km, crossing the Parisian Basin before reaching Normandy. Its catchment area covers 78,650 km² (14% of the surface of France) and it is mostly located in the Parisian basin (Flipo et al., 2021). It cannot be denied that the Seine is an important part of the life of the people of Paris in particular and the people of France in general. Moreover, the water of the Seine has been used as a source of drinking water, irrigation, industrial water, and even for swimming (Pierre Servais et al., 2009). The Seine is also important as a habitat for algae, rooted plants, benthic animals, fish, and other wildlife (Billen, 2009; Tales, 2009). With water scarcity, population growth and global warming, rivers are increasingly used for human needs. Given their importance, it is necessary to maintain their ecological systems so that they function properly. To do this, it is necessary to have a good understanding of the living organisms in these systems, which are the key players in their proper functioning.

Among living organisms, microorganisms are considered to be the most diverse and abundant biogroup in the world, and are the part of the composition of the river biocenosis. They play a very important role in maintaining the good functioning of river ecosystems (Findlay, 2010). As the microbial community in river ecosystems, the bacterial community plays an important role in various biogeochemical processes and maintains important services of river ecosystems, including the degradation of pollutants and organic matter (Schmidt, 2006). In the food web, they are the primary producers, carrying out photosynthesis or other autotrophic processes; or the primary decomposers, breaking down pollutants and other materials to recycle their components as nutrients. Therefore, the presence and characteristics of microorganisms in a particular environment can directly influence the presence and abundance of other organisms. Bacterial populations tend to respond rapidly to spatiotemporal environmental variation (Ma et al., 2016; Mai et al., 2018; Wang et al., 2015). They are highly sensitive to changes in environmental parameters such as pH, temperature, nutrient levels, and especially the presence of chemical contaminants (Gao et al., 2017; Jin and Kirk, 2018; Luo et al., 2014). It is also known that the diversity of the bacterial community can reflect its ecological

status and the functioning of river ecosystems. Therefore, microbial communities are a good promising candidate for environmental indicators (Hooper et al., 2005; Xie et al., 2016).

Regular monitoring of bacterial abundance, composition and diversity in the river is an important step towards a better understanding of the influences of anthropogenic activities to help for the conservation and sustainable development of the Seine River ecosystem. To date, the information on the variations of the bacterial community in the surface water of the Seine River at the scale of the Parisian agglomeration in response to wastewater discharges from wastewater treatment plants (WWTP) remains less known. In the activity report (phase 6) of the Piren-Seine programme in 2011, the results of the bacterial diversity in the surface water column showed that a great diversity of phyla was observed with a dominance for the following phyla: *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Betaproteobacteria*, and *Bacteroidetes* in the surface water column at three sites Marnay, Bougival and Triel which are located downstream of the Seine River (George et al., 2012). This is the only reference study on the microbial diversity of the Seine River. Nevertheless, the Seine River basin is one of the rivers in France under the strongest anthropic pressure, especially at the scale of the Paris agglomeration, due to the discharge of wastewater from various sources such as domestic, industrial, agricultural and urban stormwater runoff (Flipo et al., 2021). Along the Seine, from downstream to upstream, in the Ile-de-France region, there are seven WWTPs managed by Siaap (Paris conurbation wastewater treatment authority). The daily volume of water treated by these Siaap WWTPs is in the order of 2.5 million m³/d of wastewater in dry weather and up to 5 million m³/d (mixture of wastewater and stormwater) in wet weather (Pierre Servais et al., 2009). The Seine River also receives water from its tributaries including the Orge, the Marne, and the Oise, which can also be sources of pollution. These contributions are likely to significantly influence the microbial community both in terms of metabolism function and diversity (Drury et al., 2013; Guo et al., 2019).

The Bathing plan, launched in 2018 for the Paris 2024 Olympics, foresees the use of many advanced technologies to treat urban wastewater in WWTPs before discharge into the Seine, and to clean up the Seine River in the Parisian capital. It is therefore necessary to take stock of the ecological status of the Seine River prior to these applications. In this work, we will study the bacterial community (diversity, abundance) in order to refer and can compare before and after any changes that could occur in the future such as droughts, implementation of new techniques to disinfect WWTP effluent, such as performic acid use. To this end, we characterized the microbial abundance using the cytometry (BactoSense, bNovate, Swiss) and the microbial diversity using NGS technology along the Seine River from upstream to downstream, at five locations where the effluents from WWTPs is discharged, with two sampling points located just before the confluence between the Oise and Marne rivers and the Seine. These sampling points were selected in order to understand (i) the influence of urban wastewater discharge from upstream to downstream and (ii) the effect of two tributaries (one upstream and one downstream) on the microbial communities in the surface water of the Seine River.

2. Materials and methods

2.1. Study sites and sampling campaigns

This study is carried out on the Seine, and on the Marne and Oise, two of its main tributaries. The Seine, Marne and Oise are 777, 525 and 341 km long respectively. The Seine is a river with an oceanic rainfall regime, flowing from the south-east to the north-west. The study area is limited to the Paris conurbation on a stretch of the Seine about 110 km long. It has a temperate climate, half continental and half oceanic. The average annual temperature is between 11 and 13°C and the average annual rainfall is about 820 mm/year. The Seine flows through Paris, which is highly urbanised with a high population density. Five sampling sites were selected in the Seine: (i) three upstream of Paris, namely Juvisy-sur-Orge (JSO), Choisy-le-Roi (CLR) and Vitry-sur-Seine (VSS) and (ii) two downstream, namely Bougival (Boug) and Triel-sur-Seine (TSS) (Fig. 1). One sampling point, Champigny-sur-Marne (CSM), was selected in the Marne and one point, Conflans-Sainte-Honorine (CSH), in the Oise, before the confluence with the Seine. Four sampling campaigns were carried out during four

consecutive seasons: spring (April 2021), summer (July 2021), autumn (November 2021) and winter (January 2022).

Water samples were collected in triplicates at a depth of approximately 50 cm, mixed and homogenised to form a single sample. The collected water was then transferred to sterile bottles pre-rinsed with the sampled water. The samples were stored at 4°C before being transported to the laboratory for the various analyses.

2.2. Physicochemical and hydrometeorological parameters

Parameters including temperature, pH and electrical conductivity (EC) were measured on site after sampling collection using a HACH multi-parameter probe (sensION+, Hach Company, Germany). The 5-day biochemical oxygen demand (BOD5) and the chemical oxygen demand (COD) were measured according to the NF EN 1899-2 and NF T 90-101, standards respectively. Dissolved organic carbon (DOC) was measured according to NF EN 1484. Ammonium (NH₄⁺), nitrite (NO₂⁻) and nitrate (NO₃⁻) concentrations were quantified according to NF EN ISO 11732, NF EN ISO 10304-1 and NF EN ISO 10304-1 respectively. Orthophosphates (PO₄³⁻) were quantified according to NF EN ISO 6878. Total suspended solids (TSS) were measured by gravimetric analysis. The hydrometeorological parameters taken into account include the flow of the Seine from the records of the Vigicrues monitoring stations in France (<https://www.vigicrues.gouv.fr/>), the ambient air temperature and relative humidity from Infoclimat stations (<https://www.infoclimat.fr/>).

2.3. Bacterial abundance

The number of bacterial cells in water samples was determined using an automated flow cytometer (FCM), BactoSense (bNovate, Swiss), according to the recommendations provided. Homogenised water samples (2 ml) were transferred to a plastic screw-capped microtube (bNovate, Swiss) for use in the cytometer. An aliquot (260 µl) of the sample was automatically aspirated by the instrument. 90 µl was used for the analysis and 150 µl for instrument clean. A cleaning step was performed before and after each measurement. Each sample was measured in three replicates. The bottled water (Vittel, France) was used as a standard to check the status of the BactoSense for every five measurements. The collected aliquot is labelled with SYBR Green I and PI and incubated at 37°C for 10 minutes before counting. The automation of the process ensures reproducible measurements for all samples.

The raw FCM data files were then analysed using custom software that allowed batch processing of the large data sets generated in this study. In brief, FCM gates were constructed to separate signals from labelled cells (total cell concentration, TCC) from signals from the background and to distinguish between intact cells and cells with altered membranes using two fluorochromes SYBR Green 1 and propidium iodide (PI). SYBR Green 1 (FL1 channel at 525 nm) is a marker that can penetrate all cells regardless of the integrity of the cell membrane; whereas PI (FL3 channel at 721 nm) can only penetrate cells with damaged membranes.

2.4. Bacterial diversity and composition

2.4.1. DNA Extraction, Amplification, and Illumina sequencing

To collect the microorganisms, water samples (500 ml) were filtered through a vacuum pump system with 0.22 µm nitrate-cellulose Whatman filters (Sartorius, France) in a PSM (microbiological safety cabinet, BIOII, ADS Laminaire, France). The vacuum pump system and the filters were sterilised at 121°C for 21 min. After filtration, the filters containing the microorganisms were placed in labelled sterile Petri dishes under the flow hood for 30 min to dry. DNA was extracted directly from these filters using the DNeasy PowerWater Kit (QIAGEN) according to the manufacturer's instructions. The amount of genomic DNA was assessed on a 1% agarose gel and quantified with Quant-iT™ PicoGreen ds DNA Kit according to the manufacturer's instructions and rapidly stored at -20°C for future analysis.

Bacterial 16S rRNA gene libraries were constructed using the “16S metagenomic sequencing library preparation” protocol provided by Illumina for the Illumina MiSeq system. The V3–V4

variable regions of the 16S rRNA gene of the bacterial communities were amplified using the forward primer (5'-TAC GGG AGG CAG CAG-3') (Turner et al., 1999) and the reverse primer (5'-CCA GGG TAT CTA ATC C-3'). Each primer set contains the Illumina adapter sequence: forward primer target sequence (5'- ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT-3') and reverse primer target sequence (5'- GACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT-3'). PCR conditions were as follows: 94°C for 5 min, 30 cycles of 94°C for 30 s, 54°C for 30 s, 72°C for 45 s, and finally 72°C for 10 min. DNA amplification was verified by agarose gel electrophoresis (1.5%). DNA purity and concentration were assessed using Nanodrop ND-1000 (Thermo-Fisher Scientific). Amplified DNA was purified using the QIAquick96 PCR Purification Kit (Qiagen, CA) according to the manufacturer's instructions. Purified amplicons were normalised to 120 ng/μl in a new low-retention microtube prior to sequencing. The amplified DNA was sequenced on a 2x250 paired-end Illumina MiSeq platform by Eurofins Genomics (Germany) on an Illumina MiSeq platform according to standard protocols. The raw sequence data were deposited in the NCBI Sequence Read Archive under the BioProject PRJNA996616.

2.4.2. Data processing and analysis

The raw sequences (.fastq) of the samples sequenced by Eurofins (Germany) were imported into the FROGS pipeline (Find Rapidly OTU with Galaxy Solution) implemented on a galaxy instance (v.2.3.0) (<http://sigenae-workbench.toulouse.inra.fr/galaxy/>). Pair-end reads were merged using the software FLASH (v1.2.6) with an average merging rate of 98% (Magoč and Salzberg, 2011). Barcode and primer sequences were removed using cutadapt (Martin, 2011). Sequences were then clustered into operational taxonomic units (OTUs) using SWARM (Mahé et al., 2014), which generates the OTU abundance table, where an OTU is defined at the 97% sequence similarity level. Chimeras were removed using the VSEARCH tool (Rognes et al., 2016). The taxonomic assignment of each OTU was performed using the BLAST tool against with the database SILVA-132 16S rRNA (Quast et al., 2013). The Shannon index and the Chao1 index were calculated to estimate alphadiversity. The Shannon index was used to estimate species richness and evenness, while the Chao1 index provides an estimate of species richness based on abundance.

From the data obtained by 16S RNA sequencing, it is possible to predict the functions of the different bacteria identified. Gene prediction is performed using PICRUSt (Phylogenetic Investigation of Communities by Reconstruction of Unobserved States) to estimate the gene families contributing to the bacterial metagenome. PICRUSt will correlate phylogeny with function. The abundance of the different genes identified will be analysed using KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes). A metabolic pathway is a set of chemical reactions that lead either to the synthesis of a molecule (known as anabolism) or to its degradation (catabolism). The enzymes involved in each metabolic pathway are grouped together in the KEGG pathway tool. These pathways are organised into six major groups (known as level 1): metabolism (of sugars, lipids, carbohydrates, etc.), processing of genetic information (transcription, translation, DNA repair).

2.5. Statistical analysis

Before carrying out the various analyses to test for significant differences between treatments, the normality of the data matrices was tested using the Kolmogorov Smirnov test implemented in the R-3.6.1 software (France).

In order to evaluate the surface water quality of the Seine River and its tributaries, the Marne and the Oise, over time, we compared our physico-chemical data with the data collected over the last 10 years (from 2012 to 2022) by a permanent measuring system installed onsite by the Siaap as part of the MeSeine measuring network.

Differences between the physical and chemical parameters, the relative abundance of microbial cells, and the alphadiversity index were analysed by one-way Anova (Fisher's post hoc test) with a 95% confidence interval.

To visualise the spatio-temporal effect on physico-chemical characteristics, a PCA was performed by R software. A permutation test was used to determine whether the differences observed between the modality were large enough to reject the null hypothesis. Values were considered different if the probability of a null hypothesis was less than 0.05. Finally, a Spearman correlation test was performed between these physico-chemical parameters and the climatic conditions in order to establish statistical relationships.

3. Results

Physical–chemical properties of surface water

The values of the physico-chemical parameters are shown in [Table 1S](#). The mean surface water temperature was 5.2°C in winter and 21.1°C in summer, and two-way Anova analysis showed significant differences in water temperature between seasons, but not between sites ([Table 1](#)). pH values varied slightly between 7.7 and 8.3, with the highest value measured at JSO in autumn, and no significant spatio-temporal differences were found. Conductivity values ranged from 472 to 696 $\mu\text{S}/\text{cm}$ with high values at CSH, a tributary of the Seine, and showed a significant difference between sites. Expressed nitrogen concentrations in the water varied between 0.03 and 0.33 mg/l for NH_4^+ , 0.03 and 0.54 mg/l for NO_2^- and 16.1 and 29.3 mg/l for NO_3^- . The highest nitrogen concentrations are measured at TSS downstream of the Paris conurbation and there were no significant spatial or temporal variations. However, the concentration of NO_3^- was significantly higher in the Seine than in its tributaries. The concentration of PO_4^{3-} varied between 0.01 and 0.4 mg/l, with low values in spring and high values in summer. COD, which ranged from 2 to 15.1 mg/l, was only significantly different between seasons, with the lowest values measured in autumn, while BOD, which ranged from 0.9 to 5.1 mg/l, showed no spatial or temporal variation. The TSS content ranged from 2 to 23 mg/l and varied significantly between seasons, with a significant increase in winter.

To assess water quantity, we compared our physico-chemical data with data collected over the last 10 years (from 2012 to 2022) by a permanent measurement system installed on site. The comparison is made site-by-site and season-by-season. The results for the Bougival site, used as a model, are shown in [Fig. 2](#). For all sites, the results obtained for these 4 seasons were representative and consistent with the results obtained over the long-term monitoring period by a permanent measuring system installed on site.

A principal component analysis (PCA) of these physico-chemical parameters was carried out for all sites and 4 seasons ([Fig. 3](#)). The results showed that there was no significant difference between the Seine and its tributaries, nor between the sampling sites. When comparing between seasons, the summer samples are positioned above axis 2 of [Fig. 3A](#), clearly separated from the other seasons due to the high values of temperature and dissolved organic carbon (DOC).

When comparing the upstream samples (average of JSO, VSS, and CLR sites) with the downstream samples (average of BOUG and TSS sites), significant differences were found for the concentrations of NH_4^+ (* $P < 0.05$), NO_2^- (** $P < 0.01$), DOC (* $P < 0.05$), PO_4^{3-} (* $P < 0.05$), and the conductivity (** $P < 0.001$), with higher values in the downstream than in the upstream samples. Furthermore, to understand the seasonal effect, the analysis of variance was performed on (i) our data and (ii) the data obtained during the long-term monitoring. The results showed that in both cases PO_4^{3-} and NO_3^- concentrations varied significantly between the seasons.

Microbial abundance

Total microbial cells (TTC) and damaged microbial cells (DMC) were quantified in the water samples and shown in [Fig. 4A](#) for TTC and [Fig. 4B](#) for DMC. Total microbial cell counts ranged from 9.0×10^4 to 4.9×10^6 cells/ml. Total microbial cells in winter samples were significantly lower than those in other seasons ([Fig. 4A](#)). The Anova analysis to evaluate the spatio-temporal variation showed that the variation between the Seine and its tributaries was not significant. However, significant differences were observed between seasons (** $p < 0.001$). The number of damaged cell represented

on average 15% of the total microbial cells in spring, summer and autumn, but this value was very high (> 70%) in winter (Fig. 4B).

Diversity and richness analysis of bacterial communities

To study the bacterial communities of 28 samples (7 sites x 4 seasons) from the Seine and its tributaries, Illumina MiSeq sequencing was used to sequence the bacterial 16S rRNA gene V3-V4 regions. After removing low quality sequences and chimeras, an average of 6×10^6 high quality 16S rRNA sequences were obtained. The OTUs were determined to calculate the richness (Chao1), the Shannon's diversity of the microbial communities.

The mean values of Chao1 and Shannon (H) indices ranged from 570 to 3549 and from 3.7 to 5.8, respectively (Fig. 5). When comparing spatial diversity between rivers and between sites, the Chao1 index was similar for all rivers (Seine and its tributaries) and did not vary between upstream and downstream of the Seine in the study area. Nevertheless, the analysis of variance showed a significant variability ($^{***} p < 0.0001$) of the richness according to the seasons, with higher richness in winter and lower richness in spring. The Shannon index, like the Chao1 index, showed only seasonal significant variability, ranging from $H_{\text{spring}} (4.15) < H_{\text{summer}} (5) < H_{\text{autumn}} (5.4) < H_{\text{winter}} (5.6)$.

Composition of bacterial communities

A total of 35 phyla were identified in surface water samples collected at 7 sites along the Seine and its tributaries. Based on relative abundances, the dominant groups (greater than 1% abundance) of each sample are shown in Fig 6. As shown, among them, *Proteobacteria* (62.2%), *Actinobacteriota* (16.5%), *Bacteroidota* (17%) were the most frequently detected phyla in all samples and together accounted for 90 to 95% of the relative abundance. The phyla *Firmicutes* (2.2%), *Cyanobacteria* (0.2%), *Bdellovibrionota* (0.4 %), and *Campilobacterota* (0.5%) constituted between 5 and 10% of the abundance.

In terms of spatial variation, there were no significant differences in the relative abundance of these phyla between rivers including the Seine and its two tributaries, the Oise and the Marne nor between upstream (JSO, CLR and VSS) and downstream (BOUG and TSS) samples of the Seine. In particular, the relative abundance of *Firmicutes* was significantly higher in downstream samples than in upstream samples.

With regard to temporal variation, the main phyla were similar at all sites. In spring the most dominant phyla were *Proteobacteria* (55.7%), *Actinobacteriota* (42.4%) and *Firmicutes* (1.2%), whereas in summer *Proteobacteria* (75.9%), *Actinobacteriota* (8%) and *Bacteroidota* (13.4%) were dominant. As in summer, the most abundant bacterial phyla in autumn are *Proteobacteria* (76.0%), *Actinobacteriota* (7.1%) and *Bacteroidota* (15.1%). In winter, *Proteobacteria* (41.9%), *Actinobacteriota* (11.5%) and *Bacteroidota* (37%) are the most abundant phyla. The bacterial composition in winter was characterized by an increase in the abundance of *Bacteroidota* from 15.1 to 37.0% and the presence of *Campylobacterota* (1.6%). An analysis of variance showed a significant variation between the different seasons, but a similarity in abundance between autumn and summer. A decrease in the abundance of *Proteobacteria* was observed in winter, with an increase in *Bacteroidota*. On the other hand, a higher abundance of *Firmicutes* and *Campylobacterota* was observed. Spring is characterised by an abundance of *Actinobacteriota*. The variations in the abundance of the bacterial phyla were more pronounced from one season to another than from one site to another.

To better explain the structure of the microbial communities in different sites and seasons, the relative abundance and classification of OTUs were analysed at the class and genus level. At the class level, the dominant classes identified were *Alphaproteobacteria* and *Gammaproteobacteria* belonging to *Proteobacteria*, *Actinobacteria* belonging to *Actinobacteriota*, *Bacteroidia* of the *Bacteroidota*, the *Bacili* and *Clostridia* belonging to the *Firmicutes* and the *Campylobacteria*

affiliated with *Campylobacterota* (Fig. 7A). No significant spatial variation is observed between upstream and downstream of Paris, nor between the Seine and its tributaries. However, the abundance of these bacterial classes varied according to the season. In spring, the dominant classes were *Alphaproteobacteria* (55.0%) and *Actinobacteria* (41.4%) with a very low abundance of *Gammaproteobacteria* (0.2%). The most dominant classes in summer and autumn were similar and consisted of *Gammaproteobacteria* while in winter it was the *Bacteroidia* (37%). Higher abundances of *Bacili*, *Clostridia* and *Campylobacteria* were observed in winter.

At the level of the bacterial genera, *Brevundimonas*, *Sphingomonas*, *Flavobacterium*, *Methylothermobacter* were the most dominant (Fig. 7B). The abundance of these dominant phyla did not show any spatial variation between the Seine and its tributaries, nor between upstream and downstream samples. However, some genera such as *Zoogloea*, *Methylothermobacter* and *Comamonas* were more abundant in the downstream than in the upstream waters of the Paris agglomeration. Significant seasonal variation was observed. The dominant genera identified were *Brevundimonas*, *Sphingomonas*, *Nocardioideae*, *Novosphingobium* in spring, and *Brevundimonas*, *Sphingorhabdus*, *Flavobacterium*, and *Methylothermobacter* in summer. *Novosphingobium*, *Flavobacterium*, *Methylothermobacter*, *Pseudomonas*, *Limnolobos*, OM43 clade dominated in autumn; *Flavobacterium*, *Rhodospirillum rubrum*, *Limnolobos*, *Pseudarcicella*, and *Fluviicola* dominated in winter.

Functional predictions of bacterial communities

PICTUST analysis indicated that the major functional gene families were related to metabolism (~80%), genetic information processing (11%), cellular processes (4%) and computational processing for all sites, regardless of season (Fig. 8). At level 2 of the KEGG pathways, metabolic functions included carbohydrates, amino acids, cofactors and vitamins, terpenoids and polyketides, lipids, energy, xenobiotic metabolism and degradation; membrane transport and cell motility, growth and death (Fig. 8). The relative abundance of genes related to these functions did not show significant variation between upstream and downstream waters of the Seine, nor between rivers, but did differ significantly between seasons (**P<0.001) in the Seine. Furthermore, 0.2% of the bacterial genes were associated with human infectious diseases of the parasitic and bacterial type, with 0.11% of parasitic infections in summer and 0.08% in the other seasons.

Correlations between microbial community properties and environmental factors

RDA analysis was performed to determine the potential relationships between the bacterial community and physicochemical properties at the phyla level (Fig. 9A) and genus level (Fig. 9B). At the phylum level, the results showed that air temperature, chemical oxygen demand, and total suspended organic matter were the factors that significantly influenced community composition. *Proteobacteria*, *Cyanobacteria* and *Bdellovibrionota* were characterised by temperature and chemical oxygen demand, while *Firmicutes* and *Campylobacterota* were correlated with NO₃⁻ concentration. At the genus level, temperature, PO₄³⁻, TSS, NO₃⁻, and DOC were the main factors that significantly influenced the community composition.

Spearman's correlation test was further conducted to examine the correlations between the physicochemical properties, and microbial community characteristics, including microbial abundance, alpha diversity indices and relative abundance of dominant phyla and class had close relationships (Table 2). Microbial abundance was positively correlated with dissolved organic carbon (*p<0.01) and air temperature (**p<0.05) and negatively correlated with NO₃⁻ concentration (*p<0.01). In the relationship between physicochemical properties and alpha diversity indices, air temperature showed a negative correlation with Chao1 and Shannon, while suspended organic matter concentration showed a negative correlation with air temperature. At the phyla level, the relative abundance of *Proteobacteria* was positively correlated with temperature (**p<0.05), PO₄³⁻ concentration (*p<0.01) and chemical oxygen demand (*p<0.01), but negatively correlated with NO₃⁻ (**p<0.05). The relative abundance of predicted genes involved in amino acid, carbohydrate and terpenoids/polyketides metabolism was positively correlated with NO₃⁻ and negatively correlated

with PO_4^{3-} and dissolved organic carbon. We also observed that the relative abundance of genes identified for infectious diseases of bacterial origin was positively correlated with biochemical oxygen demand ($^{**}p < 0.05$) and negatively correlated with water temperature.

Correlations between the relative abundance of microbial community at the phyla level and the relative abundance of functional genes

Spearman's correlation test was performed to examine the relationships between the relative abundance of microbial composition at the phyla level and the relative abundance of functional genes predicted in the KEGG pathway analysis (Table 3). A positive correlation was observed between the relative abundance of genes identified for infectious diseases of bacterial origin and the abundance of *Campilobacterota* ($^{**}p < 0.05$), *Firmicutes* ($^*p < 0.01$), and *Bacteroidota* ($^{**}p < 0.05$) was found. Furthermore, the abundance of *Actinobacteria* was positively correlated with amino acid, carbohydrate, polyketide and terpenoid metabolism, xenobiotic biodegradation, but negatively correlated with vitamin and cofactor metabolism. An inverse relationship was observed between these metabolites and the abundance of *Proteobacteria*. Bacteridota was positively correlated ($^{***}p < 0.001$) with glycan biosynthesis and metabolism.

4. Discussion

River ecosystems are known to play an important role in urban ecosystem services and surface freshwater remains an important source for human needs, including drinking water, irrigation and potentially swimming (Garcia et al., 2016; Rietveld et al., 2016). River ecosystems also act as a receiving environment for discharges from wastewater treatment plants (WWTPs). The Seine in France, an urban river at the scale of the Paris agglomeration with a population of 10 million Parisians (2020), is one of the rivers undergone the highest pressure from human activities in the world (Flipo et al., 2021). Despite the implementation of various types of wastewater treatment, biotic and abiotic pollutants are still present in the effluents before they are discharged into the environment. We assume that over time this could directly or indirectly lead to differences in the physicochemical properties of surface water. It is therefore important to control the physico-chemical properties of surface water of the the Seine overtime. The results showed that the physico-chemical properties of the surface water have remained stable over the last 10 years. They were also similar to the results published for other rivers in the world. The pH of the surface water of the Seine was around 8.0, which was similar to the values of 7.8 and 8.3 of the Qing, Yongding Rivers in China, respectively (Li et al., 2022; Zhao et al., 2022). The average concentration of nitrate-nitrogen in the surface water of the Seine was about 22 mg/l, which was similar to the results (19.7 mg/l) found in the Yellow River Delta studied by (Lv et al., 2016). The average concentrations of nitrogen-ammonium (0.18 mg/l) and phosphorus-orthophosphate (0.29 mg/l) in the surface water of the Seine at five sampling sites were similar to those of the water of the Maozhou River in China at three sampling sites. However, the average concentration of NH_4^+ and its variability between the samples (from 0.03 to 0.33 mg/l) for Seine River was lower than for the Maozhou River (0.02 to 18.5 mg/l) (Ouyang et al., 2020). This can be explained by the fact that the quality of the effluent discharged from the different WWTPs into Maozhou River was not well controlled or that the effluent was not treated at some sampling points before discharge into the Maozhou River (Ouyang et al., 2020). Although no difference was observed between the sampling sites, the concentrations of N-NH_4^+ ($^*p < 0.05$), N-NO_2^- ($^{**}p < 0.01$), and P-PO_4^{3-} ($^*p < 0.05$) were higher in the upstream water than in the downstream water of the Seine due to accumulation from upstream to downstream. This phenomenon was also observed in the case of the Maozhou River (Ouyang et al., 2020). With regard to the variability of physico-chemical properties between seasons, water/air temperature and water flow were the key factors that could lead to changes in other parameters such as the concentration of N-NO_3^- , N-NH_4^+ and total suspended solids.

Water microbes are important in ensuring and maintaining the ecological processes of river ecosystems. Greater microbial diversity is thought to provide better ecosystem defence and resilience to disturbance. Microbial diversity can therefore serve as a good indicator of the health status of river ecosystems (Zinger et al., 2012). Changes in environmental factors can strongly influence microbial

abundance and composition/diversity. Here, we investigated surface water microbial communities at five sites along the Seine River at the scale of the Paris conurbation and one site at each tributary, including the Marne and Oise Rivers, during four seasons in 2021. The microbial abundance of the Seine water was analysed using a new automated system of flow cytometry which allows us to distinguish damaged cells from intact cells. The total number of cells in the Seine water was in the order of 10^6 cells/ml. This result was similar to the observation made by (George et al., 2012) in the PIREN-Seine programme for the water of the Marnay, Bougival and Triel sampling sites. Furthermore, the microbial abundance in the Seine water was also similar to that reported for the Wensum River in England (Albaggar, 2014) from 0.21 to $5.34 \cdot 10^6$ cells/ml depending on the sampling sites and for the Lancang River in China (Luo et al., 2019) between 0.25 and $0.5 \cdot 10^6$ cells/ml depending on the seasons. In terms of microbial diversity, the diversity of bacterial communities was investigated using Illumina high-throughput sequencing technology. To our knowledge, this is one of the first studies to characterise the microbial community in the surface water of the Seine using NGS technique. The dominant phyla found in the Seine water were *Proteobacteria*, *Actinobacteriota*, *Firmicutes*, *Bacteroidota*, *Cyanobacteria*, *Bdellovibrionota*, and *Campilobacterota* which were also identified in other urban river waters (Liu et al., 2013; Mai et al., 2018; Ouyang et al., 2020; Savio et al., 2015; Staley et al., 2013; Wang et al., 2023). These results showed that the surface water of the Seine shared the characteristic profile of high bacterial rank, commonly found in other river ecosystems. This seems logical, as these dominant phyla for each phylum play a different role in maintaining good functioning in the river ecosystem. Among them, *Proteobacteria* bacteria occupied more than 60% of the relative abundance of the whole community. These bacteria are widely distributed in various environments, and most *Proteobacteria* play an important role in organic matter degradation, with rapid growth in nutrient-rich environments (Goetghebuer, 2019; Sun et al., 2017; Wang et al., 2018, 2012). Meanwhile, the *Actinobacteriota* group has been confirmed to play an important role in the carbon cycle of aquatic ecosystems (Mikhailov et al., 2019). However, the relative abundance of these phyla may vary depending on environmental conditions in space and time.

Spatial variation

A high degree of similarity in microbial abundance, diversity indices (Chao1 and Shannon) and taxonomic level characteristics was observed between different sampling sites along the Seine river with a length of 110 km, between the Seine river and its tributaries including Marne and Oise. This observation suggested that effluents from the wastewater treatment plants have no impact on the quality and quantity of the microbial community in the Seine. According to our knowledge, the effluents were well controlled for all physico-chemical parameters before being discharged into the Seine. Only *Firmicutes*, its relative abundance was significantly higher in downstream samples than in upstream samples. The *Firmicutes* group is well known for its many members capable of degrading highly recalcitrant organic compounds (Köchling et al., 2017). The physicochemical data showed that the content of NH_4^+ , NO_2^- , PO_4^{3-} , and DOC was higher in downstream samples than in upstream samples due to the phenomenon of accumulation from upstream to downstream, which has been observed in a variety of ecosystems (Gücker et al., 2006; Marti et al., 2004; Spänhoff et al., 2007; Waiser et al., 2011). Furthermore, RDA showed that the abundance of the *Firmicutes* group at phyla and genus level was positively correlated with the concentration of NO_3^- , PO_4^{3-} , TSS, NO_3^- , and DOC (Fig. 9A and B). This observation was similar to the previous work, suggesting that as copiotrophs or fast-growing organisms. In deed, the *Firmicutes* group can exist in nutrient-rich environments that meet their high energy requirements and sustain their growth rates (Rebollar et al., 2017). Another brief observation concerning the genus *Flaviobacterium*, belonging to the phylum *Bacteroidota*, is a heterotrophic organism common in surface waters and involved in the degradation of organic matter (Wang et al., 2023). The relative abundance of *Flaviobacterium* was quantified to be up to 20% at the Juvisy-sur-Orge during the summer and was significantly higher than at the other sites. The reason for this is that the Seine at the JSO site, which is well upstream of the Paris conurbation, probably receives untreated water and/or poorly treated effluent, and thus the high organic matter content

favours the development of this bacterium. The positive correlation between the abundance of this bacterium and the concentration of organic matter was highlighted to support this observation.

Temporal variation

Regarding the seasonal variation of microbial communities in the river, many studies have been conducted on this topic. Several studies indicated that the effects of seasons on microbial composition were greater than those of location (Li et al., 2019; Zhu et al., 2019). Changes in temperature were found to be the most influential driver in determining the microbial structure of the Ganjiang River (Wang et al., 2016). The same is true in our case. The microbial community of the Seine River appeared to be very similar between sampling sites, but varied depending on the season.

Firstly, the variation of diversity indices according to the season was observed. The Shannon and Chao1 indices were higher in winter than in other seasons, which was consistent with the results observed by (Wang et al., 2023) in the Fuhe urban river and by (Mai et al., 2018) in the Pearl urban river. These authors have highlighted the fact that temperature is the main factor influencing the bacterial composition of water (Crump and Hobbie, 2005; Sun et al., 2017). The increase in temperature over the last decade has been remarkable and may have an impact on bacterial communities. Microorganisms may prefer low temperatures to high temperature.

As the most dominant phylum in all samples, the *Proteobacteria* group is usually one of the most important prokaryotes in water, and has shown a variation in relative abundance depending on the season. We observed that their relative abundance increased from spring to summer, and remained stable between summer and autumn, and then decreased during winter. In fact, previous studies (Wang et al., 2021; Yan et al., 2015) have shown that the *Proteobacteria* group consists of heterotrophic bacteria that thrive at high temperatures and in nitrate-rich environments. This could be explained by the high relative abundance of this group in summer and autumn compared to spring and winter in the Seine River water. This observation is consistent with Spearman's correlation test, which showed a significant correlation between their relative abundance with temperature and the concentration of nitrogen-NO₃⁻, and COD (Fig. 9). Further analysis showed that at the class level, the *Proteobacteria* group was divided into two dominant classes, *Gammaproteobacteria* and *Alphaproteobacteria*, with *Alphaproteobacteria* being the most abundant class in the Seine River and no class detected for *Betaproteobacteria*. This observation contradicts the results of previous work on the Donjiang River in China, where *Betaproteobacteria* were found to be a major and abundant class of *Proteobacteria* (Liu et al., 2012; Sun et al., 2017) and this class was considered to be a typical surface water clade. Several hypotheses have been put forward to explain the absence of *Betaproteobacteria* in favour of the high abundance of *Alphaproteobacteria* and *Gammaproteobacteria* in the Seine. Firstly, environmental parameters play a role in this selection, as *Alphaproteobacteria* and *Gammaproteobacteria* prefer salt water, which is not the case for *Betaproteobacteria* (Newton et al., 2011; Sun et al., 2017). Moreover, selection pressures may also explain this observation. In general, *Betaproteobacteria* are fast growing, nutrient loving and highly vulnerable to predation pressure, meanwhile, *Alphaproteobacteria* members are known to be resistant to predation, competitive under conditions of low nutrient and capable of recalcitrant organic compounds such as humic substances (Sun et al., 2017). As the Seine water is low in nutrients, and probably degrades recalcitrant organic compounds remaining in the effluent from the wastewater treatment plant, *Alphaproteobacteria* have been able to resist and proliferate. This hypothesis can be confirmed by the presence of the genus *Novosphingobium*, *Sphingobium* and *Sphingomonas*, two members of the *Alphaproteobacteria* (Fig. 7), which are known to degrade a variety of slowly degradable complex organic compounds such as polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), phthalate esters, aromatic hydrocarbons and dibenzofurans (Jezberová et al., 2010; Suzuki and Hiraishi, 2007; Zylstra and Kim, 1997). In spring, the relative abundance of *Alphaproteobacteria* was higher than that of *Gammaproteobacteria*. However, for other seasons, this trend was reversed with higher relative abundance of *Gammaproteobacteria* than *Alphaproteobacteria*. Changes in the proportion of relative abundance between two dominant classes differed between seasons and depending on the

river. In the study realised by (Sun et al., 2017), the relative abundance of *Alphaproteobacteria* was higher than *Gammaproteobacteria* in both dry and wet seasons in Dongjiang River. However, these two classes were found in equal proportions in the study of (Liu et al., 2012) in the same river but not in the same study year. The high abundance of *Alphaproteobacteria* in spring was probably due to the ability of members of *Alphaproteobacteria* to form filaments and aggregates during winter (Newton et al., 2011), and then develop from spring onwards. The high relative abundance of *Alphaproteobacteria* was due to the high relative abundance of *Brevundimonas*. The relative abundance of this genus decreased in summer and again in autumn and winter. This could be explained by the proliferation of cyanobacteria in the water. *Brevundimonas* is known to interact strongly with cyanobacterial blooms that developed well during the summer (Berg et al., 2009). In our sample, cyanobacteria were detected during the summer at low relative abundance. This may be due to the sampling method. *Cyanobacteria* tend to live on the surface, whereas the Seine water samples were taken from greater depths. Many members of the group *Gammaproteobacteria* originate from anthropogenic or zoonotic sources and are widely considered to be transient passengers (Newton et al., 2011; Sun et al., 2017) and may have been transported by the WWTP in our case. Members of the order *Enterobacteriales* (family *Enterobacteriaceae*, class *Gammaproteobacteria*) are often used as bioindicators to monitor pollutants in surface waters (Stoeckel and Harwood, 2007) and were not detected in the Seine, suggesting that the river is generally maintained in good water quality.

The *Actinobacteriota* consisted mainly of the *Actinobacteria* group, whose relative abundance was high in spring and decreased from summer to winter. This group has the ability to exploit nitrogen sources due to an overrepresentation of nucleic and amino acid incorporation pathways such as arginine, leucine, and thymidine (Newton et al., 2011). Indeed, in our study, positive correlations were found between the abundance of *Actinobacteriota* and the abundance of genes related to the functions of amine acid metabolism, carbohydrate metabolism, polyketides and terpenoids metabolism and membrane transport (Table 3). In the work of (Park and Kwon, 2018), *Actinobacteriota* are the synthesizers of polyketides and terpenoids. However, increasing nutrient content in the environment selects against the members of *Actinobacteria*. This observation is consistent with Spearman's correlation test, which showed a significant positive correlation between their abundance and nitrogen-NO₃⁻ and a negative correlation between their abundance and PO₄³⁻ and dissolved organic carbon. This result was consistent with those obtained in the other works of (Ouyang et al., 2020; Wang et al., 2023). Furthermore, the decrease in *Actinobacteria* abundance in summer could be explained by higher nutrient levels in summer or by competition from other phyla that grow rapidly in summer, such as the *Proteobacteria* group.

The phylum *Bacteroidota* mainly comprises the class *Bacteroidia*, and many members of this group play an important role in the degradation of complex biopolymer loads and dissolved organic carbon inputs from cyanobacterial blooms (Newton et al., 2011). As a result, they can often be used to understand top-down control in freshwater environments (Güde, 1989). In general, the abundance of the *Bacteroidota* group is strongly dependent on cyanobacterial blooms and organic matter, with an increase in abundance observed during summer when high cyanobacterial blooms occurred. However, in our study, *Bacteroidota* was less abundant in summer and autumn than in winter, and was absent in spring. Our hypothesis is that the river has natural mechanisms (*e.i.* top-down control) to control the presence of different types of microorganisms to keep the system in equilibrium.

The same observation was made for the phylum *Firmicutes*, whose relative abundant in winter (> 7%) was higher than in other seasons (< 1%). According to (Wu et al., 2015), the high abundance of *Firmicutes* in winter can be explained by its ability to adapt to low temperatures, as this group includes many members that are heat-sensitive bacteria and can survive at low temperatures. The strong negative correlation between the abundance of this phylum and temperature may support this observation.

Functional predictions of bacterial communities

Bacterial gene functions in the Seine surface water were predicted using the PICRUST algorithm and annotated from the KEGG databases at level 2 (Fig. 8). Amino acid metabolism, carbohydrate metabolism and vitamin and cofactor metabolism were the top three functions of the microbial community in the Seine surface water, similar to the results obtained by (Wang et al., 2023) for the Fuhe River in Jiangxi province, China. They also processed the ability to perform polyketide and terpenoid metabolism, xenobiotic biodegradation and metabolism, glycan biosynthesis, energy metabolism, metabolism of other amino acid as well as nucleotide metabolism. The results of the spatial-temporal variation using two-ways Anova analysis showed significant seasonal variations in the abundance of these genes whose functions are predicted. In spring and summer, the relative abundance of genes related to cofactor and vitamin metabolism, infectious diseases of both bacterial and parasitic origin, and cell mobility, growth and mortality were higher than in autumn and winter. There was also an enrichment of genes related to carbohydrates, energy metabolism, amino acids, terpenoids and polyketides in winter compared to summer, and a decrease in membrane transport and cell mobility. This observation is consistent with those obtained by (Wang et al., 2023) and contrary to those obtained by (Mai et al., 2018) for microbial communities in the waters of the Pearl urban river in China. This could be explained by the stress caused by variation in environmental conditions, which creates competition among the microbial communities present (Lv et al., 2016). A small abundance of genes related to infectious diseases of both bacterial and parasitic origin was found, and they were positively correlated with the abundance of *Campilobacterota*, *Firmicutes*, and *Bacteroidota*. These microbial groups were composed of bacteria that can be pathogenic.

5. Conclusions

The development of NGS technology has improved our knowledge of the evolution of microbial communities in the Seine. This is the first study to characterise the microbial composition/diversity of the Seine surface water, taking into account the spatial effect, including the tributaries, and from upstream to downstream of the Paris conurbation, and the temporal aspect, with the 4 seasons. Overall, the microbial community did not change at the spatial scale (except for some minor differences between upstream and downstream), but did vary according to the season. The main phyla making up the surface water microbiome were *Proteobacteria*, *Actinobacteriota*, *Firmicutes*, *Bacteroidota*, and other minor phyla such as *Deinococcota*, *Patescibacteria*, *Gemmatimonadota*, *Cyanobacteria*, *Bdellovibrionota*, *Acidobacteriota*, *Campilobacterota*, *Myxococcota*, and *Desulfobacterota*. The main factors influencing this microbiome were temperature, nitrate and orthophosphate concentrations, and total organic carbon. The key functions predicted for the bacterial communities were related to cellular metabolism, in particular carbohydrates, amino acids, lipids, energy, vitamins and cofactors, and cellular mobility.

The results of the present study will provide a reference database on the microbial diversity of the Seine, which will serve as a basis for comparison when the new technology of disinfection with performic acid is installed as tertiary treatment in the wastewater treatment plants managed by the SIAAP in the near future.

References

- Albargar, A.K.A., 2014. Investigation of bacterial community composition and abundance in a lowland arable catchment.
- Berg, K.A., Lyra, C., Sivonen, K., Paulin, L., Suomalainen, S., Tuomi, P., Rapala, J., 2009. High diversity of cultivable heterotrophic bacteria in association with cyanobacterial water blooms. *ISME J.* 3, 314–325. <https://doi.org/10.1038/ismej.2008.110>
- Billen, G., 2009. Le bassin de la Seine: découvrir les fonctions et les services rendus par le système Seine, Programme PIREN-Seine. Agence de l'eau Seine-Normandie, Nanterre.

- Crump, B.C., Hobbie, J.E., 2005. Synchrony and seasonality in bacterioplankton communities of two temperate rivers. *Limnol. Oceanogr.* 50, 1718–1729. <https://doi.org/10.4319/lo.2005.50.6.1718>
- Drury, B., Rosi-Marshall, E., Kelly, J.J., 2013. Wastewater Treatment Effluent Reduces the Abundance and Diversity of Benthic Bacterial Communities in Urban and Suburban Rivers. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 1897–1905. <https://doi.org/10.1128/AEM.03527-12>
- Findlay, S., 2010. Stream microbial ecology. *J. North Am. Benthol. Soc.* 29, 170–181. <https://doi.org/10.1899/09-023.1>
- Flipo, N., Lestel, L., Labadie, P., Meybeck, M., Garnier, J., 2021. Trajectories of the Seine River Basin, in: Flipo, N., Labadie, P., Lestel, L. (Eds.), *The Seine River Basin, The Handbook of Environmental Chemistry*. Springer International Publishing, Cham, pp. 1–28. https://doi.org/10.1007/698_2019_437
- Gao, Y., Wang, C., Zhang, W., Di, P., Yi, N., Chen, C., 2017. Vertical and horizontal assemblage patterns of bacterial communities in a eutrophic river receiving domestic wastewater in southeast China. *Environ. Pollut.* 230, 469–478. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.06.081>
- Garcia, X., Barceló, D., Comas, J., Corominas, Ll., Hadjimichael, A., Page, T.J., Acuña, V., 2016. Placing ecosystem services at the heart of urban water systems management. *Sci. Total Environ.* 563–564, 1078–1085. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.05.010>
- George, I., Anzil, A., Lanckman, R., Meyer, N., Berthe, T., Petit, F., Fechner, L., Servais, P., 2012. Communautés microbiennes dans les rivières du bassin de la Seine : diversité et lien avec la présence de polluants chimiques. 10.
- Goetghebuer, L., 2019. Les communautés bactériennes de rivières: étude de la dynamique des espèces au sein d'une communauté modèle. Université Libre de Belgique.
- Gücker, B., Brauns, M., Pusch, M.T., 2006. Effects of wastewater treatment plant discharge on ecosystem structure and function of lowland streams, in: *Journal of the North American Benthological Society*. pp. 313–329. [https://doi.org/10.1899/0887-3593\(2006\)25\[313:EOWTPD\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1899/0887-3593(2006)25[313:EOWTPD]2.0.CO;2)
- Güde, H., 1989. The Role of Grazing on Bacteria in Plankton Succession, in: Sommer, U. (Ed.), *Plankton Ecology: Succession in Plankton Communities*, Brock/Springer Series in Contemporary Bioscience. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 337–364. https://doi.org/10.1007/978-3-642-74890-5_9
- Guo, D., Lintern, A., Webb, J.A., Ryu, D., Liu, S., Bende-Michl, U., Leahy, P., Wilson, P., Western, A.W., 2019. Key Factors Affecting Temporal Variability in Stream Water Quality. *Water Resour. Res.* 55, 112–129. <https://doi.org/10.1029/2018WR023370>
- Hooper, D.U., Chapin, F.S., Ewel, J.J., Hector, A., Inchausti, P., Lavorel, S., Lawton, J.H., Lodge, D.M., Loreau, M., Naeem, S., Schmid, B., Setälä, H., Symstad, A.J., Vandermeer, J., Wardle, D.A., 2005. EFFECTS OF BIODIVERSITY ON ECOSYSTEM FUNCTIONING: A CONSENSUS OF CURRENT KNOWLEDGE. *Ecol. Monogr.* 75, 3–35. <https://doi.org/10.1890/04-0922>
- Jezberová, J., Jezbera, J., Brandt, U., Lindström, E.S., Langenheder, S., Hahn, M.W., 2010. Ubiquity of *Polynucleobacter necessarius* ssp. *asymbioticus* in lentic freshwater habitats of a heterogeneous 2000 km area. *Environ. Microbiol.* 12, 658–669. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.02106.x>
- Jin, Q., Kirk, M.F., 2018. pH as a Primary Control in Environmental Microbiology: 1. Thermodynamic Perspective. *Front Env. Sci* 6, 21. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2018.00021>

- Köchling, T., Sanz, J.L., Galdino, L., Florencio, L., Kato, M.T., 2017. Impact of pollution on the microbial diversity of a tropical river in an urbanized region of northeastern Brazil. *Int. Microbiol. Off. J. Span. Soc. Microbiol.* 20, 11–24. <https://doi.org/10.2436/20.1501.01.281>
- Li, J., Sun, Y., Zhang, X., Pan, C., Zhang, S., Zheng, B., 2022. Water Quality and Microbial Community in the Context of Ecological Restoration: A Case Study of the Yongding River, Beijing, China. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 19, 13056. <https://doi.org/10.3390/ijerph192013056>
- Li, Y., Gao, Y., Zhang, W., Wang, C., Wang, P., Niu, L., Wu, H., 2019. Homogeneous selection dominates the microbial community assembly in the sediment of the Three Gorges Reservoir. *Sci. Total Environ.* 690, 50–60. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.07.014>
- Liu, L., Yang, J., Yu, X., Chen, G., Yu, Z., 2013. Patterns in the Composition of Microbial Communities from a Subtropical River: Effects of Environmental, Spatial and Temporal Factors. *PLoS ONE* 8, e81232. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0081232>
- Liu, Z., Huang, S., Sun, G., Xu, Z., Xu, M., 2012. Phylogenetic diversity, composition and distribution of bacterioplankton community in the Dongjiang River, China. *FEMS Microbiol Ecol* 80, 30–44. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2011.01268.x>
- Luo, X., Xiang, X., Huang, G., Song, X., Wang, P., Fu, K., 2019. Bacterial Abundance and Physicochemical Characteristics of Water and Sediment Associated with Hydroelectric Dam on the Lancang River China. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 16, 2031. <https://doi.org/10.3390/ijerph16112031>
- Luo, Y., Guo, W., Ngo, H.H., Nghiem, L.D., Hai, F.I., Zhang, J., Liang, S., Wang, X.C., 2014. A review on the occurrence of micropollutants in the aquatic environment and their fate and removal during wastewater treatment. *Sci. Total Environ.* 473–474, 619–641. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.12.065>
- lv, X., Ma, B., Yu, J., Chang, S.X., Xu, J., Li, Y., Wang, G., Han, G., Bo, G., Chu, X., 2016. Bacterial community structure and function shift along a successional series of tidal flats in the Yellow River Delta. *Sci. Rep.* 6, 36550. <https://doi.org/10.1038/srep36550>
- Ma, L., Mao, G., Liu, J., Gao, G., Zou, C., Bartlam, M.G., Wang, Y., 2016. Spatial-Temporal Changes of Bacterioplankton Community along an Exhorheic River. *Front Microbiol* 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00250>
- Magoč, T., Salzberg, S.L., 2011. FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies. *Bioinforma. Oxf. Engl.* 27, 2957–2963. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr507>
- Mahé, F., Rognes, T., Quince, C., de Vargas, C., Dunthorn, M., 2014. Swarm: robust and fast clustering method for amplicon-based studies. *PeerJ* 2, e593. <https://doi.org/10.7717/peerj.593>
- Mai, Y., Lai, Z., Li, X., Peng, S., Wang, C., 2018. Structural and functional shifts of bacterioplanktonic communities associated with spatiotemporal gradients in river outlets of the subtropical Pearl River Estuary, South China. *Mar. Pollut. Bull.* 136, 309–321. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2018.09.013>
- Marti, E., Aumatell, J., Godé, L., Poch, M., Sabater, F., 2004. Nutrient retention efficiency in streams receiving inputs from wastewater treatment plants. *J. Environ. Qual.* 33, 285–293. <https://doi.org/10.2134/jeq2004.2850>
- Martin, M., 2011. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads 3.
- Mikhailov, I.S., Zakharova, Y.R., Bukin, Y.S., Galachyants, Y.P., Petrova, D.P., Sakirko, M.V., Likhoshway, Y.V., 2019. Co-occurrence Networks Among Bacteria and Microbial

- Eukaryotes of Lake Baikal During a Spring Phytoplankton Bloom. *Microb. Ecol.* 77, 96–109. <https://doi.org/10.1007/s00248-018-1212-2>
- Newton, R.J., Jones, S.E., Eiler, A., McMahon, K.D., Bertilsson, S., 2011. A Guide to the Natural History of Freshwater Lake Bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 75, 14–49. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00028-10>
- Ouyang, L., Chen, H., Liu, X., Wong, M.H., Xu, F., Yang, X., Xu, W., Zeng, Q., Wang, W., Li, S., 2020. Characteristics of spatial and seasonal bacterial community structures in a river under anthropogenic disturbances. *Environ. Pollut.* 264, 114818. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114818>
- Park, J.-S., Kwon, H.C., 2018. New Naphthoquinone Terpenoids from Marine Actinobacterium, *Streptomyces* sp. CNQ-509. *Mar. Drugs* 16, 90. <https://doi.org/10.3390/md16030090>
- Pierre Servais, Gilles Billen, Tamara Garcia-Armisen, Isabelle George, Alexandre Goncalves, Sylvie Thibert, 2009. La contamination microbienne dans le bassin de la Seine, Programme PIREN-Seine. Agence de l'eau Seine-Normandie.
- Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., Peplies, J., Glöckner, F.O., 2013. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res.* 41, D590-596. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1219>
- Rebollar, E.A., Sandoval-Castellanos, E., Roessler, K., Gaut, B.S., Alcaraz, L.D., Benítez, M., Escalante, A.E., 2017. Seasonal Changes in a Maize-Based Polyculture of Central Mexico Reshape the Co-occurrence Networks of Soil Bacterial Communities. *Front. Microbiol.* 8, 2478. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02478>
- Rietveld, L.C., Siri, J.G., Chakravarty, I., Arsénio, A.M., Biswas, R., Chatterjee, A., 2016. Improving health in cities through systems approaches for urban water management. *Environ. Health* 15, S31. <https://doi.org/10.1186/s12940-016-0107-2>
- Rognes, T., Flouri, T., Nichols, B., Quince, C., Mahé, F., 2016. VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics. *PeerJ* 4, e2584. <https://doi.org/10.7717/peerj.2584>
- Savio, D., Sinclair, L., Ijaz, U.Z., Parajka, J., Reischer, G.H., Stadler, P., Blaschke, A.P., Blöschl, G., Mach, R.L., Kirschner, A.K.T., Farnleitner, A.H., Eiler, A., 2015. Bacterial diversity along a 2600 km river continuum: River bacterioplankton diversity. *Env. Microbiol* 17, 4994–5007. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12886>
- Schmidt, T.M., 2006. The maturing of microbial ecology. *Microb. Ecol.*, INTERNATIONAL MICROBIOLOGY 17–223.
- Spänhoff, B., Bischof, R., Böhme, A., Lorenz, S., Neumeister, K., Nöthlich, A., Küsel, K., 2007. Assessing the Impact of Effluents from a Modern Wastewater Treatment Plant on Breakdown of Coarse Particulate Organic Matter and Benthic Macroinvertebrates in a Lowland River. *Water. Air. Soil Pollut.* 180, 119–129. <https://doi.org/10.1007/s11270-006-9255-2>
- Staley, C., Unno, T., Gould, T.J., Jarvis, B., Phillips, J., Cotner, J.B., Sadowsky, M.J., 2013. Application of Illumina next-generation sequencing to characterize the bacterial community of the Upper Mississippi River. *J Appl Microbiol* 115, 1147–1158. <https://doi.org/10.1111/jam.12323>
- Stoeckel, D.M., Harwood, V.J., 2007. Performance, Design, and Analysis in Microbial Source Tracking Studies. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 2405–2415. <https://doi.org/10.1128/AEM.02473-06>
- Sun, W., Xia, C., Xu, M., Guo, J., Sun, G., 2017. Seasonality Affects the Diversity and Composition of Bacterioplankton Communities in Dongjiang River, a Drinking Water Source of Hong Kong. *Front. Microbiol.* 8.

- Suzuki, S., Hiraishi, A., 2007. *Novosphingobium naphthalenivorans* sp. nov., a naphthalene-degrading bacterium isolated from polychlorinated-dioxin-contaminated environments. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 53, 221–228. <https://doi.org/10.2323/jgam.53.221>
- Tales, É., 2009. Le peuplement de poissons du bassin de la Seine: comprendre son évolution sous l’impact des changements générés par l’homme ou la nature, Programme PIREN-Seine. Agence de l’eau Seine-Normandie, Nanterre.
- Turner, S., Pryer, K.M., Miao, V.P.W., Palmer, J.D., 1999. Investigating Deep Phylogenetic Relationships among Cyanobacteria and Plastids by Small Subunit rRNA Sequence Analysis. *J. Eukaryot. Microbiol.* 46, 327–338. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1999.tb04612.x>
- Waiser, M.J., Tumber, V., Holm, J., 2011. Effluent-dominated streams. Part 1: Presence and effects of excess nitrogen and phosphorus in Wascana Creek, Saskatchewan, Canada. *Environ. Toxicol. Chem.* 30, 496–507. <https://doi.org/10.1002/etc.399>
- Wang, H., Liu, X., Wang, Y., Zhang, S., Zhang, G., Han, Y., Li, M., Liu, L., 2023. Spatial and temporal dynamics of microbial community composition and factors influencing the surface water and sediments of urban rivers. *J. Environ. Sci.* 124, 187–197. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2021.10.016>
- Wang, L., Zhang, J., Li, H., Yang, H., Peng, C., Peng, Z., Lu, L., 2018. Shift in the microbial community composition of surface water and sediment along an urban river. *Sci. Total Environ.* 627, 600–612. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.01.203>
- Wang, P., Chen, B., Yuan, R., Li, C., Li, Y., 2016. Characteristics of aquatic bacterial community and the influencing factors in an urban river. *Sci. Total Environ.* 569–570, 382–389. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.06.130>
- Wang, Y., Liu, L., Chen, H., Yang, J., 2015. Spatiotemporal dynamics and determinants of planktonic bacterial and microeukaryotic communities in a Chinese subtropical river. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99, 9255–9266. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6773-0>
- Wang, Y., Sheng, H.-F., He, Y., Wu, J.-Y., Jiang, Y.-X., Tam, N.F.-Y., Zhou, H.-W., 2012. Comparison of the levels of bacterial diversity in freshwater, intertidal wetland, and marine sediments by using millions of illumina tags. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 8264–8271. <https://doi.org/10.1128/AEM.01821-12>
- Wang, Y.-S., Tong, Z.-H., Fan, Y.-Y., 2021. Spatial and temporal patterns in bacterioplankton communities across a river-lake continuum. *Limnologica* 87, 125863. <https://doi.org/10.1016/j.limno.2021.125863>
- Wu, J., Xiong, J., Hu, C., Shi, Y., Wang, K., Zhang, D., 2015. Temperature sensitivity of soil bacterial community along contrasting warming gradient. *Appl. Soil Ecol.* 94, 40–48. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2015.04.018>
- Xie, Y., Fan, J., Zhu, W., Amombo, E., Lou, Y., Chen, L., Fu, J., 2016. Effect of Heavy Metals Pollution on Soil Microbial Diversity and Bermudagrass Genetic Variation. *Front. Plant Sci.* 7.
- Yan, Q., Bi, Y., Deng, Y., He, Z., Wu, L., Van Nostrand, J.D., Shi, Z., Li, J., Wang, X., Hu, Z., Yu, Y., Zhou, J., 2015. Impacts of the Three Gorges Dam on microbial structure and potential function. *Sci. Rep.* 5, 8605. <https://doi.org/10.1038/srep08605>
- Zhao, Z., Zhao, R., Qiu, X., Wan, Y., Lee, L., 2022. Structural Diversity of Bacterial Communities and Its Relation to Environmental Factors in the Surface Sediments from Main Stream of Qingshui River. *Water* 14, 3356. <https://doi.org/10.3390/w14213356>
- Zhu, C., Zhang, J., Nawaz, M.Z., Mahboob, S., Al-Ghanim, K.A., Khan, I.A., Lu, Z., Chen, T., 2019. Seasonal succession and spatial distribution of bacterial community structure in a eutrophic

freshwater Lake, Lake Taihu. *Sci. Total Environ.* 669, 29–40. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.03.087>

Zinger, L., Gobet, A., Pommier, T., 2012. Two decades of describing the unseen majority of aquatic microbial diversity. *Mol. Ecol.* 21, 1878–1896. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2011.05362.x>

Zylstra, G.J., Kim, E., 1997. Aromatic hydrocarbon degradation by *Sphingomonas yanoikuyae* B1. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 19, 408–414. <https://doi.org/10.1038/sj.jim.2900475>

Credit authorship contribution statement

Sadia Bagagnan: Conceptualization, Methodology, Data analysis, Writing original draft; My Dung Jusselme: Supervision, Conceptualization, Methodology, Writing, Review & Editing; Régis Moillon: Supervision, Writing, Review & Editing, Funding acquisition; Sabrina Guérin: Supervision and Investigation; Vincent Rocher: Supervision and Investigation; Vanessa Alphonse: Investigation.

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 research was supported by the MeSeine Innovation programme and financed by the Syndicat Interdépartemental de l'Assainissement de l'Agglomération Parisienne (Siaap). We are grateful to the INRAE MIGALE bioinformatics facility (MIGALE, INRAE, 2020. Migale bioinformatics Facility, doi: 10.15454/1.5572390655343293E12) for providing help and/or computing and/or storage resources.

Figure captions

Figure 1: Location of sampling sites (Juvisy-sur-Orge (JSO), Choisy-le-Roi (CLR), Vitry-sur-Seine (VSS), Bougival (Boug), Triel-sur-Seine (TSS), Champigny-sur-Marne (CSM), and Conflans-Sainte-Honorine (CSH))

Figure 2: Comparison of the physic-chemical properties of Seine water in Bougival site to the average values obtained from 2012-2022 by a permanent measuring system installed on-site.

NH₄⁺, ammonium; NO₂⁻, nitrite; NO₃⁻, nitrate; PO₄³⁻, orthophosphates; dissolved organic carbon; EC, electrical conductivity

Figure 3: PCA analysis of physic-chemical parameters of the surface water of the Seine river and its tributaries (Marne and Oise) in 4 seasons (spring, summer, autumn, and winter) (A) differences between the seasons, (B) differences between the rivers and (C) difference between the sites, Juvisy-sur-Orge (JSO), Choisy-le-Roi (CLR), Vitry-sur-Seine (VSS), Bougival (Boug), Triel-sur-Seine (TSS), Champigny-sur-Marne (CSM), and Conflans-Sainte-Honorine (CSH)

Figure 4: Total bacterial cells (A) and proposition of intact/damaged bacterial cells (B) of water samples in 4 seasons at 7 sampling sites. N = 12 for each site and each season. JSO, Juvisy-sur-Orge; CLR, Choisy-le-Roi; VSS, Vitry-sur-Seine; CSM, Champigny-sur-Marne; BOUG, Bougival; CSH, Conflans-Sainte-Honorine; TSS, Triel-sur-Seine.

Figure 5: Diversity index of Chao1 (A) and Shannon (B) of bacterial communities in water samples of Seine River and its tributaries (Marne and Oise) for four seasons.

Figure 6: Relative abundance (%) of the dominant phyla (> 1%) of the Seine water in 4 seasons of 2021 from seven sampling sites

JSO, Juvisy-sur-Orge; CLR, Choisy-le-Roi; VSS, Vitry-sur-Seine; CSM, Champigny-sur-Marne; BOUG, Bougival; CSH, Conflans-Sainte-Honorine; TSS, Triel-sur-Seine

Figure 7: Relative abundance (%) of the dominant classes (A) and genus (B) of the Seine water in 4 seasons of 2021 from seven sampling sites

JSO, Juvisy-sur-Orge; CLR, Choisy-le-Roi; VSS, Vitry-sur-Seine; CSM, Champigny-sur-Marne; BOUG, Bougival; CSH, Conflans-Sainte-Honorine; TSS, Triel-sur-Seine

Figure 8: Predicted function of operational taxonomic units based on KEGG modules level 2 of bacterial communities of the Seine water

Figure 9: Redundancy analysis (RDA) of the Seine water samples based on the bacterial communities at the phyla level (A) and the genus level (B) and environmental variables

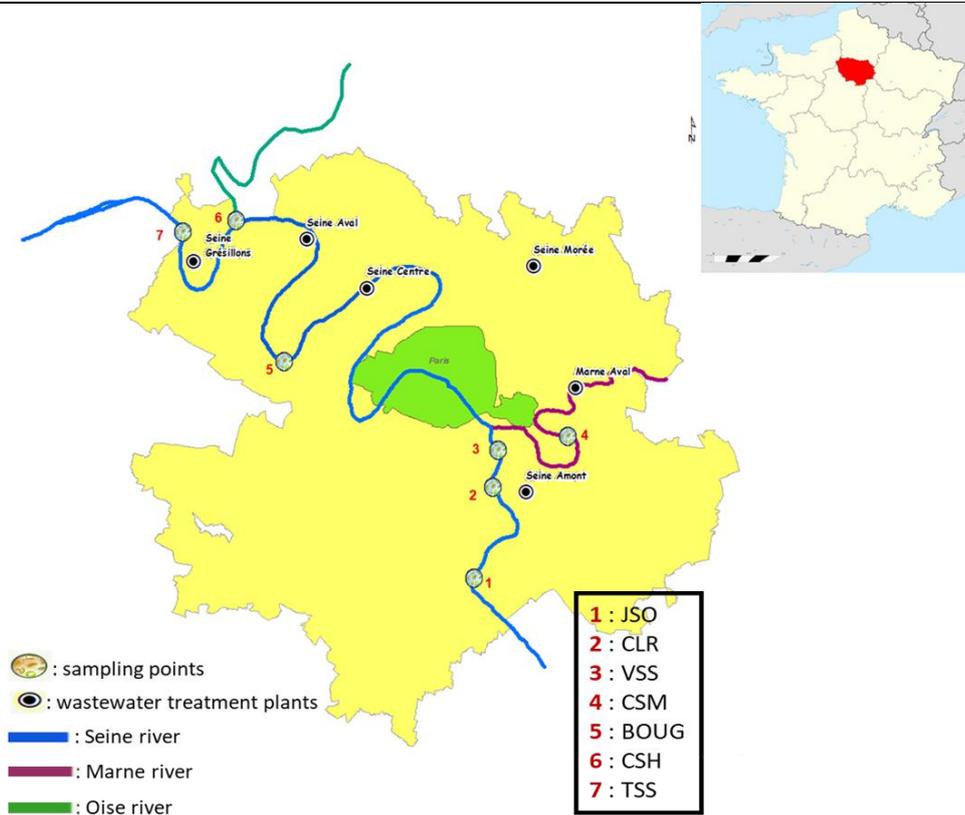


Figure 1: Location of sampling sites (Juvisy-sur-Orge (JSO), Choisy-le-Roi (CLR), Vitry-sur-Seine (VSS), Bougival (Boug), Triel-sur-Seine (TSS), Champigny-sur-Marne (CSM), and Conflans-Sainte-Honorine (CSH))

Résultats

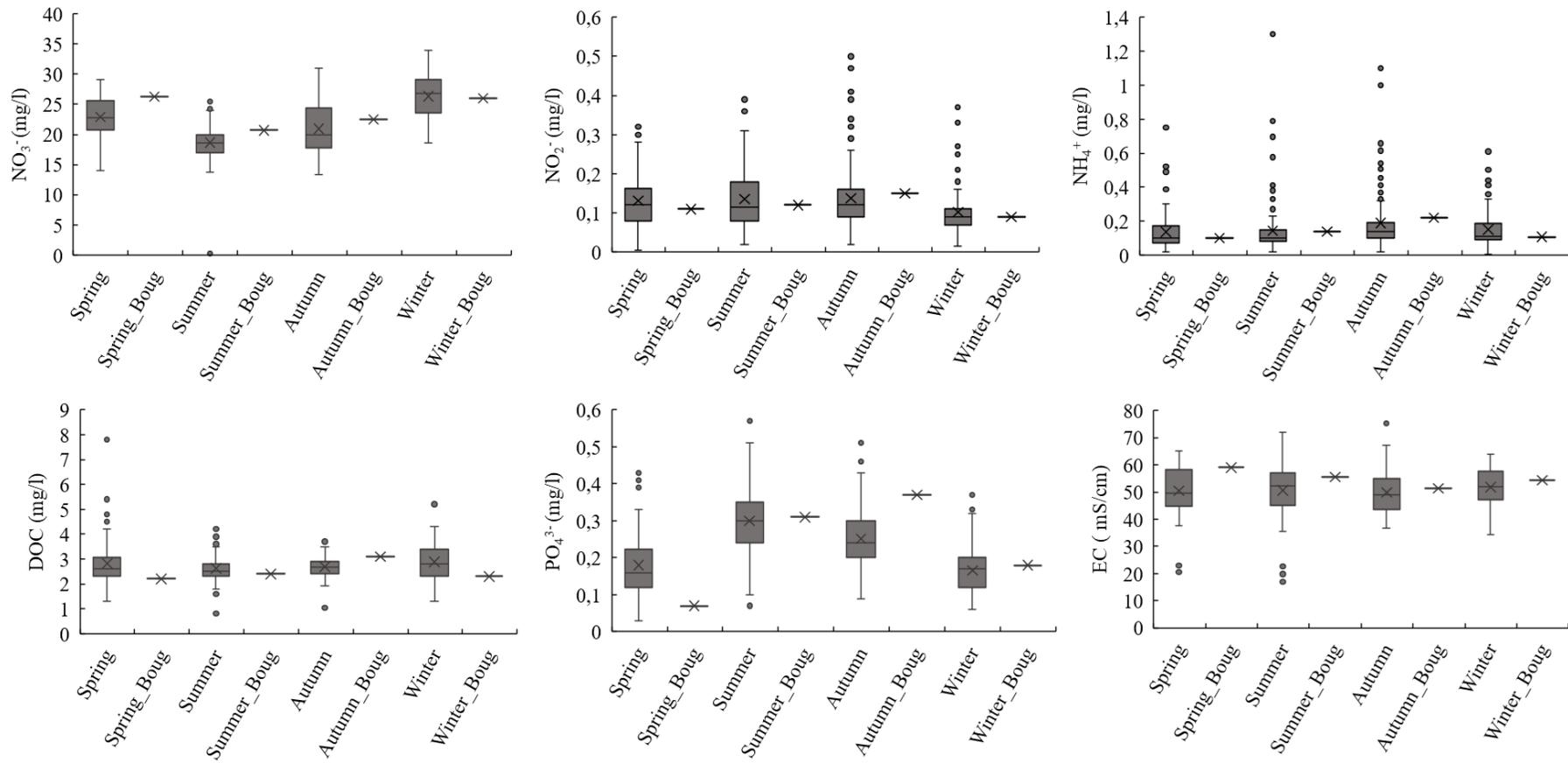


Figure 2: Comparison of the physico-chemical properties of Seine water in Bougival site to the average values obtained from 2012-2022 by a permanent measuring system installed on-site.

NH₄⁺, ammonium; NO₂⁻, nitrite; NO₃⁻, nitrate; PO₄³⁻, orthophosphates; dissolved organic carbon; EC, electrical conductivity

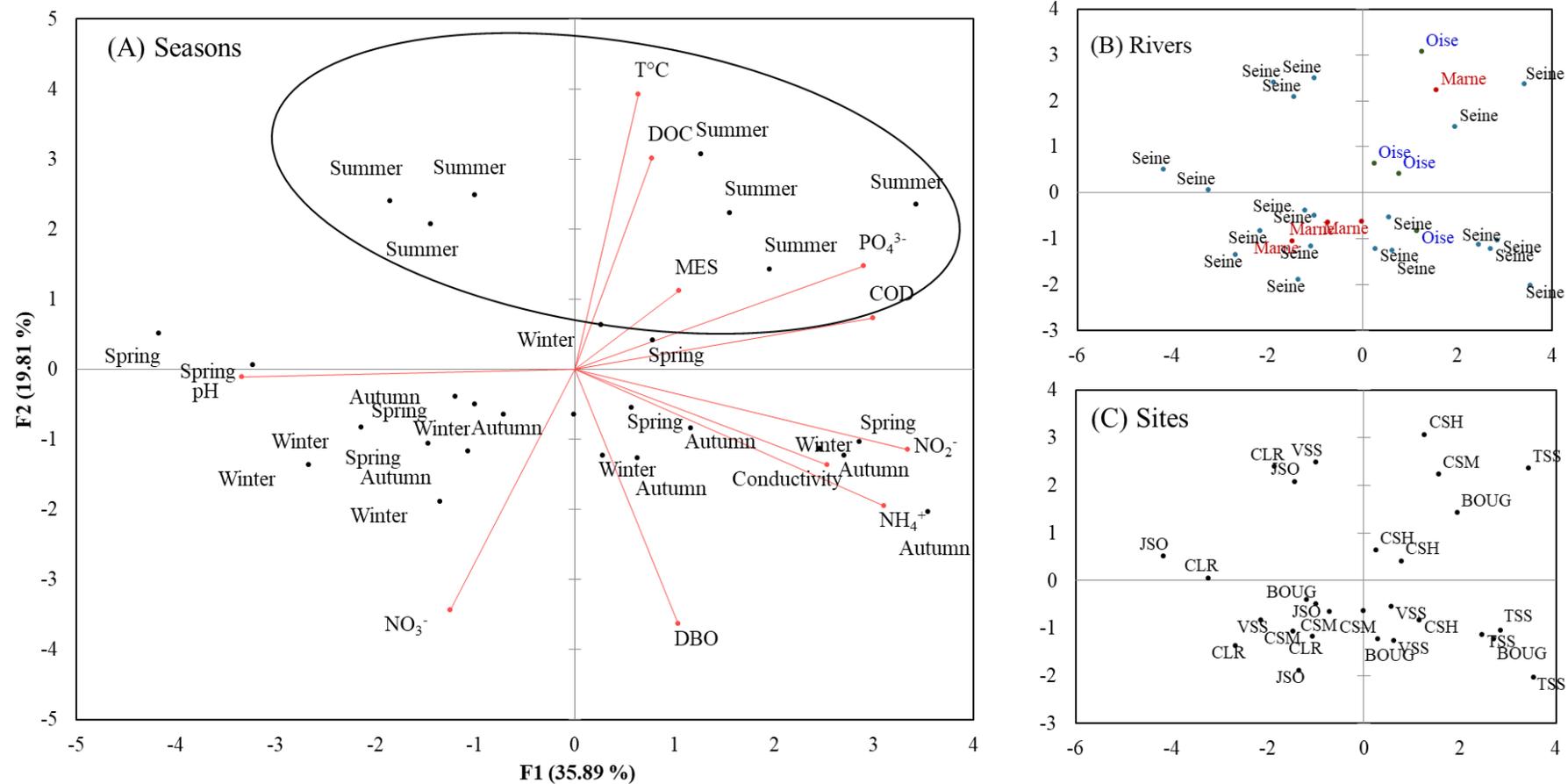


Figure 3: PCA analysis of physico-chemical parameters of the surface water of the Seine river and its tributaries (Marne and Oise) in 4 seasons (spring, summer, autumn, and winter) (A) differences between the seasons, (B) differences between the rivers and (C) difference between the sites, Juvisy-sur-Orge (JSO), Choisy-le-Roi (CLR), Vitry-sur-Seine (VSS), Bougival (Boug), Triel-sur-Seine (TSS), Champigny-sur-Marne (CSM), and Conflans-Sainte-Honorine (CSH)

Résultats

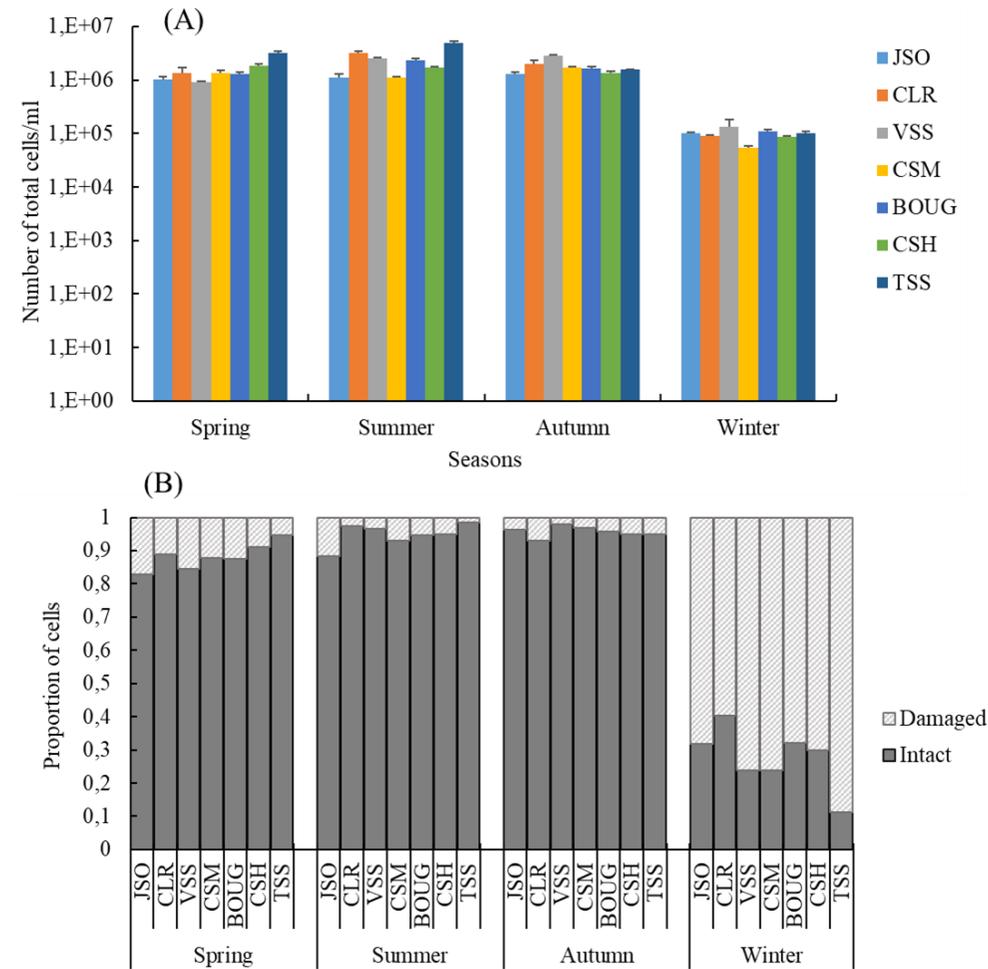


Figure 4: Total bacterial cells (A) and proposition of intact/damaged bacterial cells (B) of water samples in 4 seasons at 7 sampling sites. N = 12 for each site and each season. JSO, Juvisy-sur-Orge; CLR, Choisy-le-Roi; VSS, Vitry-sur-Seine; CSM, Champigny-sur-Marne; BOUG, Bougival; CSH, Conflans-Sainte-Honorine; TSS, Triel-sur-Seine.

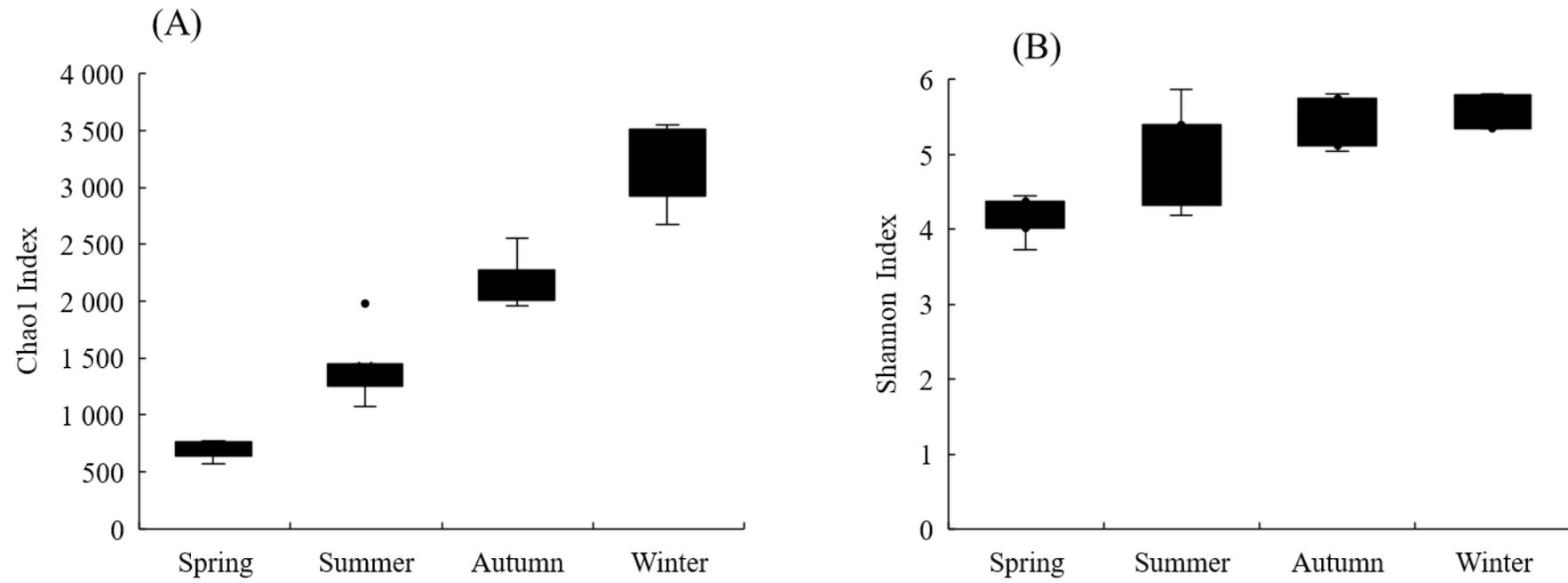


Figure 5: Diversity index of Chao1 (A) and Shannon (B) of bacterial communities in water samples of Seine River and its tributaries (Marne and Oise) for four seasons.

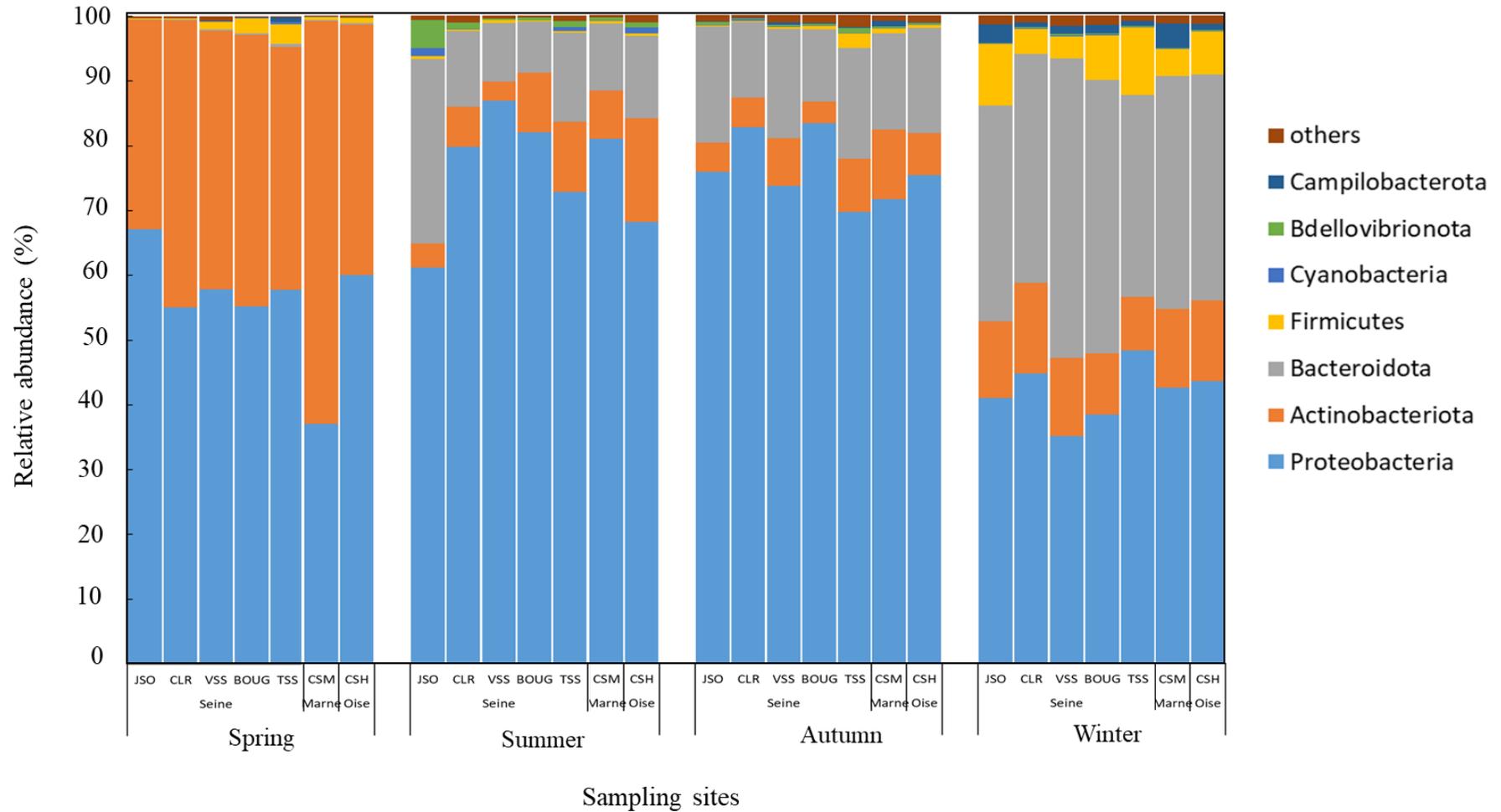
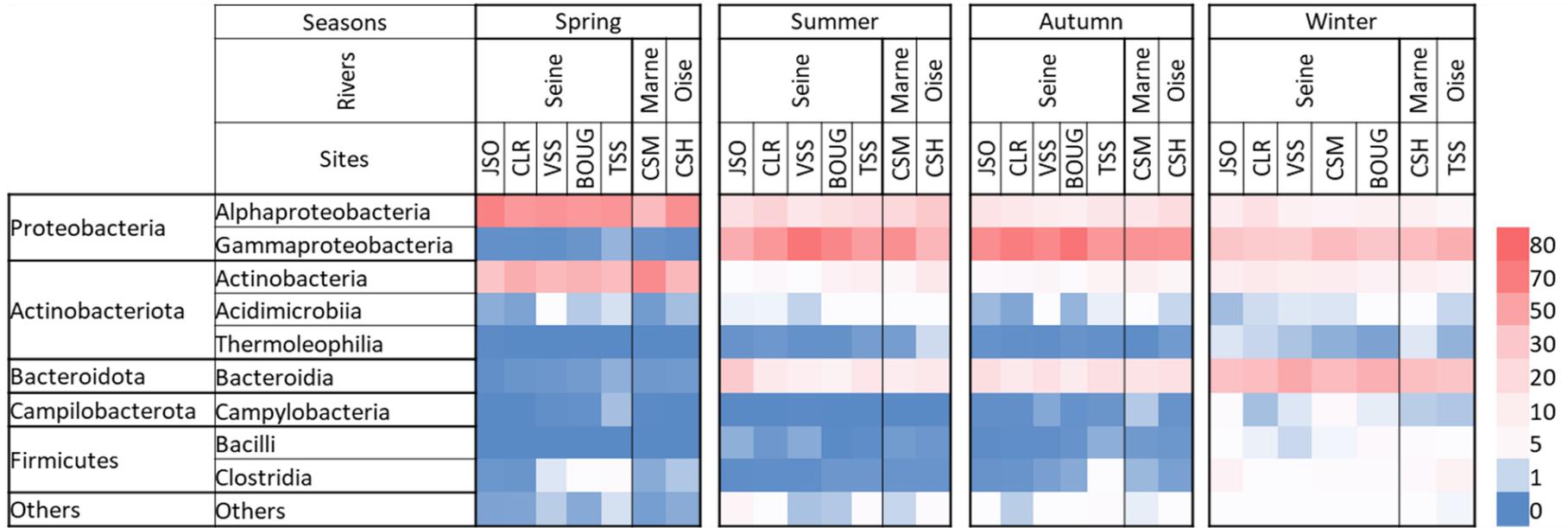


Figure 6: Relative abundance (%) of the dominant phyla (> 1%) of the Seine water in 4 seasons of 2021 from seven sampling sites

JSO, Juvisy-sur-Orge; CLR, Choisy-le-Roi; VSS, Vitry-sur-Seine; CSM, Champigny-sur-Marne; BOUG, Bougival; CSH, Conflans-Sainte-Honorine; TSS, Triel-sur-Seine

(A)



(B)

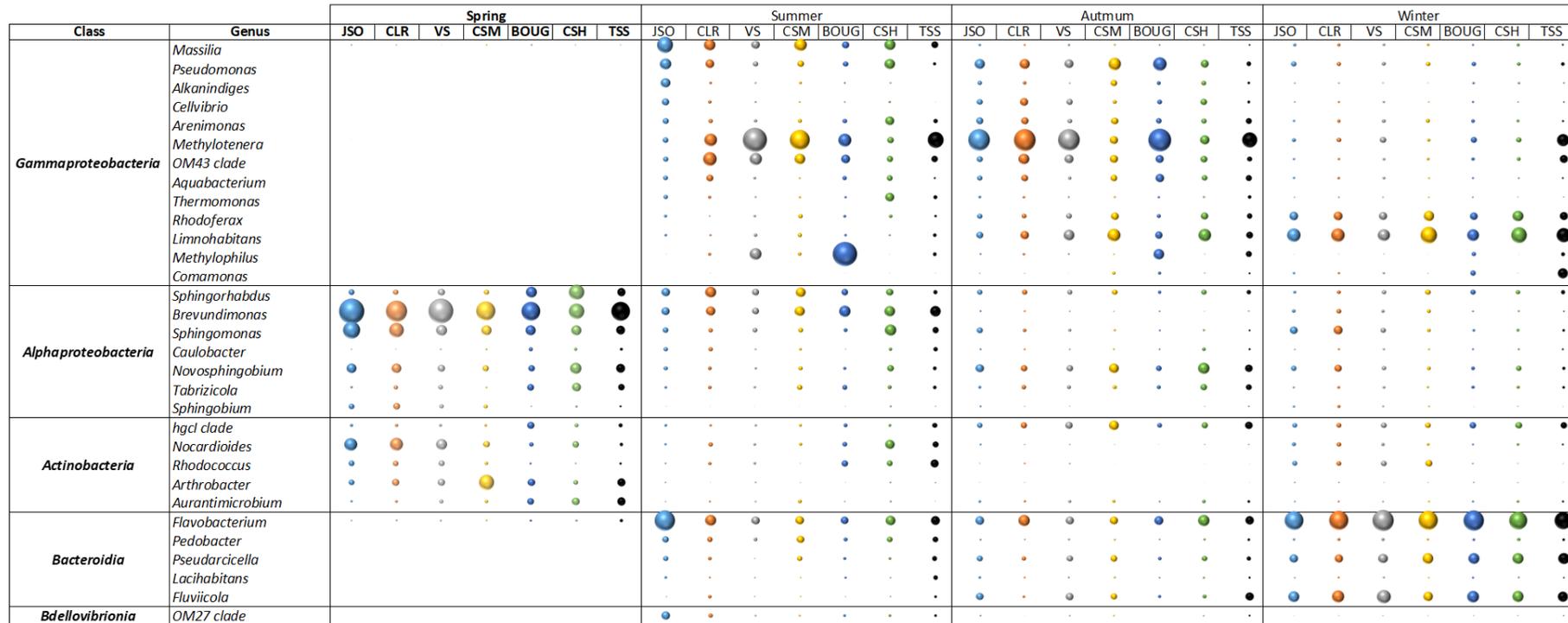


Figure 7: Relative abundance (%) of the dominant classes (A) and genus (B) of the Seine water in 4 seasons of 2021 from seven sampling sites JSO, Juvisy-sur-Orge; CLR, Choisy-le-Roi; VSS, Vitry-sur-Seine; CSM, Champigny-sur-Marne; BOUG, Bougival; CSH, Conflans-Sainte-Honorine; TSS, Triel-sur-Seine

Résultats

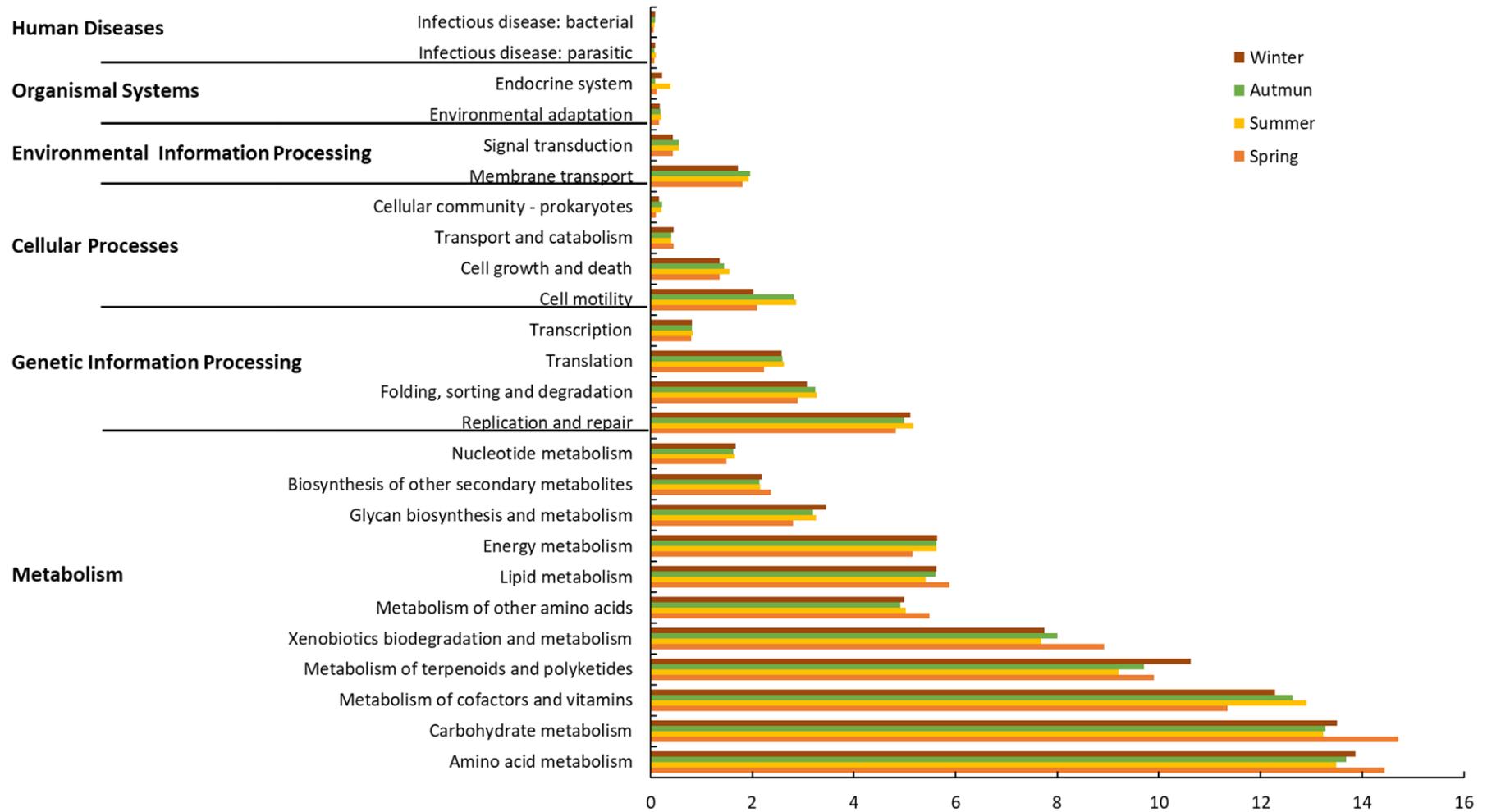


Figure 8: Predicted function of operational taxonomic units based on KEGG modules level 2 of bacterial communities of the Seine water

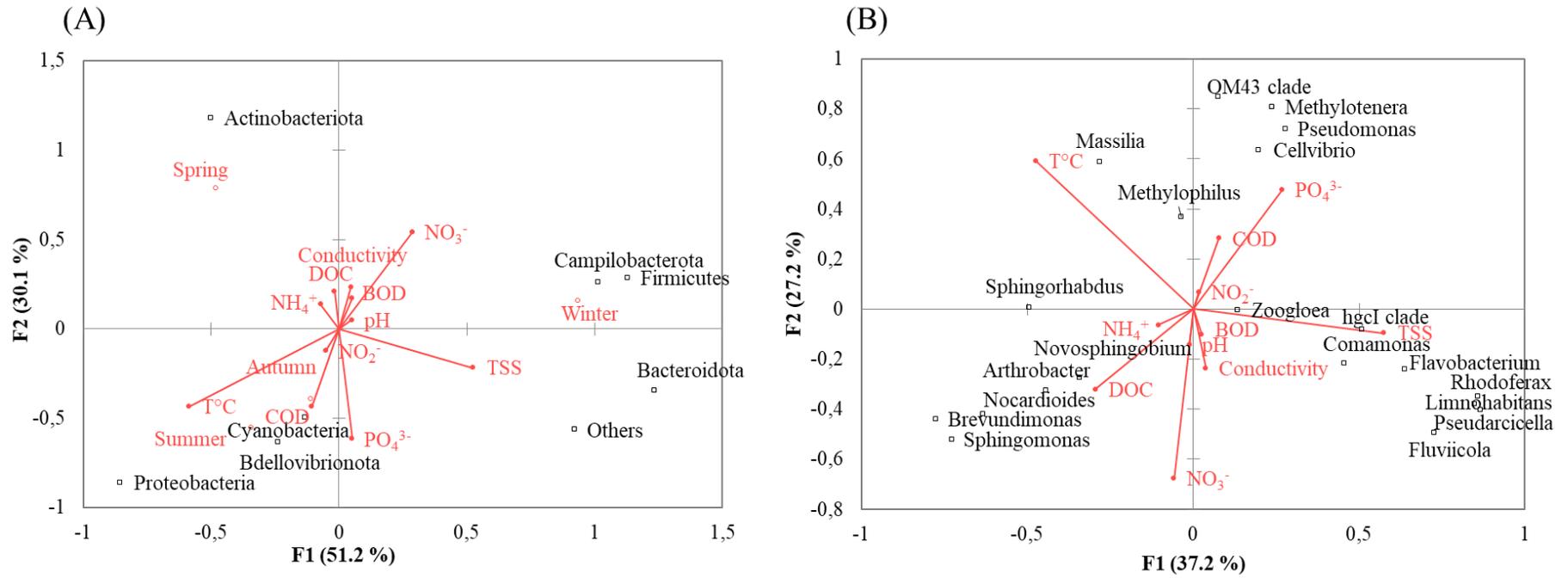


Figure 9: Redundancy analysis (RDA) of the Seine water samples based on the bacterial communities at the phyla level (A) and the genus level (B) and environmental variables

Table captions

Table 1: Effects of rivers and seasons on physical and chemical properties of surface water were tested by a two-way ANOVA analysis. F values and significance level: non significatif $^{ns}P > 0.05$, $*0.01 < P \leq 0.05$, $**0.001 < P \leq 0.01$, $***P \leq 0.001$

Table 2: Matrix of Spearman correlation between microbial community parameters including bacterial abundance (TCC = total cells, ICC = intact cells and DCC = damaged cells), diversity indices, relative abundance of phyla and genera with physicochemical parameters. DOC, dissolved organic carbon; BOD, biochemical oxygen demand; COD, chemical oxygen demand; EC, electrical conductivity; TSS, total suspended solids

Table 3: Matrix of Spearman correlation between the relative abundance of the microbial community at the phyla level and the relative abundance of functional genes

Résultats

Table 1: Effects of rivers and seasons on physical and chemical properties of surface water were tested by a two-way ANOVA analysis. F values and significance level: non significatif $^{ns}P > 0.05$, $^*0.01 < P \leq 0.05$, $^{**}0.001 < P \leq 0.01$, $^{***}P \leq 0.001$

	pH	NO ₂ ⁻	NO ₃ ⁻	NH ₄ ⁺	DOC	PO ₄ ³⁺	BDO	COD	T°C	EC	TSS
Rivers	0.9 ^{ns}	0.65 ^{ns}	6E-10 ^{***}	0.76 ^{ns}	0.0006 ^{***}	0.9 ^{ns}	0.6 ^{ns}	0.6 ^{ns}	0.9 ^{ns}	0.02 [*]	0.5 ^{ns}
Seasons	0.9 ^{ns}	0.5 ^{ns}	6E-5 ^{***}	0.6 ^{ns}	0.06 ^{ns}	0.003 ^{**}	0.4 ^{ns}	4E-5 ^{***}	3E-25 ^{***}	0.4 ^{ns}	0.006 ^{**}
Rivers*Seasons	0.9 ^{ns}	0.9 ^{ns}	8E-7 ^{***}	0.9 ^{ns}	0.03 [*]	0.2 ^{ns}	0.9 ^{ns}	0.009 ^{**}	3E-17 ^{***}	0.2 ^{ns}	0.04 [*]

DOC, dissolved organic carbon; BOD, biochemical oxygen demand; COD, chemical oxygen demand; EC, electrical conductivity; TSS, total suspended solids

Résultats

Table 2: Matrix of Spearman correlation between microbial community parameters including bacterial abundance (TCC = total cells, ICC = intact cells and DCC = damaged cells), diversity indices, relative abundance of phyla and genera with physicochemical parameters.

DOC, dissolved organic carbon; BOD, biochemical oxygen demand; COD, chemical oxygen demand; EC, electrical conductivity; TSS, total suspended solids

	Variables	pH	NO ₂ ⁻	NO ₃ ⁻	NH ₄ ⁺	DOC	PO ₄ ³⁺	BOD	COD	T°C	EC	TSS	
Microbial abundance (ml)	TCC	-0.33	0.33	*-0.44	0.14	*0.43	0.24	0.01	0.05	**0.57	0.08	-0.25	
	ICC	-0.29	0.27	*-0.46	0.11	*0.42	0.22	0.01	0.02	**0.56	0.011	-0.24	
	DCC	0.01	0.01	0.25	-0.20	-0.14	-0.35	-0.12	0.37	*0.45	0.038	*-0.42	
Diversity indices	Chao1	0.18	-0.18	0.02	0.03	0.08	0.19	0.26	-0.31	***-0.73	-0.082	**0.54	
	Shannon	0.12	-0.17	-0.09	0.05	0.20	0.30	0.14	-0.21	*-0.46	0.028	0.31	
	<i>Proteobacteria</i>	-0.16	0.19	**0.58	0.10	*0.44	*0.47	-0.08	-0.18	**0.53	-0.16	-0.06	
	<i>Actinobacteriota</i>	0.07	-0.03	**0.49	-0.08	*-0.40	**0.52	-0.23	0.35	-0.05	0.32	-0.30	
Relative abundance (%) of the dominant phyla	<i>Bacteroidota</i>	0.03	-0.14	-0.02	0.14	0.09	0.23	0.24	-0.18	**0.65	-0.06	**0.53	
	<i>Firmicutes</i>	-0.19	0.14	0.33	0.34	-0.06	0.00	0.27	0.06	**0.62	0.34	0.28	
	<i>Cyanobacteria</i>	-0.10	0.11	-0.25	0.18	0.33	0.19	0.14	0.10	-0.22	0.13	0.35	
	<i>Bdellovibrionota</i>	-0.16	0.05	**0.61	0.02	*0.45	***0.66	-0.10	-0.02	0.31	-0.17	0.33	
	<i>Campilobacterota</i>	0.01	0.09	0.37	0.36	-0.12	-0.07	*0.41	-0.34	***-0.84	0.25	0.25	
	<i>Brevundimonas</i>	0.06	-0.17	0.18	-0.28	*-0.41	*-0.38	*-0.47	**0.54	**0.56	-0.14	-0.33	
	<i>Sphingomonas</i>	0.24	*-0.38	0.33	*-0.39	*-0.39	**0.53	*-0.46	*0.41	0.34	-0.19	-0.34	
	<i>Nocardioiodes</i>	0.09	-0.31	0.24	*-0.38	*-0.38	-0.35	**0.50	**0.60	*0.43	-0.12	-0.23	
	<i>Novosphingobium</i>	0.18	-0.03	0.27	-0.04	0.08	*-0.43	0.11	-0.26	-0.09	0.27	*-0.44	
	<i>Arthrobacter</i>	0.11	-0.24	0.34	-0.33	*-0.37	**0.55	-0.32	*0.48	0.23	-0.07	-0.25	
	<i>Sphingorhabdus</i>	0.09	-0.07	-0.27	-0.29	-0.17	-0.23	*-0.42	0.36	***0.60	-0.01	-0.29	
	Relative abundance (%) of the dominant genus	<i>hgcl clade</i>	0.01	0.36	0.21	*0.45	0.17	0.02	*0.38	*-0.42	**0.62	0.31	0.06
		<i>Flavobacterium</i>	0.10	-0.24	-0.13	-0.03	0.10	0.21	0.18	-0.08	**0.49	-0.15	**0.59
		<i>Massilia</i>	0.05	-0.30	**0.59	-0.22	0.08	*0.39	-0.34	0.13	0.18	*-0.40	*0.39
<i>Methylothera</i>		-0.19	0.16	**0.49	0.16	*0.46	***0.65	0.08	-0.34	0.12	-0.22	0.24	
<i>Pseudomonas</i>		0.12	-0.08	**0.59	0.00	0.32	*0.43	0.09	*-0.42	0.01	-0.22	0.12	
<i>Rhodoferrax</i>		0.07	-0.11	-0.05	0.16	0.07	0.20	0.22	-0.35	***-0.75	0.041	*0.45	
<i>Zoogloea</i>		-0.01	0.11	0.18	0.27	0.28	0.15	**0.59	*-0.47	***-0.76	0.148	0.31	
<i>Limnohabitans</i>		0.05	-0.05	-0.09	0.21	0.08	0.22	0.27	-0.37	***-0.75	0.033	**0.51	
<i>Pseudarcicella</i>	0.07	-0.08	-0.09	0.15	0.05	0.21	0.23	-0.21	***-0.68	-0.069	**0.57		

Résultats

<i>Methylophilus</i>	-0.32	0.32	* -0.39	0.29	0.34	*** 0.72	0.16	-0.21	0.09	-0.111	0.32
<i>OM43 clade</i>	-0.12	0.11	*** -0.69	0.08	* 0.39	*** 0.63	0.01	-0.21	0.21	-0.199	0.25
<i>Fluviicola</i>	0.03	-0.11	0.05	0.13	0.07	0.23	0.28	-0.29	*** -0.71	-0.048	** 0.49
<i>Comamonas</i>	0.03	0.08	-0.04	0.26	0.17	0.34	* 0.40	* -0.39	*** -0.64	0.101	* 0.43
<i>Cellvibrio</i>	0.15	-0.12	* -0.41	-0.04	0.35	0.34	0.26	** -0.55	-0.19	-0.225	0.12

Resultats

Table 3: Matrix of Spearman correlation between the relative abundance of the microbial community at the phyla level and the relative abundance of functional genes

Variables	<i>Proteobacteria</i>	<i>Actinobacteriota</i>	<i>Bacteroidota</i>	<i>Firmicutes</i>	<i>Cyanobacteria</i>	<i>Bdellovibrionota</i>	<i>Campilobacterota</i>
Amino acid metabolism	***-0.64	***0.79	-0.27	0.18	-0.14	***-0.69	0.14
Carbohydrate metabolism	***-0.66	***0.87	-0.31	0.32	-0.27	***-0.81	0.23
Metabolism of cofactors and vitamins	***0.64	***-0.83	0.29	-0.28	0.13	***0.72	-0.16
Metabolism of terpenoids and polyketides	***-0.80	*0.43	*0.41	***0.73	0.26	**0.49	***0.78
Xenobiotics biodegradation and metabolism	-0.21	**0.61	*-0.41	-0.063	-0.20	*-0.48	-0.12
Metabolism of other amino acids	*-0.43	***0.74	*-0.46	-0.05	-0.11	**0.5	-0.22
Lipid metabolism	*-0.43	***0.67	-0.22	0.16	-0.15	**0.57	0.21
Energy metabolism	0.32	***-0.75	**0.53	0.09	0.11	**0.53	0.26
Folding, sorting and degradation	***0.64	***-0.79	0.27	-0.25	0.06	***0.66	-0.05
Cell motility	***0.82	***-0.65	-0.11	***-0.63	0.02	***0.65	**0.53
Translation	**0.51	***-0.77	*0.37	-0.11	0.07	**0.58	0.06
Glycan biosynthesis and metabolism	-0.227	*-0.42	***0.64	*0.44	0.34	0.25	*0.40
Biosynthesis of other secondary metabolites	-0.299	*0.47	-0.22	0.14	-0.01	-0.32	0.09
Membrane transport	***0.93	***-0.66	-0.30	**0.52	-0.19	*0.46	*-0.41
Cell growth and death	***0.74	**0.60	-0.17	**0.62	-0.14	**0.56	*-0.56
Nucleotide metabolism	0.174	***-0.62	**0.56	0.19	0.20	*0.46	0.30
Transcription	*0.47	*-0.46	-0.03	*-0.47	-0.07	*0.39	-0.28
Signal transduction	***0.87	***-0.78	-0.05	**0.52	-0.01	***0.64	-0.41
Transport and catabolism	***-0.83	**0.58	0.21	*0.42	0.17	*-0.37	0.29
Environmental adaptation	***0.76	***-0.87	0.17	-0.29	0.01	***0.75	-0.27
Endocrine system	0.186	0.017	-0.14	-0.22	-0.05	0.31	**0.54
Cellular community - prokaryotes	***0.71	***-0.88	0.26	-0.28	0.155	***0.76	-0.16
Infectious disease: parasitic	0.01	-0.18	0.19	0.19	*0.38	0.340	-0.15
Infectious disease: bacterial	-0.082	*-0.37	**0.52	*0.44	0.10	0.169	**0.53

1.2 Evolution des communautés microbiennes de la Seine en réponse au changement climatique et aux activités anthropiques

L'étude de l'évolution des communautés microbiennes de la Seine en réponse au changement climatique et aux activités anthropiques a donné lieu à un article qui a été soumis en **septembre 2023** dans la revue **Aquatic Ecology** :

Bagagnan S., Guérin S., Marconi A., Rocher V., Giusti-Miller S., Moilleron R. & Jusselme M. D. Overview of microbial communities in the surface water of the Seine River to understand their response to climate change and human activities, *Aquatic Ecology*, soumis

Les données supplémentaires de l'article sont disponibles en Annexe 3.

Objectifs

L'étude des communautés microbiennes d'amont en aval de l'agglomération parisienne a montré que la variabilité temporelle était plus forte que la variabilité spatiale. Aussi pour affiner ces premiers résultats, il a été décidé de se concentrer sur la variabilité temporelle sur deux années (2020 et 2021) pour deux saisons : l'été et l'automne. La même démarche de caractérisation des communautés bactériennes a été suivie pour permettre une comparaison des résultats obtenus pour ces deux années. Les campagnes d'échantillonnages ont également porté sur les mêmes sites que dans l'étude précédente. Les deux années 2020 et 2021 ont présenté des caractéristiques contrastées en termes de profils de débits. En effet, la période d'étiage ($Q < 200 \text{ m}^3/\text{s}$) était plus prononcée en 2020 qu'en 2021 tant à l'amont qu'à l'aval de l'agglomération parisienne permettant de potentiellement cerner l'influence du changement climatique sur la diversité microbienne des eaux de la Seine. Les données brutes du séquençage ont été déposées dans la *NCBI Sequence Read Archive* sous le nom BioProject PRJNA1016134.

Principaux résultats

Les premières tendances observées précédemment se sont confirmées à savoir une forte variabilité temporelle et une faible variabilité spatiale de la structure de la communauté bactérienne. De même, les phyla dominants identifiés dans la Seine sont les protéobactéries, les actinobactéries, les bactériodotes. Cependant la proportion de protéobactéries étaient plus faibles en 2020 qu'en 2021 alors qu'à l'inverse les cyanobactéries étaient plus présentes en 2020 qu'en 2021 pour les deux saisons. Aussi, la composition bactérienne de la Seine en 2020 était significativement différente de celle de 2021. Cette différence s'explique par des fluctuations de débit entre les deux années, les faibles débits en 2020 ont favorisé le développement des cyanobactéries. De plus, l'activité microbienne et l'abondance étaient plus élevées en été qu'en automne, la température et les concentrations en orthophosphates et COD expliquaient ces différences. Par ailleurs, la présence des *Alphaproteobacteria* et des *Gammaproteobacteria* suggère que la Seine contient des composés organiques récalcitrants apportés probablement par les rejets des STEP. Cependant pour confirmer cette hypothèse, des mesures des niveaux de contaminants émergents seraient nécessaires soit par screening ciblé (avec le risque de ne pas chercher les « bonnes » molécules) ou par screening non ciblé (par comparaison des empreintes observées entre l'amont et l'aval du rejet) voire une analyse par Fluo 3D de la matière organique. Cette dernière approche est envisagée dans le cadre de la 2^e phase du programme MeSeine Innovation avec le déploiement de sonde Fluocopée® sur la zone SIAAP.

Overview of microbial communities in the surface water of the Seine River to understand their response to climate change and human activities

Sadia BAGAGNAN¹, Sabrina GUERIN², Anthony MARCONI², Vincent ROCHER², Stéphanie GIUSTI-MILLER³, Régis MOILLERON¹ and My Dung JUSSSELME^{1,*}

¹Leesu, Univ Paris Est Creteil, Ecole des ponts, Creteil, France

²SIAAP, Direction de l'Innovation, F-92700 Colombes, France

³IEES, Univ Paris Est Creteil, F-94010 Creteil, France

Corresponding author:

Email: jusselme@u-pec.fr

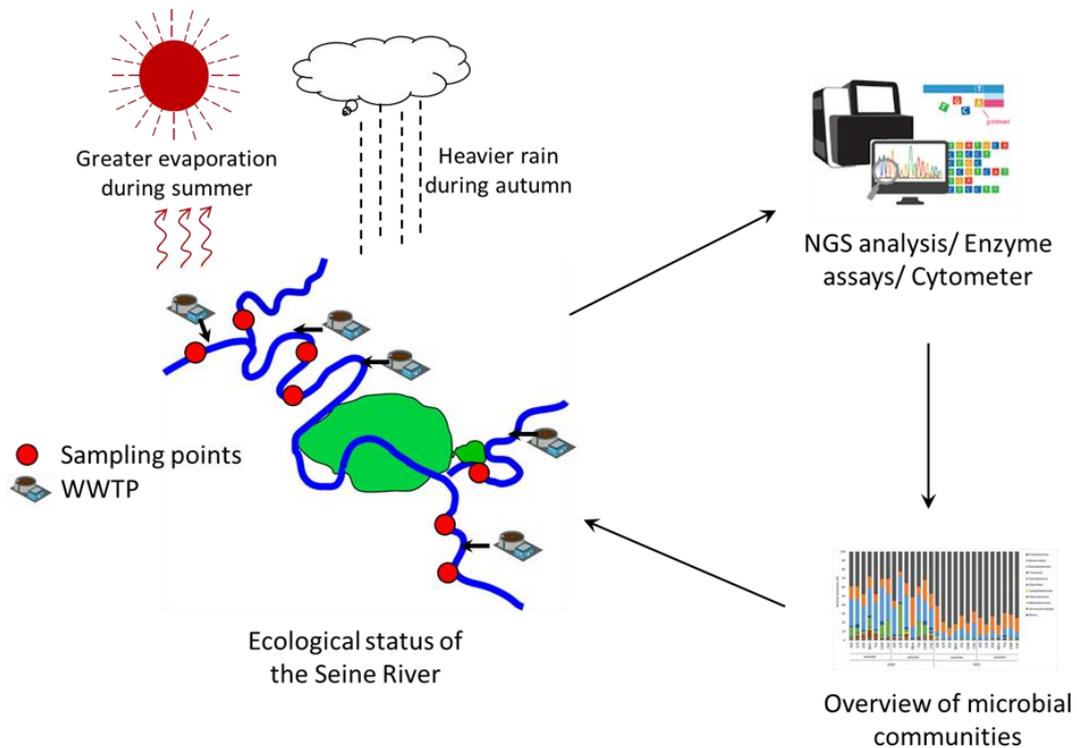
Full postal address:

Laboratory of Water, Environment and Urban Systems (Leesu)

Univ Paris Est Creteil

61 avenue du Général de Gaulle, 94000-Créteil, France

GRAPHICAL ABSTRACT



Abstract

Microbial communities, which are very dense and diverse, help to maintain the proper functioning of river ecosystems and are therefore often considered to be important indicators of river water quality. To date, there are very few data on the microbial communities in the surface water of the

Seine River, despite the fact that the Seine River is one of the most heavily impacted rivers in the world by human activities. In view of the forthcoming installation of new disinfection technology, we need to know more about the microbial community composition, its abundance and its activity. To this end, microbial communities in the surface water of the Seine River were evaluated using high-throughput sequencing and the relationships between their parameters and the physico-chemical properties were investigated. Samples were collected at seven sites, five on the Seine River and two on two of its main tributaries, both in summer and autumn during 2020 and 2021. The dominant phyla identified in the Seine River were *Proteobacteria*, *Actinobacteriota*, *Bacteriodota*, and *Cyanobacteria*. The presence of the *Alphaproteobacteria* and *Gammaproteobacteria* suggests that the Seine River water is poor in nutrients, and consists mainly of recalcitrant organic compounds remaining in WWTP effluents. The results showed a strong temporal variability and lower spatial variability in the bacterial community structure of surface water in the Seine River. It is interesting to note that the bacterial composition of the Seine water in 2020 was significantly different from that in 2021. The possible parameter responsible for this difference was the water flow that allowed *Cyanobacteria* to develop, leading to changes in the composition of the bacterial communities. Higher microbial activity and abundance was found in summer than in autumn, due to temperature and orthophosphate content. Moreover, spatial variation in bacterial composition was observed between upstream and downstream sites, and between before and after of the Seine Valenton-WWTP subjected to an impact of the effluent from WWTP due to either linked to the wastewater treatment method or to an accumulation phenomenon. For example, *Gammaproteobacteria* were higher in the downstream sites than in the upstream sites, suggesting that the presence of residual contaminants in the effluent. Further measurements of levels of emerging contaminants and other pollutants are needed to better understand these variability. These results provide a basic understanding of the microbial community in the Seine River, serving as a reference for assessing the impact of implementing new wastewater disinfection techniques in the near futures such as disinfection by performic acid.

Keywords: Seine River; microbial diversity; microbial activity; surface water; high-throughput sequencing

1. Introduction

Surface water ecosystems, particularly those found in rivers, acts as a receiver for effluents from wastewater treatment plants (WWTP) and is essential for the biochemical cycling, recycling of nutrients, and energy flows (Jin et al., 2018). The high diversity of microorganisms in these ecosystems, which is closely associated with physicochemical parameters, play a fundamental role in the operation and preservation of these processes. The rise in using surface water for drinking purposes and leisure activities like swimming requires microbial analysis of these water resources to ensure water quality and human health.

A number of investigations into the microbial diversity of surface water have been conducted (Bryant et al., 2016; Ibekwe et al., 2012). However, the microbial community in the inhabiting urban surface water are still less understood in the case of the Seine River. Only one reference is available in the 2011 activity report (phase 6) of the Piren-Seine program, which investigated the microbial composition and diversity of the Seine water. In this report, it was observed that there is a diverse range of phyla present in the surface water column with *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, and *Bacteroidetes* being the dominant phyla. The study was conducted at three sites including Marnay, upstream site and Bougival and Triel, downstream sites of the Seine River (George et al., 2012), in relation to the Paris conurbation. These study sites were located far from the Parisian basin where the impact of urbanisation is highly significant. Furthermore, there was no correlation found between microbial and physicochemical parameters.

The Seine River is the most important river in France and the second longest, stretching for 776 kilometres, and crossing the Parisian basin before arriving in Normandy. Its basin covers 76,000 km² and it is mostly within the Parisian Basin (Flipo, 2013). It is undeniable that the Seine River has a crucial aspect of life for the people of Paris, specifically, and of France, in general. Like all rivers, the Seine performs a crucial function in biogeochemical processes whereby the transfer of carbon and vital mineral nutrients from upstream to downstream areas holds utmost significance. (Lestel et al., 2021) mentioned that the impact of Greater Paris is still considerable. Due to extreme population density, the treatment of urban wastewater is still far from adequate in relation to the river's capacity for dilution and self-purification. It therefore covers 100 km of the Seine River, at the scale of the Parisian conurbation, which is subject to significant anthropogenic pressure from treated effluent from WWTPs during dry weather periods, and treated effluent from WWTPs along with combined sewer overflows and urban runoff during wet weather periods (Flipo et al., 2021). Along the Seine River, extending from downstream to upstream in the Ile-de-France region, SIAAP (greater Paris sanitation authority) runs six WWTPs. SIAAP treats approximately 2.5 million m³/d of wastewater during dry weather and up to 5 million m³/d (a mix of wastewater and rainwater because the sewer network is mainly combined) during wet weather conditions (Servais et al., 2009) before discharging them into the Seine River. In addition, the Seine River receives water from its tributaries such as the Orge, Marne, and Oise Rivers, which are also sources of pollution for some of them.

Numerous studies have demonstrated that treated, partially treated or untreated effluents from WWTPs affect the physicochemical and microbiological quality of surface water of the receiving environment due to the persistent presence of pharmaceutical and cosmetic contaminants (Behera et al., 2011; Luo et al., 2014; Paijens et al., 2022, 2021) and pathogenic microorganisms such as bacteria, viruses and parasites (Castro-Hermida et al., 2008; Rhymes et al., 2015). Among living organisms, microorganisms are considered to be the most diverse and abundant biogroup in the world, and are part of the composition of the river biocenosis. They play a very important role in maintaining the good functioning of river ecosystems (Findlay, 2010). Like the microbial community in river ecosystems, the bacterial community plays an important role in various biogeochemical processes and maintains important services of river ecosystems, including the degradation of pollutants and organic matter (Schmidt, 2006). They show great sensitivity to changes in environmental factors such as pH, temperature, nutrient levels, and particularly the presence of chemical pollutants (Rath et al., 2019; Wang et al., 2023, 2015). In various cases, bacterial populations tend to respond rapidly to environmental spatiotemporal variations (Mai et al., 2018; Wang et al., 2015). In numerous cases, the diversity of the bacterial community can mirror its ecological function alongside that of river ecosystems. As a result, bacterial communities are promising candidates for biological indicators (Hooper et al., 2005; Xie et al., 2016). Recently, the development of high-throughput next-generation sequencing methods, such as MiSeq pyrosequencing of the 16S rRNA gene has led more comprehensive characterisations of microbial communities in various environments due to their ability to generate a vast number of sequence reads. It is crucial for the local authorities to oversee microbial diversity for water quality assessments.

The Bathing plan on the Seine River, initiated in 2018 for the Paris 2024 Olympics Games, is evaluating an advanced oxidation technology to treat urban wastewater in WWTPs. The aim is to eliminate organic contaminants and disease-causing microorganisms from the effluents of WWTPs so as to preserve the water quality of the Seine River, which is a notable concern for the local authorities. Before implementing any new technology, it is crucial to grasp the traits of the microbial communities in surface water serving as valuable baseline data. They provide a reference point for future research and monitoring efforts. If there are any future changes in water quality, this baseline

can help identifying trends and potential causes, such as the impact of climate change and the implementation of new technologies. In this investigation, we characterized the microbial communities to establish an ecological baseline of the Seine River and to facilitate a before- and after- comparison following subsequent treatment. We will also assess how effluents from the WWTPs and tributaries impact the microflora of the Seine River. For this purpose, we analysed the abundance of microorganisms in the Seine River from upstream to downstream, using the cytometry (BactoSense). We also assessed their activity via enzyme assays and evaluated their diversity using NGS technology of the Seine river water from upstream to downstream. We chose five locations along the Seine River where effluents were discharged from WWTPs. In addition, two other sampling sites located just before the confluence of the Oise River and the Marne River with the Seine River were also investigated.

During wet weather periods, occasionally, wheather forecast predicts that certain areas may receive between 10 and 25 mm of rainfall. SIAAP collects these huge amounts of stormwater and then transport part of them to WWTPs where they are treated under a degraded mode. Nevertheless, the quantity of water collected may exceed the storage capacity of the transport infrastructure. To avoid flooding, some of the excess volumes are discharged directly into the Seine River through combined sewer overflows (CSOs). These contributions are likely to have a significant impact on both the microbial community metabolism function and diversity (Drury et al., 2013; Guo et al., 2019). On the contrary, during the summer season, the level of the Seine River is particularly low and water temperature is high, especially after a heatwave. In such circumstances, the oxygen concentration in the river is lower than normal (Lestel et al., 2021), which can significantly affect microorganisms that are particularly sensitive to variations in water oxygen levels. Therefore, we have selected four sampling campaigns specifically during the summer and autumn seasons of two consecutive years 2020 and 2021, to gather significant insights about microbial communities.

2. Material and methods

2.1 Field sites and sample collection

Water samples have been collected at seven points along the Seine River, from upstream to downstream of the Parisian conurbation. These sampling sites, which are depicted in the [Figure 1](#), were chosen to identify the potential impact of both WWTP discharges and tributaries on the quality of the Seine River. This approach enables the microbial communities to be characterised by considering the upstream-downstream gradient of the Parisian agglomeration.

Seven sampling points were selected, including (i) five points in the Seine River from upstream to downstream of the Paris conurbation, starting at Juvisy-sur-Orge (JSO), followed by Choisy-le-Roi (CLR), Vitry-sur-Seine (VSS), Bougival (BOUG), and Triel-sur-Seine (TSS), (ii) one point on the Marne River at Champigny-sur-Marne (CSM) before the confluence with the Seine River and located just after the discharge of the Marne aval WWTP, and (iii) one point on the Oise River at Conflans-Sainte-Honorine (CSH) before the confluence with the Seine River ([Figure1A](#)). GPS coordinates are given in [Table 1](#). Samples were collected from a bridge, using a sampling bucket at the center of the width of the river. Water samples were collected at a depth of approximately 50 cm. All the samples were taken in triplicate and then combined to produce a composite sample. The composite samples were then put in sterile bottles and immediately stored at 6°C. Afterwards, the samples were then transported to the laboratory for additional analysis. The samples were taken in the summer and autumn of two successive years, 2020 and 2021.

2.2 Physicochemical analysis

Parameters including conductivity (EC), pH and temperature were determined on-site after collection of water samples, using a Hach multiprobe portable meter (sensION⁺, Hach Company, Germany). Ammonium [NH₄⁺], nitrate [NO₃⁻], and nitrite [NO₂⁻] were determined according to NF EN ISO 11732, NF EN ISO 10304-1 and NF EN ISO 10304-1, respectively. Orthophosphate [PO₄³⁻] were determined following NF EN ISO 6878. The chemical oxygen demand (COD) and the 5-day biochemical oxygen demand (BOD₅), and the total organic carbon (TOC) were analysed using the appropriate analytical methods (ISO 15,705 for COD, NF EN 1899 for BOD₅, and NF EN 1484 for TOC). The hydrometeorological parameters taken into account include the flow of the Seine River from the records of the Vigicrues monitoring stations in France (<https://www.vigicrues.gouv.fr/>), the ambient air temperature and relative humidity data collected from Infoclimat stations (<https://www.infoclimat.fr/>).

2.3. Abundance of microbial cells

The microbial cell count in water samples was determined using the BactoSense automated flow cytometry (FCM) instrument (bNovate, Switzerland), in accordance with recommended practices. Homogenized water samples (2 ml) were transferred to a plastic screw cap micro tube (bNovate, Switzerland) for analyse. The instrument automatically took an aliquot (260 µl) of the sample, of which 90 µl was used for the analysis and 150 µl was used to clean the instrument. A cleaning step was carried out before and after each measurement. Each sample was measured in triplicate. Vittel bottled water was used as the standard to check the status of the BactoSense after every five measurements. The collected aliquot is labelled with SYBR GREEN I and propidium iodide (PI), and incubated at 37°C for 10 min before counting. The process is automated to guarantee consistent measurements for all samples.

The raw FCM data files were then analysed using custom software that enabled batch processing of the large data sets generated in this study. Briefly, FCM gates were constructed to separate bacterial cell signals (total cell concentration, TCC) from background signals and differentiate between intact cells and altered membranes cells, using two fluorochromes SYBR Green 1 and PI. SYBR Green 1 is a marker capable to penetrate all cells whatever the integrity of the cell membrane; whereas PI can only penetrate cells with damaged membranes.

2.4. Microbial activity

The enzymatic activity of the microorganisms was measured using the colorimetric assay technique. This method is based on the hydrolysis of fluorescein diacetate (FDA). The microorganisms produce multiple enzymes (esterases, lipases and proteases), leading to the hydrolysis and consequent release of fluorescein (Adam and Duncan, 2001). Subsequently, the absorbance of the released fluorescein was measured at 490 nm. The higher the intensity, the greater the amount of FDA hydrolysed, resulting in increased microbial activity. The assay is conducted in 96-well microplates following the modified method of (Taylor et al., 2002). A 100 µl water sample is added to each well, followed by 50 µl of Mac Ilvain buffer (0.1 M citric acid and 0.2 M Na₂HPO₄) and 50 µl of fluorescein diacetate (FDA). The microplates were then incubated under agitation (150 rpm) in the dark at 37°C for 2 hours. After the incubation period, the microplates were then centrifuged at 4°C at 15,000 rpm for 10 min. Then, 100 µl of the supernatant of the centrifuged solution were transferred to a new microplate containing 100 µl of Mac Ilvain buffer. The optical density (OD) was measured with a spectrophotometer (Xenius, Safas, Monaco) at a wavelength of 490 nm. The enzyme activity is expressed in µg of fluorescein per ml and per hour, in accordance with the standard range established beforehand.

2.5. Bacterial diversity analysis

2.5.1. DNA Extraction and Polymerase Chain Reaction (PCR) Amplification

To collect the microorganisms, water samples (500 ml) were filtered through a vacuum pump system with 0.22 µm nitrate-cellulose Whatman filters (Sartorius, France) under a laminar flow hood (BIOII, ADS Laminaire, France). The vacuum pumping system and the filters were sterilized at 121°C for 21 min. After filtration, the filters containing the microorganisms were placed in labelled sterile Petri dishes in a laminar flow hood for 30 min for drying. DNA was extracted directly from these filters using the DNeasy PowerWater Kit (QIAGEN) according to the manufacturer's instructions. The genomic DNA quantity was assessed on 1% agarose gel and quantified with Quant-iT™ PicoGreen dsDNA kit according to the manufacturer's instructions and quickly stored at -20°C for the future analysis.

The bacterial 16S rRNA gene libraries were constructed using the "16S metagenomic sequencing library preparation" protocol given by Illumina for the Illumina MiSeq System. The variable V3–V4 regions of the 16S rRNA gene of the bacterial communities were amplified with the forward primer (5'-TAC GGG AGG CAG CAG-3') (Turner et al., 1999) and the reverse primer (5'-CCA GGG TAT CTA ATC C-3'). Each primer set contains the Illumina adapter sequence: forward primer target sequence (5'-ACACTCTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT-3') and reverse primer target sequence (5'-GACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT-3'). The PCR conditions were as follows: 94°C for 5 min, 30 cycles of 94°C for 30 s, 54°C for 30 s, 72°C for 45 s, and finally 72°C for 10 min. DNA amplification was verified by agarose gel electrophoresis (1.5%). The purity and concentration of DNA were assessed using Nanodrop ND-1000 (Thermo-Fisher Scientific). Amplified DNA was purified with QIAquick96 PCR purification kit (Qiagen, CA) according to the manufacturers' instructions. Purified amplicons were normalized to 120 ng/µl into a new low-retention microtube prior to sequencing. The amplified DNA was sequenced using 2x250 paired-end Illumina MiSeq platform by Eurofins Genomics (Germany) on an Illumina MiSeq platform according to the standard protocols. The raw sequence data have been deposited in the NCBI Sequence Read Archive under the BioProject PRJNA1016134.

2.5.2. Sequence analysis and data processing

The raw sequences (.fastq) for all of the samples from Eurofins were imported into the FROGS pipeline (Find Rapidly OTU with Galaxy Solution) implemented on a galaxy instance (v.2.3.0) (<http://sigenae-workbench.toulouse.inra.fr/galaxy/>). Pair-end reads were merged using the SoftWare FLASH (v1.2.6) with a mean merging rate of 98% (Magoč and Salzberg, 2011). Barcode and primer sequences were removed with cutadapt (Martin, 2011). Sequences were then clustered into operational taxonomic units (OTU) with SWARM (Mahé et al., 2014), which generates the OTU abundance table with an OTU being defined at the 97% sequence similarity level. Chimeras were removed using the VSEARCH tool (Rognes et al., 2016). The taxonomic assignment of each OTU was performed using the BLAST tool against with the database SILVA-132 16S rRNA (Quast et al., 2013). The Shannon index and the Chao1 index were calculated to estimate alpha diversity. The Shannon index was used to estimate species richness and evenness, while the Chao1 index provides an estimate of species richness based on abundance.

2.6. Statistical analysis

Before the various analyses were performed to test for significant differences between the treatments, the normality of the data matrices was tested using the Kolmogorov Smirnov test implemented in R-3.6.1 software (France). Differences between the physical and chemical parameters, the relative abundance of microbial cells, the enzyme activity, and the diversity index were analyzed by one-way ANOVA (Fisher's Post Hoc Test) with a 95% confidence interval.

3. Results and discussion

3.1. Physical-chemical parameters

The results for the physico-chemical parameters of the surface water of the Seine River during summer and autumn of 2020 and 2021 are presented in [Table S1](#). The pH ranged between 7.8 and 8.2, no variability was observed between sampling sites nor sampling periods ([Table 1](#)). Besides, N-NO_3^- exhibited the highest concentration in comparison to N-NO_2^- and N-NH_4^+ for all samples, ranging from 16.1 to 29.3 mg/L. The results of the Two-ways Anova analysis revealed a significant spatial variability in NO_2^- , NO_3^- , and NH_4^+ concentrations, while no seasonal variability existed between the sampling periods ([Table 1](#)). The total organic carbon (TOC) content varied significantly among sampling sites from 1.8 to 5.1 mgC/L ([Table 1](#)). The TSS (Triel-sur-Seine) site, situated downstream of the Parisian conurbation, recorded the highest value of TOC; while the lowest value was observed at the CSM (Champigny-sur-Marne) site, situated on the Marne River, upstream Paris. COD (chemical oxygen demand) ranged between 5.8 mg/L (TSS in summer 2021) and 15.1 mgO₂/L (CSM in summer 2020). BOD₅ (biological oxygen demand) ranged from 0.5 mgO₂/L (CLR in summer 2021) to 5.1 mgO₂/L (TSS in summer 2021). Both BOD and COD maximum were observed during the summer 2021 at TSS site. The results of the two-way Anova analysis revealed that there were no significant differences in COD and BOD concentrations along the spatial axis, while a significant seasonal variability was noted ([Table 1](#)). P-PO_4^{3-} concentrations ranged from 0.2 mg/L (JSO in summer 2021) to 0.39 mg/L (TSS in autumn 2021) and varied significantly between seasons, whereas there was no significant difference between the sampling sites. The highest $[\text{PO}_4^{3-}]$ values were recorded during autumn 2021 regardless of the site concerned. The water temperature (T°C) did not differ between summer and autumn in 2020, however it was significantly different between the seasons in 2021. Indeed, the average water temperature was approximately 20.5°C during summer and 9.75°C in autumn ([Table S1](#)).

A principal component analysis (PCA) was conducted on the physico-chemical data of all parameters for the 7 sampling sites and the 2 seasons (summer and autumn) in 2020 and 2021 ([Figure 2](#)). The PCA revealed that there was no significant disparity between the Seine River and its tributaries, i.e., Marne and Oise ([Figure 2A](#)). When compared to the other sites, the TSS site exhibited significantly higher concentrations of $[\text{NO}_3^-]$, $[\text{NO}_2^-]$, $[\text{NH}_4^+]$, and TOC ([Figure 2C, D](#)), and appeared separated from the other sites. All the samples regardless both the site and the year collected during summer displayed higher concentrations of PO_4^{3-} and COD compared to those collected during autumn. Additionally, the water temperature during summer was much higher, reaching approximately 20.5°C versus 9.8°C during autumn ([Figure 2E](#)). The contrast in seasonal changes (summer vs. autumn) during 2021 was clearly apparent; whereas this distinction was less noticeable in the samples collected during 2020.

The mean flow of the Seine River in 2021 (> 200 m³/s) was higher than that in 2020 (< 200 m³/s). This was the case for all the samples regardless the location from April to December ([Figure 3A and B](#)).

3.2. Abundance of intact/damaged cells

Total microbial cells (TTC) and damaged microbial cells (DMC) were quantified and are presented in [Figure 4A](#) for TTC and [Figure 4B](#) for DMC. TTC ranged between 1×10^6 and 6×10^6 cells/mL, DMC represents an average of 6% of TTC. The samples from the CSH site had the highest TTC, observed in autumn 2020 at 5.3×10^6 cells/mL. Conversely, the lowest TTC, 1.1×10^6 cells/mL, was recorded for the JSO site in summer 2021. The two-way Anova results showed that no significant differences were observed for TTC and DMC between sampling sites and seasons.

3.3. Microbial activity

The global microbial activity was measured by assessing the hydrolysis of fluorescein diacetate [3', 6'- diacetylfluorescein, FDA], which was released and expressed as the quantity of fluorescein ml⁻¹ h⁻¹. The values of microbial activity ranged between 12 and 30 µg fluorescein ml⁻¹ h⁻¹ (Figure 5). The FDA activity in the samples collected during the summer was significantly higher than that for sample collected during autumn. These findings were confirmed by the two-way Anova analysis (***p < 0.01) (Table 1). However, no significant difference between the sampling sites and no interaction between the sampling sites and seasons were observed as shown Table 1. Besides, Figure 6 shows that there is a strong correlation between microbial activity and the number of microbial cells.

3.4. Bacterial community composition

After eliminating low-quality sequences and chimeras, a total of 6 million high-quality 16S rRNA sequences were obtained. Subsequently, all samples were then randomly subsampled to 25,700 sequences, which were subjected to further statistical analysis. The mean number of Operational Taxonomic Units (OTU) in samples collected from the Champigny-sur-Marne site (approximately 5,500 OTUs) was significantly lower than that found in the other sites (approximately 7,800 OTUs), regardless of the season or year. Moreover, the average number of OTUs in all samples during both summer and autumn of 2020 was significantly higher than that of 2021. The classified OTUs belonged to 40, 43, 34, and 25 phyla in the autumn and summer of 2020 and 2021, respectively. It has been observed that changes in the relative abundance of phyla between years (2020 and 2021) were much more significant than those between seasons (summer and autumn) and sites (Figure 7). Whatever the site, there was a significant difference in the number of classified OTUs between summer and autumn 2021 (**p < 0.05), between summer 2020 and 2021 (***p < 0.001), and between autumn 2020 and 2021 (***p < 0.001), as determined by a two ways Anova analysis. Moreover, the OTU count in the downstream samples was significantly higher than that in the upstream samples (Figure 8A). Figure 7 illustrates the predominant groups present in each sample, with abundances exceeding 1%, based on their relative abundance. The dominant phyla observed were *Proteobacteria*, *Actinobacteriota*, *Bacteroidota* and *Cyanobacteria*, which accounted for approximately 90-95% of the total abundance. The followed phyla, namely *Chloroflexi*, *Firmicutes*, *Verrumomicrobiota*, *Campilobacterota*, *Bdellovibrionota*, and *Patescibacteria*, constituted 5-10% of the abundance.

Regardless the site, the most dominant phylum *Proteobacteria* was significantly less abundant in both summer and autumn 2020 (75.5% in summer and 75.4% in autumn) when compared to 2021 (37.8% in summer and 40.5% in autumn), as demonstrated by the results of the two-way Anova analysis (***p < 0.001) (Figure 9A). The second most abundant phylum, *Actinobacteriota*, made up 10-30% of the total abundance. The occurrence of this phylum was significantly greater in 2020 than to 2021 for both seasons, in contrast to the results obtained for *Proteobacteria* (***p < 0.001). There were no significant differences observed for *Bacteroidota*, between seasons and years, and they accounted for approximately 18% of the total abundance. The *Cyanobacteria* phylum was detected at around 10% relative abundance in the samples collected throughout 2020. This level of abundance has been consistently maintained over the seasons, while its presence in samples taken during 2021 was insignificant, at less than 1%. A significant difference in the abundance of *Cyanobacteria* between seasons was observed (*p < 0.05). The other phyla, including *Chloroflexi*, *Firmicutes*, *Verrumomicrobiota* and *Campilobacterota* were detected only in the samples collected in 2020, with a minimal relative abundance of less than 1%. For the comparison between sites, we noted that a higher relative abundance of the phyla *Bacteroidota* and *Patescibacteria* in the downstream sites (i.e., BOU and TSS) than in the upstream samples (i.e., JSO, CLR, and VSS). Conversely, the relative abundance of *Firmicutes* and *Cyanobacteria* was lower in the downstream sites than in the upstream ones (Figure 10A).

To clarify the microbial composition in the Seine water in different locations and seasons, we examined the relative abundance and classification of OTUs from the four most prevalent phyla including *Proteobacteria*, *Bacterioida*, *Actinobacteriota* and *Cyanobacteria* at the class level (Figure 9). The analysis carried out to detect spatial discrepancies (between seasons and years) revealed the existence of two classes, *Alphaproteobacteria* and *Gammaproteobacteria*, both of which belong to the *Proteobacteria* phylum, in the water of the Seine River. The abundance of *Gammaproteobacteria* was higher than that of *Alphaproteobacteria* in all samples. Meanwhile, there were no significant seasonal differences in the relative abundance of *Alphaproteobacteria*. However, in 2021 samples, the relative abundance of *Gammaproteobacteria* was significantly higher than that for 2020 samples, whatever the season. Furthermore, the relative abundance of the other classes such as *Cyanobacteriia* (members of *Cyanobacteria*), *Actinobacteria* and *Acidimicrobiia* (members of *Actinobacteriota*) was significantly greater in 2020 samples compared to that of 2021 samples. When comparing the relative abundance between the studied sites at the phylum level, it is worth mentioning that there was no difference in the relative abundance of the *Proteobacteria* phylum between the downstream and upstream samples. Nonetheless, when comparing the classes α - and γ -*Proteobacteria* (two important members *Proteobacteria*), the downstream samples showed a higher abundance of alpha *Proteobacteria* than in the upstream samples, and conversely, a lower abundance of gamma (Figure 9B). Hence, no significant difference was detected at the phylum level. Within the *Actinobacteriota* phylum, the abundance of the class *Actinobacteria* was higher in downstream samples than in upstream samples; and conversely *Acidimicrobiia* exhibited a lower abundance in upstream samples. Moreover, the downstream samples showed a higher abundance of classes such as *Bacteroidia*, *Clostridia*, and *Saccharimonadia* in comparison to the upstream samples (Figure 10).

In addition, we analyzed the OTUs classification and relative abundance at the genus level (Figure 11). The dominant genus abundance varied for both year and season, with *Microtrichales_CL500-29 marine group*, *Sporochthyaceae_hgcl clade*, *unclassified Actinobacteriota*, *Cyanobium PCC-6307*, and *unclassified-Cyanobacteriia* being dominant in samples from 2020 in both seasons. Conversely, *Methylophilaceae_OM43clade*, *Methylotenera*, and *Pseudomonas* were dominant in 2021 samples. During the summer of 2021, *Sphingorhabdus* and *Massilia* were the two most common genera. *Flaviobacterium* was present throughout all seasons and particularly plentiful at Bougival as illustrated Figure 11. It is worth noting that *Methylophilus* made up over 30% of the Bougival samples during the summer of 2021. Additionally, the aquatic_group *Burkholderiales_MWH-UniP1* was detected in all samples and was more widespread in the 2021 samples than in the 2020 ones.

General bacterial community characteristics were assessed at phylum level in all samples collected at different sites and seasons in 2020 and 2021, using non-metric multidimensional scaling analysis (NMDS) (Figure 12). Figure 12A shows that axis 1 separated four sampling sites along the Seine (excluding TSS, which is the furthest site downstream from Paris) from CSM, situated on the Marne and CSH located on the Oise. Thus, each river has its own distinct microbial community. The NMDS analysis outcomes demonstrated a clear differentiation between bacterial communities in summer and autumn (Figure 12B). This was further confirmed by the analysis of data from individual sites (Figure 12C). However, when the year variable (2020 and 2021) was added to the data (Figure 12D), samples from both years were segregated along axis 1, irrespective of the seasons. This suggests that the effect from one year to the next, as demonstrated in our research between 2020 and 2021, carries more weight than the impact of seasonal variations.

3.5. Diversity indices

Diversity indices, including Chao1, Shannon, and Shannon Equitability were calculated using the OTU count and their presence or absence. A higher richness index was found in the 2020 samples than in the 2021 samples. (Figure 8A). The 2021 samples for both seasons exhibited a significantly higher Chao1 than those of 2020 ($p < 0.05$), as depicted in Figure 8B. The Shannon index of the 2021 samples has decreased compared to the 2020 samples ($*p < 0.01$) for both seasons summer ($*p < 0.01$) and autumn ($** p < 0.05$) (Figure 8C). The Shannon equitability (Figure 8D) showed a higher value for the 2020 samples compared to the 2021 samples, regardless of the seasons.

From the comparison between the upstream (i.e., JSO, CLR, VSS) and downstream (i.e., BOU and TSS) sites along the Seine River, it clearly appeared that the richness index values of the downstream samples were higher than those of the upstream samples. In addition, the Shannon index and Shannon equitability values in the upstream samples were higher than in the downstream samples.

3.6. Multivariate correlation analysis between water bacterial communities at the phylum level and environmental variables

RDA (Redundancy analysis) was performed to assess the correlation between environmental factors and the family-level composition of bacterial communities in water samples from seven sampling sites during the summer and autumn of 2020 and 2021 (Figure 13). Different bacterial phyla responded differently to nutrients, temperature, and pH at different sampling sites (Figure 13A), rivers (Figure 13B), and seasons according to the year (Figure 13C). RDA analysis has revealed that the relative abundance of four phyla, namely *Proteobacteria*, *Cyanobacteria*, *Bacteroidota* and *Actinobacteriota*, varies across the sampling sites, based on different parameters, including N-NO_3^- , temperature, BOD and P-PO_4^{3-} , respectively. *Proteobacteria* and *Bacteroidota* were found to be dominant phyla in the Seine and Oise samples, due to various nutrient parameters such as N-NO_3^- , N-NH_4^+ , N-NO_2^- , TOC, DOC and temperature. At last, *Actinobacteria* and *Cyanobacteria* were the predominant phyla identified in the 2020 samples, despite seasonal variations. However, *Proteobacteria* was the predominant phylum in 2021. No particular environmental factor has been fully identified to provide a satisfactory explanation for this variability.

4. Discussion

Surface water in the Seine River basin, consisting of both natural and man-made water bodies of water, plays a vital role in urban ecosystem services. It also remains an essential source of drinking water, irrigation, and recreation, and is vital for the swimming plan launched in 2018 for the Paris 2024 Olympics Games. Changes in urban surface water due to climate change and human activities could cause variations in microbial communities, affecting water quality and ecosystem functioning. In other words, a diverse microbial community can enhance the resilience and stability of ecosystems. Assessing and understanding the microbial ecology of the Seine River is essential for ecosystem management and conservation endeavours. In our study, high-throughput amplicon sequencing was used to describe the bacterial community diversity of surface water samples collected from 5 sites along the Seine River and 2 sites on the Marne and Oise rivers, which are two tributaries of the Seine River (one upstream and one downstream), during two seasons (summer and autumn) over two years (2021 and 2022).

Microorganisms, including bacteria, archaea and others, exhibit remarkable diversity in terms of species and functions. This diversity is influenced by environmental factors such as pH, temperature, nutrient availability and more. Microorganisms are highly sensitive to the physico and chemical conditions of their surroundings. For instance, the pH level of water, the availability of oxygen, the presence of contaminants, and temperature can significantly impact on their development and production (Savio et al., 2015; Wang et al., 2023, 2018, 2012). These physicochemical parameters

act as selective pressures, shaping the microbial communities in an ecosystem. Therefore, these parameters need to be checked regularly to monitor the status of microbial diversity in the environment. Furthermore, the relationship between microorganisms, physicochemical parameters, and ecosystem function is complex and crucial for the well-being and sustainability of ecosystems. Understanding this relationship is essential for ecosystem management and conservation endeavors as it enables the creation of more efficient approaches to maintain and renovate these valuable natural systems. For this, we present at first the results of physicochemical parameters of the water in the Seine River. As we mentioned in our precedent publication ([Bagagnan et al., 2023 in progress](#)), the physicochemical properties of the surface water have remained stable over the last 10 years. Comparing these results with those from other rivers around the world showed that the pH value of the surface water of the Seine River (approximately 8.0) was comparable to the values of 7.8 and 8.3 of the Quin and Yongding Rivers in China, respectively, which are subject to strong human impacts, such as the Seine in the region of Paris conurbation ([Li et al., 2022](#); [Zhao et al., 2022](#)). Moreover, the nutrient parameters such as N-NO_3^- (22.8 mg/L), N-NH_4^+ (0.12 mg/L), and P-PO_4^{3-} (0.13 mg/L) are within the ranges of values determined from the other rivers such as Yellow Delta River, and Maozhou River in China ([Lv et al., 2016](#); [Ouyang et al., 2020](#)). The shift from one season to another and from one year to the next results in remarkable alterations of the physicochemical properties of the water. However, no changes between the sampling sites was observed when each site was analysed separately ([Figure 2](#)). The variation in water temperature in the Seine River and its tributaries depending on the season is a natural and expected phenomenon in temperate climates, and it is indeed closely linked to atmospheric temperatures. Nitrogen-based nutrients (NO_2^- , NO_3^- and NH_4^+) and other parameters did not significantly vary between seasons. However, we noted variations between upstream and downstream samples. The TSS site, located downstream of the Paris conurbation, demonstrated a high concentration of nutrients, including NO_2^- , NO_3^- , NH_4^+ , and total organic carbon. This can be explained by the phenomenon of the accumulation from upstream to downstream and it was also observed in the case of the Maozhou River ([Ouyang et al., 2020](#)). In addition, a recently installed tertiary treatment system at the Gresillons WWTP performs nitrification-denitification, but only partially treats the wastewater, allowing nitrites to be discharged into the Seine River ([Raimonet et al., 2017](#); [Rocher et al., 2015](#)). The observation of seasonal fluctuations in orthophosphates in various studies, along with the explanation provided by ([Liu et al., 2013](#)) that these fluctuations can be partially attributed to a reduction in river flows during the summer, highlights an important aspect of nutrient dynamics in aquatic ecosystems. In fact, the reduction in river flows during the summer is a common phenomenon in many regions. This phenomenon undergoes a significant implications for nutrient dynamics in rivers. When flow rates are low, the residence time of water in the river increases. As a result, nutrients like orthophosphates may become more concentrated in the water. Changes in environmental factors can significantly impact the abundance and composition/diversity of microorganisms. Therefore, comprehending how environmental factors affect microbial communities is essential for a range of fields, such as ecology, microbiology, and environmental science. It helps us predicting how ecosystems might respond to natural or human-induced changes and providing strategies for managing and conserving these environments.

According to the results obtained from high-throughput sequencing technology, the total number of phyla in our samples varied from 25 to 43. This is the common number of phyla identified in several studies using similar technology to analyse bacterial communities in rivers, such as the Danube in Europe ([Savio et al., 2015](#)), Apies in South Africa ([Abia et al., 2018](#)), Mississippi in the USA ([Korajkic et al., 2015](#); [Staley et al., 2013](#)), Kalamas in Greece ([Meziti et al., 2016](#)), Yangtze in Japan ([Liu et al., 2018](#)), and Maozhou in China ([Ouyang et al., 2020](#)). The dominant phyla identified in the Seine River were *Proteobacteria*, *Actinobacteriota*, *Bacteriodota*, and *Cyanobacteria*. These findings are in line with previous works ([George et al., 2012](#)), where the three aforementioned phyla were

the most dominant in the Seine water at three sites, Marnay upstream Paris site and Bougival and Triel-sur-Seine downstream Paris sites along the Seine River. Moreover, it is important to note that the presence of these phyla is consistent with what has been observed in other urban rivers by (Mai et al., 2018; Ouyang et al., 2020; Savio et al., 2015; Wang et al., 2023) which suggests some commonality in the microbial communities of rivers under urban pressure. Each of these dominant phyla likely plays a unique role in maintaining the overall ecological functioning of the river ecosystem. Among them, *Proteobacteria* are a diverse group of bacteria known for their metabolic versatility. They can be involved in various functions, including nitrogen cycling, organic matter decomposition, and pollutant degradation (Goetghebuer, 2019; Sun et al., 2017). *Actinobacteria* are often associated with the decomposition of complex organic compounds, including plant material and recalcitrant organic matter. They contribute to nutrient recycling in aquatic ecosystems (Mikhailov et al., 2019). *Bacteroidota* are known for their ability to degrade complex carbohydrates (i.e., glycans) and play a role in breaking down organic matter, which can impact nutrient cycle (Kruczyńska et al., 2023). *Cyanobacteria* are photosynthetic bacteria found in aquatic ecosystems. While they are primary producers that can contribute to oxygen production, they can also form toxic algal blooms in specific conditions, affecting the ecosystem negatively (Soto Ramos et al., 2023). As far as microbial abundance is concerned, we analysed the microbial abundance of the Seine water with a novel automated system that differentiates damaged and intact cells. The Seine water contained approximately 10^6 cells/ml, this finding is in good agreement with the results reported by (George et al., 2012) in the PIREN-Seine programme for the Marnay, Bougival and Triel-sur-Seine sites. In addition, the microbial abundance in the Seine water is similar to that reported for the Wensum River in England (Albaggar, 2014), ranging between 0.2 and 5.3×10^6 cells/ml, depending on the sampling sites and higher to that measured on the Lancang River in China (Luo et al., 2019), lying between 0.3 and 0.5×10^6 cells/ml, depending on the seasons.

Temporal changes of bacterial communities in water

Seasonal variations in microbial communities in river ecosystems are indeed a well-documented phenomenon. Indeed, the Seine River and its tributaries are open ecosystems and hence sensitive to climatic variations. The transition from one season to another causes variation in the physico-chemical characteristics of the water which in turn affects the bacterial composition. In the current study, samples were collected in two seasons: summer and autumn of two consecutive years, 2020 and 2021. When comparing the bacterial communities throughout the seasons, we observed a significant difference overall (Figure 12). However, the adding of the year factor resulted in a substantial variation between years, which overshadowed the seasonal variation. Regardless of the seasons, we noted fascinating results as we compared the bacterial compositions between those years. The finding that bacterial communities in the water of the Seine river were more diverse and evenly distributed in 2020 compared to 2021 is very interesting (Figure 7&8&9). The first hypothesis, that the COVID-19 lockdown in 2020 may have played a role in this disparity, warrants further investigation. During the lockdown period, numerous human activities were suspended, resulting in a decrease in wastewater production and fewer contaminants being discharged into the Seine River. Another explanation could be linked to the lower water flow in the Seine River in 2020 compared to 2021 (Figure 3). Unlike the even distribution between the phyla in 2020, in 2021, the phylum *Proteobacteria* constituted more than 60 % of the relative abundance. The main genera associated with the *Proteobacteria* phylum included *Methylotenera*, *Methylophilaceae*-OM43clade, *Pseudomonas*, and *Massilia* which significantly contributed to the high abundance of this phylum. *Massilia*, *Pseudomonas*, and *Methylotenera* are opportunistic pathogens, and several authors have suggested that the presence of these pathogens may stem from insufficient removal at the WWTP level (Pandey et al., 2014; Shao et al., 2019). Conversely, in 2020, there was a significantly greater relative abundance of the genera *Microtrichales*, *Sporichthyaceae*, *Actinobacteria*_unclassified from

the phylum *Actinobacteria*, and *Cyanobacteriia_unclassified*, *Cyanobium* from the phylum *Cyanobacteria* compared to 2021. The presence of *Cyanobacteria* can be explained by the low river flow in 2020. In fact, it is known that *Cyanobacteria* are often associated with slower-moving or stagnant water bodies where they can form blooms (Shang et al., 2023). Meanwhile, high water flow causes continuous mixing of suspended solids and prevents water stratification. As a result, the acquisition of nutrients by *Cyanobacteria* is unlikely and they cannot position themselves in the water column to receive the light intensity they need. Therefore, *Cyanobacteria* would have benefited from the low water flow conditions in the Seine River during 2020 to develop. It is also interesting to note that the development of *Cyanobacteria* in 2020 has led to a shift in the composition of the microbial community with the high abundance of *Actinobacteria*. In fact, (Tu et al., 2022) have shown that a *Cyanobacteria* bloom would accelerate the conversion of organic phosphorus to soluble inorganic phosphorus from sediment to water, which was necessary for the development of *Actinobacteria*. However, these changes in bacterial composition and diversity by year did not result in changes in the microbial activity and abundance. This suggests that despite fluctuations in the types and numbers of bacteria present, the overall microbial activity and abundance remained relatively stable. Nevertheless, microbial activity and abundance were higher in summer than in autumn for both years. This indicates a seasonal pattern where microbial activity tends to be more active during summer months compared to autumn. And, the higher microbial abundance contributes to this increased activity (Figure 6). This could be due to various factors such as temperature, light availability, nutrient availability, or other environmental conditions that favour microbial growth and metabolic activity during the summer as previously mentioned (Crump and Hobbie, 2005; Sun et al., 2017; Wang et al., 2016). In our case, according to the results of the PCA analysis (Figure 2), temperature and orthophosphate content were two of the most important environmental factors affecting microbial activity.

Spatial variations of bacterial communities in water

Regarding the spatial variation of microbial diversity in river ecosystems, many studies have been conducted on this topic. However, it is interesting to note that numerous studies have showed that the effect of seasons on microbial communities can often be more pronounced than the effect of geographic location (Li et al., 2019; Zhu et al., 2019). In our study, the spatial variation has been taken into account to differentiate between sampling sites (seven sites), between before (JSO with respect to Seine-Valenton WWTP) and after (CLR, VSS with respect to Seine-Valenton, and BOU with regard to Seine-Aval) a WWTP discharge, between upstream (JSO, CLR and VSS) and downstream (BOU and TSS) sites, between rivers (Seine, Marne and Oise). In general, microbial activity and abundance varied in different ways within the sampling sites for each season and each year. When comparing the sampling sites located before and after the WWTP discharge, we observed a higher abundance (**p < 0.01) and activity (*p < 0.05) of microorganisms in the sampling sites located downstream the WWTP discharge compared to those located upstream the WWTP. This suggests that the discharge of effluent from WWTPs can contribute to an increase in the activity and abundance of microbial populations in the river. Moreover, we observed that microbial abundance (*p < 0.05) in upstream Paris was higher than in downstream Paris, however no changes in activity were observed. This was in contrast to our observations of the physico-chemical parameters. We noticed an accumulation phenomenon of the nutrient concentration from upstream to downstream, which has been suggested by numerous studies (Gücker et al., 2006; Marti et al., 2004; Spänhoff et al., 2007; Waiser et al., 2011). Several factors can contribute to these variations. The discharge from the Seine Valenton WWTP, an upstream site, which uses activated sludge for biological treatment, could explain why the river upstream contains more microorganisms than downstream. However, it's important to consider that changes in microbial activity may lag behind changes in microbial abundance. Microorganisms may need time to adapt to new conditions or to

recover from environmental perturbations. Therefore, despite the high abundance in the upstream water, no difference in activity was observed.

Unlike the strong variability in microbial composition and diversity between seasons and years, the variability is less remarkable among sampling sites. This suggests that the dominant factors shaping the microbial communities in the Seine River are more related to seasonal and annual changes than to differences in spatial locations. According to our knowledge, the effluents were well controlled for all physico-chemical parameters before being discharged into the Seine River. Thus, the ecosystem of the Seine River, in the Paris conurbation, may have relatively uniform environmental conditions across the various sampling sites, resulting in less variability in microbial communities among sites. The variations were found between the upstream and downstream samples. Species diversity and richness estimators (Shannon and Chao1) showed that downstream samples had lower bacterial diversity than upstream samples, suggesting that WWTP discharges may have an effect on bacterial community diversity in the Seine ecosystems. Moreover, there was a higher abundance of the phyla *Bacteroidota* and *Patescibacteria* in the downstream water than in the upstream water. In fact, it is worth noting that *Bacteroidota* are commonly found in human intestines (Dowd et al., 2008; Shanks et al., 2011), which suggests that the spatial distribution of this bacteria may be influenced by the accumulation of excessive concentration of faecal matter and other contaminants in wastewater caused by the high population density of residential areas in the Paris metropolitan area. *Patescibacteria* groups are known to be able to encode various organically active enzymes, thus degrading complex organic matter to simple molecules, as shown in previous studies (Dong et al., 2021; Gu et al., 2023). These authors have shown that the dominance of *Patescibacteria* was associated with the presence of high concentrations of some complex organic matter, such as PolyPh and PolyAr compounds, which can be partially or even completely removed from the leachate during the membrane bioreactor (MBR) process. The Seine River downstream receives the effluents from the Seine Centre, Seine Aval and Seine Grésillons WWTPs. Among them, the Seine Aval WWTP use the MBR process to treat the wastewater, which can result in more specific compounds associated with this system in the effluent discharged into the Seine River, thus promoting the development of this phylum.

Interestingly, at the phylum level, the relative abundance of *Proteobacteria* was similar between upstream and downstream samples. However, significant variations were observed at the class level. The abundance of the *Gammaproteobacteria* class was the most abundant in all samples of the surface water of the Seine River, which is in accordance with the findings of (Ge et al., 2021). These authors indicated that *Gammaproteobacteria* was predominantly prevalent in the urbanised zone, followed by *Alphaproteobacteria* and *Betaproteobacteria*. This is because many members of the genus *Gammaproteobacteria* originate from anthropogenic or zoonotic sources and are widely considered to be transient passengers (Newton et al., 2011; Sun et al., 2017) and may have been transported by the WWTP effluent in our case. It is interesting also to note that no class was detected for *Betaproteobacteria*, yet *Betaproteobacteria* were found to be an important and abundant class of *Proteobacteria* and this class was considered to be a typical surface water class in the Donjiand River in China (Liu et al., 2012; Sun et al., 2017). This can be explained by the selection pressures. *Betaproteobacteria* are fast-growing, nutrient-loving and highly vulnerable to predation pressure, whereas, members of Alpha- and Gamma-*proteobacteria* are known to be resistant to predation, competitive in low nutrient conditions and able to degrade recalcitrant organic compounds such as humic substances (Sun et al., 2017). As the Seine River has water poor in nutrients, and presumably degrades recalcitrant organic compounds remaining in WWTP effluents, *Alphaproteobacteria* and *Gammaproteobacteria* are able to resist and proliferate. The abundance of the *Gammaproteobacteria* class was greater in the downstream sites than in the upstream sites. Conversely, the abundance of the *Alphaproteobacteria* class was greater in the upstream than in

the downstream sites. This finding is similar to the results presented by (Marti and Balcázar, 2014), where *Gammaproteobacteria* were higher in the downstream sites than in the upstream sites in the Ter River; however it is opposite to the finding presented by (Yuan et al., 2023), where the *Gammaproteobacteria* were higher in the upstream sites than in the downstream sites in the North Canal River, China. These authors explained those variations between upstream and downstream sites for this class as being related to WWTP, due to the presence of residual contaminants in the effluent. To better understand these variations, the measurement of contaminant levels in term of emerging organic contaminants in water and the correlation between microbial diversity and contaminant need to be further complemented.

5. Conclusion

Changes in the bacterial communities were evaluated using high-throughput sequencing, and the relationships between microbial parameters and physico-chemical properties were investigated. The dominant phyla identified in the Seine River were *Proteobacteria*, *Actinobacteriota*, *Bacteriodota*, and *Cyanobacteria*. The presence of the *Alphaproteobacteria* and *Gammaproteobacteria* suggests that the Seine River water is poor in nutrients, and consists mainly of recalcitrant organic compounds remaining in WWTP effluents. The results show a strong temporal variability and a lower spatial variability in the bacterial community structure of surface water in the Seine River. It is interesting to note that the bacterial composition of the Seine River in 2020 was clearly different from that in 2021 probably due to the low water flow rate, which allowed *Cyanobacteria* to develop, leading to changes in the composition of the bacterial communities. Higher microbial activity and abundance was found in summer than in autumn, due to temperature and orthophosphate content. Moreover, spatial variation in bacterial composition was observed between upstream and downstream sites, and between before and after of the Seine Valenton-WWTP subjected to an impact of the effluent from WWTP due to either linked to the wastewater treatment method or to an accumulation phenomenon. For example, *Gammaproteobacteria* were higher in the downstream sites than in the upstream sites, suggesting that the presence of residual contaminants in the effluent. Further measurements of levels of emerging contaminants and other pollutants are needed to better understand these variability. These results provide a basic understanding of the microbial community in the Seine River, serving as a reference for assessing the impact of implementing new wastewater disinfection techniques in the near futures such as disinfection by performic acid.

References

- Abia, A.L.K., Alisoltani, A., Keshri, J., Ubomba-Jaswa, E., 2018. Metagenomic analysis of the bacterial communities and their functional profiles in water and sediments of the Apies River, South Africa, as a function of land use. *Sci Total Env.* 616–617, 326–334. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.10.322>
- Adam, G., Duncan, H., 2001. Development of a sensitive and rapid method for the measurement of total microbial activity using fluorescein diacetate (FDA) in a range of soils. *Soil Biol. Biochem.* 33, 943–951. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(00\)00244-3](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(00)00244-3)
- Albaggar, A.K.A., 2014. Investigation of bacterial community composition and abundance in a lowland arable catchment.
- Behera, S.K., Kim, H.W., Oh, J.-E., Park, H.-S., 2011. Occurrence and removal of antibiotics, hormones and several other pharmaceuticals in wastewater treatment plants of the largest industrial city of Korea. *Sci. Total Environ.* 409, 4351–4360. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2011.07.015>

- Bryant, J.A., Aylward, F.O., Eppley, J.M., Karl, D.M., Church, M.J., DeLong, E.F., 2016. Wind and sunlight shape microbial diversity in surface waters of the North Pacific Subtropical Gyre. *ISME J.* 10, 1308–1322. <https://doi.org/10.1038/ismej.2015.221>
- Castro-Hermida, J.A., García-Presedo, I., Almeida, A., González-Warleta, M., Correia Da Costa, J.M., Mezo, M., 2008. Contribution of treated wastewater to the contamination of recreational river areas with *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis*. *Water Res.* 42, 3528–3538. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2008.05.001>
- Crump, B.C., Hobbie, J.E., 2005. Synchrony and seasonality in bacterioplankton communities of two temperate rivers. *Limnol. Oceanogr.* 50, 1718–1729. <https://doi.org/10.4319/lo.2005.50.6.1718>
- Dong, X., Zhang, C., Li, W., Weng, S., Song, W., Li, J., Wang, Y., 2021. Functional diversity of microbial communities in inactive seafloor sulfide deposits. *FEMS Microbiol. Ecol.* 97, fiab108. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiab108>
- Dowd, S.E., Callaway, T.R., Wolcott, R.D., Sun, Y., McKeenan, T., Hagevoort, R.G., Edrington, T.S., 2008. Evaluation of the bacterial diversity in the feces of cattle using 16S rDNA bacterial tag-encoded FLX amplicon pyrosequencing (bTEFAP). *BMC Microbiol.* 8, 125. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-8-125>
- Drury, B., Rosi-Marshall, E., Kelly, J.J., 2013. Wastewater Treatment Effluent Reduces the Abundance and Diversity of Benthic Bacterial Communities in Urban and Suburban Rivers. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 1897–1905. <https://doi.org/10.1128/AEM.03527-12>
- Findlay, S., 2010. Stream microbial ecology. *J. North Am. Benthol. Soc.* 29, 170–181. <https://doi.org/10.1899/09-023.1>
- Flipo, N., 2013. Modélisation des Hydrosystèmes Continentaux pour une Gestion Durable de la Ressource en Eau (Memoire d’HDR). Université Pierre et Marie Curie – Paris VI, Paris.
- Flipo, N., Lestel, L., Labadie, P., Meybeck, M., Garnier, J., 2021. Trajectories of the Seine River Basin, in: Flipo, N., Labadie, P., Lestel, L. (Eds.), *The Seine River Basin, The Handbook of Environmental Chemistry*. Springer International Publishing, Cham, pp. 1–28. https://doi.org/10.1007/698_2019_437
- Ge, Y., Lou, Y., Xu, M., Wu, C., Meng, J., Shi, L., Xia, F., Xu, Y., 2021. Spatial distribution and influencing factors on the variation of bacterial communities in an urban river sediment. *Environ. Pollut.* 272, 115984. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115984>
- George, I., Anzil, A., Lanckman, R., Meyer, N., Berthe, T., Petit, F., Fechner, L., Servais, P., 2012. Communautés microbiennes dans les rivières du bassin de la Seine : diversité et lien avec la présence de polluants chimiques. 10.
- Goetghebuer, L., 2019. Les communautés bactériennes de rivières: étude de la dynamique des espèces au sein d’une communauté modèle. Université Libre de Belgique.
- Gu, Z., Bao, M., He, C., Chen, W., 2023. Transformation of dissolved organic matter in landfill leachate during a membrane bioreactor treatment. *Sci. Total Environ.* 856, 159066. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.159066>
- Gücker, B., Brauns, M., Pusch, M.T., 2006. Effects of wastewater treatment plant discharge on ecosystem structure and function of lowland streams, in: *Journal of the North American Benthological Society*. pp. 313–329. [https://doi.org/10.1899/0887-3593\(2006\)25\[313:EOWTPD\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1899/0887-3593(2006)25[313:EOWTPD]2.0.CO;2)
- Guo, D., Lintern, A., Webb, J.A., Ryu, D., Liu, S., Bende-Michl, U., Leahy, P., Wilson, P., Western, A.W., 2019. Key Factors Affecting Temporal Variability in Stream Water Quality. *Water Resour. Res.* 55, 112–129. <https://doi.org/10.1029/2018WR023370>
- Hooper, D.U., Chapin, F.S., Ewel, J.J., Hector, A., Inchausti, P., Lavorel, S., Lawton, J.H., Lodge, D.M., Loreau, M., Naeem, S., Schmid, B., Setälä, H., Symstad, A.J., Vandermeer, J., Wardle, D.A.,

2005. EFFECTS OF BIODIVERSITY ON ECOSYSTEM FUNCTIONING: A CONSENSUS OF CURRENT KNOWLEDGE. *Ecol. Monogr.* 75, 3–35. <https://doi.org/10.1890/04-0922>
- Ibekwe, A.M., Leddy, M.B., Bold, R.M., Graves, A.K., 2012. Bacterial community composition in low-flowing river water with different sources of pollutants. *FEMS Microbiol. Ecol.* 79, 155–166. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2011.01205.x>
- Jin, D., Kong, X., Cui, B., Jin, S., Xie, Y., Wang, X., Deng, Y., 2018. Bacterial communities and potential waterborne pathogens within the typical urban surface waters. *Sci. Rep.* 8, 13368. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-31706-w>
- Korajkic, A., Parfrey, L.W., McMinn, B.R., Baeza, Y.V., VanTeuren, W., Knight, R., Shanks, O.C., 2015. Changes in bacterial and eukaryotic communities during sewage decomposition in Mississippi river water. *Water Res.* 69, 30–39. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.11.003>
- Kruczyńska, A., Kuźniar, A., Banach, A., Jurczyk, S., Podlewski, J., Słomczewski, A., Marzec-Grządziel, A., Sochaczewska, A., Gałązka, A., Wolińska, A., 2023. Changes in the mycobiome structure in response to reduced nitrogen fertilization in two cropping systems of maize. *Sci. Total Environ.* 904, 166343. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.166343>
- Lestel, L., Carré, C., Mouchel, J.-M., Meybeck, M., Briand, C., Servais, P., Haghe, J.-P., Euzen, A., 2021. Chapitre 2 - Paris et la Seine : l'impossible équipement d'une agglomération, in: *Les rivières urbaines et leur pollution*, Indisciplines. Éditions Quæ, Versailles, pp. 23–78.
- Li, J., Sun, Y., Zhang, X., Pan, C., Zhang, S., Zheng, B., 2022. Water Quality and Microbial Community in the Context of Ecological Restoration: A Case Study of the Yongding River, Beijing, China. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 19, 13056. <https://doi.org/10.3390/ijerph192013056>
- Li, Y., Gao, Y., Zhang, W., Wang, C., Wang, P., Niu, L., Wu, H., 2019. Homogeneous selection dominates the microbial community assembly in the sediment of the Three Gorges Reservoir. *Sci. Total Environ.* 690, 50–60. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.07.014>
- Liu, L., Yang, J., Yu, X., Chen, G., Yu, Z., 2013. Patterns in the Composition of Microbial Communities from a Subtropical River: Effects of Environmental, Spatial and Temporal Factors. *PLoS ONE* 8, e81232. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0081232>
- Liu, T., Zhang, A.N., Wang, J., Liu, Shufeng, Jiang, X., Dang, C., Ma, T., Liu, Sitong, Chen, Q., Xie, S., Zhang, T., Ni, J., 2018. Integrated biogeography of planktonic and sedimentary bacterial communities in the Yangtze River. *Microbiome* 6. <https://doi.org/10.1186/s40168-017-0388-x>
- Liu, Z., Huang, S., Sun, G., Xu, Z., Xu, M., 2012. Phylogenetic diversity, composition and distribution of bacterioplankton community in the Dongjiang River, China. *FEMS Microbiol Ecol* 80, 30–44. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2011.01268.x>
- Luo, X., Xiang, X., Huang, G., Song, X., Wang, P., Fu, K., 2019. Bacterial Abundance and Physicochemical Characteristics of Water and Sediment Associated with Hydroelectric Dam on the Lancang River China. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 16, 2031. <https://doi.org/10.3390/ijerph16112031>
- Luo, Y., Guo, W., Ngo, H.H., Nghiem, L.D., Hai, F.I., Zhang, J., Liang, S., Wang, X.C., 2014. A review on the occurrence of micropollutants in the aquatic environment and their fate and removal during wastewater treatment. *Sci. Total Environ.* 473–474, 619–641. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.12.065>
- Lv, X., Ma, B., Yu, J., Chang, S.X., Xu, J., Li, Y., Wang, G., Han, G., Bo, G., Chu, X., 2016. Bacterial community structure and function shift along a successional series of tidal flats in the Yellow River Delta. *Sci. Rep.* 6, 36550. <https://doi.org/10.1038/srep36550>
- Magoč, T., Salzberg, S.L., 2011. FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies. *Bioinforma. Oxf. Engl.* 27, 2957–2963. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr507>

- Mahé, F., Rognes, T., Quince, C., de Vargas, C., Dunthorn, M., 2014. Swarm: robust and fast clustering method for amplicon-based studies. *PeerJ* 2, e593. <https://doi.org/10.7717/peerj.593>
- Mai, Y., Lai, Z., Li, X., Peng, S., Wang, C., 2018. Structural and functional shifts of bacterioplanktonic communities associated with spatiotemporal gradients in river outlets of the subtropical Pearl River Estuary, South China. *Mar. Pollut. Bull.* 136, 309–321. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2018.09.013>
- Marti, E., Aumatell, J., Godé, L., Poch, M., Sabater, F., 2004. Nutrient retention efficiency in streams receiving inputs from wastewater treatment plants. *J. Environ. Qual.* 33, 285–293. <https://doi.org/10.2134/jeq2004.2850>
- Marti, E., Balcázar, J.L., 2014. Use of pyrosequencing to explore the benthic bacterial community structure in a river impacted by wastewater treatment plant discharges. *Res. Microbiol.* 165, 468–471. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2014.04.002>
- Martin, M., 2011. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads 3.
- Meziti, A., Tsementzi, D., Kormas, K., Karayanni, H., Konstantinidis, K., 2016. Anthropogenic effects on bacterial diversity and function along a river-to-estuary gradient in Northwest Greece revealed by metagenomics. *Environ. Microbiol.* 18, n/a-n/a. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13303>
- Mikhailov, I.S., Zakharova, Y.R., Bukin, Y.S., Galachyants, Y.P., Petrova, D.P., Sakirko, M.V., Likhoshway, Y.V., 2019. Co-occurrence Networks Among Bacteria and Microbial Eukaryotes of Lake Baikal During a Spring Phytoplankton Bloom. *Microb. Ecol.* 77, 96–109. <https://doi.org/10.1007/s00248-018-1212-2>
- Newton, R.J., Jones, S.E., Eiler, A., McMahon, K.D., Bertilsson, S., 2011. A Guide to the Natural History of Freshwater Lake Bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 75, 14–49. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00028-10>
- Ouyang, L., Chen, H., Liu, X., Wong, M.H., Xu, F., Yang, X., Xu, W., Zeng, Q., Wang, W., Li, S., 2020. Characteristics of spatial and seasonal bacterial community structures in a river under anthropogenic disturbances. *Environ. Pollut.* 264, 114818. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114818>
- Paijens, C., Bressy, A., Frère, B., Tedoldi, D., Mailler, R., Rocher, V., Neveu, P., Moilleron, R., 2021. Urban pathways of biocides towards surface waters during dry and wet weathers: Assessment at the Paris conurbation scale. *J. Hazard. Mater.* 402, 123765. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.123765>
- Paijens, C., Tedoldi, D., Frère, B., Mailler, R., Rocher, V., Moilleron, R., Bressy, A., 2022. Biocidal substances in the Seine River: contribution from urban sources in the Paris megacity. *Environ. Sci. Water Res. Technol.* 8, 2358–2372. <https://doi.org/10.1039/D2EW00253A>
- Pandey, P.K., Kass, P.H., Soupier, M.L., Biswas, S., Singh, V.P., 2014. Contamination of water resources by pathogenic bacteria. *AMB Express* 4, 51. <https://doi.org/10.1186/s13568-014-0051-x>
- Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., Peplies, J., Glöckner, F.O., 2013. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res.* 41, D590-596. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1219>
- Raimonet, M., Cazier, T., Rocher, V., Laverman, A.M., 2017. Nitrifying Kinetics and the Persistence of Nitrite in the Seine River, France. *J. Environ. Qual.* 46, 585–595. <https://doi.org/10.2134/jeq2016.06.0242>
- Rath, K.M., Fierer, N., Murphy, D.V., Rousk, J., 2019. Linking bacterial community composition to soil salinity along environmental gradients. *ISME J.* 13, 836–846. <https://doi.org/10.1038/s41396-018-0313-8>
- Rhymes, J., Jones, L., Lapworth, D.J., White, D., Fenner, N., McDonald, J.E., Perkins, T.L., 2015. Using chemical, microbial and fluorescence techniques to understand contaminant sources and

- pathways to wetlands in a conservation site. *Sci. Total Environ.* 511, 703–710. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.12.085>
- Rocher, V., Laverman, A.M., Gasperi, J., Azimi, S., Guérin, S., Mottelet, S., Villières, T., Paus, A., 2015. Nitrite accumulation during denitrification depends on the carbon quality and quantity in wastewater treatment with biofilters. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22, 10179–10188. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4196-1>
- Rognes, T., Flouri, T., Nichols, B., Quince, C., Mahé, F., 2016. VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics. *PeerJ* 4, e2584. <https://doi.org/10.7717/peerj.2584>
- Savio, D., Sinclair, L., Ijaz, U.Z., Parajka, J., Reischer, G.H., Stadler, P., Blaschke, A.P., Blöschl, G., Mach, R.L., Kirschner, A.K.T., Farnleitner, A.H., Eiler, A., 2015. Bacterial diversity along a 2600 km river continuum: River bacterioplankton diversity. *Env. Microbiol* 17, 4994–5007. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12886>
- Schmidt, T.M., 2006. The maturing of microbial ecology. *Microb. Ecol.*, INTERNATIONAL MICROBIOLOGY 17–223.
- Servais, P., Billen, G., Garcia-Armisen, T., George, I., Goncalves, A., Thibert, S., 2009. La contamination microbienne dans le bassin de la Seine, Programme PIREN-Seine. Agence de l'eau Seine-Normandie.
- Shang, J., Zhang, W., Gao, Y., Li, Y., Wu, H., 2023. Dam-induced flow alternations drive the regime shift towards a cyanobacteria-dominated microbiota state in the Yangtze River. *Water Res.* 244, 120527. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2023.120527>
- Shanks, O.C., Kelty, C.A., Archibeque, S., Jenkins, M., Newton, R.J., McLellan, S.L., Huse, S.M., Sogin, M.L., 2011. Community structures of fecal bacteria in cattle from different animal feeding operations. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 2992–3001. <https://doi.org/10.1128/AEM.02988-10>
- Shao, K., Yao, X., Xie, G., Wu, Y., Hu, Y., Tang, X., Gao, G., 2019. Detectable Levels of Bacterial Pathogens in the Rivers of the Lake Chaohu Basin, China. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 16, 4857. <https://doi.org/10.3390/ijerph16234857>
- Soto Ramos, I.M., Crooke, B., Seegers, B., Cetinić, I., Cambazoglu, M.K., Armstrong, B., 2023. Spatial and temporal characterization of cyanobacteria blooms in the Mississippi Sound and their relationship to the Bonnet Carré Spillway openings. *Harmful Algae* 127, 102472. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2023.102472>
- Spänhoff, B., Bischof, R., Böhme, A., Lorenz, S., Neumeister, K., Nöthlich, A., Küsel, K., 2007. Assessing the Impact of Effluents from a Modern Wastewater Treatment Plant on Breakdown of Coarse Particulate Organic Matter and Benthic Macroinvertebrates in a Lowland River. *Water. Air. Soil Pollut.* 180, 119–129. <https://doi.org/10.1007/s11270-006-9255-2>
- Staley, C., Unno, T., Gould, T.J., Jarvis, B., Phillips, J., Cotner, J.B., Sadowsky, M.J., 2013. Application of Illumina next-generation sequencing to characterize the bacterial community of the Upper Mississippi River. *J Appl Microbiol* 115, 1147–1158. <https://doi.org/10.1111/jam.12323>
- Sun, W., Xia, C., Xu, M., Guo, J., Sun, G., 2017. Seasonality Affects the Diversity and Composition of Bacterioplankton Communities in Dongjiang River, a Drinking Water Source of Hong Kong. *Front. Microbiol.* 8.
- Taylor, J.P., Wilson, B., Mills, M.S., Burns, R.G., 2002. Comparison of microbial numbers and enzymatic activities in surface soils and subsoils using various techniques. *Soil Biol. Biochem.* 34, 387–401. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(01\)00199-7](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(01)00199-7)
- Tu, C., Jin, Z., Che, F., Cao, X., Song, X., Lu, C., Huang, W., 2022. Characterization of phosphorus sorption and microbial community in lake sediments during overwinter and recruitment

- periods of cyanobacteria. *Chemosphere* 307, 135777. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.135777>
- Turner, S., Pryer, K.M., Miao, V.P.W., Palmer, J.D., 1999. Investigating Deep Phylogenetic Relationships among Cyanobacteria and Plastids by Small Subunit rRNA Sequence Analysis. *J. Eukaryot. Microbiol.* 46, 327–338. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1999.tb04612.x>
- Waiser, M.J., Tumber, V., Holm, J., 2011. Effluent-dominated streams. Part 1: Presence and effects of excess nitrogen and phosphorus in Wascana Creek, Saskatchewan, Canada. *Environ. Toxicol. Chem.* 30, 496–507. <https://doi.org/10.1002/etc.399>
- Wang, H., Liu, X., Wang, Y., Zhang, S., Zhang, G., Han, Y., Li, M., Liu, L., 2023. Spatial and temporal dynamics of microbial community composition and factors influencing the surface water and sediments of urban rivers. *J. Environ. Sci.* 124, 187–197. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2021.10.016>
- Wang, L., Zhang, J., Li, H., Yang, H., Peng, C., Peng, Z., Lu, L., 2018. Shift in the microbial community composition of surface water and sediment along an urban river. *Sci. Total Environ.* 627, 600–612. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.01.203>
- Wang, P., Chen, B., Yuan, R., Li, C., Li, Y., 2016. Characteristics of aquatic bacterial community and the influencing factors in an urban river. *Sci. Total Environ.* 569–570, 382–389. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.06.130>
- Wang, Y., Liu, L., Chen, H., Yang, J., 2015. Spatiotemporal dynamics and determinants of planktonic bacterial and microeukaryotic communities in a Chinese subtropical river. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99, 9255–9266. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6773-0>
- Wang, Y., Sheng, H.-F., He, Y., Wu, J.-Y., Jiang, Y.-X., Tam, N.F.-Y., Zhou, H.-W., 2012. Comparison of the levels of bacterial diversity in freshwater, intertidal wetland, and marine sediments by using millions of illumina tags. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 8264–8271. <https://doi.org/10.1128/AEM.01821-12>
- Xie, Y., Fan, J., Zhu, W., Amombo, E., Lou, Y., Chen, L., Fu, J., 2016. Effect of Heavy Metals Pollution on Soil Microbial Diversity and Bermudagrass Genetic Variation. *Front. Plant Sci.* 7.
- Yuan, S., Zhang, W., Li, W., Li, Z., Wu, M., Shan, B., 2023. Shifts in the bacterial community caused by combined pollutant loads in the North Canal River, China. *J. Environ. Sci.* 127, 541–551. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2022.05.026>
- Zhao, Z., Zhao, R., Qiu, X., Wan, Y., Lee, L., 2022. Structural Diversity of Bacterial Communities and Its Relation to Environmental Factors in the Surface Sediments from Main Stream of Qingshui River. *Water* 14, 3356. <https://doi.org/10.3390/w14213356>
- Zhu, C., Zhang, J., Nawaz, M.Z., Mahboob, S., Al-Ghanim, K.A., Khan, I.A., Lu, Z., Chen, T., 2019. Seasonal succession and spatial distribution of bacterial community structure in a eutrophic freshwater Lake, Lake Taihu. *Sci. Total Environ.* 669, 29–40. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.03.087>

Acknowledgments

This research was supported by the MeSeine Innovation programme. We would like to express our gratitude to the Siaap technical team for their assistance with sampling and conducting physicochemical measurements. We are grateful to the INRAE MIGALE bioinformatics facility (MIGALE, INRAE, 2020. Migale bioinformatics Facility, doi: 10.15454/1.5572390655343293E12) for providing help and/or computing and/or storage resources.

Credit authorship contribution statement

Sadia Bagagnan: Conceptualization, Methodology, Data analysis, Writing original draft; My Dung Jusselme: Supervision, Conceptualization, Methodology, Data analysis, Writing, Review & Editing;

Régis Moilleron: Conceptualization, Supervision, Writing, Review & Editing, Funding acquisition; Anthony Marconi: Supervision and Investigation; Sabrina Guérin: Supervision and Investigation; Vincent Rocher: Supervision and Investigation

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.

Figure captions

Figure 1: Map of study area and location of sampling sites in Seine river, Ile-de-France Region, France

Figure 2. PCA analysis of physic-chemical parameters of the surface water of the Seine river in two seasons (summer and autumn) 2020 and 2021. (A) Correlation circle. Ordination of the samples in the plane defined by axis 1 and 2 of the PCA highlighting (B) the similarity of the 3 rivers, (C) the differences between the samples, (D) the differences between the sampling sites, (E) the differences between two seasons, and (F) the differences between season and year. N = 7 sites for all parameters and 2 seasons of 2020 and 2021. Total organic carbon, TOC; biological oxygen demand, BOD; chemical oxygen demand, COD ; T°C, water temperature. JSO, Juvisy-sur-Orge; CLR, Choisy-le-Roi; VSS, Vitry-sur-Seine; CSM, Champigny-sur-Marne; BOUG, Bougival; CSH, Conflans-Sainte-Honorine; TSS, Triel-sur-Seine

Figure 3. Water flow of the Seine River for upstream and downstream water in 2020 (A) and 2021 (B)

Figure 4. Microbial cells of the Seine water in summer and autumn 2020 and 2021 at seven sampling sites. N = 12 for each site and each season. JSO, Juvisy-sur-Orge; CLR, Choisy-le-Roi; VSS, Vitry-sur-Seine; CSM, Champigny-sur-Marne; BOUG, Bougival; CSH, Conflans-Sainte-Honorine; TSS, Triel-sur-Seine

Figure 5. FDA activity (μg fluorescein $\text{ml}^{-1} \text{h}^{-1}$) of the Seine water of the 7 sampling sites in summer and autumn 2020 and 2021. N=12 for each site and each season. JSO, Juvisy-sur-Orge; CLR, Choisy-le-Roi; VSS, Vitry-sur-Seine; CSM, Champigny-sur-Marne; BOUG, Bougival; CSH, Conflans-Sainte-Honorine; TSS, Triel-sur-Seine

Figure 6. Correlation between microbial cells and microbial activity in all samples collected at all sites and different seasons.

Figure 7. Relative abundance (%) histograms of the dominant phyla (> 1%) for the Seine water from seven sampling sites in autumn and summer 2020 and 2021. JSO, Juvisy-sur-Orge; CLR, Choisy-le-Roi; VSS, Vitry-sur-Seine; CSM, Champigny-sur-Marne; BOUG, Bougival; CSH, Conflans-Sainte-Honorine; TSS, Triel-sur-Seine

Figure 8. Comparisons of OTU number (A), and diversity index including Chao1 (B), Shannon index (C) and Shannon Equitability (D) were made between seasons (three figures above) and localizations (three figures below) at five sampling sites along the Seine River during the autumn and summer of 2020 and 2021. Upstream including the 3 sampling sites (JSO, Juvisy-sur-Orge; CLR, Choisy-le-Roi; VSS, Vitry-sur-Seine), situated before Paris center and Downstream including two sampling sites (BOUG, Bougival; CSH, TSS, Triel-sur-Seine), situated after Paris center

Figure 9. Comparisons of the relative abundance of the bacterial community in phylum (A) and class (B) levels were made between seasons summer and autumn in 2020 and 2021. *, significant different between season/year ; ns, not significant different

Figure 10. Comparisons of the relative abundance of the microbial community in phylum (A) and class (B) levels were made between five sampling locations along the Seine River during the autumn and summer of 2020 and 2021. Upstream including the 3 sampling sites (JSO, Juvisy-sur-Orge; CLR, Choisy-le-Roi; VSS, Vitry-sur-Seine), situated before Paris center and Downstream including two sampling sites (BOUG, Bougival; CSH, TSS, Triel-sur-Seine), situated after Paris center.

Figure 11. Relative abundance of the dominant genera in the Seine water in summer and autumn 2020 and 2021 at different sampling sites from upstream to downstream of the Seine river. JSO, Juvisy-sur-Orge; CLR, Choisy-le-Roi; VSS, Vitry-sur-Seine; CSM, Champigny-sur-Marne; BOUG, Bougival; CSH, Conflans-Sainte-Honorine; TSS, Triel-sur-Seine

Figure 12. Nonmetric multidimensional scaling plot (MDS) analysis of bacterial community at the phylum level in water for all sampling by comparison between sites (A), between seasons according to the sites (B), between seasons according to the year (C) and between seasons including summer and autumn (D). JSO, Juvisy-sur-Orge; CLR, Choisy-le-Roi; VSS, Vitry-sur-Seine; BOUG, Bougival; TSS, Triel-sur-Seine (located on the Seine river) CSM, Champigny-sur-Marne (located on the Marne river) CSH, Conflans-Sainte-Honorine (located on the Oise river)

Figure 13. Redundancy analysis of bacterial community composition at the phylum level of the Seine water and environmental factors from different sampling sites (A), different rivers (B) and different seasons according to the year 2020 and 2021 (C)

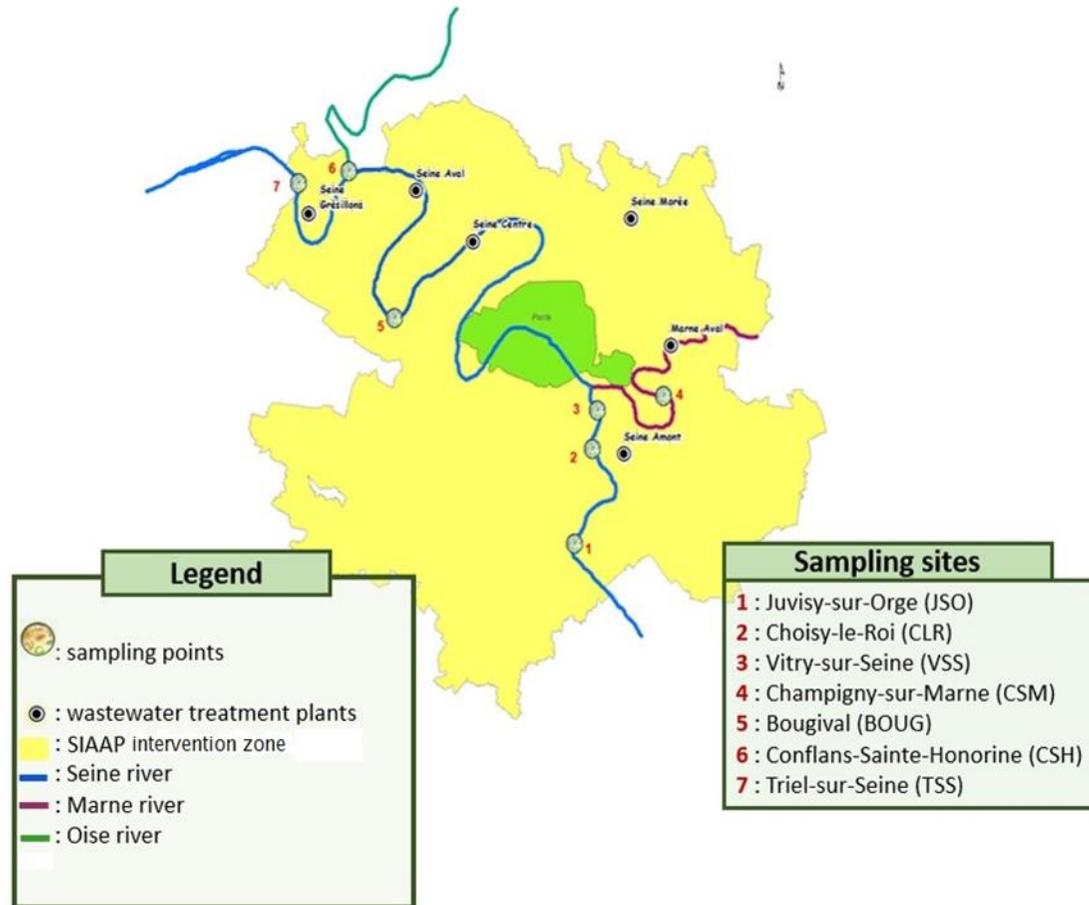


Figure 1: Map of study area and location of sampling sites in Seine river, Ile-de-France Region, France

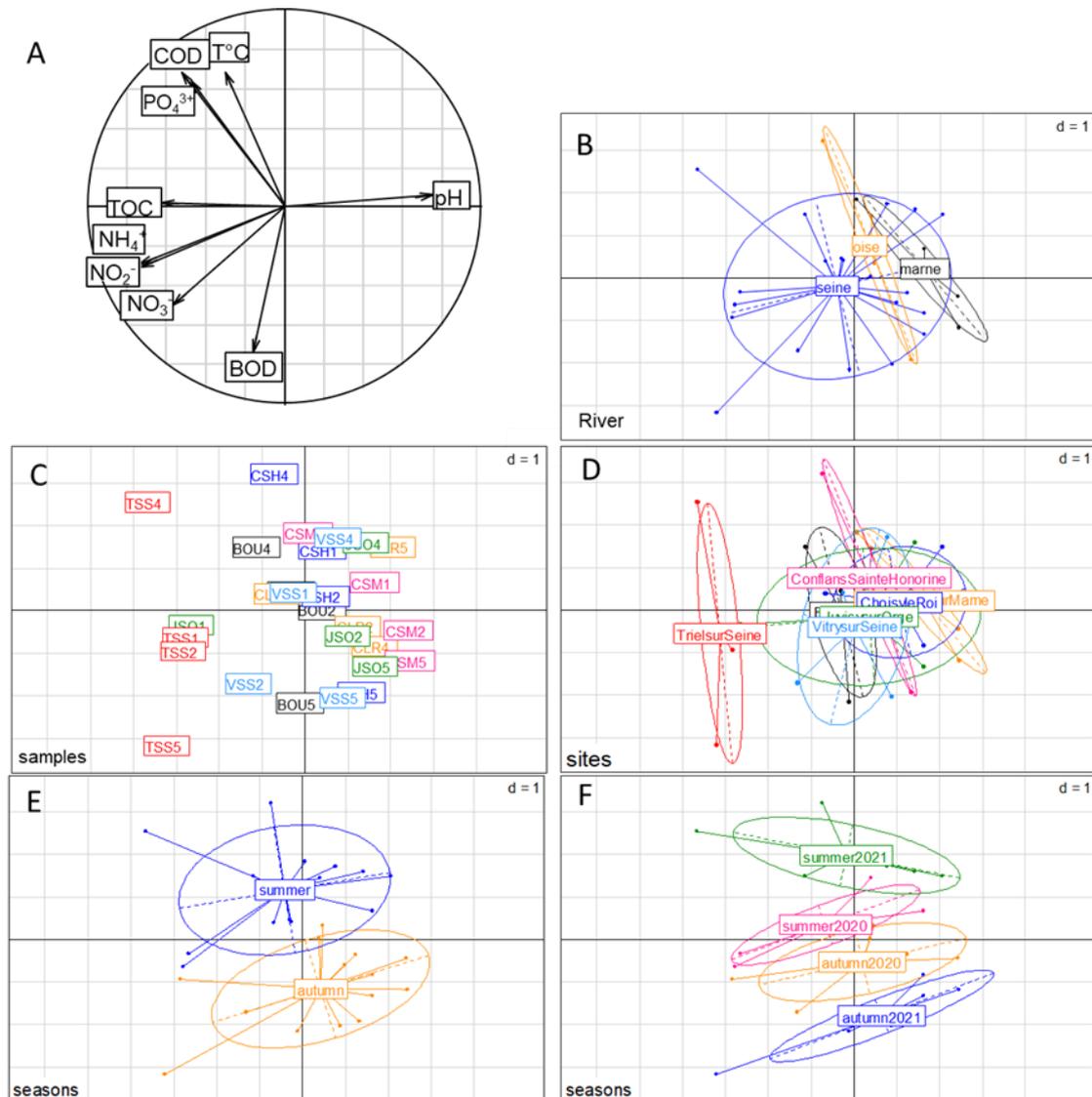


Figure 2. PCA analysis of physico-chemical parameters of the surface water of the Seine river in two seasons (summer and autumn) 2020 and 2021. (A) Correlation circle. Ordination of the samples in the plane defined by axis 1 and 2 of the PCA highlighting (B) the similarity of the 3 rivers, (C) the differences between the samples, (D) the differences between the sampling sites, (E) the differences between two seasons, and (F) the differences between season and year. N = 7 sites for all parameters and 2 seasons of 2020 and 2021. Total organic carbon, TOC; biological oxygen demand, BOD; chemical oxygen demand, COD ; T°C, water temperature. JSO, Juvisy-sur-Orge; CLR, Choisy-le-Roi; VSS, Vitry-sur-Seine; CSM, Champigny-sur-Marne; BOUG, Bougival; CSH, Conflans-Sainte-Honorine; TSS, Triel-sur-Seine

Résultats

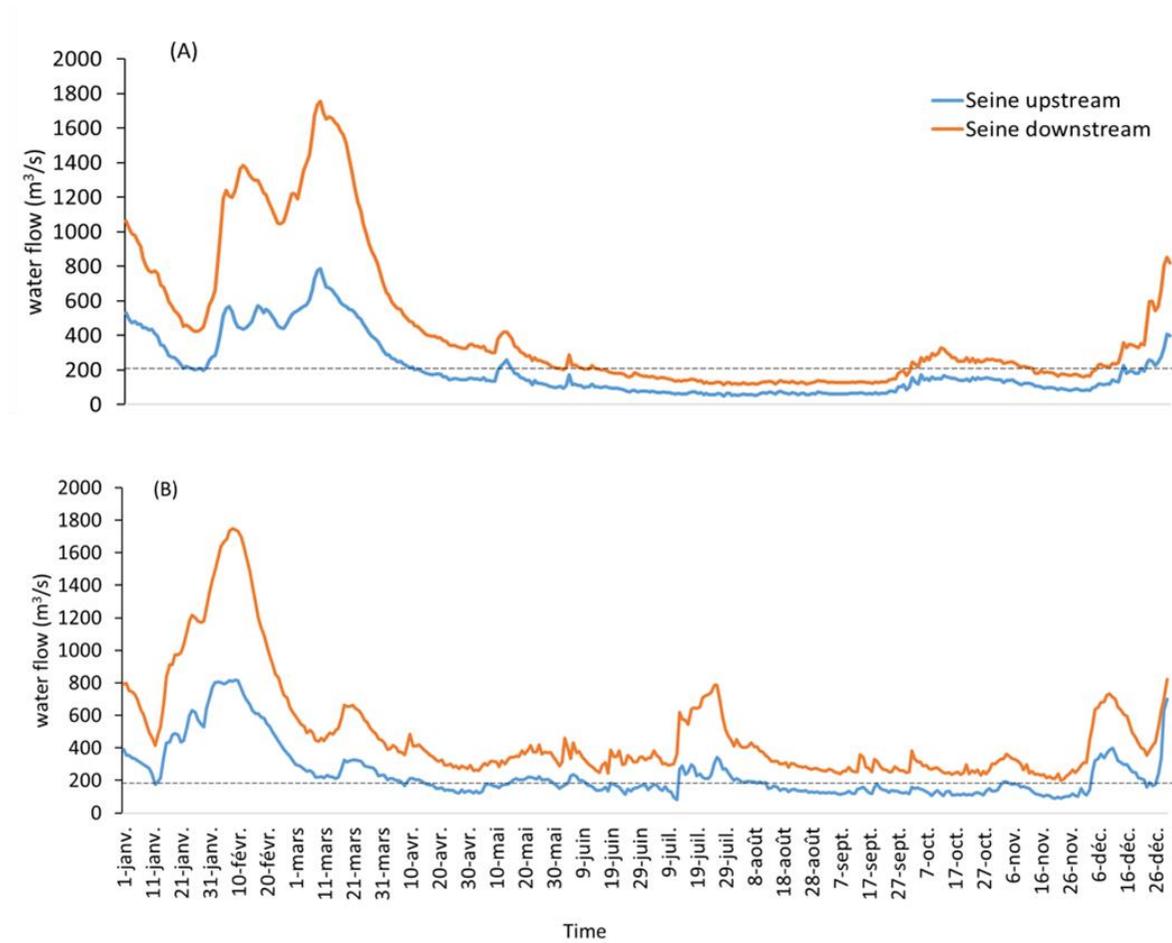


Figure 3. Water flow of the Seine River for upstream and downstream water in 2020 (A) and 2021 (B)

Résultats

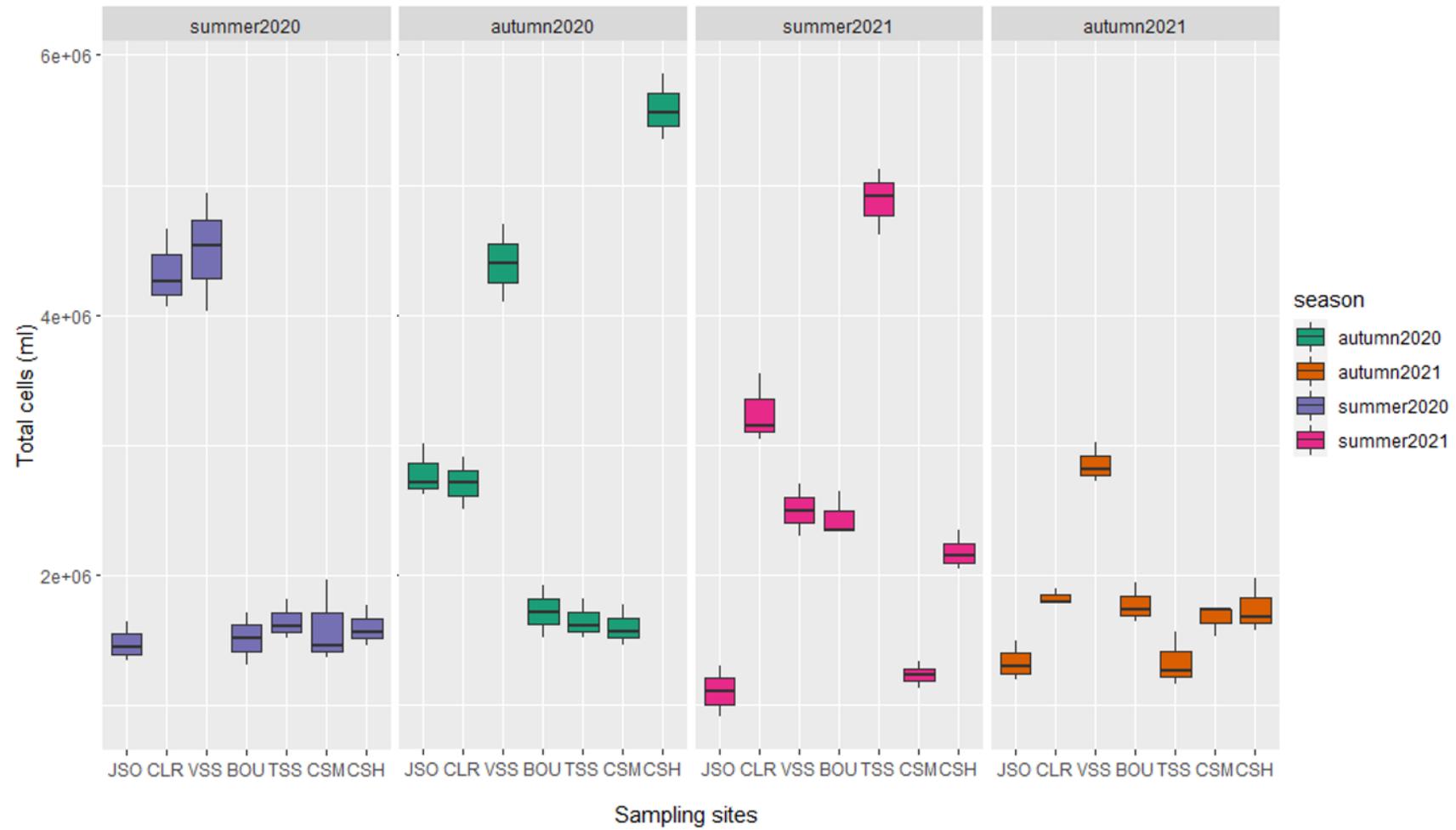


Figure 4. Microbial cells of the Seine water in summer and autumn 2020 and 2021 at seven sampling sites. N = 12 for each site and each season. JSO, Juvisy-sur-Orge; CLR, Choisy-le-Roi; VSS, Vitry-sur-Seine; CSM, Champigny-sur-Marne; BOUG, Bougival; CSH, Conflans-Sainte-Honorine; TSS, Triel-sur-Seine

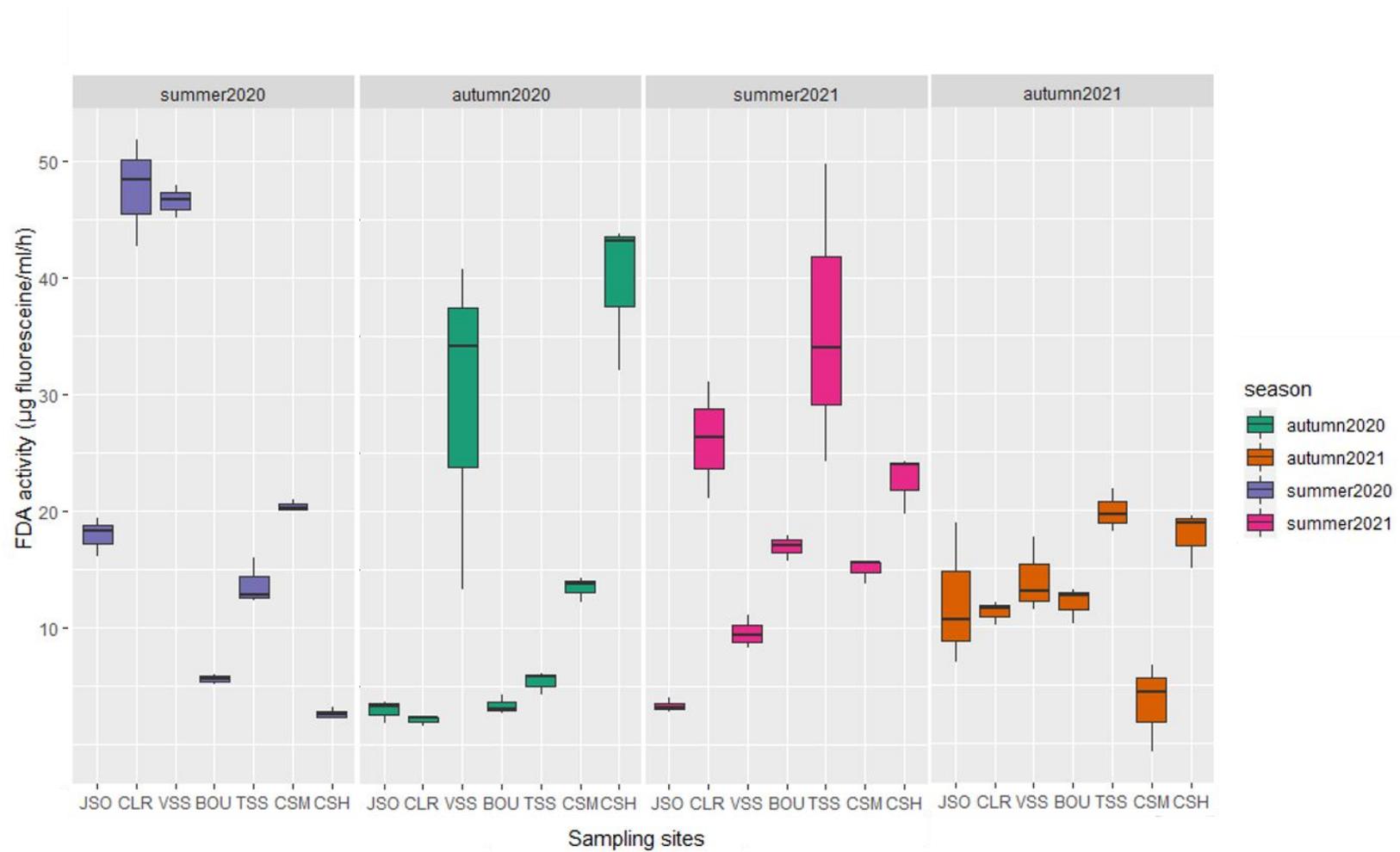


Figure 5. FDA activity ($\mu\text{g fluorescein ml}^{-1} \text{ h}^{-1}$) of the Seine water of the 7 sampling sites in summer and autumn 2020 and 2021. N=12 for each site and each season. JSO, Juvisy-sur-Orge; CLR, Choisy-le-Roi; VSS, Vitry-sur-Seine; CSM, Champigny-sur-Marne; BOUG, Bougival; CSH, Conflans-Sainte-Honorine; TSS, Triel-sur-Seine

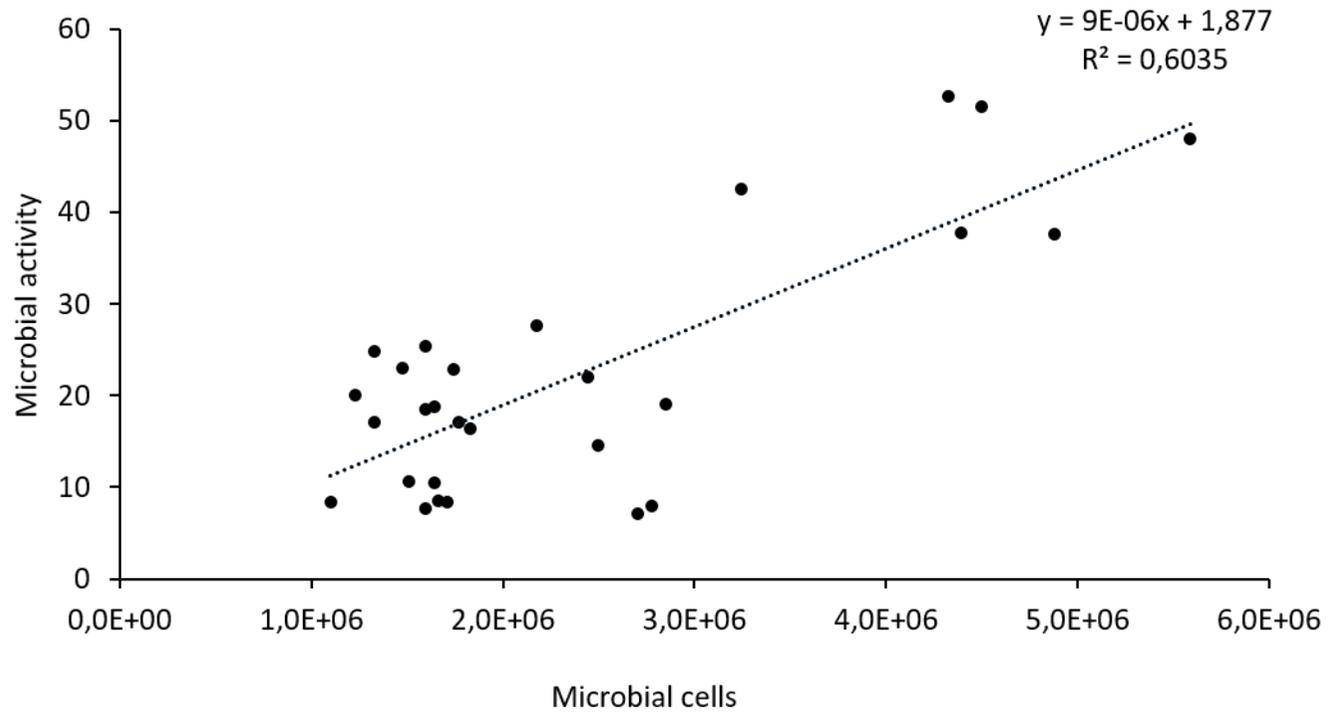


Figure 6. Correlation between microbial cells and microbial activity in all samples collected at all sites and different seasons.

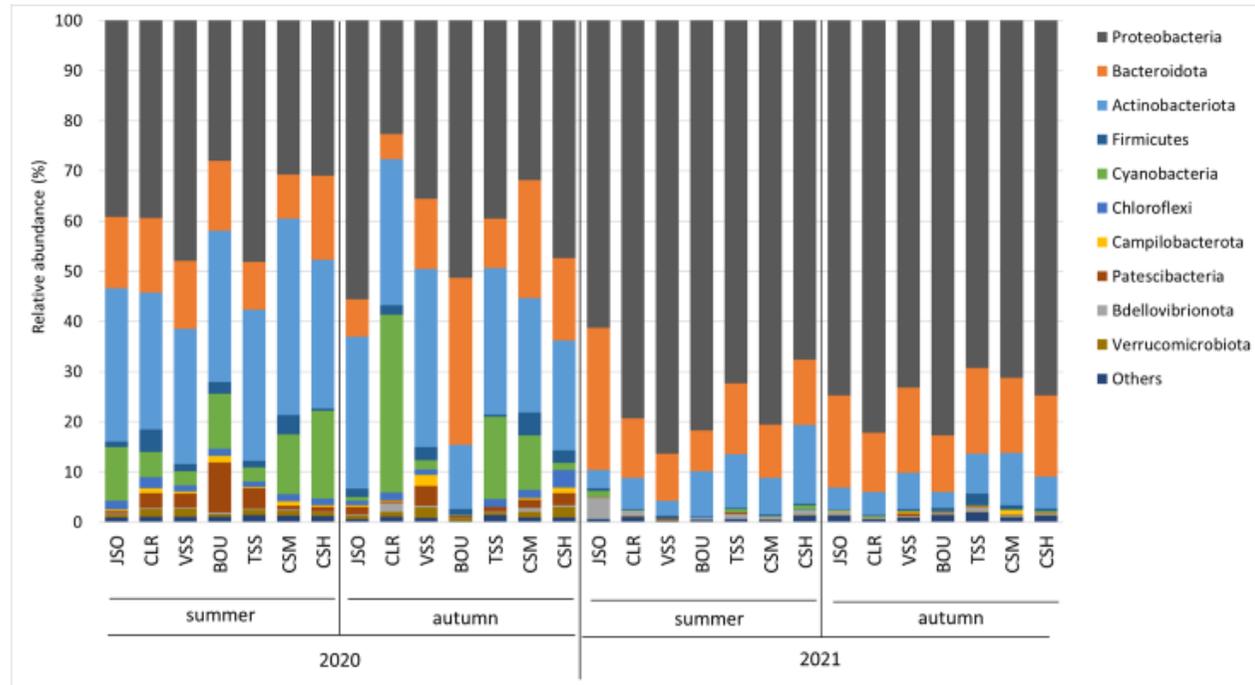


Figure 7. Relative abundance (%) histograms of the dominant phyla (> 1%) for the Seine water from seven sampling sites in autumn and summer 2020 and 2021
 JSO, Juvisy-sur-Orge; CLR, Choisy-le-Roi; VSS, Vitry-sur-Seine; CSM, Champigny-sur-Marne; BOUG, Bougival; CSH, Conflans-Sainte-Honorine; TSS, Triel-sur-Seine

Figure 7. Relative abundance (%) histograms of the dominant phyla (> 1%) for the Seine water from seven sampling sites in autumn and summer 2020 and 2021. JSO, Juvisy-sur-Orge; CLR, Choisy-le-Roi; VSS, Vitry-sur-Seine; CSM, Champigny-sur-Marne; BOUG, Bougival; CSH, Conflans-Sainte-Honorine; TSS, Triel-sur-Seine

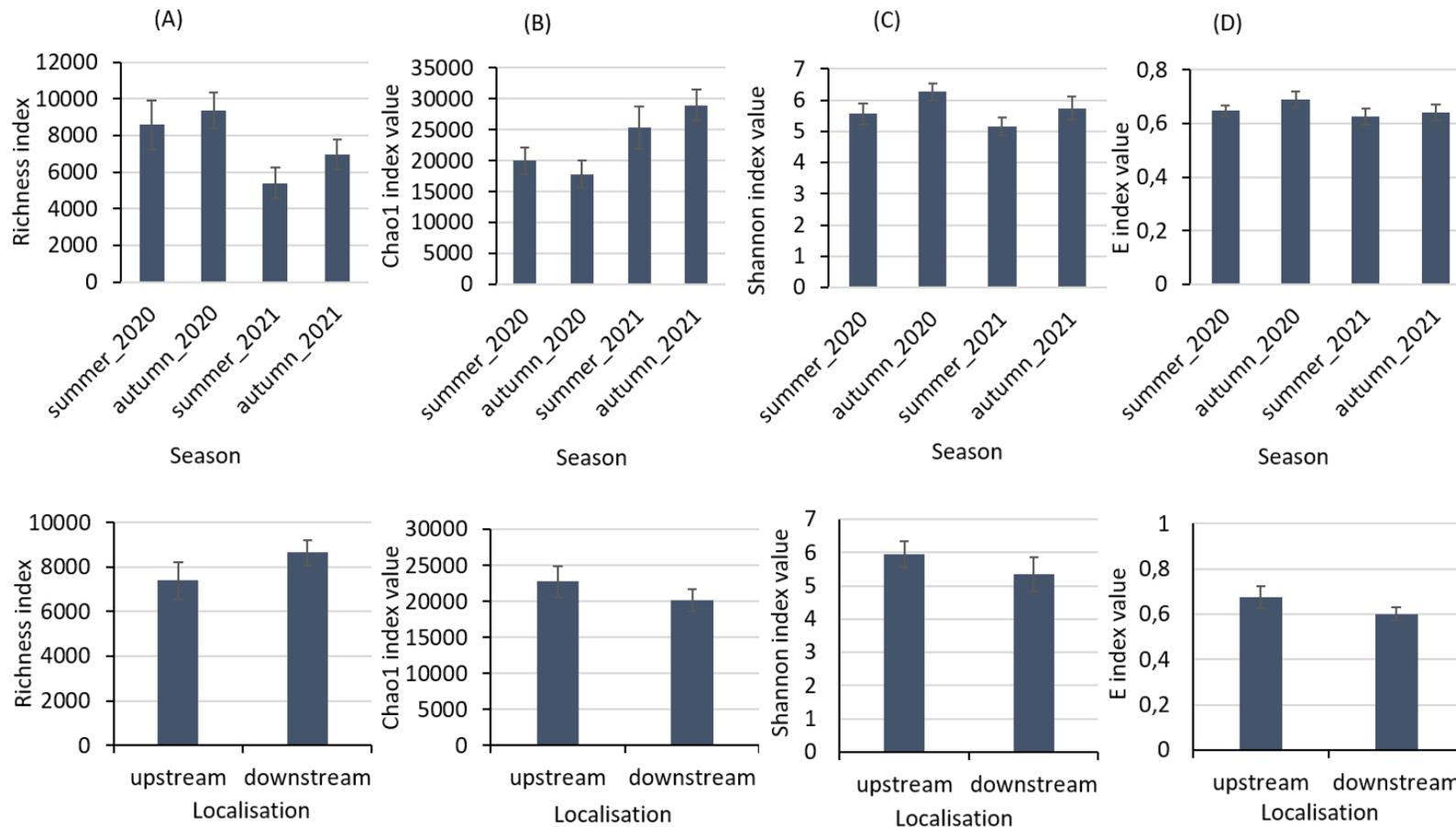


Figure 8. Comparisons of OTU number (A), and diversity index including Chao1 (B), Shannon index (C) and Shannon Equitability (D) were made between seasons (three figures above) and localizations (three figures below) at five sampling sites along the Seine River during the autumn and summer of 2020 and 2021. Upstream including the 3 sampling sites (JSO, Juvisy-sur-Orge; CLR, Choisy-le-Roi; VSS, Vitry-sur-Seine), situated before Paris center and Downstream including two sampling sites (BOUG, Bougival; CSH, TSS, Triel-sur-Seine), situated after Paris center

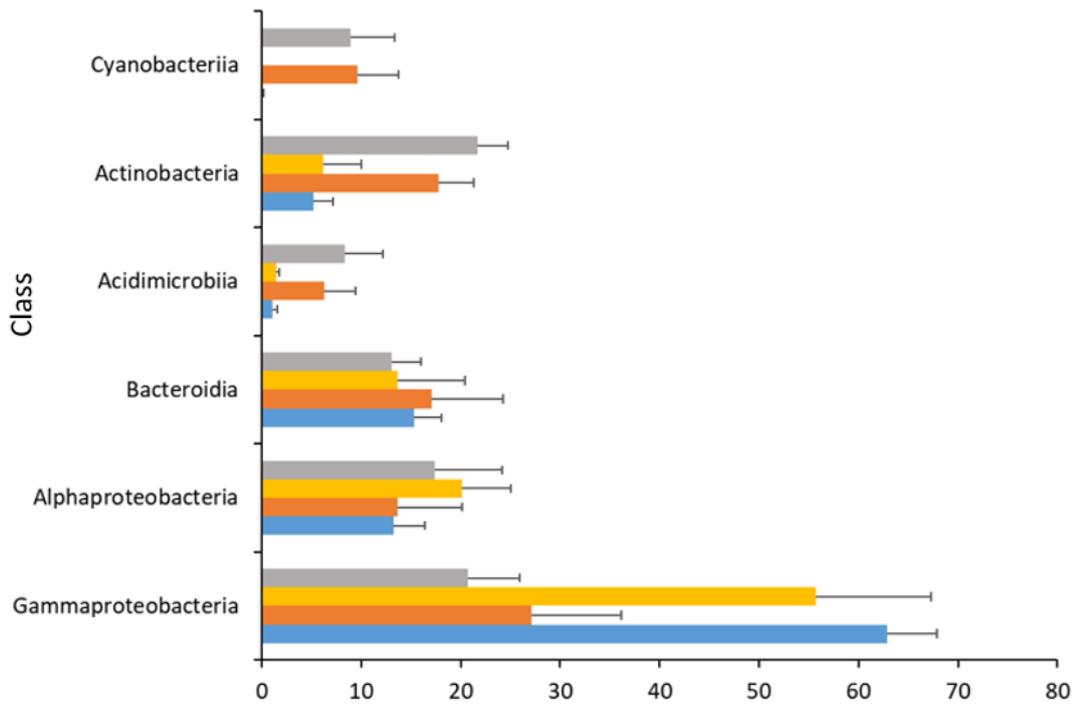
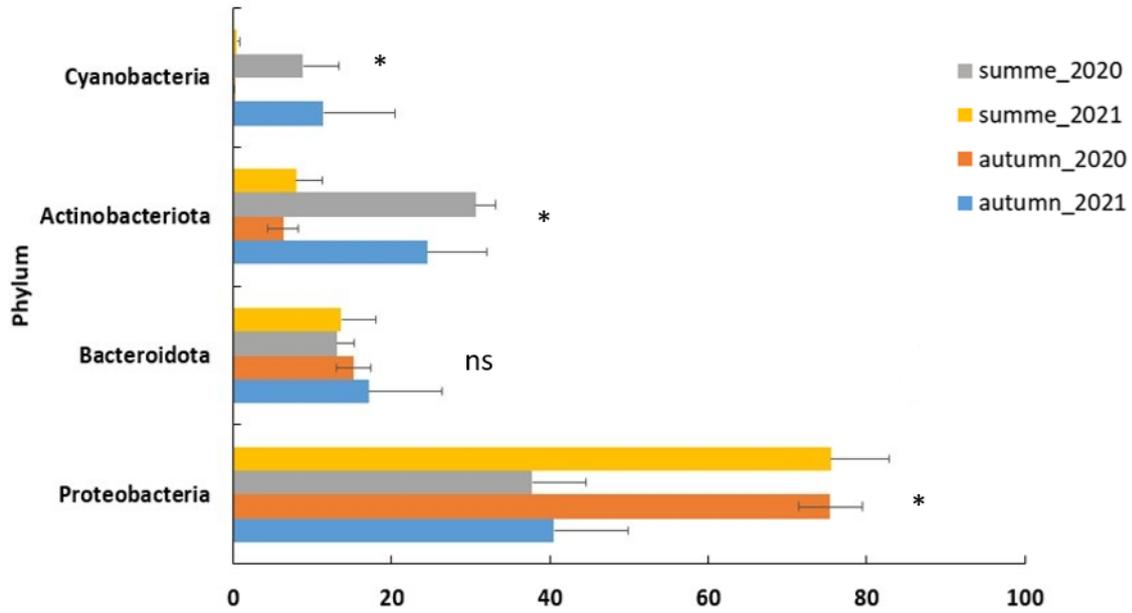


Figure 9. Comparisons of the relative abundance of the bacterial community in phylum (A) and class (B) levels were made between seasons summer and autumn in 2020 and 2021. *, significant different between season/year ; ns, not significant different

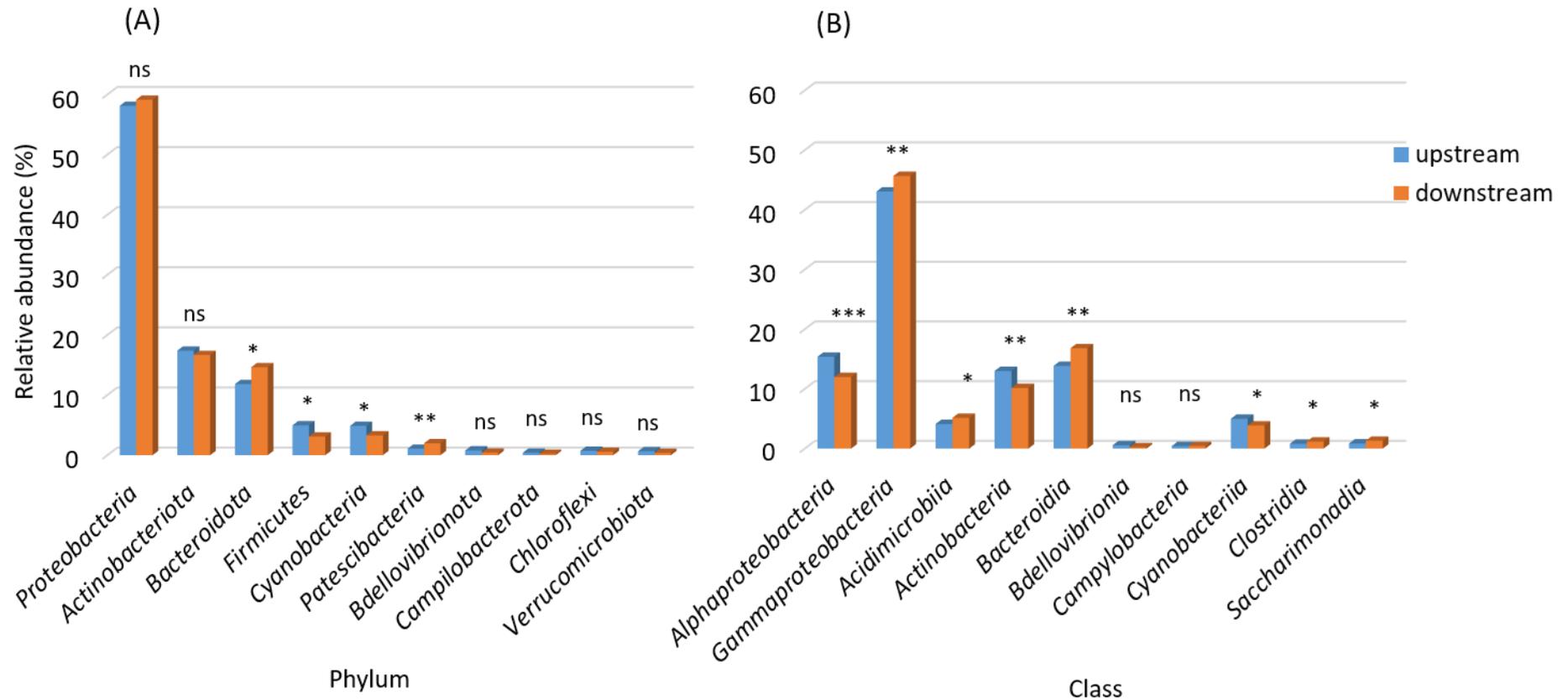


Figure 10. Comparisons of the relative abundance of the microbial community in phylum (A) and class (B) levels were made between five sampling locations along the Seine River during the autumn and summer of 2020 and 2021. Upstream including the 3 sampling sites (JSO, Juvisy-sur-Orge; CLR, Choisy-le-Roi; VSS, Vitry-sur-Seine), situated before Paris center and Downstream including two sampling sites (BOUG, Bougival; CSH, TSS, Triel-sur-Seine), situated after Paris center.

Résultats

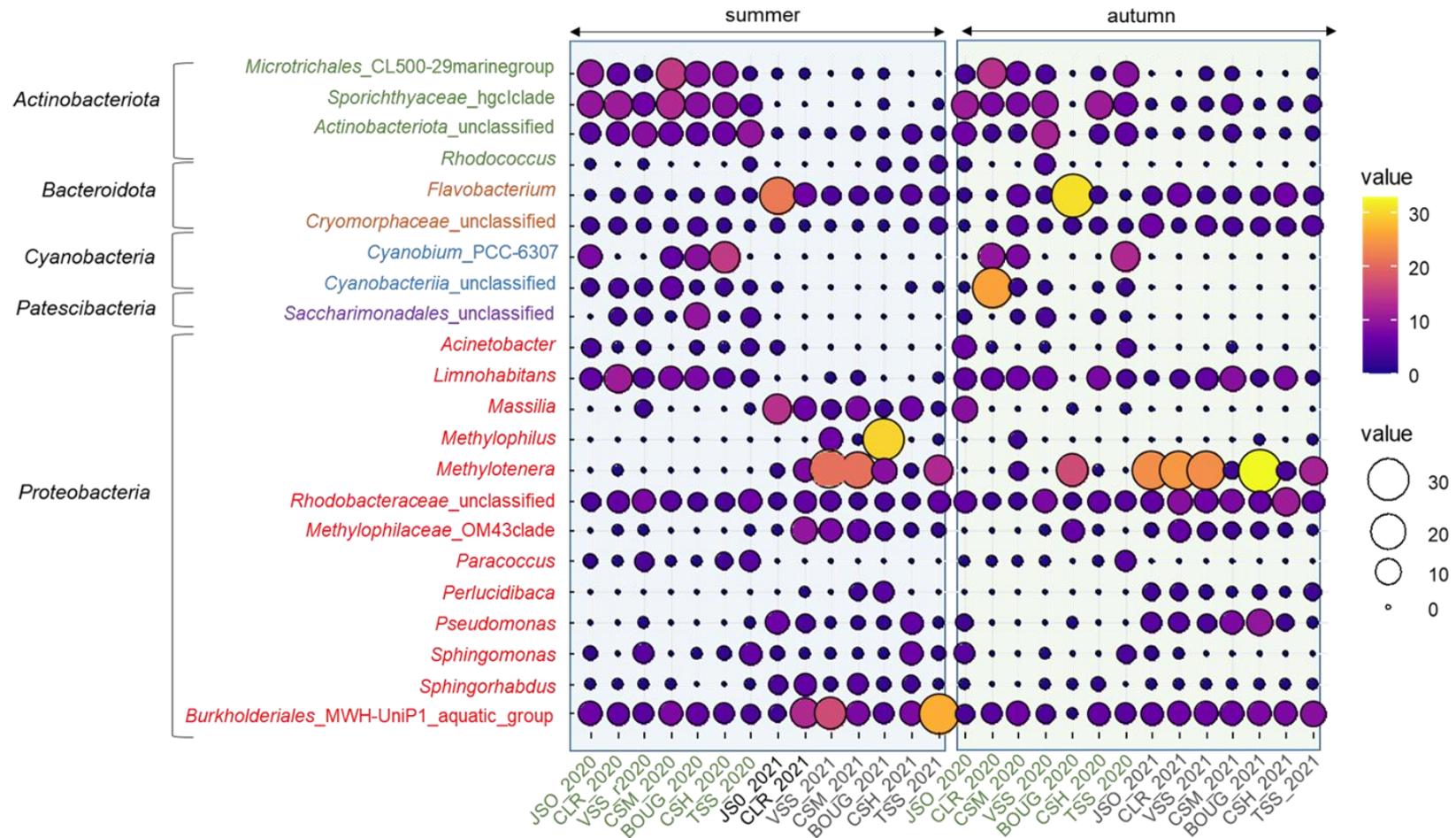


Figure 11. Relative abundance of the dominant genera in the Seine water in summer and autumn 2020 and 2021 at different sampling sites from upstream to downstream of the Seine river. JSO, Juvisy-sur-Orge; CLR, Choisy-le-Roi; VSS, Vitry-sur-Seine; CSM, Champigny-sur-Marne; BOUG, Bougival; CSH, Conflans-Sainte-Honorine; TSS, Triel-sur-Seine

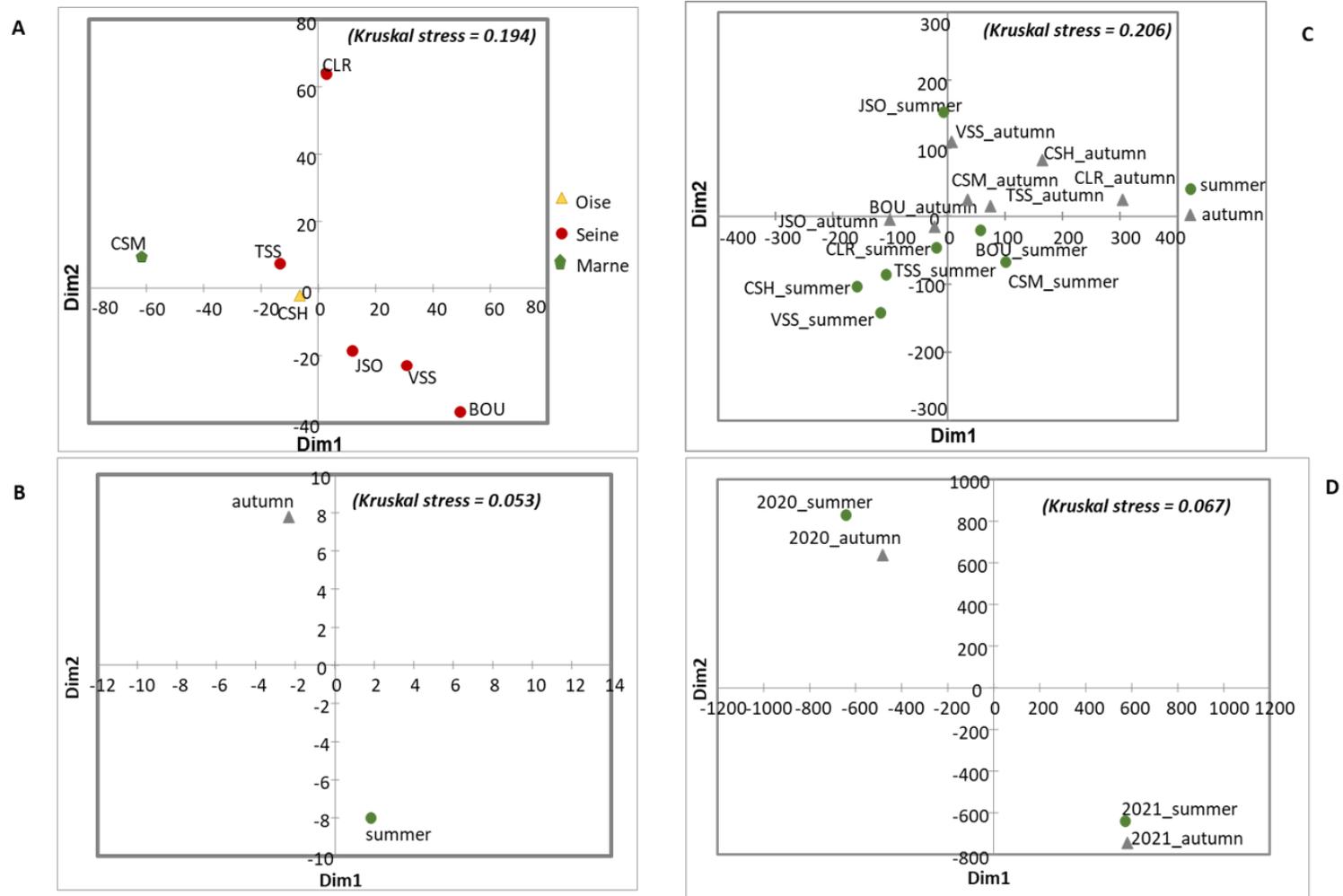


Figure 12. Nonmetric multidimensional scaling plot (MDS) analysis of bacterial community at the phylum level in water for all sampling by comparison between sites (A), between seasons according to the sites (B), between seasons according to the year (C) and between seasons including summer and autumn (D). JSO, Juvisy-sur-Orge; CLR, Choisy-le-Roi; VSS, Vitry-sur-Seine; BOUG, Bougival; TSS, Triel-sur-Seine (located on the Seine river) CSM, Champigny-sur-Marne (located on the Marne river) CSH, Conflans-Sainte-Honorine (located on the Oise river)

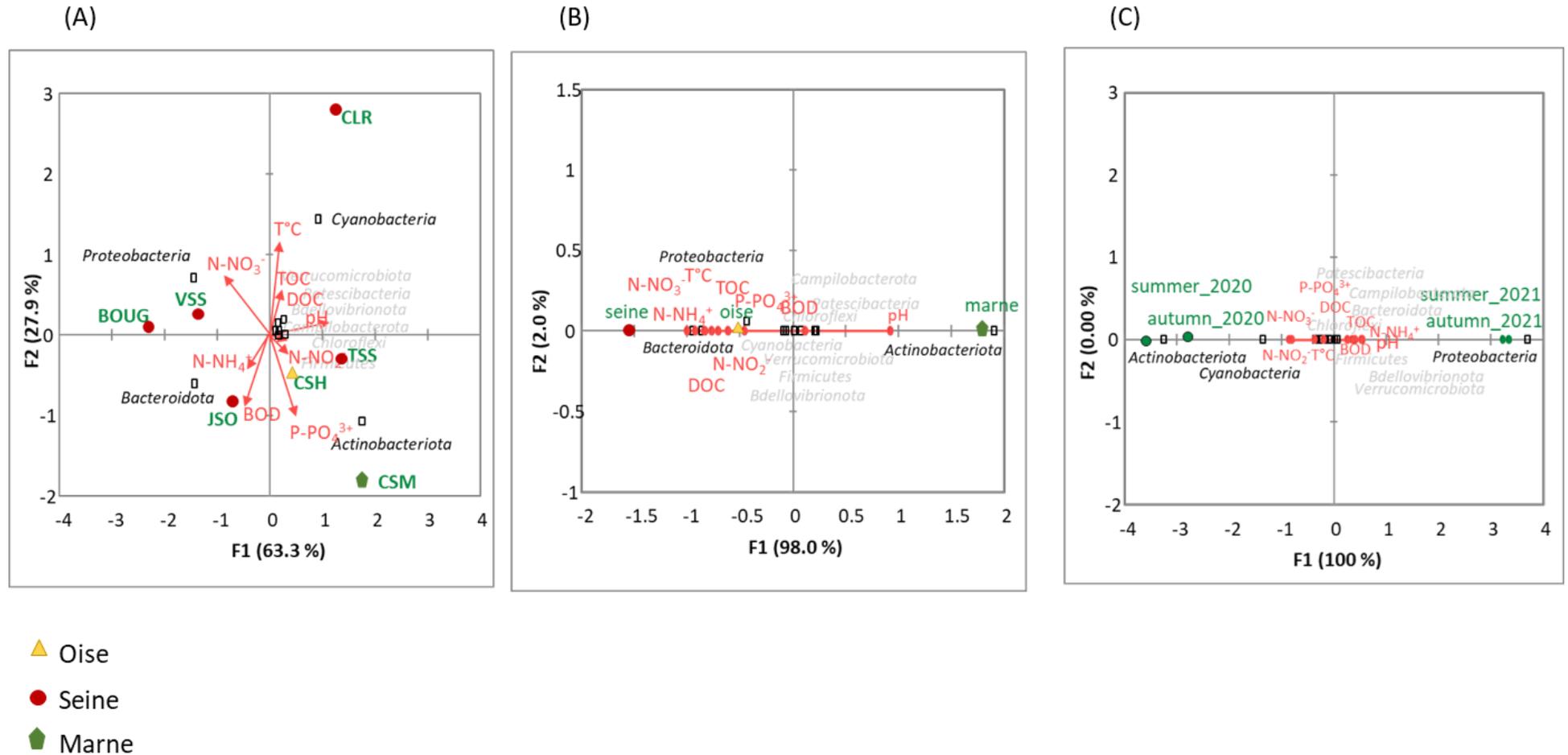


Figure 13. Redundancy analysis of bacterial community composition at the phylum level of the Seine water and environmental factors from different sampling sites (A), different rivers (B) and different seasons according to the year 2020 and 2021 (C)

Table captions

Table 1. GPS latitude and longitude coordinates of sampling sites

Table

Table 1. GPS latitude and longitude coordinates of sampling sites

Sampling site	River	Adresse	Latitude	Longitude
Juvisy-sur-Orge	Seine	Pont D931 (91260)	48°68'90"N	2°38'80"E
Choisy-le-Roi	Seine	Pont D86 (94600)	48°76'62"N	2°41'19"E
Vitry-sur-Seine	Seine	Pont du port à l'anglais D148 (94400)	48°79'75"N	2°41'91"E
Champigny-sur-Marne	Marne	Pont de la D 130 (94210)	48°80'97"N	2°50'97"E
Bougival	Seine	Pont D 321 (78380)	48°87'01"N	2°13'72"E
Conflans-Sainte-Honorine	Oise	Pont D 48 (78700)	48°98'89"N	2°07'18"E
Triel-sur-Seine	Seine	Pont D2 (78510)	48°97'84"N	2°00'13"E

II. Suivi des communautés bactériennes dans les eaux de rejet de STEP désinfectées à l'acide performique avant et après rejet en Seine

II.1 Évaluation de l'efficacité de la désinfection des effluents par l'acide performique : abondance et diversité bactériennes

L'évaluation de l'efficacité de la désinfection des effluents par l'acide performique : abondance et diversité bactériennes, a donné lieu à un article :

Bagagnan S., Jusselme M. D., Alphonse V., Guérin Rechdaoui S., Marconi A., Rocher V. & Moilleron R. Assessing the effectiveness of performic acid disinfection on effluents: focusing on bacterial abundance and diversity, en cours de finalisation.

Les données supplémentaires de l'article sont disponibles en Annexe 4.

Objectifs

Des eaux usées mal traitées peuvent abriter des microorganismes pathogènes qui constituent un risque pour l'environnement et la santé publique. Pour y remédier, il est impératif d'intégrer des mesures de désinfection efficaces sur les rejets de STEP. Les techniques traditionnelles comme la chloration et le traitement UV présentent des inconvénients tels que la formation de sous-produits de désinfection, l'inefficacité ou la reviviscence bactérienne, ce qui les rend moins intéressantes pour le traitement des eaux usées. La présente étude vise à évaluer de manière globale l'efficacité de la désinfection à l'acide performique sur la communauté microbienne des rejets de la STEP Seine centre (92). Plusieurs traitements ont été étudiés en jouant sur la concentration en PFA (0,8, 2 et 4 mg/l) et le temps de contact (0, 5, 10, 15, 30, 45 et 60 min) permettant de couvrir une large gamme de CT s'échelonnant entre 0 et 240 mg/l•min. Les communautés microbiennes des eaux usées ont été suivies avant et après désinfection au PFA afin de déterminer si d'autres cibles bactériennes que les habituels pathogènes étaient affectées par le traitement. Les données brutes du séquençage ont été déposées dans la *NCBI Sequence Read Archive* sous le nom BioProject PRJNA1039624.

Principaux résultats

Dans un premier temps, les communautés bactériennes des effluents ont été caractérisées avec les taxons dominants identifiés à la fois au niveau des phyla (*Proteobacteria*, *Bacteroidota*, *Firmicutes*, *Actinobacteriota* et *Patescibacteria*) et au niveau des genres (*Pseudomonas*, *Massilia*, *Sphingorhabdus*, *Actinetobacter*, *Brevundimonas*, *Flavobacterium*, *Pedobacter*, et *Exiguobacterium*). Ensuite, l'effet du PFA sur les communautés microbiennes a été mis en évidence même à une faible valeur de CT de 8 mg/l•min, démontrant son efficacité à de faibles concentrations et à des temps de contact courts. Aux différents temps de contact et concentrations testés, certains genres bactériens ont montré une sensibilité au PFA, notamment *Flavobacterium*, *Pedobacter*, *Massilia*, *Exiguobacterium* et *Sphingorhabdus*, tandis que d'autres ont montré une résistance, comme *Acinetobacter*, *Leucobacter*, *Thiothrix*, *Paracoccus*, *Cloacibacterium* et *Hydrogenophaga*. La prédiction des fonctions métagénomiques à l'aide de Picrust a révélé que le métabolisme restait la fonction dominante après désinfection au PFA quelles que soient les conditions expérimentales considérées. Enfin, nos résultats fournissent des informations détaillées sur la résistance et la sensibilité de différents groupes bactériens au PFA au regard de leur structure membranaire Gram positive ou Gram négative. En conclusion, ces résultats soulignent l'efficacité du PFA dans la réduction de l'abondance microbienne et la modification des communautés bactériennes à de faibles concentrations et à des temps de contact courts.

Assessing the effectiveness of performic acid disinfection on effluents: focusing on bacterial abundance and diversity

BAGAGNAN Sadia¹, JUSSELME My Dung^{1*}, ALPHONSE Vanessa¹, GUERIN RECHDAOUI Sabrina², MARCONI Anthnoy², ROCHER Vincent², MOILLERON Régis^{1**}

¹Leesu, Univ Paris Est Creteil, Ecole des Ponts, Creteil, France

²SIAAP, Direction de l'Innovation, F-92700 Colombes, France

**jusselme@u-pec.fr

***moilleron@u-pec.fr

Abstract

Inadequately treated wastewater can harbor pathogenic microorganisms that pose a risk to the environment and public health. To counter this, incorporating effective disinfection measures within wastewater treatment plants (WWTPs) becomes imperative. Traditional techniques like chlorination and UV treatment have drawbacks such as disinfection by-product formation, inefficacy or bacterial revival, making them less appealing for wastewater treatment. Performic acid (PFA) has emerged as a promising alternative due to its potent disinfection properties and minimal environmental impact. The present study aims to comprehensively evaluate the effectiveness of PFA disinfection on the microbial community present in treated WWTP effluents, encompassing diverse pathogens. Illumina Miseq sequencing was employed to identify and assess the microbiome in effluent. The results indicated the highest extent of damaged cells at a CT level of 60 mg/l•min, highlighting the optimal efficacy of PFA disinfection on viability of microorganisms. Moreover, at low concentration of 0.8 mg/l PFA with a contact time of 10 min, resulting in a CT of 8 mg/l•min, significantly affected the microbial composition. Noteworthy was the sensitive of specific bacterial genera such as *Flavobacterium*, *Pedobacter*, *Massilia*, *Exiguobacterium* and *Sphingorhabdus*, to PFA action, while others including *Acinetobacter*, *Leucobacter*, *Thiothrix*, *Paracoccus*, and *Cloacibacterium*, displayed resistance. The results of the present study provides detailed findings on the resilience and susceptibility of different bacterial group to PFA, which is linked to their membrane structure Gram-positive or Gram-negative. In conclusion, the findings underscore PFA's efficacy in reduction microbial abundance and altering bacterial communities, at low concentrations and short contact times, highlighting its viability for widespread application in WWTPs.

Keywords: performic acid, wastewater, disinfection, bacterial diversity, bacterial abundance

Introduction

Inadequately or partially treated wastewater holds the potential to harbor pathogenic microorganisms, which might then be their way into the receiving environment through discharge (Drury et al., 2013; Mansfeldt et al., 2020). Consequently, these discharges can alter the quality of receiving waters, increasingly frequented by the public for recreational purposes like bathing (Castro-Hermida et al., 2008; Kistemann et al., 2016; Rhymes et al., 2015). To prevent or mitigate the degradation of the microbiological quality of these waters, incorporating a disinfection step into wastewater treatment plant (WWTP) effluents become imperative. Numerous disinfection techniques existed, such as chlorination, ultraviolet (UV) treatment, and ozonation. However, every technique carried its set of advantages and drawbacks. For instance, chlorination, widely favored for its efficiency against pathogenic bacteria, had a significant drawback in the production of harmful disinfection by-products (DBP) known to be toxic and potentially carcinogenic, teratogenic and mutagenic (Lin

et al., 2021; Xu et al., 2022). UV disinfection, while effective, grappled with the challenge of the bacterial revivification (Sinha and Häder, 2002; Stohl et al., 2003). These constraints make these disinfection techniques less attractive for implementation in WWTP.

To identify an effective disinfectant with minimal or no disinfection by-products formation, nor non-toxic degradation products for the aquatic environments, and cost-effectiveness, researchers are exploring the use of peracids, including peracetic acid (PAA) and performic acid (PFA). Initially, peracetic acid gained attention for waste disinfection due to its high potent oxidizing capacities, notably in countries like the United Kingdom (Falsanisi et al., 2006). Its effectiveness spans a wide spectrum of pathogenic microorganisms, ranging in susceptibility from bacteria to protozoa, ordered as follows: bacteria > viruses > spores > cysts (Acosta et al., 2022; Gehr and Cochrane, 2002; Gesto et al., 2018; Wessels and Ingmer, 2013). However, a significant drawback of this approach lies in potential microbial revival and proliferation. The acetic acid produced from PAA degradation serves as a source of carbon for microorganisms, leading to their growth and proliferation (da Silva et al., 2020). Consequently, performic acid has emerged as an alternative to peracetic acid. Possessing robust oxidising properties akin to peracetic acid, performic acid is synthesized through formic acid (HCOOH) catalysed by sulphuric acid and hydrogen peroxide H₂O₂ (Gehr et al., 2009). Its synthesis reaction generates heat (Ragazzo et al., 2013), and the PFA produced must be used promptly after its synthesis due to its instability (Mattila and Aksela, 2006). Historically utilized as a bleaching agent in paper pulp production, replacing chlorinated chemicals (Brasileiro et al., 2001; LANG et al., 2018; Schmidt and Ruecker, 1967), performic acid also finds application as a disinfectant in the medical field, due to its effectiveness against pathogenic microorganisms. Recent studies have extensively evaluated its effectiveness in treating effluents at various treatment step: primary (Gehr et al., 2009), secondary (Ragazzo et al., 2013) or tertiary (Luukkonen et al., 2015) and even for combined sewer overflows discharges (Chhetri et al., 2014). These disinfection trials targeted specific microorganisms, including faecal indicator bacteria like *Escheria coli*, *intestinal Enterococci*, and other pathogens, such as bacterial genera *Clostridium*, *Aeromonas*, *Salmonella*, spore-formers like *Cryptosporidium* and cysts such as *Giardia* (Gehr et al., 2009; Karpova et al., 2013).

In numerous experiments, PFA has demonstrated remarkable effectiveness against these pathogenic microorganisms at low concentrations and short contact times (Chhetri et al., 2014; Gehr et al., 2009; Luukkonen et al., 2015; Ragazzo et al., 2013). However, this efficiency can vary depending on the treatment level of these discharges. For example, the removal of 1 log of *Enterococci* required a concentration of 1 mg/l for primary effluents compared to 0.5 mg/l for secondary effluents, within a maximum contact time of 20 minutes (Gehr et al., 2009). Additionally, this efficiency can differ based on the type of microorganisms. For identical concentration and contact time, the reduction of *E. coli* is more significant compared to that of *Enterococci*. Specially, for pathogens like *E. coli*, an abatement between 2.2 and 4 log was achieved with PFA doses ranging from 0.9 to 1.2 mg/l within a contact time less than 10 min (Ragazzo et al., 2013). In the same study (Ragazzo et al., 2013), at similar concentrations and contact times, the removal of *Enterococci* ranged between 0.7 and 3.2 log. Furthermore, apart of its proven biocidal action, PFA decomposes into formic acid, hydrogen peroxide and CO₂ (Santacesaria et al., 2017), all of which are not toxic to the aquatic environment (Gehr et al., 2009). Notably, no significant general toxicity effects were observed in bacteria, fungi (*Septoria tritici*) and yeasts (*Saccharomyces cerevisia*), serving as biological models for the receiving waters of effluents disinfected with PFA (Rocher and Azimi, 2021). In addition, a comparison between peracetic acid and performic acid shows a greater bacterial inactivation capacity for PFA (Campo et al., 2020; Chhetri et al., 2014). Therefore, PFA presents a compelling option for water treatment plant managers. Previous experiments involving performic acid have predominantly targeted specific microorganisms. However, wastewater harbors numerous other microorganisms, including genera like *Campylobacter*, *Pseudomonas*, *Shigella* and *Aeromonas* (Chahal et al., 2016), all of which are potential pathogenic agents. This study,

performed within the framework of the MeSeine Innovation research program, aimed to assess the PFA effectiveness, considering the whole effluent microbiome. More precisely, we aimed to study the resistance of microorganisms to PFA action. The microbial community will be analysed along two well-defined aspects: abundance and diversity.

Material and methods

1.1. Effluent collection

Effluent samples were collected from the outlet of the Seine Centre (SEC) WWTP situated in Colombes (France), near Paris, in October 2021. In this WWTP, the wastewater originates from an approximate population of one million inhabitants. This WWTP processes a daily volume of water around 240,000 m³ during dry weather and up to 404,800 m³ during wet weather conditions. A sequence of treatment techniques is carried out before discharging treated effluent into the Seine River, *i.e.*, physico-chemical laminar decantation, followed by biological treatment using a bio-filtration unit to eliminate carbon and nitrogen pollution. Once taken, the effluents were stored at a temperature of -20°C until the disinfection tests were carried out.

1.2. PFA synthesis

PFA was synthesised according to the protocol detailed in (Rocher and Azimi, 2021). The first step involved preparing catalyzed formic acid by adding 0.96 g of sulphuric acid (98%, Aldrich) to 7.49 g of formic acid (99%, Aldrich) on ice. The second step consisted of adding 1,370 ml of H₂O₂ (50% wt, Aldrich) to 1,260 ml of formic acid solution to generate performic acid (PFA) in an ice bath. This mixture is slowly stirred for 90 minutes under cold conditions. Once the 90 minutes have elapsed, a performic acid solution was get ready to use. The PFA concentration was measured by iodometric titration. For this, 83.4 µl of this mixture was mixed with 25mL H₂SO₄ (1M) solution and titrated to determine the concentrations of H₂O₂ and PFA. The H₂O₂ titration was conducted with potassium permanganate solution (KMnO₄, 0.02M, Aldrich). An excess of potassium iodide was then added and oxidized by PFA. Iodine was then titrated with sodium thiosulfate (Na₂SO₃, 0.02M, Aldrich). The mass concentrations of PFA obtained range between 8 and 11%. The PFA solution was kept at 4°C and titrated in triplicate each time right before use to confirm its concentration

1.3. Experimental design

The disinfections were carried out in a microcosm at a laboratory scale. This was set up using a laboratory fermenter (Minfor2, France) that helped keeping the temperature constant (18°C). In the microcosm, 4l of effluent was stirred constantly at 200 rpm. While stirring, performic acid was gradually added to targeted concentrations of 0.8, 2 and 4 mg/l. For each concentration, samples were extracted at different contact times (5, 10, 15, 30, 45 and 60 min). Just after sampling, sodium thiosulphate was introduced to stop the action of the PFA. These samples were stored at 4°C prior to microbial abundance characterization, and at -20°C for microbial diversity analysis.

1.4. Microbial communities analysis

1.4.1. Bacterial abundance measurement

The bacterial cells in PFA-treated samples were measured by flow cytometry using the "BACTOSENSE" automatic cytometer (Marque). This technique is commonly used to measure bacterial abundance in liquid environmental samples. The BACTOSENSE operates on the principle of employing double labelling with two fluorochromes: SYBR Green I and propidium iodide (PI). SYBR Green I, a dye, permeates all bacterial cells regardless of membrane integrity (Barbesti et al., 2000), enabling the quantification of all cells. In contrast, PI penetrates only cells with damaged membranes, allowing the quantification of damaged cells (Grégori et al., 2001). This dual-staining technique leads to the simultaneous quantification of total, intact and damaged cells. For measurement, an automated extraction of 260 µl sample was performed, of which 90 µl was labelled with the fluorochromes. The stained samples were then incubated at 37°C for 10

minutes before cell counting. Samples were measured in triplicate. To avoid contamination, thorough cleaning was set up between sample measurement. The raw FCM data files were then analysed using custom software that enabled batch processing of the large data sets generated in this study. Briefly, FCM gates are constructed to separate bacterial cell signals (total cell concentration, TCC) from background signals and differentiate between intact cells and altered membranes cells. Accordingly, the results provided the numbers of total cells, intact cells and damaged cells as Excel files.

1.4.2. Bacterial diversity assessment

High through sequencing. To collect the microorganisms, PFA-treated samples (500 ml) were filtered through a sterilized vacuum pump system with 0.22 µm nitrate-cellulose Whatman filters (Sartorius, France) under a laminar flow hood (BIOII, ADS Laminaire, France). After filtration, the filters containing the microorganisms were placed in labelled sterile Petri dishes in a laminar flow hood for 30 min for drying. DNA was extracted from these filters using DNeasy PowerWater Kit (QIAGEN) according to the manufacturer's instructions. The library preparation and the high-throughput sequencing were performed on an Illumina MiSeq platform by Eurofins Genomics (Germany) according their standards protocols. The variable V3–V4 region were amplified with the forward primer (5'-TAC GGG AGG CAG CAG-3') and the reverse primer (5'-CCA GGG TAT CTA ATC C-3'). The Illumina raw sequences have been deposited in the NCBI database under the BioProject ID: PRJNA1039624.

Data processing. The output sequences datasets from Eurofins were bioinformatically processed using the FROGS analysis pipeline available on INRAE's Galaxy platform whose steps are described by (Escudié et al., 2018). Firstly, the sequences were cleaned up by eliminating those that were too short or had too many ambiguous bases (errors). These cleaned sequences were then regrouped into clusters from which chimeras were removed in the third step. A filtration step kept only the clusters containing more than 0.0005% of the sequences. This treatment made it possible to get operational taxonomic units (OTUs) that were taxonomically affiliated using the Blast 16-SILVA-138 database. Diversity indices like Shannon index and Simpson richness were calculated using Phyloseq R package in FROGS (FROGSSTAT). Simpson index represents the uniformity, while microbial diversity was evaluated by Shannon index. From the data obtained by 16S RNA sequencing, it was possible to predict the potential functions of the different bacterial communities identified using PICRUSt (Phylogenetic Investigation of Communities by Reconstruction of Unobserved States). The OTUs table was used as input file into PICRUSt, then, a correlation was made between phylogeny and the functions. The abundance of the different predicted genes identified was analysed using KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes).

1.5. Statistical analyses

Variations between effluents treated and non-treated for the parameters of number of damaged cells and the relative abundance of microbial groups were assessed by one-way ANOVA (Fisher's Post Hoc Test) with a 95% confidence interval. Correlation tests and comparisons between the different data were carried out using XLSTAT software (Addinsoft, USA).

Results and discussions

Evaluating the damaged microbial cells by PFA disinfection

Disinfection processes aim to inactivate or eliminate pathogenic organisms present in WWTP effluents. Inactivation of bacteria can temporarily or permanently stop their metabolic functions. Disinfectants can impact the membrane (Cho et al., 2010) and/or DNA (Cho et al., 2010; Oguma et al., 2001) of bacterial cells. Recent studies (Ding et al., 2023; Lin et

al., 2023) have shown that PFA disrupted bacterial cells by damaging their cell walls, causing a loss of protective capacity and releasing internal cellular contents. Therefore, flow cytometry technique with double labelling of viable/damaged cells is more suitable for monitoring the effect of PFA on bacterial abundance. To evaluate the effectiveness of PFA disinfection, the proportion of damaged cells was monitored for three PFA concentrations of 0.8, 2 and 4 mg/l at different time contacts (0, 5, 10, 15, 30, 45 and 60 minutes). Hence, Figure 1a shows the proportion of damaged cells (DC) as a function of time for the three concentrations of PFA, while Figure 1b shows the evolution of the percentage of damaged cells with CT (expressed in mg/l•min), i.e., taking into account the combination of PFA concentration and the contact time. It can be seen from Figure 1a that the DC proportion increased with time for all PFA concentrations. After a contact time of 30 minutes, the DC proportion was over 50%. The highest DC proportion was observed for a PFA concentration of 4 mg/l after 45 minutes of contact time (i.e., a CT of 180 mg/l•min). These findings highlighted the efficiency of PFA to disinfect WWTP effluents. Figure 1b underlined the importance of the contact time, since the DC proportion increased with CT. However, this proportion stabilized, reaching a plateau around 60 mg/l•min, remaining at around 60% up to 240 mg/l•min. The value of 60 mg/l•min represents the peak activity, consistent with the findings of Wang et al. (2023b), where a value of 60 mg/l•min demonstrated more efficient *E. coli* inactivation, achieving a 99% efficiency rate. Consequently, for the WWTP operators, this meant that the same level of disinfection could be achieved by increasing either the PFA concentration or the contact time but not necessarily both.

Characterization of the bacterial communities of untreated effluent

Firstly, the bacterial communities present in the untreated effluent were characterized. These results were used as a basis for comparison in the future, before evaluating the changes in bacterial community resulting from PFA disinfection. The dominant phyla are *Proteobacteria* (63.8%), *Bacteroidota* (27.1%), *Firmicutes* (4.3%), *Actinobacteriota* (2.7%) and *Patescibacteria* (0.9%) (Fig. 2a). These identified phyla are commonly found within the microbiome of WWTP discharges (Plaza et al., 2021; Tian and Wang, 2020; Wang et al., 2020; Zhang et al., 2019; Wang et al., 2023a). The relative abundance of these phyla varied depending on the origin of the nature of the influent, whether domestic or industrial (Meerbergen et al., 2017). *Proteobacteria*, prevalent in aerobic environments, stood as the most abundant phylum, followed by *Bacteroidota*, known for their role in the degradation of organic matter (Kruczyńska et al., 2023; Thomas et al., 2011). *Firmicutes* thrive in anaerobic conditions and exhibit capability in organic compound degradation (Garcia et al., 2011; Yang et al., 2014). Similarly, *Actinobacteriota* are associated with the breakdown of organic matter (Mikhailov et al., 2019).

At the class level, seven predominant classes were observed, including *Gammaproteobacteria* (53.7%) and *Alphaproteobacteria* (10.1%) belonging to the phylum *Proteobacteria*, *Bacteroidia* of the phylum *Bacteroidota* (27.1%), *Clostridia* (2.5%) and *Bacilli* (1.8%) belonging to the *Firmicutes* phylum, *Actinobacter* (2.3%) from the *Actinobacteriota* phylum and *Saccharimonadia* (0.9%) from the *Patescibacteria* phylum (Fig. 2b). Further analysis of the bacterial genus showed that the dominant genes were *Pseudomonas* (29.2%), *Massilia* (4.8%), *Sphingorhabdus* (1.3%) and *Actinetobacter* (0.9%), belonging to the *Gammaproteobacteria* class; *Brevundimonas* (1.1%) and *Sphingomonas* (0.6%), belonging to the *Alphaproteobacteria* class; *Flavobacterium* (16.5%) and *Pedobacter* (5.2%) belonging to the *Bacteroidia* class (phylum *Bacteroidota*), *Exiguobacterium* (1.3%) from the *Clostridia* class (phylum *Firmicutes*) (Fig. 2c). The presence of these bacterial genera in the discharges can be explained by their role in diverse stages of the wastewater treatment process. For example, *Pseudomonas*, a Gram-negative bacterium, displays in diverse environments and is involved in removal of organic compounds such as hydrocarbons, pesticides and herbicides (Pacwa-Płociniczak et al., 2014). This bacterial genus is known for its resistance to antimicrobial treatments due to the presence of three exopolysaccharides (Psl, Pel and alginate) in its membrane structure (Chino et al., 2017; Fong and Yildiz, 2015), and it

also thrives in anoxic conditions (Line et al., 2014). *Flavobacterium*, a Gram-negative bacterium belonging to the *Bacteroidia* family, play a significant role in wastewater denitrification within WWTPs (Wang et al., 2016). Additionally, *Exiguobacteria*, non-spore-forming, motile, and Gram-positive bacteria (Vishnivetskaya et al., 2009) contributes to the degradation of organic compounds and denitrification (Raichand et al., 2012). *Sphingorhabdus*, a Gram-negative, non-spore-forming bacteria (Jogler et al., 2013), plays an important role in the degradation of aromatic compounds and xenobiotic compounds (Jeong et al., 2016). In parallel with this, effluent remains a source of potential pathogenic microorganisms such as *Pseudomonas* (e.g., *Pseudomonas aeruginosa*) and *Massilia* (e.g., *Massilia timonae*) are known for causing infections in immunodepressed individuals (Liao et al., 2022; Lindquist et al., 2003). Additionally, pathogens like *Acinetobacter*, *Brevundimonas*, and *Flavobacterium*, with certain strains known for causing nosocomial infections in vulnerable hospital patients (Bergogne-Bérézin and Towner, 1996; Ryan and Pembroke, 2018), contribute to the treatment process within WWTPs but pose health risks when released into the environment. Furthermore, bacterial species associated with good ecological status, such as *Mycobacterium*, *Enterococcus*, and *Streptococcus* were found in weak proportions (0.02, 0.01, and 0.11%, respectively). Similarly, *Klebsiella* and *Escherichia-shigella*, responsible for gastroenteritis (Okoh et al., 2007) were identified in the untreated effluent, i.e., before PFA disinfection, at low abundances of 0.001% and 0.002%, respectively. Consequently, these pathogens were included in the disinfection test monitoring.

Changes in bacterial community at the phylum level in the treated effluents with CT (mg/l•min) in compare with untreated effluent

The relative abundances of these bacterial taxa at the phylum and genus levels were monitored at various CT values during disinfection. Figure 3 summarizes the changes that occurred during PFA disinfection in terms of the relative abundance of bacterial community at the level of the main phyla. For CT below 48 mg/l•min, fluctuations were observed for the relative abundance of all phyla. These fluctuations differed from phyla to another, making it difficult for treatment plant operators to understand how PFA acts on these phyla for low CT (i.e. below 48 mg/l•min). However, for CTs higher than 60 mg/l•min, for all the phyla a plateau was reached confirming the previous observations for the damaged cells. This is in accordance with previous results (Karpova et al., 2013) since a CT of 60 mg/l•min is considered as being the the optimal dose for disinfection.

For *Proteobacteria*, PFA action led to a decrease of its relative abundance from 63.8% before treatment (CT=0) to about 55%, with the exception of the CT40, for which the relative abundance reached 64.2%. For high CTs (> 60 mg/l•min) the relative abundance of *Proteobacteria* was close to that of the untreated effluent. This was explained by the fact the relative abundance of *Proteobacteria* was associated with an increase of the relative abundance of *Alphaproteobacteria*, one of the principal classes within this phylum. The relative abundance of *Alphaproteobacteria* increased from 10.2% before treatment to about 15% for high CTs. Generally, members of the class *Alphaproteobacteria* are gram-negative bacteria (Gupta et al., 2000), so they are more sensitive to the action of PFA. The increase in this bacterial group could be explained by another pathway of their resistance capacity to PFA, apart from their negative membrane, or because the relative abundance of other groups decreases, leading to an increase in this group.

Conversely, for *Bacteroidota*, a different trend was observed. The relative abundance of *Bacteroidota* decreased with increasing CT. Initially at 27.1%, the *Bacteroidota* relative abundance decreased to approximately 20% for higher CTs. This pattern suggests that members of this phylum are sensitive to the action of PFA, potentially due to their Gram-negative membrane structure (Hudson and Egan, 2022). This observation is consistent with previous findings (Ding et al., 2023), demonstrating that PFA efficiency is higher against Gram-negative bacterial cells. Furthermore, the higher the

concentration, the stronger the action of the PFA on *Bacteroidota*. Indeed, a more significant reduction was observed for CT40 (4 mg/L for 10 min) compared to that for CT48 (0.8 mg/L for 60 min). This suggests that PFA concentration plays a more important role than the contact time. This rapid action aligns with previous results (Luukkonen et al., 2015), where *E.coli* showed a rapid 2.9 log reduction after one minute and reached 3.5 log reduction after 60 min of contact time.

Finally, *Firmicutes*, *Actinobacteriota* and *Patescibacteria* phyla displayed an increase in their relative abundance for high CTs. *Firmicutes* increased from 4.3% before treatment to 6.0 % for high CTs. This increase in *Firmicutes* relative abundance was linked to the rise of the *Clostridia* class. The behaviour of *Firmicutes* might be elucidated by considering the membrane structure characteristic of bacteria within this phylum, in relation to the mechanism of action of PFA. Many bacteria within this phylum exhibit the Gram-positive membrane, characterized by a membrane featuring a thick peptidoglycan layer, which provides a certain level of protection (Pang et al., 2016). This trait is particularly prominent in the *Clostridia* class, known for its resistant against PFA action. In addition to their membrane structure, these bacteria have the capacity to produce endospores, enabling survival even in harsh conditions (Kaldhusdal and Jordan, 2008). Notably, this class of bacteria has displayed resistance to disinfectants like chlorine (Baron et al., 2014; Pang et al., 2016) and peracetic acid (Eramo et al., 2017). In contrast, the relative abundance of *Bacilli* remains constant across all experimental phases, regardless of disinfection. Like *Clostridia*, bacteria belonging to the *Bacilli* class possess an exclusively Gram-positive with a robust membrane structure (Ludwig et al., 2015). This feature might explain their resistance to PFA disinfectant action. For *Actinobacteriota*, its relative abundance rose from 2.7% before treatment to 6.0 % for high CTs. This observation suggests resistance to PFA. *Actinobacteria* classes are capable of forming exo-spores to protect themselves in the presence of unfavourable external conditions such as disinfectants (Beskrovnaya et al., 2021). Like *Clostridia*, *Actinobacteria* are found to be resistant to chlorine (Li et al., 2020; Wang et al., 2023a).

Changes in bacterial community at the genus level in the treated effluents with CT (mg/l•min) in compare with untreated effluent

To gain deeper insight into the impact of PFA, the PFA disinfection effect was evaluated at the bacterial genus level (Figure 4). *Pseudomonas*, the most abundant bacterial genus identified in the untreated effluent, exhibited a decrease in relative abundance during the treatment process. Their relative abundance declines from 29.2% before treatment up to about 17.0% for high CTs. This reduction reflects the impact of PFA on some bacteria within this genus, despite they are generally known resistant to various disinfection methods like chlorine, UV and ozone (Feng et al., 2021; Wang et al., 2019). The increase in *Pseudomonas* abundance could be partly explained by the removal of some other bacteria. This indicates that besides *Pseudomonas*, other bacteria are unable to withstand the effect of PFA. As illustrated in Figure 4, a correlation between the increase in *Pseudomonas* abundance and a simultaneous decrease in *Flavobacterium* abundance is observed. Moreover, the impact of PFA was observed on the genera *Flavobacterium*, *Pedobacter*, *Massilia*, *Exiguobacterium* and *Sphingorhabdus*, resulting in a decrease in their abundance in the treated effluents. It's noteworthy that all these bacterial genera are Gram-negative (Jogler et al., 2013; Li et al., 2017), which could explain their sensitivity to the action of PFA. Conversely, certain bacterial genera exhibit increased relative abundance during PFA disinfection, notably *Acinetobacter*, *Leucobacter*, *Thiothrix*, *Paracoccus*, *Cloacibacterium* and *Hydrogenophaga* (Figure 5). These genera, which dominate the untreated effluent, were after PFA addition among the dominant taxa in the treated effluent. This trend suggests their resilience against PFA. Notably, some bacteria within these resistant genera are Gram-negative (such as *Acinetobacter*, *Paracoccus Cloacibacterium*, and *Hydrogenophaga*) (Allen et al., 2006; Bates and King, 2021; Chung et al., 2007; Towner, 2006), while one genus displays Gram-negative and positive variability (*Thiorix*) (Unz and Head, 2015). For some genera, the abundance remained stable, with no decreasing or increasing trend; this is the case for *Brevundimonas*, *Novosphingobium*, *Methylothera* and *Sphingomonas*. The bacteria affiliated to these genera are Gram-

negative. These observations regarding the membrane structure of PFA-sensitive and -resistant bacteria indicate a more pronounced effect of PFA on Gram-negative bacteria compared to Gram-positive bacteria. Gram-positive bacteria typically possess thicker cell walls, typically 20-80 nanometres thick (compared to 1.5-10 nanometres for Gram-negative), providing some resistance to disinfection (Mai-Prochnow et al., 2016). However, certain gram-negative bacteria exhibit PFA-resistance despite these factors. Upon assessing the effectiveness of PFA against pathogenic microorganisms, it is evident that among the potential pathogenic microorganisms identified, *Pseudomonas*, initially dominant in untreated effluent, showed reduced but persistent presence in treated effluent. A decrease is observed in the relative abundance of *Massilia* at some CT values, with certain *Massilia* species, like *Massilia timonae*, known to cause infections in immunodepressed individuals (Lindquist et al., 2003). Another observation concerning *Flavobacterium*, despite its resistance to chlorine treatment, this genus exhibited decreasing abundance during the disinfection process. Other pathogens such as *Acinetobacter* and *Brevundimonas* were identified in the treated effluents, illustrating their resistance capacity to PFA. Among the bacteria monitored to assess ecological status, *Mycobacterium*, *Enterococcus* and *Streptococcus* were detected in minimal proportions of 0.02, 0.01 and 0.11%, respectively. No reduction in relative abundance was observed for any of them during PFA disinfection. Other pathogenic bacteria such as *Klebsiella* and *Escherichia-Shigella*, known for causing gastroenteritis (Okoh et al., 2007), were found in untreated effluent with abundances of 0.001 and 0.002%, respectively. However complete removal for them was achieved at a CT of 8 mg/l•min for *Klebsiella* and 20 mg/l•min for *Escherichia-Shigella*.

Changes in functional profiles

The functional genes predictions of the identified bacterial communities were conducted using Picrust software. In the untreated effluent, the functional profiles linked to KEGG pathways were categorized into six main level-1 functional groups: metabolism (80.2%), genetic information processing (10.6%), cellular processes (4.96%), environmental information processing (2.63%), human diseases (0.86%) and organisational systems (0.71%) (Figure 6). At level 2, the classification of functions revealed 11 pathways for metabolism, 4 pathways for the processing of genetic information, 3 pathways for environmental information processing, 5 pathways for cellular processes, 9 pathways for organic systems and 9 pathways for human diseases. These different pathways and their relative abundances are detailed in Table S1 (supplementary data). The impact of PFA on gene prediction was analysed for treated effluent at various CTs. At KEGG level 1, no clear upward or downward trend in gene abundance was any observed for the 6 groups, regardless of whether the effluents had been treated or not. Subsequent analysis at level 2 revealed specific changes: a decrease in the relative abundance of genes in the glycan biosynthesis and metabolism pathway and metabolism of cofactors and vitamin pathway, as well as an increase in genes related to the xenobiotic biodegradation and metabolism pathway. A Pearson correlation matrix was used to assess the correlation between the bacterial genera and the abundance of their level 2 functional groups (Figure 6). As shown in Table 1, positive correlations were evident between the glycan biosynthesis and metabolism pathway, metabolism of cofactors and vitamins pathway, and the relative abundance of the genera *Exiguobacterium* and *Algoriphagus*. Similarly, another correlation was found between xenobiotic biodegradation and metabolism pathway and the relative abundance of *Thiothrix* and *Hydrogenophaga*. This finding suggests the involvement of these bacterial genera in these biological processes. Effectively, this finding aligns with research indicating the potential involvement of certain strains of *Exiguobacterium* in glycan biosynthesis and metabolism (Delegan et al., 2021).

Table 1 : Pearson correlation between bacterial diversity at genus level and predicted function at level 1

Résultats



In this study, attention was given to the abundance of genes linked to human diseases and their variations during disinfection tests (Table S1 supplementary data). Eight classes were considered: cancers, cardiovascular diseases, immune system diseases, infectious diseases, metabolic diseases (bacterial, parasitic and viral), and neurodegenerative diseases, with neurodegenerative diseases showing the highest abundant. Among the observed human disease level-3 functions in the treated effluents, Epithelial cell signaling in *Helicobacter pylori* infection (Infectious disease: bacterial), African trypanosomiasis (Infectious disease: parasitic) and Amyotrophic lateral sclerosis (neurodegenerative disease) were most prevalent. Interestingly, a decrease in the relative abundance of these functional groups was noted during PFA disinfection. The presence of bacterial communities associated with pathways in cancer, viral myocarditis (cardiovascular), Toxoplasmosis, Alzheimer's disease and Parkinson's disease is also noteworthy. Furthermore, these functional genes are typically detected in WWTP effluents (Zhao et al., 2020) and even in drinking water (Jiang et al., 2022). Despite the PFA disinfection, no reduction was observed in these functional groups associated with human diseases.

Conclusion

The aim of this study was to assess, for the first time, the impact of PFA disinfection on the microbial communities of WWTP effluents, and not just on *E. coli* and total coliforms as it is generally the case. At first, bacterial communities in the effluent was characterized with the dominant taxa identified at both phyla level (*Proteobacteria*, *Bacteroidota*, *Firmicutes*, *Actinobacteriota* and *Patescibacteria*) and genus level (*Pseudomonas*, *Massilia*, *Sphingorhabdus*, *Acinetobacter*, *Brevundimonas*, *Flavobacterium*, *Pedobacter*, and *Exiguobacterium*). Then, the effect of PFA on microbial communities was highlighted even at low CT value such as 8 mg/l•min, demonstrating its effectiveness at low concentrations and short contact times. Across the various contact times and concentrations tested, certain bacterial genera exhibited sensitivity to PFA, notably *Flavobacterium*, *Pedobacter*, *Massilia*, *Exiguobacterium* and *Sphingorhabdus*, while others display resistance, such as *Acinetobacter*, *Leucobacter*, *Thiothrix*, *Paracoccus*, *Cloacibacterium* and *Hydrogenophaga*. Metagenomics function prediction using Picrust revealed that metabolism remained the dominant function after PFA disinfection for all the effluents. Considering these findings, the use of PFA in WWTP appears to be a promising option.

References

Acosta, F., Bravo, J., Monzón-Atienza, L., Galindo-Villegas, J., Torrecillas, S., Montero, D., 2022. Peracetic acid can be used as a disinfectant for gilthead sea bream (*Sparus aurata*) juveniles without affecting fish welfare. *Aquac. Rep.* 24, 101107. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2022.101107>

- Allen, T.D., Lawson, P.A., Collins, M.D., Falsen, E., Tanner, R.S., 2006. *Cloacibacterium normanense* gen. nov., sp. nov., a novel bacterium in the family Flavobacteriaceae isolated from municipal wastewater. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56, 1311–1316. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.64218-0>
- Baron, J.L., Vikram, A., Duda, S., Stout, J.E., Bibby, K., 2014. Shift in the Microbial Ecology of a Hospital Hot Water System following the Introduction of an On-Site Monochloramine Disinfection System. *PLOS ONE* 9, e102679. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0102679>
- Bates, K.A., King, K.C., 2021. *Leucobacter*. *Trends Microbiol.* 29, 1046–1047. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2021.06.010>
- Bergogne-Bérézin, E., Towner, K.J., 1996. *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: microbiological, clinical, and epidemiological features. *Clin. Microbiol. Rev.* 9, 148–165.
- Beskrovnyaya, P., Fakih, D., Morneau, I., Hashimi, A., Guadarrama Bello, D., Xing, S., Nanci, A., Huan, T., Tocheva, E.I., 2021. No Endospore Formation Confirmed in Members of the Phylum Proteobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 87, e02312-20. <https://doi.org/10.1128/AEM.02312-20>
- Brasileiro, L.B., Colodette, J.L., Piló-Veloso, D., 2001. A utilização de perácidos na deslignificação e no branqueamento de polpas celulósicas. *Quím. Nova* 24, 819–829. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422001000600020>
- Campo, N., De Flora, C., Maffettone, R., Manoli, K., Sarathy, S., Santoro, D., Gonzalez-Olmos, R., Auset, M., 2020. Inactivation kinetics of antibiotic resistant *Escherichia coli* in secondary wastewater effluents by peracetic and performic acids. *Water Res.* 169, 115227. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.115227>
- Chahal, C., van den Akker, B., Young, F., Franco, C., Blackbeard, J., Monis, P., 2016. Pathogen and Particle Associations in Wastewater. *Adv. Appl. Microbiol.* 97, 63–119. <https://doi.org/10.1016/bs.aambs.2016.08.001>
- Chhetri, R.K., Thornberg, D., Berner, J., Gramstad, R., Öjstedt, U., Sharma, A.K., Andersen, H.R., 2014. Chemical disinfection of combined sewer overflow waters using performic acid or peracetic acids. *Sci. Total Environ.* 490, 1065–1072. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.05.079>
- Chino, T., Nukui, Y., Morishita, Y., Moriya, K., 2017. Morphological bactericidal fast-acting effects of peracetic acid, a high-level disinfectant, against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in tubing. *Antimicrob. Resist. Infect. Control* 6, 122. <https://doi.org/10.1186/s13756-017-0281-1>
- Cho, M., Kim, J., Kim, J.Y., Yoon, J., Kim, J.-H., 2010. Mechanisms of *Escherichia coli* inactivation by several disinfectants. *Water Res.* 44, 3410–3418. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.03.017>
- Chung, B.S., Ryu, S.H., Park, M., Jeon, Y., Chung, Y.R., Jeon, C.O., 2007. *Hydrogenophaga caeni* sp. nov., isolated from activated sludge. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57, 1126–1130. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.64629-0>
- da Silva, W.P., Carlos, T.D., Cavallini, G.S., Pereira, D.H., 2020. Peracetic acid: Structural elucidation for applications in wastewater treatment. *Water Res.* 168, 115143. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.115143>
- Delegan, Y., Kocharovskaya, Y., Bogun, A., Sizova, A., Solomentsev, V., Iminova, L., Lyakhovchenko, N., Zinovieva, A., Goyanov, M., Solyanikova, I., 2021. Characterization and genomic analysis of *Exiguobacterium alkaliphilum* B-3531D, an efficient crude oil degrading strain. *Biotechnol. Rep.* 32, e00678. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2021.e00678>
- Ding, N., Li, Z., Jiang, L., Liu, H., Zhang, Y., Sun, Y., 2023. Kinetics and mechanisms of bacteria disinfection by performic acid in wastewater: In comparison with peracetic acid and sodium hypochlorite. *Sci. Total Environ.* 878, 162606. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.162606>
- Eramo, A., Medina, W.M., Fahrenfeld, N.L., 2017. Peracetic acid disinfection kinetics for combined sewer overflows: indicator organisms, antibiotic resistance genes, and microbial community. *Environ. Sci. Water Res. Technol.* 3, 1061–1072. <https://doi.org/10.1039/C7EW00184C>
- Falsanisi, D., Gehr, R., Santoro, D., Dell’Erba, A., Notarnicola, M., Liberti, L., 2006. Kinetics of PAA Demand and its Implications on Disinfection of Wastewaters. *Water Qual. Res. J.* 41, 398–409. <https://doi.org/10.2166/wqrj.2006.043>
- Fernandes, L.M., Ramos, G.L. de P.A., Malta, R.C.R., Nascimento, J.D.S., 2022. Tolerance of foodborne *Acinetobacter* spp. to sanitizer agents. *J. Infect. Dev. Ctries.* 16, 1845–1851. <https://doi.org/10.3855/jidc.17226>
- Fong, J.N.C., Yildiz, F.H., 2015. Biofilm Matrix Proteins. *Microbiol. Spectr.* 3, 10.1128/microbiolspec.mb-0004–2014. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.mb-0004-2014>
- Frontier, S., 1983. *Stratégies d’échantillonnage en écologie*. Masson.
- Garcia, S.L., Jangid, K., Whitman, W.B., Das, K.C., 2011. Transition of microbial communities during the adaption to anaerobic digestion of carrot waste. *Bioresour. Technol.* 102, 7249–7256. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.04.098>
- Gehr, R., Chen, D., Moreau, M., 2009. Performic acid (PFA): tests on an advanced primary effluent show promising disinfection performance. *Water Sci. Technol.* 59, 89–96. <https://doi.org/10.2166/wst.2009.761>

- Gehr, R., Cochrane, D., 2002. PERACETIC ACID (PAA) AS A DISINFECTANT FOR MUNICIPAL WASTEWATERS: ENCOURAGING PERFORMANCE RESULTS FROM PHYSICOCHEMICAL AS WELL AS BIOLOGICAL EFFLUENTS. Presented at the Disinfection and Reuse Symposium 2002, Water Environment Federation, pp. 182–198.
- Gerardi, M.H., Zimmerman, M.C., 2004. Wastewater Pathogens. John Wiley & Sons.
- Gesto, M., Liu, D., Pedersen, L.-F., Meinelt, T., Straus, D.L., Jokumsen, A., 2018. Confirmation that pulse and continuous peracetic acid administration does not disrupt the acute stress response in rainbow trout. *Aquaculture* 492, 190–194. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.04.009>
- Gupta S.R., 2000. The phylogeny of proteobacteria: relationships to other eubacterial phyla and eukaryotes. *FEMS Microbiology Reviews*.
- Hudson, J., Egan, S., 2022. Opportunistic diseases in marine eukaryotes: Could Bacteroidota be the next threat to ocean life? *Environ. Microbiol.* 24, 4505–4518. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.16094>
- Jeong, H.I., Jin, H.M., Jeon, C.O., 2016. Complete genome sequence of *Sphingorhabdus* sp. M41, a versatile hydrocarbon degrader, isolated from crude oil-contaminated coastal sediment. *J. Biotechnol.* 227, 41–42. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.04.016>
- Jiang, R., Li, Z., Li, Q., Liu, Y., Zhu, Y., Chen, Z., Liu, P., Jia, S., Ren, H., Zhang, X.-X., 2022. Metagenomic insights into the variation of bacterial communities and potential pathogenic bacteria in drinking water treatment and distribution systems. *Natl. Sci. Open* 1, 20220015. <https://doi.org/10.1360/nso/20220015>
- Jogler, M., Chen, H., Simon, J., Rohde, M., Busse, H.-J., Klenk, H.-P., Tindall, B.J., Overmann, J., 2013. Description of *Sphingorhabdus planktonica* gen. nov., sp. nov. and reclassification of three related members of the genus *Sphingopyxis* in the genus *Sphingorhabdus* gen. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 63, 1342–1349. <https://doi.org/10.1099/ij.s.0.043133-0>
- Kaldhusdal, M., Jordan, F.T.W., 2008. Chapter 18 - Clostridia, in: Pattison, M., McMullin, P.F., Bradbury, J.M., Alexander, D.J. (Eds.), *Poultry Diseases (Sixth Edition)*. W.B. Saunders, Edinburgh, pp. 200–214. <https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-2862-5.50023-4>
- Karpova, T., Pekonen, P., Gramstad, R., Öjstedt, U., Laborda, S., Heinonen-Tanski, H., Chávez, A., Jiménez, B., 2013. Performic acid for advanced wastewater disinfection. *Water Sci. Technol.* 68, 2090–2096. <https://doi.org/10.2166/wst.2013.468>
- Karumathil, D.P., Yin, H.-B., Kollanoor-Johny, A., Venkitanarayanan, K., 2014. Effect of Chlorine Exposure on the Survival and Antibiotic Gene Expression of Multidrug Resistant *Acinetobacter baumannii* in Water. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 11, 1844–1854. <https://doi.org/10.3390/ijerph110201844>
- Kruczyńska, A., Kuźniar, A., Banach, A., Jurczyk, S., Podlewski, J., Słomczewski, A., Marzec-Grządziel, A., Sochaczewska, A., Gałązka, A., Wolińska, A., 2023. Changes in the mycobiome structure in response to reduced nitrogen fertilization in two cropping systems of maize. *Sci. Total Environ.* 904, 166343. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.166343>
- LANG, J., CREW, B., Fast, J.P., Becker, A., Lundberg, S., 2018. Bleaching using peroxyformic acid and an oxygen catalyst. WO2018237255A1.
- Li, C., Dong, F., Feng, L., Zhao, J., Zhang, T., Cizmas, L., Sharma, V.K., 2017. Bacterial community structure and microorganism inactivation following water treatment with ferrate(VI) or chlorine. *Environ. Chem. Lett.* 15, 525–530. <https://doi.org/10.1007/s10311-017-0623-5>
- Li, W., Tan, Q., Zhou, W., Chen, J., Li, Y., Wang, F., Zhang, J., 2020. Impact of substrate material and chlorine/chloramine on the composition and function of a young biofilm microbial community as revealed by high-throughput 16S rRNA sequencing. *Chemosphere* 242, 125310. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.125310>
- Lin, D., Bohui, X., Fanfang, Z., Prasad, S.R., 2021. Effects of nitrate and glucose on the formation of chloronitromethane (CNM) under UV/chlorine treatment. *J. Water Reuse Desalination* 11, 475–489. <https://doi.org/10.2166/wrd.2021.010>
- Lin, Y., Xu, X., Tian, S., Wang, J., Cao, S., Huang, T., Xie, W., Ran, Z., Wen, G., 2023. Inactivation of fungal spores by performic acid in water: Comparisons with peracetic acid. *J. Hazard. Mater.* 458, 131929. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2023.131929>
- Lindquist, D., Murrill, D., Burrall, W.P., Winans, G., Janda, J.M., Probert, W., 2003. Characteristics of *Massilia timonae* and *Massilia timonae*-Like Isolates from Human Patients, with an Emended Description of the Species. *J. Clin. Microbiol.* 41, 192–196. <https://doi.org/10.1128/jcm.41.1.192-196.2003>

- Line, L., Alhede, M., Kolpen, M., Kühn, M., Ciofu, O., Bjarnsholt, T., Moser, C., Toyofuku, M., Nomura, N., Høiby, N., Jensen, P.Ø., 2014. Physiological levels of nitrate support anoxic growth by denitrification of *Pseudomonas aeruginosa* at growth rates reported in cystic fibrosis lungs and sputum. *Front. Microbiol.* 5.
- Ludwig, W., Schleifer, K.-H., Whitman, W.B., 2015. *Bacilli* class. nov., in: *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 1–1. <https://doi.org/10.1002/9781118960608.cbm00033>
- Luukkonen, T., Heyninck, T., Rämö, J., Lassi, U., 2015. Comparison of organic peracids in wastewater treatment: Disinfection, oxidation and corrosion. *Water Res.* 85, 275–285. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2015.08.037>
- Mai-Prochnow, A., Clauson, M., Hong, J., Murphy, A.B., 2016. Gram positive and Gram negative bacteria differ in their sensitivity to cold plasma. *Sci. Rep.* 6, 38610. <https://doi.org/10.1038/srep38610>
- Mattila, T., Aksela, R., 2006. A method for preparation of aqueous solutions containing performic acid as well as their use. CA2185100C.
- Meerbergen, K., Van Geel, M., Waud, M., Willems, K.A., Dewil, R., Van Impe, J., Appels, L., Lievens, B., 2017. Assessing the composition of microbial communities in textile wastewater treatment plants in comparison with municipal wastewater treatment plants. *MicrobiologyOpen* 6, e00413. <https://doi.org/10.1002/mbo3.413>
- Mikhailov, I.S., Zakharova, Y.R., Bukin, Y.S., Galachyants, Y.P., Petrova, D.P., Sakirko, M.V., Likhoshway, Y.V., 2019. Co-occurrence Networks Among Bacteria and Microbial Eukaryotes of Lake Baikal During a Spring Phytoplankton Bloom. *Microb. Ecol.* 77, 96–109. <https://doi.org/10.1007/s00248-018-1212-2>
- Oguma, K., Katayama, H., Mitani, H., Morita, S., Hirata, T., Ohgaki, S., 2001. Determination of Pyrimidine Dimers in *Escherichia coli* and *Cryptosporidium parvum* during UV Light Inactivation, Photoreactivation, and Dark Repair. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 4630–4637. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.10.4630-4637.2001>
- Okoh, A.I., Odjadjare, E.E., Igbinsosa, E.O., Osode, A.N., 2007. Wastewater treatment plants as a source of microbial pathogens in receiving watersheds. *Afr. J. Biotechnol.* 6. <https://doi.org/10.4314/ajb.v6i25.58260>
- Pacwa-Płociniczak, M., Płaza, G.A., Poliwoda, A., Piotrowska-Seget, Z., 2014. Characterization of hydrocarbon-degrading and biosurfactant-producing *Pseudomonas* sp. P-1 strain as a potential tool for bioremediation of petroleum-contaminated soil. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 21, 9385–9395. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-2872-1>
- Pang, Y.-C., Xi, J.-Y., Xu, Y., Huo, Z.-Y., Hu, H.-Y., 2016. Shifts of live bacterial community in secondary effluent by chlorine disinfection revealed by Miseq high-throughput sequencing combined with propidium monoazide treatment. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100, 6435–6446. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7452-5>
- Płaza, G., Jałowicki, Ł., Głowacka, D., Hubeny, J., Harnisz, M., Korzeniewska, E., 2021. Insights into the microbial diversity and structure in a full-scale municipal wastewater treatment plant with particular regard to Archaea. *PLOS ONE* 16, e0250514. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0250514>
- Ragazzo, P., Chiucchini, N., Piccolo, V., Ostoich, M., 2013. A new disinfection system for wastewater treatment: performic acid full-scale trial evaluations. *Water Sci. Technol.* 67, 2476–2487. <https://doi.org/10.2166/wst.2013.137>
- Raichand, R., Pareek, S., Singh, N.K., Mayilraj, S., 2012. *Exiguobacterium aquaticum* sp. nov., a member of the genus *Exiguobacterium*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 62, 2150–2155. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.035790-0>
- Rocher, V., Azimi, S. (Eds.), 2021. Effectiveness of Disinfecting Wastewater Treatment Plant Discharges: Case of chemical disinfection using performic acid. IWA Publishing. <https://doi.org/10.2166/9781789062106>
- Ryan, M.P., Pembroke, J.T., 2018. *Brevundimonas* spp: Emerging global opportunistic pathogens. *Virulence* 9, 480–493. <https://doi.org/10.1080/21505594.2017.1419116>
- Santacesaria, E., Russo, V., Tesser, R., Turco, R., Di Serio, M., 2017. Kinetics of Performic Acid Synthesis and Decomposition. *Ind Eng Chem Res* 56, 12940–12952. <https://doi.org/10.1021/acs.iecr.7b00593>
- Schmidt, O., Ruecker, K.H., 1967. Production of a bleaching liquor containing performic acid. GB1064534A.
- Sinha, R.P., Häder, D.-P., 2002. UV-induced DNA damage and repair: a review. *Photochem. Photobiol. Sci.* 1, 225–236. <https://doi.org/10.1039/b201230h>
- Stohl, E.A., Brockman, J.P., Burkle, K.L., Morimatsu, K., Kowalczykowski, S.C., Seifert, H.S., 2003. *Escherichia coli* RecX Inhibits RecA Recombinase and Coprotease Activities in Vitro and in Vivo *. *J. Biol. Chem.* 278, 2278–2285. <https://doi.org/10.1074/jbc.M210496200>
- Thomas, F., Hehemann, J.-H., Rebuffet, E., Czjzek, M., Michel, G., 2011. Environmental and Gut Bacteroidetes: The Food Connection. *Front. Microbiol.* 2, 93. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00093>
- Tian, L., Wang, L., 2020. A meta-analysis of microbial community structures and associated metabolic potential of municipal wastewater treatment plants in global scope. *Environ. Pollut.* 263, 114598. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114598>

- Towner, K., 2006. The Genus *Acinetobacter*, in: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H., Stackebrandt, E. (Eds.), *The Prokaryotes: A Handbook on the Biology of Bacteria Volume 6: Proteobacteria: Gamma Subclass*. Springer, New York, NY, pp. 746–758. https://doi.org/10.1007/0-387-30746-X_25
- Unz, R.F., Head, I.M., 2015. *Thiothrix*, in: *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 1–16. <https://doi.org/10.1002/9781118960608.gbm01229>
- Wang, B., Duran, R., Pigot, T., Cravo-Laureau, C., 2023. Safe reuse of wastewater: Effect of disinfection methods on microbial community. *Journal of Cleaner Production*, 419, 138291.
- Wang, J., Song, X., Wang, Y., Abayneh, B., Li, Y., Yan, D., Bai, J., 2016. Nitrate removal and bioenergy production in constructed wetland coupled with microbial fuel cell: Establishment of electrochemically active bacteria community on anode. *Bioresour. Technol.* 221, 358–365. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.09.054>
- Wang, M., Zhang, Y., Niu, Z., Miao, Q., Fu, W., 2023a. Study on the distribution characteristics and metabolic mechanism of chlorine-resistant bacteria in indoor water supply networks. *Environ. Pollut.* 328, 121640. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2023.121640>
- Wang, B., Duran, R., Pigot, T., Cravo-Laureau C., 2023b. Safe reuse of wastewater: Effect of disinfection methods on microbial community. *Journal of Cleaner Production* 419, 138291.
- Wang, Q., Liang, J., Zhang, S., Yoza, B.A., Li, Q.X., Zhan, Y., Ye, H., Zhao, P., Chen, C., 2020. Characteristics of bacterial populations in an industrial scale petrochemical wastewater treatment plant: Composition, function and their association with environmental factors. *Environ. Res.* 189, 109939. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.109939>
- Wessels, S., Ingmer, H., 2013. Modes of action of three disinfectant active substances: A review. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 67, 456–467. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2013.09.006>
- Xu, Z., Shen, J., Qu, Y., Chen, H., Zhou, X., Hong, H., Sun, H., Lin, H., Deng, W., Wu, F., 2022. Using simple and easy water quality parameters to predict trihalomethane occurrence in tap water. *Chemosphere* 286, 131586. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.131586>
- Yang, Y., Yu, K., Xia, Y., Lau, F.T.K., Tang, D.T.W., Fung, W.C., Fang, H.H.P., Zhang, T., 2014. Metagenomic analysis of sludge from full-scale anaerobic digesters operated in municipal wastewater treatment plants. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98, 5709–5718. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5648-0>
- Zerva, I., Remmas, N., Kagalou, I., Melidis, P., Ariantsi, M., Sylaios, G., Ntougias, S., 2021. Effect of Chlorination on Microbiological Quality of Effluent of a Full-Scale Wastewater Treatment Plant. *Life* 11, 68. <https://doi.org/10.3390/life11010068>
- Zhang, L., Shen, Z., Fang, W., Gao, G., 2019. Composition of bacterial communities in municipal wastewater treatment plant. *Sci. Total Environ.* 689, 1181–1191. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.06.432>
- Zhao, L., Liu, Y.-W., Li, N., Fan, X.-Y., Li, X., 2020. Response of bacterial regrowth, abundant and rare bacteria and potential pathogens to secondary chlorination in secondary water supply system. *Sci. Total Environ.* 719, 137499. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.137499>

Figure captions

Figure 1: Rate of bacterial damaged cells (%) with contact-time at different concentration of PFA (A) and damaged rate relative to CT (B)

Figure 2: Relative abundance of bacterial community in the untreated effluent at (A) phylum, (B) class and (C) genus level

Figure 3: Changes in the relative abundance of bacterial community at phylum level during PFA disinfection

Figure 4: Evolution of relative abundance of PFA-sensitive bacterial community at genus level during the disinfection process

Figure 5: Relative abundance of PFA-resistant bacterial community at genus level during the disinfection process

Figure 6: Relative abundance of KEGG pathway groups at the level 1

Figures

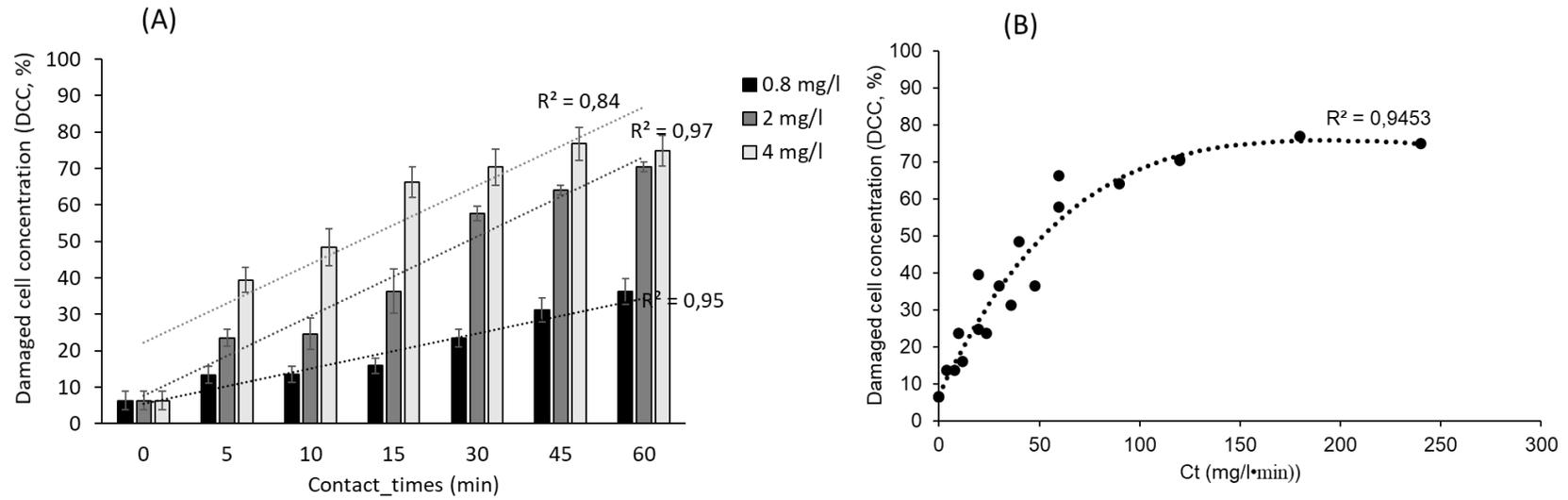


Figure 1: Rate of bacterial damaged cells (%) with contact-time at different concentration of PFA (A) and damaged rate relative to CT (B)

Résultats

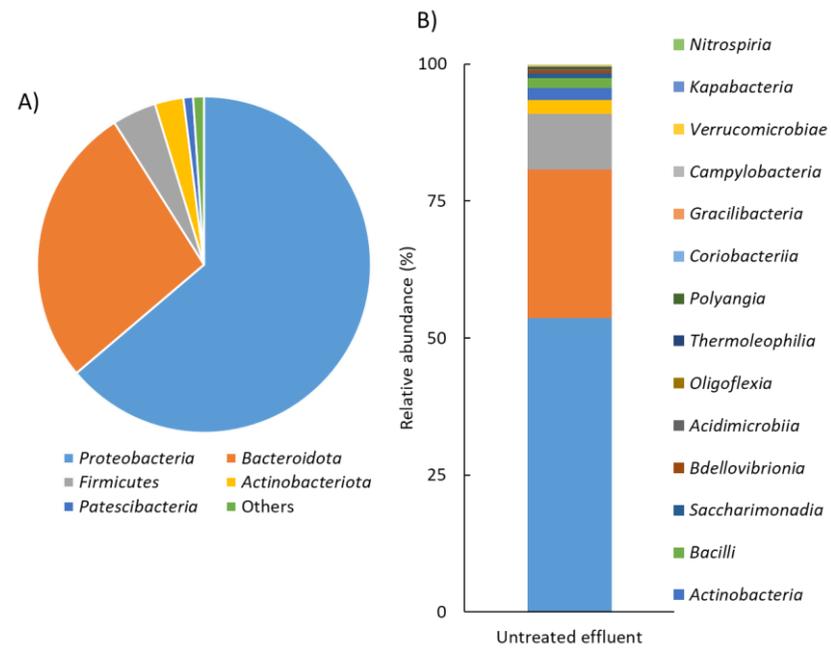


Figure 2: Relative abundance of bacterial community in the untreated effluent at (A) phylum, (B) class and (C) genus level

Résultats

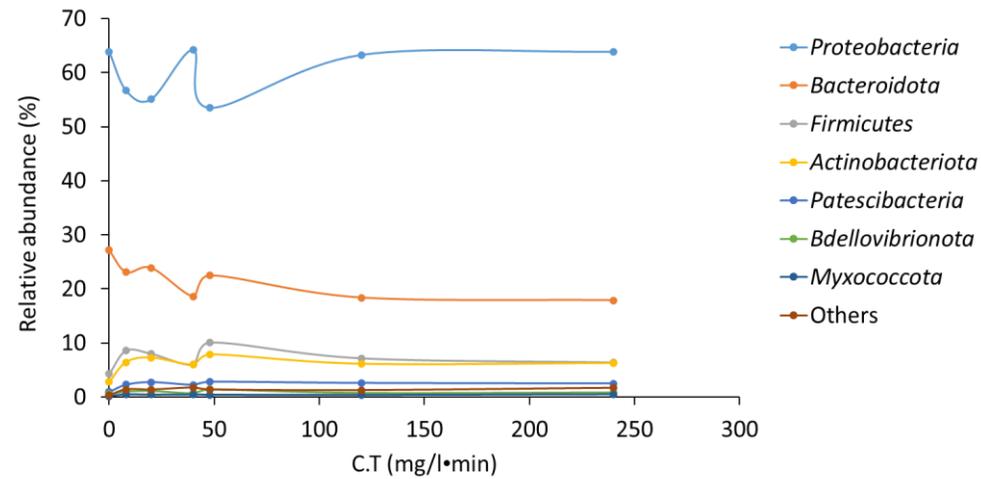


Figure 3: Changes in the relative abundance of bacterial community at phylum level during PFA disinfection

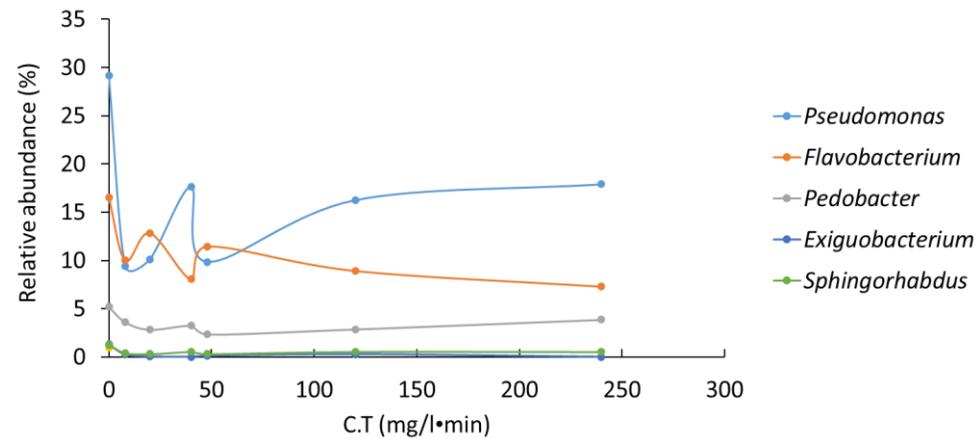


Figure 4: Evolution of relative abundance of PFA-sensitive bacterial community at genus level during the disinfection process

Résultats

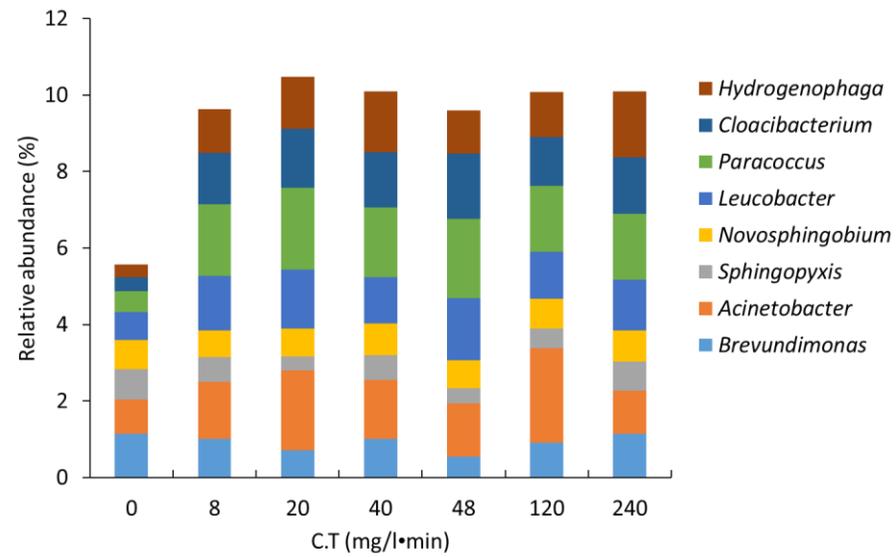


Figure 5: Relative abundance of PFA-resistant bacterial community at genus level during the disinfection process

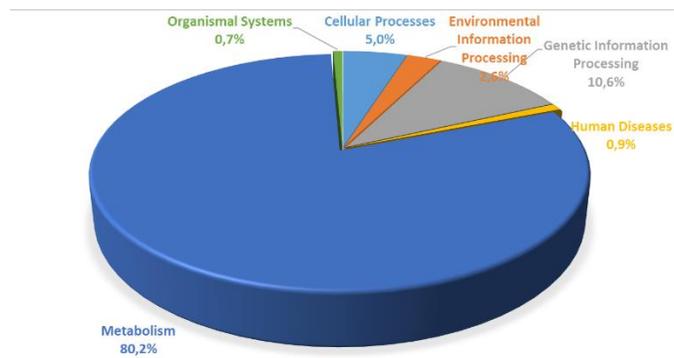


Figure 6: Relative abundance of KEGG pathway groups at the level 1

II.2 Evaluation de l'effet potentiel de rejets de station d'épuration désinfectés à l'acide performique (PFA) sur les communautés microbiennes du milieu récepteur

L'étude de l'évaluation de l'effet potentiel de rejets de station d'épuration désinfectés à l'acide performique (PFA) sur les communautés microbiennes du milieu récepteur a donné lieu à un article qui a été soumis en **septembre 2023** à la revue **Technique, Sciences et Méthodes** de l'ASTEE.

Bagagnan S., Jusselme M. D., Alphonse V., Livet A., Guérin Rechdaoui S., Marconi A., Rocher V. & Moilleron R. Evaluation de l'effet potentiel de rejets de station d'épuration désinfectés à l'acide performique (PFA) sur les communautés microbiennes du milieu récepteur, *Technique, Sciences et Méthodes*, soumis

Les données de séquençage obtenues ont été enregistrées dans la NCBI Sequence Read Archive sous la référence PRJNA1003815.

Objectifs

Il s'agissait dans cet article de présenter les effets potentiels des rejets de STEP traités à l'acide performique sur les communautés microbiennes de la Seine (à Bougival). Le rejet de la STEP Seine centre (SEC) traité au PFA à 2 mg/l pendant 10 min (soit un CT de 20 mg/L·min, conditions prévues par le gestionnaire de la STEP) a été mis en contact avec l'eau de la Seine pendant 60 min. Un dispositif expérimental de type « microcosme » a été développé pour suivre le mélange du rejet de la STEP SEC, traité ou non au PFA, avec de l'eau de Seine dans les proportions 1:9 (v/v). Les communautés microbiennes de ce mélange ont été suivies à pas de temps réguliers durant soixante minutes. Plusieurs approches ont été suivies : étude de l'abondance microbienne, capacité à dégrader différents substrats carbonés, caractérisation à l'échelle du phylum et du genre, pour aller d'une approche macroscopique vers une approche plus microscopique de la diversité microbienne.

Principaux résultats

Nos résultats ont mis en évidence, durant les quinze minutes qui suivent la dilution des rejets avec l'eau de Seine, une diminution de l'abondance microbienne de 6 % due à la présence de PFA résiduel, cohérent avec le temps de demi-vie du PFA. Au-delà de ces quinze minutes, l'abondance microbienne ne varie plus soulignant la disparition complète du PFA et l'absence d'effet rémanent. Les autres paramètres étudiés confirment qu'après quinze minutes le mélange Rejet traité au PFA-Eau de Seine suit les mêmes tendances que le mélange Rejet non traité-Eau de Seine. D'un point de vue opérationnel, il est donc nécessaire de s'assurer, afin de minimiser tout impact du PFA sur les communautés microbiennes du milieu, que le transfert d'un rejet traité au PFA vers le milieu récepteur devrait se faire *a minima* 30 minutes après l'ajout du PFA. Dans la même optique, la concentration en PFA devrait être inférieure à celle qui a été utilisée dans notre étude, à savoir 2,5 mg/l. D'autres expériences et mesures sont nécessaires pour confirmer les effets mineurs observés au début du contact. Les résultats de cette étude apportent un premier retour d'expérience dans des conditions d'exploitation soulignant l'impact réduit des rejets traités au PFA sur les communautés microbiennes du milieu récepteur.

Evaluation de l'effet potentiel de rejets de station d'épuration désinfectés à l'acide performique (PFA) sur les communautés microbiennes du milieu récepteur

BAGANAN Sadia^{1*}, JUSSELME My Dung^{1**}, ALPHONSE Vanessa¹, LIVET Alexandre¹, GUERIN RECHDAOUI Sabrina², MARCONI Anthnoy², ROCHER Vincent², MOILLERON Régis^{1***}

¹Leesu, Univ Paris Est Creteil, F-94010 Creteil, France

[*sadia.bagagnan@enpc.fr](mailto:sadia.bagagnan@enpc.fr); [**jusselme@u-pec.fr](mailto:jusselme@u-pec.fr); [***moilleron@u-pec.fr](mailto:moilleron@u-pec.fr)

²SIAAP, Direction de l'Innovation, F-92700 Colombes, France

sabrina.guerin@siaap.fr; vincent.rocher@siaap.fr

CATEGORIE DE L'ARTICLE : *Recherche appliquée*

FORMAT DE L'ARTICLE : *Article scientifique*

TABLE DES MATIERES : *A compléter manuellement (pas de table des matières automatique)*

Résumé / Abstract.....	p. 2
Introduction.....	p. 4
1. Matériels et méthodes.....	p. 5
1.1. Prélèvement d'eau, design expérimental et collection des échantillons	p. 5
1.2. Abondance microbienne.....	p. 6
1.3. Capacités cataboliques des microorganismes	p. 7
1.4. Diversité microbienne.....	p. 7
1.5. Analyses statistiques	p. 8
2. Résultats et discussion.....	p. 8
2.1. pH.....	p. 8
2.2. Abondance microbienne.....	p. 9
2.3. Capacités cataboliques des communautés microbiennes.....	p. 10
2.4. Diversité microbienne.....	p. 12
Conclusion.....	p. 15
Remerciements.....	p. 15
Bibliographie.....	p. 16

Résumé

Des techniques avancées efficaces et écologiques pour le traitement des rejets de stations d'épuration ont été développées pour répondre à la demande croissante de protection de la qualité des ressources en eaux et aux menaces pour la sécurité de l'eau par des contaminants provenant des rejets. Récemment, l'utilisation de l'acide performique (PFA) suscite un intérêt croissant grâce à ses propriétés oxydantes élevées. La plupart des travaux de recherche se sont concentré sur son efficacité à éliminer les bactéries indicatrices fécales qui sont utilisées pour contrôler la qualité biologique des rejets. Mais, les effets potentiels de ces rejets traités à l'acide performique sur les communautés microbiennes du milieu récepteur restent moins renseignés. Dans ce travail, les effets potentiels de rejets de stations d'épuration traités au PFA sur les microorganismes du milieu récepteur, dans le cas présent la Seine, ont été étudiés. Pour cela, des expériences en laboratoire ont

été mises en place. Le rejet de la station de Seine Centre traité au PFA à 2 mg/l pendant 10 min a été mis en contact avec l'eau de la Seine pendant 60 min. L'abondance, les activités et la diversité des communautés microbiennes de ce mélange ont été suivies à pas de temps réguliers durant soixante minutes. Les résultats montrent que dans les conditions expérimentales de cette étude, il subsiste un effet rémanent léger après la mise en contact des rejets traités au PFA avec de l'eau de la Seine sur l'abondance des cellules microbiennes intactes. L'activité et la diversité microbienne des eaux de la Seine recevant les rejets non traités diffèrent de celles des eaux de Seine recevant les rejets traités au PFA. Ceci est probablement dû à la différence de concentration des cellules microbiennes intactes/endommagées dans les rejets non-traités et traités ainsi qu'à la dégradation des matières organiques des rejets par le PFA. Dans l'ensemble, nous n'avons pas observé d'impacts spécifiques des rejets traités au PFA sur les microorganismes de la Seine. D'autres expériences et mesures sont nécessaires pour confirmer les effets mineurs observés au début du contact. Les résultats de cette étude apportent un premier retour d'expérience dans des conditions d'exploitation sur la désinfection au PFA soulignant l'impact réduit des rejets traités au PFA sur les communautés microbiennes du milieu récepteur.

Mots-clés : acide performique, désinfection, rejet de station d'épuration, diversité microbienne, Seine

Abstract

Advanced and effective techniques for the treatment of wastewater from wastewater treatment plants have been developed to meet the growing demand for protection of the quality of water resources. Recently, there has been growing interest in the use of performic acid (PFA), thanks to its high oxidizing properties. Most research has focused on its effectiveness in eliminating fecal indicator bacteria. However, less is known about the potential effects of performic acid on the microbial communities of the receiving environment. In this work, the potential effects of PFA-treated wastewater treatment plant discharges on microorganisms in the receiving environment, in this case the Seine, were investigated. To this end, laboratory experiments were carried out. Discharge from the Seine Centre plant, treated with PFA at 2 mg/l for 10 min, was placed in contact with water from the Seine for 60 min. The abundance, activities and diversity of the microbial communities in this mixture were monitored at regular time intervals for sixty minutes. The results show that, under the experimental conditions of this study, there is a slight residual effect on the abundance of intact microbial cells following contact of PFA-treated waste with water from the Seine. The microbial activity and diversity of the Seine waters receiving the untreated discharges differed from those of the Seine waters receiving the PFA-treated discharges. This is probably due to the difference in the concentration of intact/damaged microbial cells in the untreated and treated discharges, and to the degradation of organic matter in the discharges by the PFA. Overall, we did not observe any specific impacts of PFA-treated discharges on microorganisms in the Seine. Further experiments and measurements are required to confirm the minor effects observed at the start of contact. The results of this study provide initial feedback under operating conditions on PFA disinfection, highlighting the reduced impact of PFA-treated discharges on microbial communities in the receiving environment.

Keywords: performic acid, disinfection, wastewater effluent, microbial diversity, Seine River

Introduction

Les eaux de surface constituent généralement le milieu récepteur des rejets des stations d'épuration (STEP). La qualité de ces milieux récepteurs est une priorité pour les collectivités en raison de leur importance, tant

pour les besoins en eau potable que pour les activités récréatives de la population telles que la baignade durant les périodes estivales. Par conséquent, maintenir leur bonne qualité en limitant des bactéries pathogènes, conformément aux exigences de la Directive cadre sur l'eau (2000/60/CE) et de la Directive Baignade (2006/7/CE), est devenue une question de santé publique pour les collectivités locales. Des études ont montré que les rejets de STEP traités, partiellement traités voire non traités peuvent affecter la qualité physicochimique et microbiologique des eaux de surface réceptrices par la présence de substances polluantes telles que des produits pharmaceutiques, cosmétiques, etc. (Behera et al., 2011; Luo et al., 2014) et de microorganismes pathogènes tels que les bactéries, les virus et les parasites (Castro-Hermida et al., 2008; Rhymes et al., 2015). La désinfection des rejets de STEP constitue un des leviers à activer pour préserver la qualité microbiologique des eaux réceptrices. Cette désinfection vise à éliminer ou à réduire de manière significative la concentration en microorganismes pathogènes. Il existe plusieurs techniques de désinfection disponibles lors du traitement tertiaire : chloration, ultraviolets (UV) et ozonation, qui possèdent toutes leurs avantages et inconvénients. La chloration est l'une des techniques de désinfection les plus répandues. Elle implique l'ajout de chlore ou de composés chlorés aux rejets pour éliminer ou inactiver les microorganismes pathogènes présents. Cependant, elle génère des sous-produits de désinfection (Disinfection By-Products en anglais ou DBP), qui sont des composés chimiques, issus de la réaction avec la matière organique et/ou les micropolluants organiques, pendant la désinfection des rejets. En raison de la formation de nombreux DBP toxiques, cancérigènes, tératogènes et mutagènes (Lin et al., 2021; Xu et al., 2022), les agents désinfectants à base de chlore deviennent moins attractifs et dans certains cas, sont même interdits depuis 2013 (Tang et al., 2020). Il est donc essentiel de se tourner vers d'autres techniques de désinfection limitant la production de sous-produits toxiques.

Récemment, l'acide performique (PFA) a émergé comme une nouvelle technique intéressante pour les opérateurs de l'assainissement (Ragazzo et al., 2013). Cette technique est considérée comme une nouvelle technologie efficace, économique et respectueuse de l'environnement pour éliminer les microorganismes pathogènes dans les rejets. Le PFA a ainsi été récemment étudié à l'échelle du laboratoire. Par exemple, Rocher et Azimi (2021) ont montré que l'efficacité du PFA vis-à-vis des bactéries indicatrices fécales (*E. coli* et *Entérocoques intestinaux*) à des faibles concentrations et pour un temps de contact court. Ragazzo et al., (2013) ont mis en évidence un abattement compris entre 2,2 et 4 log pour les *E. coli* et entre 0,7 et 3,2 log pour les *Entérocoques* à des doses de PFA allant de 0,9 à 1,2 mg/L et un temps de contact inférieur à 10 min. Sur la base de ces travaux, et en raison des propriétés biocides (virucide, fongicide, sporicide et bactéricide), de la formation limitée de sous-produits de désinfection, et des faibles coûts de mise en œuvre et d'exploitation, l'utilisation du PFA a été expérimentée à l'échelle de la STEP (Gehr et al., 2009; Heinonen-Tanski and Miettinen, 2010) à différentes étapes du traitement des eaux usées : traitement primaire (Gehr et al., 2009), traitement secondaire (Ragazzo et al., 2013) ou traitement tertiaire (Luukkonen et al., 2015) et également des rejets provenant de déversoirs d'orage (Chhetri et al., 2014).

Le PFA est un acide synthétisé à partir de l'acide formique (HCOOH) en présence d'acide sulfurique (H₂SO₄) et de peroxyde d'hydrogène H₂O₂ (Gehr et al., 2009). C'est une réaction exothermique et le PFA produit est instable (Ragazzo et al., 2013), il doit donc être utilisé juste après sa synthèse (Mattila and Aksela, 2006). Le PFA, lors de sa décomposition, libère des espèces réactives à l'oxygène (ERO) plus connues sous le nom de (ROS) en anglais comme les radicaux hydroxyle (HO•) et peroxide (O₂•) dans le milieu. Ces ROS ont une action antimicrobienne car ils sont capables d'oxyder les lipides des membranes cellulaires (lipoperoxydation)

et conduisent à l'altération de la fluidité et la structure de la membrane des microorganismes (Juan et al., 2021). En plus, ces ROS peuvent endommager l'ADN et la protéine des microorganismes s'ils sont directement en contact par cassure des brins d'ADN ou dommages oxydatifs des bases puriques et pyrimidiques (Juan et al., 2021). Il a été montré que l'utilisation du PFA ne conduit pas à la formation de sous-produits mutagènes ou génotoxiques (Ragazzo et al., 2017). Normalement, sa décomposition complète va produire du CO₂ et de l'eau (H₂O). Cependant, une étude menée par Nihemaiti et al. (2022) a montré, que suite au traitement de rejets à faible dose de PFA (2mg/L pendant 10 minutes), la composition de la matière organique a été altérée. Certaines molécules pharmaceutiques telles que la lidocaïne, l'amisulorude, le tramadol et la clarithromycine présentes dans les rejets ont été oxydées par le PFA. D'autre part, la dégradation incomplète du PFA peut entraîner une source supplémentaire d'H₂O₂ et d'acide formique dans les rejets, puis dans les eaux réceptrices. On sait que l'H₂O₂ a tendance à se dégrader naturellement plus lentement que le PFA, et sa demi-vie dépend des paramètres physico-chimiques de l'eau réceptrice. Par conséquent, des investigations en laboratoire sont essentielles pour exploiter pleinement les avantages et comprendre les limites de cette technique, permettant ainsi son amélioration and son optimisation. En fin de compte, cela contribuera de manière significative au développement de stratégies efficaces pour éliminer les pathogènes dans les rejets, préservant ainsi la santé du milieu récepteur et, par conséquent, la santé publique.

L'objectif de cette étude est donc d'évaluer l'effet potentiel des rejets traités au PFA sur les communautés microbiennes du milieu récepteur. Ces communautés microbiennes sont le premier maillon de la chaîne trophique et régissent les cycles locaux et globaux de l'azote, du soufre, de l'oxygène, du phosphore et de nombreux métaux (Schmidt, 2006). Elles sont très sensibles aux changements environnementaux et constituent donc un indicateur du bon fonctionnement de l'écosystème (Ma et al., 2016; Mai et al., 2018; Wang et al., 2015). L'effet de la désinfection au PFA des rejets de STEP sur les communautés microbiennes du milieu récepteur a donc été appréhendé au travers de trois indicateurs caractéristiques de ces communautés microbiennes : l'abondance bactérienne, les fonctions bactériennes en particulier leurs capacités cataboliques, et la diversité microbienne.

1. Matériels et méthodes

1.1. Prélèvement d'eau, design expérimental et collection des échantillons

Les expériences ont été menées au laboratoire pour évaluer l'effet des rejets de station d'épuration traitées au PFA sur les communautés microbiennes du milieu récepteur. Pour cela, les rejets de station Seine Centre (SEC) ont été prélevés durant l'été 2021. La station SEC traite en moyenne un volume quotidien d'eaux usées de 240 000 m³ et ce volume peut atteindre 404 800 m³ par temps de pluie. Différents traitements y sont mis en place avant le rejet dans la Seine, une décantation physicochimique laminaire, suivi d'un traitement biologique par une unité de bio-filtration qui permet d'éliminer la pollution carbonée et azotée. Le prélèvement de l'eau du milieu récepteur, c'est la Seine, est effectué à Bougival en aval de SEC durant l'été 2021.

La procédure mise en place comprend deux étapes réalisées dans des conditions expérimentales maîtrisées identiques. La première étape concerne le traitement des rejets de SEC au PFA. Pour cela, le rejet de SEC (2 l) a été traité au PFA à 2 mg/l pendant 10 min sous agitation à 200 tr/min à 18°C dans un milieu stérile (sous hotte aspirante), cet échantillon sera appelé R_{pfa} pour rejet traité au PFA. Parallèlement le rejet de SEC seul a été mis sous agitation dans les mêmes conditions (10 min, agitation à 200 tr/min, 18°C), il servira de contrôle, et sera désigné par R pour rejet sans traitement. La seconde étape concerne l'évaluation à proprement parler du rejet d'effluents de STEP traité au PFA dans le milieu récepteur. Ainsi, le rejet traité (R_{pfa}) ou non (R) est

Résultats

mis en contact avec de l'eau de Seine (S) dans des proportions respectives de 10 et 90 %, correspondant à une composition d'étiage sévère (**Figure 29**). Cette étape est effectuée dans un fermenteur, Minifors 2 (France), sous agitation à 200 tr/min. La température, le pH, et la pression partielle en oxygène (pO_2) ont été suivis. Les échantillons ont été prélevés à différents pas de temps, c'est-à-dire après 0, 5, 15, 30, 45 et 60 minutes suivant la mise en contact des deux types d'eau : rejet traité ou non et Seine. A chaque prélèvement, du thiosulfate de sodium ($Na_2S_2O_3$) est ajouté pour arrêter l'action du PFA. Les échantillons issus du mélange du rejet traité au PFA avec de l'eau de Seine ($R_{pfa}+S$) et du rejet non traité avec de l'eau de Seine ($R+S$), prélevés aux différents pas de temps, sont ensuite conservés à 4°C avant leur caractérisation en termes d'abondance microbienne, de capacité de dégradation de substrats carbonés et de diversité microbienne

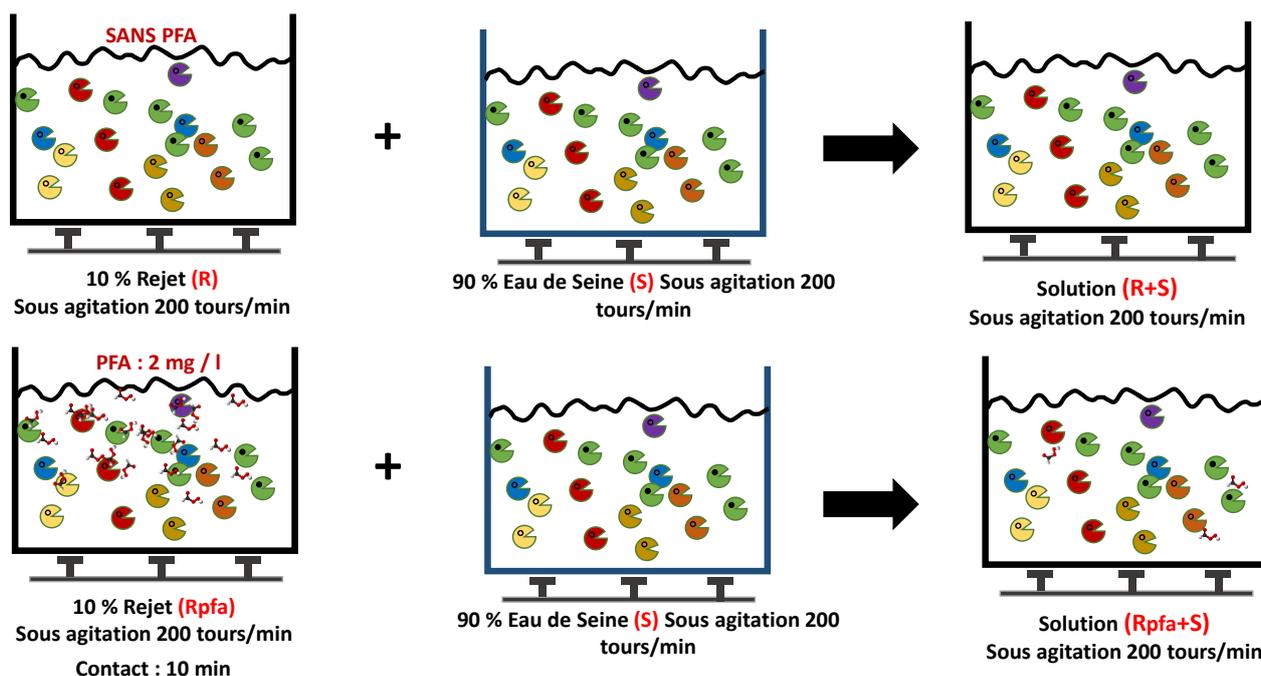


Figure 29 : Design expérimental

1.2. Abondance microbienne

L'abondance microbienne est mesurée par la technique de la cytométrie en flux automatique « BACTOSENSE » de l'entreprise bNOVATE (Suisse). Le principe de la technique est basé sur la fluorescence de deux fluorochromes : le SYBR Green I et l'iodure de propidium (PI) qui vont se fixer sur l'acide nucléique. Ces marqueurs permettent de distinguer et quantifier le nombre de cellules en fonction de leur intégrité physique. En effet, le SYBR Green I est un marqueur capable de pénétrer dans toutes les cellules peu importe l'intégrité de leurs membranes. Ce marquage permet donc de quantifier toutes les cellules qu'elles soient intactes ou présentant des membranes altérées. Le PI, quant à lui, est un marqueur ne pénétrant que dans les cellules aux membranes altérées. Ce marqueur permet de quantifier les cellules endommagées (Grégori et al., 2001). Le marquage simultané avec ces deux marqueurs sur le même échantillon présente l'avantage de quantifier la proportion de cellules intactes (vivantes) et de cellules endommagées (considérées comme mortes).

Pour cette mesure, 2 ml d'échantillon, homogénéisé par agitation, sont transvasés dans un tube vissé au cytomètre de flux. Ensuite, un aliquote de 260 μ l est automatiquement prélevé dont 90 μ l sont marqué avec les deux fluorochromes pour l'analyse, le volume restant sert à rincer la cellule de mesure avant et après

analyse. L'aliquote prélevé est incubé dans une solution fournie contenant les 2 fluorochromes (SYBR Green I et PI) pendant 10 min à 37°C. Les cellules marquées sont ensuite dénombrées, d'une part les cellules totales (c'est-à-dire sans distinction des cellules intactes et des cellules endommagées) et, d'autre part, les cellules endommagées uniquement. Les échantillons sont mesurés en triplicat. Les données brutes sont traitées en utilisant le logiciel fourni par l'entreprise bNovate. Les différentes fenêtres sont créées pour séparer les signaux des cellules microbiennes aux débris et pour séparer les cellules endommagées (FL 2, émission de PI) des cellules intactes (FL1, émission de SYBR Green I).

1.3. Capacités cataboliques des microorganismes

Des microplaques EcoPlate™ de BIOLOG® sont utilisées pour caractériser la capacité microbienne de dégradation de différentes sources de carbone (C). Chaque microplaque est composée de 96 puits comprenant 31 sources de C et un blanc pour le contrôle, en 3 triplicats. Ces 31 sources de C appartiennent à six groupes : hydrates de carbone, acides carboxyliques, acides aminés, amines/amides, polymères de carbone, composés phénoliques. En plus du substrat carboné, chaque puits contient un indicateur coloré, le tétrazolium. Lorsque le substrat est dégradé par les microorganismes, le tétrazolium incolore se réduit en formazan qui est un composé violet insoluble (Wu et al., 2020) mesurable à 595 nm.

Pour cela, chaque puit de la plaque est inoculé avec 150 µl d'échantillons ayant une densité optique (DO 600 nm) de 0,05. Le puits contenant le blanc contient lui 150 µl d'eau physiologique stérilisée. Les DO initiales (T0) sont mesurées à l'aide d'un lecteur de plaques (ThermoScientific, Multiskan FC) à une longueur d'onde de 595 nm. Les microplaques EcoPlate™ sont ensuite fermées à l'aide de parafilm et incubées à 18°C, la même température expérimentale. Un suivi de la DO est effectué à la même longueur d'onde avec une lecture des plaques toutes les 24 heures pendant 7 jours. L'intensité de cette coloration violette dans chaque puits représente la capacité métabolique des microorganismes pour chaque substrat permettant ainsi de quantifier l'AWCD (Average Well Colour Development) qui représente l'activité microbienne globale. Les valeurs d'AWCD à 120 h permettra de comparer la capacité des microorganismes à dégrader les six grands groupes de carbone dans les échantillons R_{pfa}+S par rapport aux échantillons R+S.

1.4. Diversité microbienne

La diversité des communautés microbiennes du milieu récepteur recevant les rejets traités au PFA a été analysée par la technique de séquençage à haut débit « *Illumina* ». Cette analyse comprend 5 étapes dont (i) la collecte des microorganismes de l'échantillons par filtration, (ii) extraction de l'ADN microbien à l'aide d'un kit d'extraction de l'ADN, (iii) la PCR avec des amorces universelles pour les régions V3-V4, (iv) le séquençage à haut débit et (v) l'analyse bio-informatique. Le protocole détaillé est présenté dans (Bagagnan et al., 2023).

Pour cela, 500 ml d'échantillon sont filtrés grâce à un système de pompage stérile à 0,22 µm sous une hotte PSM. De ces filtres, l'ADN microbien est extrait en utilisant le kit DNeasy PowerWater (Qiagen) conformément aux instructions du fabricant. L'ADN extrait est amplifié pour les régions V3-V4 ARNr 16S des bactéries avec les amorces spécifiques fwd-5'-TACGGGAGGCAGCAG-3' et rev-5'-CCAGGGTATCTAATCC-3' (Turner et al., 1999). Les conditions de la PCR sont les suivantes : 94°C pendant 5 min, 30 cycles à 94°C pendant 30 s, 54°C pendant 30 s, 72°C pendant 45 s, et enfin 72°C pendant 10 min. La concentration de l'ADN est évaluée à l'aide du Nanodrop ND-1000 (Thermo-Fisher Scientific). L'ADN amplifié est séquencé par la technologie Miseq 2x250 bp PE300 Illumina par l'entreprise (Eurofins Genomics, Allemagne). Les données de séquençage obtenues ont été enregistrées dans la NCBI Sequence Read Archive sous la référence PRJNA1003815.

Les données brutes ont été traitées par une approche bio-informatique à l'aide de la pipeline d'analyse FROGS disponible sur la plateforme Galaxy de l'INRAE dont les différentes étapes sont décrites par (Escudié et al., 2018). Ce traitement a permis d'accéder aux unités taxonomiques opérationnelles (OTU) en utilisant la banque de données 16-SILVA-138 de Blast. Pour chaque échantillon, une matrice d'abondance des OTUs fournit l'abondance des différents taxons.

1.5. Analyses statistiques

Les différences entre les échantillons pour les paramètres d'abondance microbienne, d'activité microbienne *via* l'analyse des capacités cataboliques des microorganismes et d'abondance relative des différents groupes microbiens sont analysées par l'analyse One-way anova (test post doc de Fisher) avec un intervalle de confiance de 95 %.

2. Résultats et discussion

2.1. pH

Comme le montre le **Tableau 1**, le pH initial du mélange ($R_{pfa}+S$) était de 7,6. Une augmentation de 0,2 unité de pH a été observée pour les deux mélanges dont $R_{pfa}+S$ et $R+S$ à la fin de l'expérience (après 60 minutes). Cette augmentation a déjà été noté lors du traitement des rejets de la station de Seine-Valenton par le PFA (Rocher and Azimi, 2021) et de ceux de deux stations d'épuration municipales en Italie en réacteurs discontinus (Ragazzo et al., 2013). La variation du pH est observée en tenant compte de la présence ou de l'absence de PFA et aucune corrélation entre la concentration du PFA et le pH est observée. Cela suggère que l'augmentation du pH observée ne soit pas spécifiquement attribuable à l'action du PFA mais plutôt liée à d'autres facteurs, telle que des réactions acidobasiques entre différents composants chimiques présents. Les microorganismes jouent un rôle important dans les processus de dégradation et de transformation des substances dans le milieu. Lorsqu'ils sont présents dans le milieu, ils métabolisent divers substrats pour leur développement. Certains de ces processus métaboliques peuvent conduire à la production de produits finaux qui peuvent influencer le pH du milieu. Il est également important de noter que les microorganismes peuvent produire des enzymes qui sont impliquées dans la dégradation des composés organiques, et cette activité enzymatique peut influencer le pH du milieu en libérant des ions H^+ ou OH^- dans le milieu. Par exemple, l'hydrolyse de l'urée présente dans les eaux usées en ammoniac va entraîner une libération d'ions OH^- et entraîner une augmentation du pH (Vial, 2005; Yang et al., 2021) . Il convient de souligner que le suivi du pH durant l'expérience est important car l'action du PFA peut être neutralisé et/ou paralysé si le pH du milieu est alcalin ou neutre (Luukkonen and Pehkonen, 2017) à cause de la constante d'acidité du PFA qui est de l'ordre de 7,1. La compréhension fine des mécanismes impliqués dans l'augmentation du pH nécessiterait une analyse plus approfondie des communautés microbiennes et les produits métabolites.

2.2. Abondance microbienne

Au début de l'expérimentation, l'abondance bactérienne totale était en moyenne de l'ordre de 10^6 cellules/ml. La proportion de cellules intactes par rapport au nombre total de cellules bactériennes a été calculée pour évaluer l'effet des rejets traités au PFA sur les microorganismes des eaux de la Seine. Ces résultats pour les échantillons ($R+S$) et ($R_{pfa}+S$) sont présents dans la Figure 30a et 2b, respectivement. A T0, la proportion des cellules intactes dans les échantillons ($R+S$) (85 %) était plus élevée que dans les échantillons ($R_{pfa}+S$) (81 %). Ces résultats sont logiques et s'expliquent par l'action du PFA sur les microorganismes présentés dans le rejet de STEP avant que ceux-ci soient mis en contact avec l'eau de Seine. En effet, le PFA est reconnue

Résultats

comme un désinfectant efficace et est utilisé pour ses propriétés bactéricides, c'est-à-dire sa capacité à altérer les membranes cellulaires des bactéries. De nombreux travaux de recherche sur l'efficacité de la PFA-désinfection des agents pathogènes présents dans des rejets des STEU ont été mentionnés dans la littérature scientifique (Karpova et al., 2013; Luukkonen et al., 2015; Rocher and Azimi, 2021). Dans notre cas, il a été observé que l'abattement sur l'ensemble des cellules était de l'ordre de 10 % lorsque le rejet était traité au PFA à 2 mg/l pendant 10 min. Une faible diminution de la proportion des cellules intactes a été observée dans le mélange du rejet traité au PFA et de l'eau de la Seine ($R_{\text{pfa}+\text{S}}$), par rapport au mélange du rejet non traité et de l'eau de la Seine ($R+\text{S}$). La proportion de cellules intactes dans les échantillons ($R+\text{S}$) n'a pas varié de façon significative ($p > 0,05$) au cours de l'expérience (T_0 à $T_{60\text{min}}$) et avoisine les 80%. Pour le mélange ($R_{\text{pfa}+\text{S}}$), une diminution de la proportion de cellules intactes a été observée, passant de 81 % (T_0) à 76 % ($T_{15\text{min}}$). Au-delà de 15 minutes, cette proportion est restée stable jusqu'à la fin de l'expérience (60 min).

La diminution de la proportion de cellules intactes dans le mélange ($R_{\text{pfa}+\text{S}}$) observée durant les 15 premières minutes pourrait s'expliquer par l'action du PFA résiduel apporté par les rejets traités. Le PFA est connu pour être instable, il tend à se dégrader très rapidement en fonction des conditions environnementales et de la nature de la matrice à traiter. Rocher and Azimi, (2021) ont montré que la demi-vie du PFA est comprise entre 17 et 33 min dans le rejet de la station Seine-Valenton. Dans notre cas, le temps de contact entre le rejet de la STEP et la solution de PFA n'a été que de 10 minutes. Cela signifie que le PFA pourrait ne pas avoir été complètement dégradé et qu'il resterait du PFA résiduel dans l'échantillon. Cela signifie que le PFA pourrait ne pas avoir été complètement dégradé et qu'il resterait du PFA résiduel dans l'échantillon. Ce dernier continuerait son action sur les microorganismes. Le suivi de la cinétique de dégradation du PFA à une concentration de 2,5 mg/l dans de l'eau de rejet stérilisée (Rocher and Azimi, 2021) a montré, qu'après 10 min, la concentration en PFA résiduel était d'environ 1,25 mg/l, soit 50 % du PFA initial. En extrapolant ce résultat à notre étude, le PFA résiduel dans le rejet serait de l'ordre de 1 mg/l au bout de 10 min. Le rejet traité (20 ml) à cette concentration potentielle en PFA de 1 mg/l a ensuite été dilué dans l'eau de Seine (180 ml). La concentration en PFA résiduel serait alors de l'ordre de 0,1 mg/l. Son action se serait poursuivie jusqu'à 15 min, temps à partir duquel la dégradation du PFA aurait été complète, expliquant l'absence d'effet sur l'abondance bactérienne au-delà de 15 min. Les conditions expérimentales de notre étude en laboratoire sont statiques (une dilution unique au $1/10^6$). Elles sont plus contraignantes de celles rencontrées à l'échelle d'une usine pour laquelle un rejet traité au PFA, lors de son introduction dans le milieu, verrait sa dilution augmenter avec l'écoulement de la rivière. Lors de la mise en œuvre opérationnelle à Seine Valenton de la désinfection au PFA, le temps de contact rejets-PFA sera d'environ 1 h, 6 fois plus long que dans notre étude. De plus, la concentration en PFA envisagée est de 1 à 1,2 mg/l qui est plus faible que celle de notre étude (2 mg/l). Ces conditions (temps de contact plus long, concentration en PFA plus faible) devraient permettre la dégradation du PFA avant le déversement du rejet en Seine et donc éviter la présence de PFA résiduel dans le milieu.

Résultats

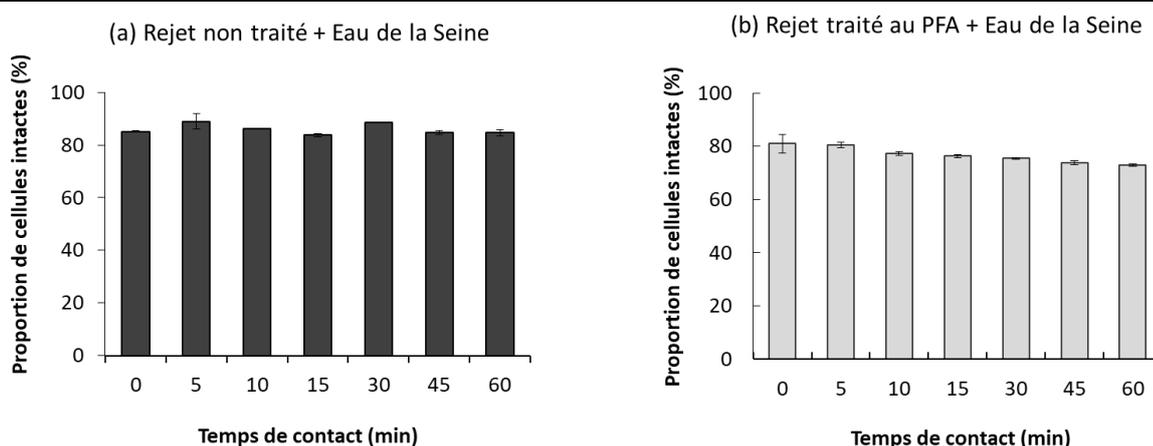


Figure 30 : Abondance de cellules intactes (%) dans les mélanges Rejet non traité-Eau de la Seine (a) et Rejet traité au PFA-Eau de la Seine (b) à différents pas de temps de contact au cours d'expérience

2.3. Capacités cataboliques des communautés microbiennes

Les microplaques Ecoplate (Biolog™) ont été utilisées pour observer les changements de profil métabolique *via* la capacité de dégradation de substrats carbonés du consortium microbien présents dans les eaux de la Seine recevant les rejets traités au PFA ($R_{pfa}+S$) par rapport à ceux recevant des rejets non traités ($R+S$). Nous avons observé que la capacité de dégradation des différents substrats des microorganismes, c'est-à-dire l'activité microbienne globale dans $R_{pfa}+S$ était plus faible que dans $R+S$ sur toute la durée du suivi (**Figure 3**). Ces résultats sont cohérents avec les observations d'une faible abondance de cellules intactes apportées par le rejet traité au PFA par rapport au rejet non traité.

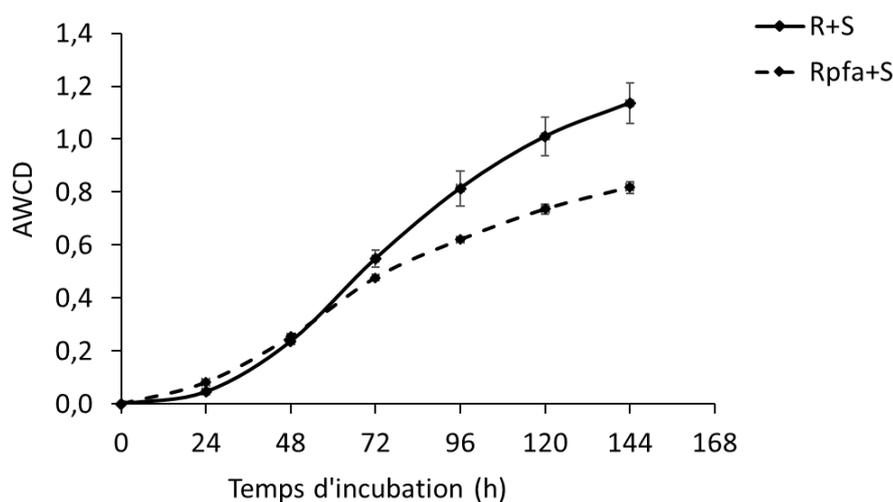


Figure 3 : Cinétique de dégradation de tous les groupes de substrats carbonés (représenté par la valeur moyenne de l'AWCD) par les microorganismes présents dans les mélanges Rejet non traité-Eau de la Seine ($R+S$) et Rejet traité-Eau de Seine ($R_{pfa}+S$) à différents pas de temps durant le temps d'incubation

Pour une compréhension plus fine de la dynamique des communautés microbiennes du milieu récepteur ayant reçu des rejets traités au PFA (mélange $R_{pfa}+S$) ou non (mélange $R+S$), la capacité d'utilisation de chacun des six groupes substrats (carbohydrates, polymères, acides carboxyliques, acides aminés, amines/amides et composés phénoliques) a été déterminée (**Figure 4**). La capacité de dégradation des substrats dont

Résultats

carbohydate, polymère, et acides carboxyliques dans ($R_{pfa}+S$) était plus faible que dans ($R+S$) sur toute la durée du suivi, sauf pour le groupe amides/amines. Ces résultats sont cohérents avec ceux sur l'abondance de cellules intactes. L'ajout de PFA diminue l'abondance et donc l'activité microbienne durant les 15 premières minutes puis l'effet du PFA sur les communautés microbiennes de la Seine s'estompe. En effet, pour les deux mélanges ($R+S$) et ($R_{pfa}+S$), la capacité de dégradation des groupes de substrats ne présente pas de variations significatives au-delà de 15 minutes au cours du suivi.

En regardant de plus près les différents groupes de substrats, nous observons deux tendances différentes. Pour le mélange ($R_{pfa}+S$), les groupes de substrats carbohydrates, polymères et acides carboxyliques sont moins bien dégradés par la communauté microbienne présente que pour le mélange ($R+S$). A l'opposé pour les autres substrats (composés phénoliques, amides/amines), la communauté microbienne du mélange ($R_{pfa}+S$) dégrade mieux ces substrats que celle du mélange ($R+S$). L'hypothèse qui pourrait expliquer ces observations serait une différence dans la composition des groupes microbiens présents dans chaque mélange (Chazarenc et al., 2010; Grover and Chrzanowski, 2000). L'ajout de PFA dans le rejet de la STEP pourrait jouer un rôle sur la diversité microbienne en favorisant la présence de bactéries résistantes au PFA lors du traitement et potentiellement impliquées dans la dégradation des composés phénoliques et des amines/amides. Inversement, la plus faible dégradation des autres groupes (carbohydrates, polymères et acides carboxyliques) pourrait s'expliquer par une élimination par le PFA de microorganismes impliqués dans les processus de la dégradation de ces substrats. En effet, selon (Flint et al., 2012; Xu et al., 2003), des bactéries telles que les *Bactériodètes* et les *Firmicutes* provenant de matières fécales humaines se retrouvent dans les eaux usées à des concentrations importantes. Ces bactéries sont connues pour leur capacité de dégradation des carbohydrates. Leur élimination lors du traitement par le PFA pourrait expliquer la faible dégradation des carbohydrates dans les eaux recevant les rejets traités au PFA par rapport aux rejets non traités. Une analyse de la diversité microbienne a été réalisée dans cette optique.

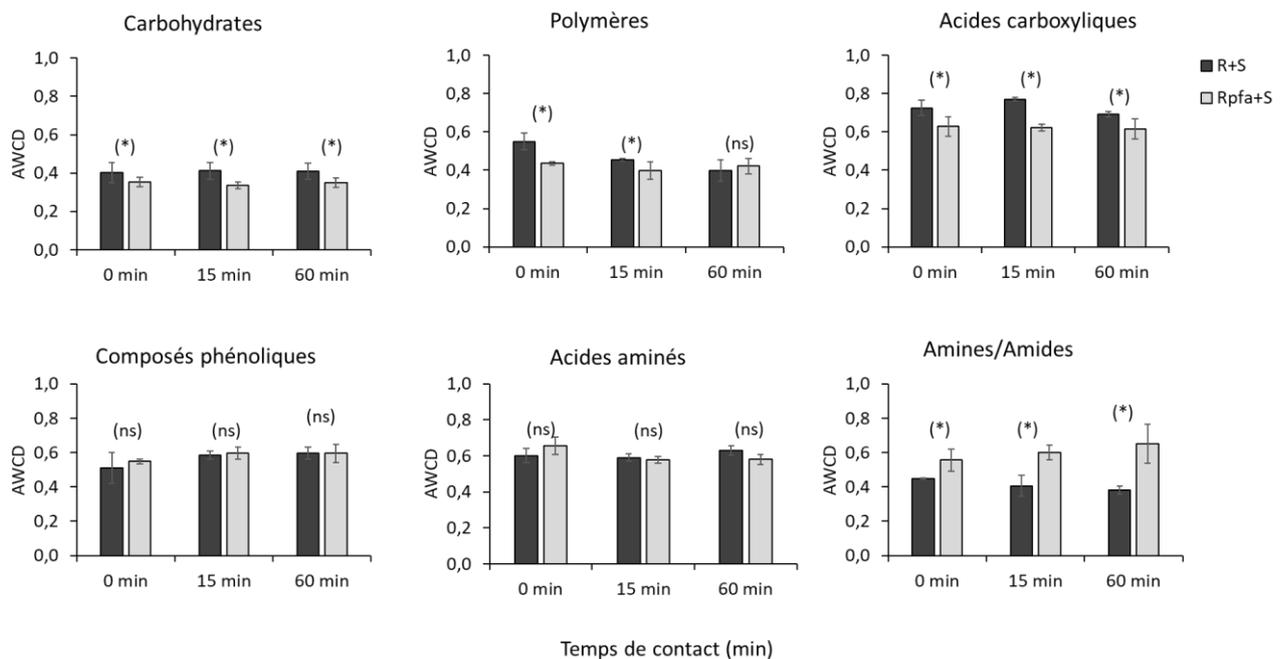


Figure 4 : Capacité de dégradation des six groupes de substrats carbonés par les microorganismes présents dans les mélanges Rejet non traité mélangé-Eau de la Seine ($R+S$) et Rejet traité-Eau de la Seine ($R_{pfa}+S$) (*), différence significative entre les $R+S$ et $R_{pfa}+S$ pour chaque temps, (ns) différence non significative

2.4. Diversité microbienne

La composition taxonomique des communautés microbiennes présentées dans les échantillons a été analysée par séquençage à haut débit. Dans un premier temps, les communautés microbiennes présentes dans les rejets de station SEC ont été identifiées. Ensuite, les communautés microbiennes dans les eaux de la Seine ayant reçu des rejets non traités (R+S) et les eaux de Seine ayant reçu des rejets traités ($R_{pfa}+S$) ont été analysées afin d'évaluer les changements qui se produiraient lors que les eaux de la Seine recevaient les rejets.

Les principaux phyla composant le microbiome des rejets de SEC sont les suivants : *Proteobacteria* (63,8 %), *Bacteroidota* (27,1 %), *Firmicutes* (4,3 %), *Actinobacteriota* (2,7 %), et *Patescibacteria* (0,9 %). Ces phyla ont déjà été identifiés comme majoritaires dans les rejets d'autres STEP en Chine (Wang et al., 2020; Zhang et al., 2019), Pologne (Plaza et al., 2021) et France (station d'épuration de Mèze). Après mélange du rejet de SEC avec l'eau de Seine (1/9, v/v) pour créer le mélange témoin (R+S), les phyla dominants étaient toujours les *Proteobacteria* (68,8 %), suivi des *Bacteroidota* (27,8 %), *Actinobacteriota* (2,3 %) et *Firmicutes* (1,0 %). Ces phyla avaient déjà été identifiés comme majoritaires lors d'une étude sur les communautés microbiennes de la Seine (Bagagnan et al., 2023 en cours de publication). La présence de ces phyla est régulièrement rapportée dans les écosystèmes d'eau rivière en zone rurale (Mai et al., 2018; Ouyang et al., 2020; Savio et al., 2015; Staley et al., 2013; Wang et al., 2023). La comparaison des deux mélanges (R+S) et ($R_{pfa}+S$) montre que les phyla principaux sont les mêmes pour les 2 mélanges (Figure 5). Cependant, les abondances relatives de chaque phylum diffèrent et cela dès la première observation (T0).

Lorsque la comparaison se concentre sur les échantillons prélevés à (T0), c'est-à-dire 10 minutes après l'ajout du PFA, nous avons observé que l'abondance relative des *Proteobacteria* dans ($R_{pfa}+S$) était inférieure à celle de (R+S) : 55,5% contre 68,8 %, respectivement. A l'échelle du genre bactérien (Figure 6), plusieurs genres appartenant au phylum *Proteobacteria* voient leur abondance relative diminuer dans ($R_{pfa}+S$) : *Massilia* (passe de 13,6 % à 4,6 %), *Comamonas* (de 0,7 % à 0,02 %), *Methylotenera* (de 0,5 % à 0,04 %), *Sphingorhabdus* (de 0,8 % à 0,1 %), *Aeromonas* (de 0,4 % à 0,004 %). A l'inverse, les abondances relatives des phyla *Bacteroidota* et *Actinobacteriota* étaient plus élevées dans ($R_{pfa}+S$) que dans (R+S).

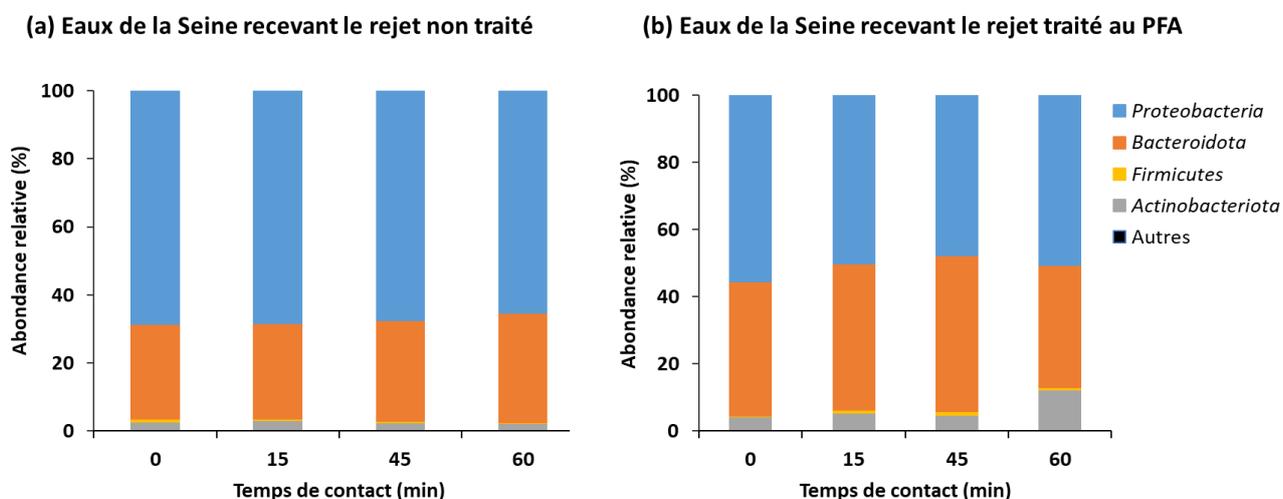


Figure 5 : Abondance relative (%) des phyla dominants présents dans les mélanges Rejet non traité-Eau de Seine (R+S) (a) et Rejet traité-Eau de Seine ($R_{pfa}+S$) (b) à différents temps de contact

L'évolution de la composition des communautés microbiennes a été suivie pendant 60 min pour les 2 mélanges (Figure 5). Pour (R+S), l'abondance relative des principaux phyla est restée constante durant tout le suivi. Pour ($R_{pfa}+S$), une diminution de l'abondance relative des *Proteobacteria* a été observée après 15 min, passant de 55,5 % à 50 %, pour se stabiliser à 50% jusqu'à la fin du suivi. Comme évoqué précédemment, cette diminution peut être reliée à la présence de PFA résiduel durant les 15 premières minutes du suivi.

Par ailleurs, pour le mélange ($R_{pfa}+S$), nous avons observé que l'abondance relative des *Bacteroidota* était constante du début de l'expérience jusqu'à la 45^e minute, une diminution de 46,4 % à 36,4 % a été ensuite observée entre la 45^e min et la 60^e min. Cette diminution ne peut pas être liée au PFA car, comme expliqué précédemment, après 15 minutes toute action du PFA a disparu. De plus, nos expériences ont été réalisées dans un volume fixé sans apport nutritif supplémentaire. Avec l'augmentation du temps d'incubation, le développement microbien peut conduire à une compétition entre microorganismes vis-à-vis des ressources disponibles. La diminution de ces ressources aura un impact sur certains phyla microbiens, comme *Bacteroidota*. Ce phylum ne possède pas la capacité de minéraliser des sources de matière organique complexes plus difficiles à dégrader.

A l'inverse, certains autres phyla, comme les *Actinobacteriota*, capables d'exploiter les substrats azotés grâce à une surreprésentation des voies d'incorporation des acides nucléiques et aminés tels que l'arginine, la leucine et la thymidine (Newton et al., 2011) profitent de ces conditions pour se développer, conduisant probablement à une augmentation de leur abondance. Cependant, ce changement n'a pas été observée dans les eaux de la Seine ayant reçu les rejets non traités au PFA. L'hypothèse qui peut être formulée pour expliquer ce phénomène est l'action du PFA sur la matière organique du rejet avant qu'il ne soit mis en contact avec de l'eau de la Seine dans un rapport de 1:9. En raison de son action sur la dénaturation des protéines, le PFA peut favoriser le développement de certains groupes microbiens comme les *Actinobacteriota* comme observé pour ($R_{pfa}+S$). (Rocher and Azimi, 2021) ont rapporté que le PFA conduit à une augmentation de la dégradation des molécules organiques de type protéine en composés chimiques de tailles plus petites facilement assimilables par *Actinobacteriota*. Aucune augmentation de l'abondance relative pour *Actinobacteriota* n'a été observée pour le mélange (R+S). Par ailleurs, il faut bien noter que les conditions du traitement dans cette étude sont 1000ppm.min PFA ce qui est beaucoup plus élevée que la nôtre 20ppm.min PFA. Ces résultats devront être complétés par de nouvelles expériences et des analyses plus poussées pour vérifier ces observations.

Pour aller plus loin dans le suivi des communautés microbiennes, le genre a été également considéré (Figure 6). Les résultats montrent que les genres dominants pour les deux mélanges (R+S) et ($R_{pfa}+S$) sont les *Pseudomonas*, *Massilia*, *Acidovorax* et *Actinetobacter*, appartenant à la classe gamma-*Proteobacteria* (phylum *Proteobacteria*); *Brevundimonas*, et *Sphingomonas*, de la classe alpha-*Proteobacteria* (phylum *Proteobacteria*); *Flavobacterium*, et *Pedobacter*, appartenant à la classe *Bacteroidia* (phylum *Bacteroidota*). Les genres bactériens dont *Pseudomonas* et *Acinetobacter* (classe gamma-*Proteobacteria*) et *Pseudorhodobacter* (classe alpha-*Proteobacteria*) ont diminué respectivement de 33 à 20 %, de 1,5 à 0.8% et de 1,3 % à 0,13 %, dès de début d'expérience (T_{15min}) pour se stabiliser ensuite. La diminution de ces genres bactériens peut être liée soit à la présence de PFA résiduel dans le rejet, soit à la limitation des ressource d'alimentation. Ces genres bactériens *Pseudomonas*, *Acinetobacter* et *Pseudorhodobacter* sont de type de Gram négatif (Tao et al., 2023; Lee et al., 2016) dont les paroi cellulaire

Résultats

sont pauvres en peptidoglycane et donc possiblement plus fragiles sous l'action du PFA.

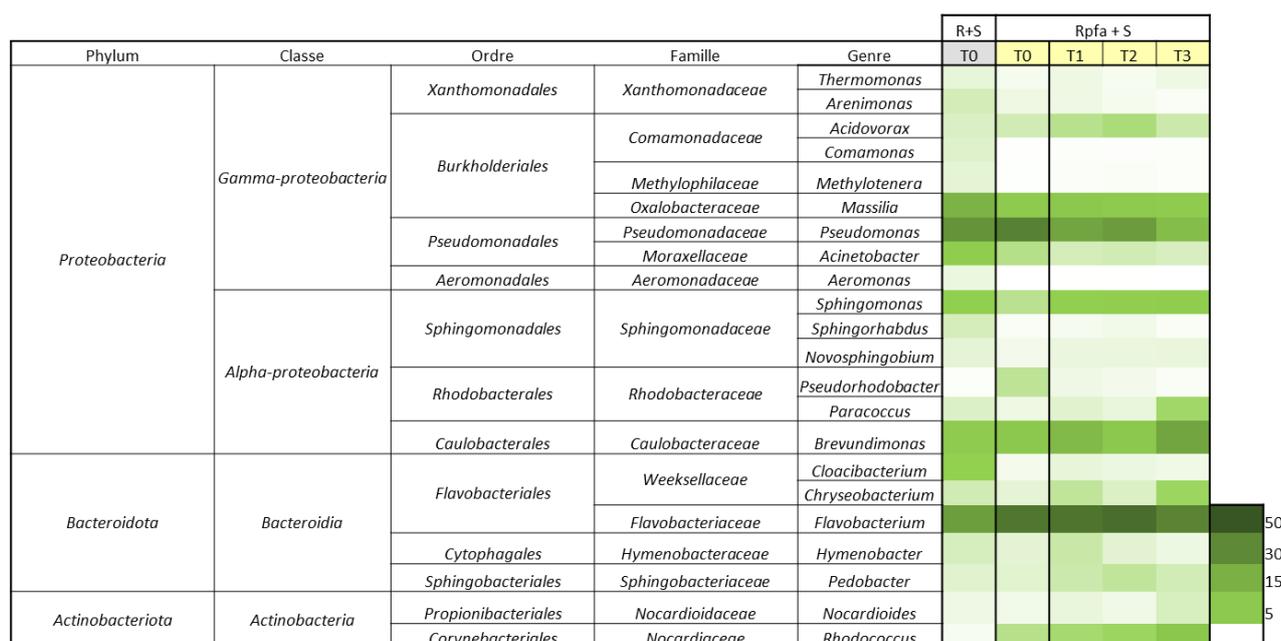


Figure 6 : *Heatmap* de l'abondance relative (%) des genres bactériens dans les mélanges Rejet non traité-Eau de Seine (R+S) et Rejet traité-Eau de Seine (R_{pfa}+S) à différents temps de contact T0 (0 min) ; T1 (15 min) ; T2 (30 min) et T3 (60 min)

Conclusion

L'objectif de cette étude était d'évaluer l'effet de l'introduction de rejets de STEP traités à l'acide performique (PFA) sur les communautés microbiennes du milieu récepteur, dans notre cas la Seine. Un dispositif expérimental de type « microcosme » a été développé pour suivre le mélange du rejet de la STEP Seine centre (SEC), traité ou non au PFA, avec de l'eau de Seine dans les proportions 1:9 (v/v). Plusieurs approches ont été suivies : étude de l'abondance microbienne, capacité à dégrader différents substrats carbonés, caractérisation à l'échelle du phylum et du genre, pour aller d'une approche macroscopique vers une approche plus microscopique de la diversité microbienne. Le rejet de la STEP (2 l) a été traité au PFA à 2 mg/l pendant 10 minutes. A l'issue de ces dix minutes, la dilution avec de l'eau de Seine prélevée à Bougival a été effectuée. Nos résultats ont mis en évidence que durant les quinze minutes qui suivent la dilution des rejets avec l'eau de Seine, une diminution de l'abondance microbienne de 6 % due à la présence de PFA résiduel, cohérent avec le temps de demi-vie du PFA. Au-delà de ces quinze minutes, l'abondance microbienne ne varie plus soulignant la disparition complète du PFA et l'absence d'effet rémanent. Les autres paramètres étudiés confirment qu'après quinze minutes le mélange Rejet traité au PFA-Eau de Seine suit les mêmes tendances que le mélange Rejet non traité-Eau de Seine. D'un point de vue opérationnel, il est donc nécessaire de s'assurer, afin de minimiser tout impact du PFA sur les communautés microbiennes du milieu, que le transfert d'un rejet traité au PFA vers le milieu récepteur devrait se faire à *minima* 30 minutes après un traitement de CT de 2,5. Dans la même optique, la concentration en PFA devrait être inférieure à celle qui a été utilisée dans notre étude, à savoir 2,5 mg/l.

Remerciements

Ces travaux de recherche ont été financés par le programme MeSeine Innovation. Nous tenons également à

remercier l'équipe technique du Siaap qui nous a aidé à collecter les eaux de la Seine.

Nous sommes également reconnaissants envers l'infrastructure bioinformatique MIGALE de l'INRAE (INRAE, Installation de Bioinformatique MIGALE, doi : 10.15454/1.5572390655343293E12) pour son aide et/ou ses ressources en matière de calcul et/ou de stockage.

Bibliographie

- Bagagnan, S., Guérin S., Rocher V., Alphonse V., Moilleron R. and Jusselme M.D., 2023. Spatial and temporal characteristics of microbial communities in the Seine River in the Greater Paris area under anthropogenic perturbation. En cours de publication
- Behera, S.K., Kim, H.W., Oh, J.-E., Park, H.-S., 2011. Occurrence and removal of antibiotics, hormones and several other pharmaceuticals in wastewater treatment plants of the largest industrial city of Korea. *Sci. Total Environ.* 409, 4351–4360. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2011.07.015>
- Castro-Hermida, J.A., García-Presedo, I., Almeida, A., González-Warleta, M., Correia Da Costa, J.M., Mezo, M., 2008. Contribution of treated wastewater to the contamination of recreational river areas with *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis*. *Water Res.* 42, 3528–3538. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2008.05.001>
- Chazarenc, F., Brisson, J., Merlin, G., 2010. Seasonal and Spatial Changes of Microorganism Communities in Constructed Wetlands: A Community Level Physiological Profiling Analysis. *Int. J. Chem. Eng.* 2010, e490240. <https://doi.org/10.1155/2010/490240>
- Chhetri, R.K., Thornberg, D., Berner, J., Gramstad, R., Öjstedt, U., Sharma, A.K., Andersen, H.R., 2014. Chemical disinfection of combined sewer overflow waters using performic acid or peracetic acids. *Sci. Total Environ.* 490, 1065–1072. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.05.079>
- Escudié, F., Auer, L., Bernard, M., Mariadassou, M., Cauquil, L., Vidal, K., Maman, S., Hernandez-Raquet, G., Combes, S., Pascal, G., 2018. FROGS: Find, Rapidly, OTUs with Galaxy Solution. *Bioinformatics* 34, 1287–1294. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx791>
- Flint, H.J., Scott, K.P., Duncan, S.H., Louis, P., Forano, E., 2012. Microbial degradation of complex carbohydrates in the gut. *Gut Microbes* 3, 289–306. <https://doi.org/10.4161/gmic.19897>
- Gehr, R., Chen, D., Moreau, M., 2009. Performic acid (PFA): tests on an advanced primary effluent show promising disinfection performance. *Water Sci. Technol.* 59, 89–96. <https://doi.org/10.2166/wst.2009.761>
- Grégori, G., Citterio, S., Ghiani, A., Labra, M., Sgorbati, S., Brown, S., Denis, M., 2001. Resolution of Viable and Membrane-Compromised Bacteria in Freshwater and Marine Waters Based on Analytical Flow Cytometry and Nucleic Acid Double Staining. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 4662–4670. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.10.4662-4670.2001>
- Grover, J., Chrzanowski, T., 2000. Seasonal patterns of substrate utilization by bacterioplankton: case studies in four temperate lakes of different latitudes. *Aquat. Microb. Ecol.* 23, 41–54. <https://doi.org/10.3354/ame023041>
- Heinonen-Tanski, H., Miettinen, H., 2010. PERFORMIC ACID AS A POTENTIAL DISINFECTANT AT LOW TEMPERATURE: PERFORMIC ACID AS POTENTIAL DISINFECTANT. *J. Food Process Eng.* 33, 1159–1172. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4530.2008.00332.x>
- Juan, C.A., Pérez de la Lastra, J.M., Plou, F.J., Pérez-Lebeña, E., 2021. 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.* 22, 4642. <https://doi.org/10.3390/ijms22094642>
- Karpova, T., Pekonen, P., Gramstad, R., Öjstedt, U., Laborda, S., Heinonen-Tanski, H., Chávez, A., Jiménez, B., 2013. Performic acid for advanced wastewater disinfection. *Water Sci. Technol.* 68, 2090–2096. <https://doi.org/10.2166/wst.2013.468>
- Lee, Y.M., Yang, J.Y., Baek, K., Han, S.J., Shin, S.C., Hwang, C.Y., Hong, S.G., Lee, H.K., 2016. *Pseudorhodobacter psychrotolerans* sp. nov., a psychrotolerant bacterium isolated from terrestrial soil, and emended description of the genus *Pseudorhodobacter*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 66, 1068–1073. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.000841>
- Lin, D., Bohui, X., Fanfang, Z., Prasad, S.R., 2021. Effects of nitrate and glucose on the formation of chloronitromethane (CNM) under UV/chlorine treatment. *J. Water Reuse Desalination* 11, 475–489. <https://doi.org/10.2166/wrd.2021.010>
- Luo, Y., Guo, W., Ngo, H.H., Nghiem, L.D., Hai, F.I., Zhang, J., Liang, S., Wang, X.C., 2014. A review on the occurrence of micropollutants in the aquatic environment and their fate and removal during wastewater treatment. *Sci. Total Environ.* 473–474, 619–641. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.12.065>
- Luukkonen, T., Heyninck, T., Rämö, J., Lassi, U., 2015. Comparison of organic peracids in wastewater treatment: Disinfection, oxidation and corrosion. *Water Res.* 85, 275–285. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2015.08.037>
- Luukkonen, T., Pehkonen, S.O., 2017. Peracids in water treatment: A critical review. *Crit. Rev. Environ. Sci.*

- Technol. 47, 1–39. <https://doi.org/10.1080/10643389.2016.1272343>
- Ma, L., Mao, G., Liu, J., Gao, G., Zou, C., Bartlam, M.G., Wang, Y., 2016. Spatial-Temporal Changes of Bacterioplankton Community along an Exorheic River. *Front Microbiol* 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00250>
- Mai, Y., Lai, Z., Li, X., Peng, S., Wang, C., 2018. Structural and functional shifts of bacterioplanktonic communities associated with spatiotemporal gradients in river outlets of the subtropical Pearl River Estuary, South China. *Mar. Pollut. Bull.* 136, 309–321. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2018.09.013>
- Mattila, T., Aksela, R., 2006. A method for preparation of aqueous solutions containing performic acid as well as their use. CA2185100C.
- Newton, R.J., Jones, S.E., Eiler, A., McMahon, K.D., Bertilsson, S., 2011. A Guide to the Natural History of Freshwater Lake Bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 75, 14–49. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00028-10>
- Nihemaiti, M., Huynh, N., Mailler, R., Mèche-Ananit, P., Rocher, V., Barhdadi, R., Moilleron, R., Le Roux, J., 2022. High-Resolution Mass Spectrometry Screening of Wastewater Effluent for Micropollutants and Their Transformation Products during Disinfection with Performic Acid. *ACS EST Water* 2, 1225–1233. <https://doi.org/10.1021/acsestwater.2c00075>
- Ouyang, L., Chen, H., Liu, X., Wong, M.H., Xu, F., Yang, X., Xu, W., Zeng, Q., Wang, W., Li, S., 2020. Characteristics of spatial and seasonal bacterial community structures in a river under anthropogenic disturbances. *Environ. Pollut.* 264, 114818. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114818>
- Plaza, G., Jałowicki, Ł., Głowacka, D., Hubeny, J., Harnisz, M., Korzeniewska, E., 2021. Insights into the microbial diversity and structure in a full-scale municipal wastewater treatment plant with particular regard to Archaea. *PLOS ONE* 16, e0250514. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0250514>
- Ragazzo, P., Chiuchini, N., Piccolo, V., Ostoich, M., 2013. A new disinfection system for wastewater treatment: performic acid full-scale trial evaluations. *Water Sci. Technol.* 67, 2476–2487. <https://doi.org/10.2166/wst.2013.137>
- Rhymes, J., Jones, L., Lapworth, D.J., White, D., Fenner, N., McDonald, J.E., Perkins, T.L., 2015. Using chemical, microbial and fluorescence techniques to understand contaminant sources and pathways to wetlands in a conservation site. *Sci. Total Environ.* 511, 703–710. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.12.085>
- Rocher, V., Azimi, S. (Eds.), 2021. Effectiveness of Disinfecting Wastewater Treatment Plant Discharges: Case of chemical disinfection using performic acid. IWA Publishing. <https://doi.org/10.2166/9781789062106>
- Savio, D., Sinclair, L., Ijaz, U.Z., Parajka, J., Reischer, G.H., Stadler, P., Blaschke, A.P., Blöschl, G., Mach, R.L., Kirschner, A.K.T., Farnleitner, A.H., Eiler, A., 2015. Bacterial diversity along a 2600 km river continuum: River bacterioplankton diversity. *Env. Microbiol* 17, 4994–5007. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12886>
- Schmidt, T.M., 2006. The maturing of microbial ecology. *Microb. Ecol.*, INTERNATIONAL MICROBIOLOGY 17–223.
- Staley, C., Unno, T., Gould, T.J., Jarvis, B., Phillips, J., Cotner, J.B., Sadowsky, M.J., 2013. Application of Illumina next-generation sequencing to characterize the bacterial community of the Upper Mississippi River. *J Appl Microbiol* 115, 1147–1158. <https://doi.org/10.1111/jam.12323>
- Vial, S., 2005. Immobilisation d'enzymes dans des hydroxydes doubles lamellaires. Réalisation de biocapteurs pour la détection de polluants organiques. Université Blaise Pascal - ClermontFerrand II.
- Tao Z., Ye H., Zhang C., Zhou S., Wang K., Zhang M., Xie J., Munang'andu M., Xu C., Wang P., Yan X., 2023 PvgAS: A Novel Two-Component System that Controls Type III and Type VI Secretion Systems and Virulence in the Fish Pathogen *Pseudomonas plecoglossicida*. *Aquaculture*
- Wang, H., Liu, X., Wang, Y., Zhang, S., Zhang, G., Han, Y., Li, M., Liu, L., 2023. Spatial and temporal dynamics of microbial community composition and factors influencing the surface water and sediments of urban rivers. *J. Environ. Sci.* 124, 187–197. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2021.10.016>
- Wang, Q., Liang, J., Zhang, S., Yoza, B.A., Li, Q.X., Zhan, Y., Ye, H., Zhao, P., Chen, C., 2020. Characteristics of bacterial populations in an industrial scale petrochemical wastewater treatment plant: Composition, function and their association with environmental factors. *Environ. Res.* 189, 109939. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.109939>
- Wang, Y., Liu, L., Chen, H., Yang, J., 2015. Spatiotemporal dynamics and determinants of planktonic bacterial and microeukaryotic communities in a Chinese subtropical river. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99, 9255–9266. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6773-0>
- Wu, M., Zhang, M., Ding, W., Lan, L., Liu, Z., Miao, L., Hou, J., 2020. Microbial Carbon Metabolic Functions in Sediments Influenced by Resuspension Event. *Water* 13, 7. <https://doi.org/10.3390/w13010007>
- Xu, J., Bjursell, M.K., Himrod, J., Deng, S., Carmichael, L.K., Chiang, H.C., Hooper, L.V., Gordon, J.I., 2003. A genomic view of the human-Bacteroides thetaiotaomicron symbiosis. *Science* 299, 2074–2076. <https://doi.org/10.1126/science.1080029>
- Xu, Z., Shen, J., Qu, Y., Chen, H., Zhou, X., Hong, H., Sun, H., Lin, H., Deng, W., Wu, F., 2022. Using simple and easy water quality parameters to predict trihalomethane occurrence in tap water. *Chemosphere* 286, 131586. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.131586>

Résultats

Yang, W., Li, J., Yang, X., 2021. Features and Applications of Urine Stabilization Methods: A Review. *Front. Sustain.* 2.

Zhang, L., Shen, Z., Fang, W., Gao, G., 2019. Composition of bacterial communities in municipal wastewater treatment plant. *Sci. Total Environ.* 689, 1181–1191. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.06.432>

Les Tableaux

Tableau 6. Suivi paramètres physicochimiques pour les (R_{pfa}+S)

Temps (min)	Vitesse de d'agitation (tours/min)	Température (°C)	pH	pO ₂
0	200	18,1	7,6	98,99
5	200	18,0	7,6	99,10
10	200	18,1	7,6	98,96
15	200	18,0	7,6	98,63
30	199	18,0	7,7	97,88
45	200	18,1	7,7	96,40
60	200	18,6	7,8	94,18

III. Désinfection à l'acide performique des eaux de rejet d'une STEP alimentant une lagune d'affinage : surveillance des communautés bactériennes de la colonne d'eau et du sédiment

Cette partie se concentre sur la lagune de la STEP de Mèze (34), plus précisément sur le suivi des communautés bactériennes de la colonne d'eau et du sédiment avant, pendant et après désinfection à l'acide performique des eaux usées avant rejet dans la lagune. Les résultats obtenus sont présentés sous la forme d'un article prochainement soumis à la revue *Technique, Sciences et Méthodes*.

Bagagnan S., Jusselme M. D., Alphonse V., Giusti-Miller S., Guérin Rechdaoui S., Marconi A., Rocher V. & Moilleron R. Utilisation de l'acide performique dans un système de traitement des eaux par lagunage : surveillance des communautés bactériennes de la colonne d'eau et du sédiment, *Technique, Sciences et Méthodes*

Les données de séquençage obtenues ont été enregistrées dans la NCBI Sequence Read Archive sous la référence PRJNA1055135.

Objectifs

Les expérimentations sur les effets de rejets de STEP traités au PFA ont précédemment été réalisées dans des conditions maîtrisées cherchant au maximum à se rapprocher de la réalité. Il n'a pas été possible de transposer cette approche *in situ* sur la Seine en raison de la mise en œuvre tardive de la désinfection au PFA à Seine Valenton en juin 2023. Toutefois, le projet NOROVIRUS a été l'opportunité de faire ce suivi sur le terrain. Piloté par le Syndicat Mixte du Bassin de Thau (SMBT), ce projet s'intéressait à la diversité microbienne du système de lagunage de la station d'épuration de Mèze (34) qui a reçu des eaux traitées au PFA dans le but d'éliminer les Norovirus. L'impact écologique à court terme sur les microorganismes libres (matrice eau) ainsi que l'impact à long terme sur les microorganismes liés (matrice sédiment) ont été suivis durant six mois (de décembre 2020 à juin 2021). Trois phases ont été distinguées au cours du temps : (i) une phase avant l'injection du PFA pour caractériser les diversités microbiennes de référence pour la colonne d'eau et le sédiment, (ii) pendant la période de désinfection et, enfin (iii) à la suite de l'arrêt du traitement. Les mêmes approches que dans les études précédentes ont été utilisées pour permettre de comparer ces nouvelles données à celles déjà générées.

Principaux résultats

Les résultats de cette étude ont montré une stabilité de l'abondance bactérienne dans les sédiments de la lagune quelle que soit la phase considérée alors que des variations ont été observées dans la colonne d'eau, notamment après la fin du traitement au PFA. Ces variations semblent être plus influencées par des facteurs environnementaux tels que la température et la pluviométrie que par l'action du PFA. L'étude a mis également en lumière des différences dans la diversité et la composition des communautés bactériennes entre les échantillons d'eau et de sédiment. Par exemple, certains phyla bactériens dominants *Proteobacteria*, *Bacteroidota*, et *Actinobacteria* varient entre les deux matrices. De plus, certains genres bactériens spécifiques montrent une réponse différente à l'action de l'acide performique, ce qui se reflète dans leur abondance relative. La lagune étudiée étant ouverte, ses communautés bactériennes restent sensibles aux variations saisonnières. Cette recherche souligne l'importance des facteurs environnementaux comme la température dans la dynamique des communautés bactériennes, ainsi que la variabilité de la réponse des différentes communautés à un traitement spécifique comme celui à l'acide performique.

Traitement des eaux usées par l'acide performique : surveillance des communautés bactériennes dans les matrices d'eau et de sédiments d'un système en lagune desservant un système récepteur

BAGAGNAN Sadia^{1*}, JUSSELME My Dung^{1**}, ALPHONSE Vanessa¹, GIUSTI-MILLER Stéphanie³, GUERIN RECHDAOUI Sabrina², MARCONI Anthnoy², ROCHER Vincent², MOILLERON Régis^{1***}

¹Leesu, Univ Paris Est Creteil, F-94010 Creteil, France

*sadia.bagagnan123@gmail.com, **jusselme@u-pec.fr, ***moilleron@u-pec.fr

²SIAAP, Direction de l'Innovation, F-92700 Colombes, France

sabrina.guerin@siaap.fr; vincent.rocher@siaap.fr

³IEES, Univ Paris Est Creteil, F-94010 Creteil, France

giusti@u-pec.fr

CATEGORIE DE L'ARTICLE : *Recherche appliquée*

FORMAT DE L'ARTICLE : *Article scientifique*

1. Introduction

La désinfection des eaux de rejets des stations de traitement est une priorité pour les gestionnaires des stations d'épuration (STEP) afin de limiter l'impact des rejets de STEP sur la qualité microbiologique du milieu récepteur. Il est devenu également primordial que la technique de désinfection utilisée soit efficace, économique et respectueuse de l'environnement. C'est dans cette optique que l'utilisation de l'acide performique (PFA) est envisagée. Elle a déjà prouvé son efficacité sur des microorganismes pathogènes en général à des concentrations faibles avec des temps de contact courts ciblant divers bactéries pathogènes et indicatrices comme *Escherichia coli* ou les bactéries de type *Enterococcus* spp (Bagagnan et al., 2024a; Chhetri et al., 2014; Gehr et al., 2009; Ragazzo et al., 2020, 2013). En raison de ses propriétés oxydantes, l'utilisation du PFA a été envisagée pour lutter contre les virus entériques, notamment les Norovirus responsables d'épidémies de gastroentérites (Maffettone et al., 2020) particulièrement prévalentes en hiver (Mounts et al., 2000). C'est dans ce contexte, que le projet NOROVIRUS a été mis en place. Piloté par le Syndicat Mixte du Bassin de Thau (SMBT), ce projet s'intéresse à la diversité microbienne du système de lagunage de la station d'épuration de Mèze (34) qui reçoit des eaux traitées au PFA dans le but d'éliminer les Norovirus. L'impact écologique à court terme sur les microorganismes libres (matrice eau) ainsi que l'impact à long terme sur les microorganismes liés (matrice sédiment) ont été suivis durant six mois (de décembre 2020 à juin 2021). Trois phases ont été distinguées au cours du temps : (i) une phase avant l'injection du PFA pour caractériser les diversités microbiennes de référence pour la colonne d'eau et le sédiment, (ii) pendant la période de désinfection et, enfin (iii) à la suite de l'arrêt du traitement. Ce projet s'inscrit dans la continuité des expérimentations déjà réalisées pour accroître les connaissances de l'effet de la désinfection au PFA sur le milieu récepteur (Bagagnan et al., 2024b, 2024a).

2. Matériels et méthodes

2.1. Prélèvement d'eau, design expérimental et collection des échantillons

Des échantillons de sédiments et d'eau ont été collectés au niveau de la lagune de la STEP de Mèze (34) (26 920 EH). Au sein de cette STEP, le traitement des eaux usées comprend plusieurs étapes, un

prétraitement classique (dégrillage, dessablage, dégraissage), suivi d'un traitement par boues activées, d'un passage par un clarificateur avant leur rejet dans le système de lagunage pour finaliser leur épuration avant rejet définitif dans le milieu naturel, la lagune du bassin de Thau. Les volumes quotidiens traités sont de l'ordre de 2000 m³. Le PFA a été produit *in situ* selon le procédé Desinfix®. Il était injecté directement en sortie de clarificateur à une concentration de 4 mg/l. Le temps de contact entre l'effluent traité et le PFA a été estimé à 8 min. Ainsi le CT (Concentration x Temps de contact) dans cette étude est d'environ 32 mg/l•min. Les échantillons des matrices « eau » et « sédiment » ont été prélevés en entrée et en sortie de la première lagune après leur sortie du clarificateur. Ces deux matrices permettent d'évaluer respectivement l'effet du PFA à court et à long termes sur les communautés microbiennes. Les campagnes d'échantillonnage ont débuté le 07/12/2020 et se sont étendues six mois jusqu'au 14/06/2021. Ces campagnes ont été subdivisées en 3 phases, une première, dite de pré-injection, qui visait à servir d'état de référence des communautés microbiennes de la lagune d'étude les 7 et 9 décembre (T0 et T1), une deuxième phase durant le traitement au PFA qui a duré 3 mois (de T2 à T6) et une troisième de 3 mois également, dite post-injection c'est-à-dire après l'arrêt de la désinfection au PFA (de T7 à T10). Les correspondances entre les dates et les périodes d'échantillonnage sont fournies dans le Tableau 1.

Les échantillons d'eau ont été prélevés à environ 80 cm de profondeur. Le déplacement sur la lagune s'est fait grâce à une barque mise à disposition par les responsables de la STEP. Le système de prélèvement a été systématiquement rincé avant échantillonnage. Les flacons de prélèvement stériles ont également été rincés trois fois avant prélèvement. Différents paramètres physicochimiques à savoir température, oxygène dissous, conductivité et pH ont été mesurés *in situ*. La fraction de sédiments qui nous intéressait était la partie superficielle des dépôts dont nous avons prélevé la fraction fine. Le prélèvement a été réalisé au moyen d'une benne « Van Veen » (SDEC) reliée à une corde. Sur chaque point, du sédiment est prélevé trois fois, puis homogénéisé pour constituer un échantillon moyen représentatif avant d'être réparti dans les différents flacons. Avant et après chaque échantillonnage, le préleveur et le bac d'homogénéisation étaient nettoyés. Tous les échantillons d'eau et de sédiments ont été ensuite conservés dans des flacons stériles en polyéthylène à -20°C avant leur transfert pour analyse des communautés microbiennes.

Tableau 1 : Planning des campagnes d'échantillonnage

2.2. Analyses microbiennes

Les communautés microbiennes des échantillons d'eau et de sédiments ont été caractérisées en termes d'abondance, d'activités métaboliques et de diversité bactérienne.

2.2.1 Abondance bactérienne

L'abondance bactérienne des échantillons et des sédiments a été quantifiée à l'aide d'un appareil BactoSense™, cytomètre en flux automatisé. Cette technologie de double marquage permet de dénombrer à la fois les cellules totales et intactes présentes dans les échantillons. Pour les échantillons de sédiments, une étape préalable d'extraction des cellules bactériennes a été nécessaire. Les échantillons de sédiment collectés ont été homogénéisés avec un Ultra-Turrax T25, en procédant à 4 cycles d'homogénéisation de 30 secondes intercalées de 30 secondes de repos. Par la suite, 0,1 g d'échantillon de sédiment homogénéisé a été prélevé et placé dans un tube falcon de 15 mL, auquel on a rajouté 9,9 g d'eau physiologique stérilisée et des microbilles de verres stérilisées. Ce mélange a été ensuite mis sous agitation à 250 rpm pendant 30 min permettant ainsi de détacher les cellules bactériennes du sédiment. Puis les falcons ont été centrifugés à 500

g pendant 5 min pour permettre la récupération du surnageant contenant les cellules microbiennes détachées. Ce surnageant a été utilisé pour quantifier l'abondance bactérienne. Les échantillons d'eau et les surnageants extraits des sédiments ont été analysés selon le protocole décrit dans (Bagagnan et al., 2024b). Chaque échantillon a été analysés en triplicat et les résultats générés ont permis le suivi de l'abondance des cellules intactes et totales pour les deux matrices.

2.2.1 Diversité fonctionnelle

Les microplaques EcoPlate de BIOLOG ont été utilisées pour évaluer la capacité microbienne des sédiments et des eaux à dégrader différentes sources de carbone (C). Chaque microplaque est composée de 96 puits comprenant 31 sources de C et un blanc pour le contrôle, les analyses ont été réalisées en triplicat. Les échantillons de sédiments ont été soumis à une étape d'extraction des cellules bactériennes. Pour cela, 5 g de sédiment ont été mélangés avec 45 ml d'eau physiologique stérilisée (NaCl, 0.9 %). Le mélange obtenu était alors agité à 250 rpm pendant 30 min. Les suspensions obtenues étaient ensuite centrifugées à 500 g pendant 5 min à 4°C. Les surnageant transférés dans de nouveaux tubes falcon puis centrifugés à nouveau à 500 g pendant 5 min à 4°C. Les surnageants issus de cette deuxième centrifugation ont été récupérés dans des tubes falcon et la DO de cette suspension mesurée à 600 nm. Si la DO obtenue était > 0,05, une dilution était effectuée avec une solution de sérum physiologique pour obtenir une DO finale de 0,05. Ensuite 150 µl de ces surnageants ou d'échantillons d'eau étaient alors inoculés dans les puits des microplaques. Les microplaques ont été incubées à des températures allant de 10 à 25° C en fonction de la température d'échantillonnage. Un suivi de la DO a été effectué pour chaque puits des microplaques toutes les 24 h pendant 7 jours avec un lecteur de plaques ThermoScientific Multiskan FC. Les données acquises à la fin de ce suivi ont permis de calculer l'AWCD (*Average Well Color Development*) qui représente la capacité métabolique des microorganismes selon la formule : $AWCD = \frac{\sum(C_i - R)}{n}$ avec n : nombre de puits de la microplaque (31), DO_i : DO mesurée dans le puits i (i allant de 1 à n) à 595 nm, R : DO mesurée dans le blanc (puits de contrôle) à 595 nm. Les DO mesurées, après 96 heures d'incubation, ont permis de calculer différents indices de diversité fonctionnelle : indice de Shannon-Wiener (H'), richesse fonctionnelle (S) et uniformité (E).

2.2.3 Diversité bactérienne

L'analyse des communautés bactériennes a été effectuée à partir de 500 ml d'échantillon d'eau et de 1 g de sédiments par séquençage *illumina* haut débit. Les régions V3-V4 ont été amplifiées en utilisant les primers : forward primer (5'-TAC GGG AGG CAG CAG-3') et reverse primer (5'-CCA GGG TAT CTA ATC C-3'). L'extraction d'ADN, la PCR, le séquençage ainsi que le traitement bio-informatique des séquences obtenues sont décrites par ailleurs (Bagagnan et al., 2024a). Après le traitement bioinformatique des données, une matrice d'abondance a été générée puis utilisée pour calculer des indices d' α -diversité : indice de richesse (Chao1) et indice de Shannon. Les données de séquençage obtenues ont été enregistrées dans la NCBI Sequence Read Archive sous la référence PRJNA1055135.

2.2.4 Analyses statistiques

Les données collectées ont été traitées par analyse en composantes principales (ACP). L'échelle multidimensionnelle (MDS) sur les dissimilarités a été réalisée pour observer la proximité entre les échantillons au cours des différentes étapes du traitement. Une analyse de variance de type Two-way ANOVA (Fisher's Post Hoc Test avec un intervalle de confiance à 95 %) a été également utilisée pour évaluer la variabilité entre

Résultats

les échantillons en fonction de la phase de traitement et de la localisation de l'échantillonnage. Des tests de corrélations de Pearson ont été effectués pour étudier les relations entre les différentes variables étudiées.

3. Résultats

3.1. Suivi de l'abondance bactérienne

Avant le début du traitement par l'acide performique, les valeurs d'abondance totale moyenne pour les sédiments étaient respectivement de $3,8 \cdot 10^8$ et $5,3 \cdot 10^8$ cellules.g⁻¹ en entrée et en sortie de la lagune (Figure 1). Pour l'eau, les abondances étaient de l'ordre de $1,6 \cdot 10^6$ et $4,1 \cdot 10^5$ cellules.ml⁻¹ respectivement en entrée et en sortie (Figure 2). Le suivi de l'abondance bactérienne n'a pas permis de mettre en évidence de variabilité spatiale significative, pour l'eau et les sédiments, entre les trois phases (p-value > 0,05).

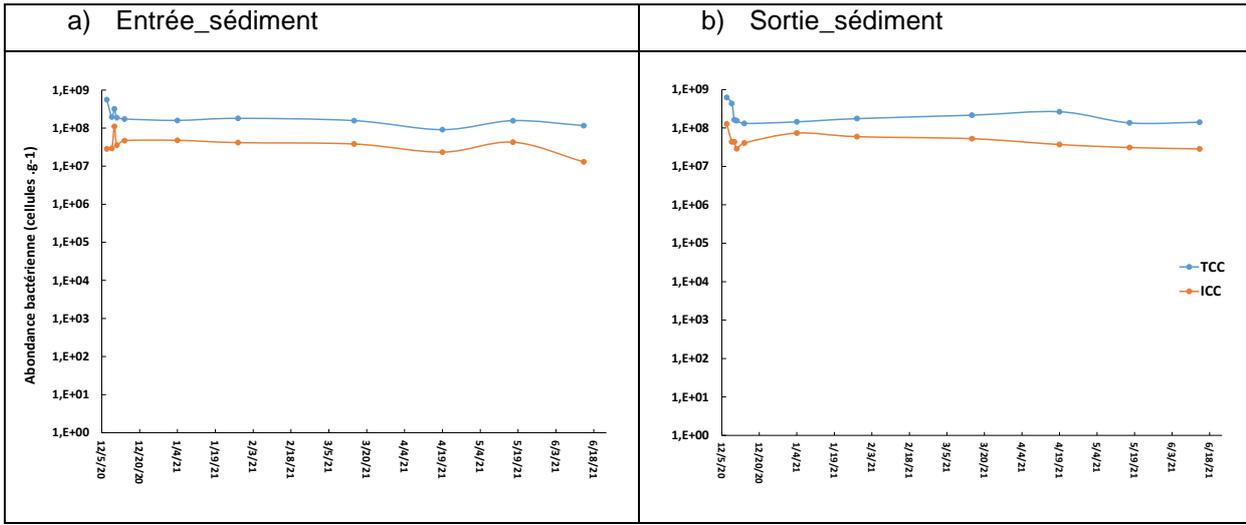


Figure 31 : abondance des cellules totales (TCC) et intactes (ICC) des échantillons de sédiment en entrée (a) et en sortie (b) de la lagune en cellules.g⁻¹

En ce qui concerne la variabilité temporelle, pour les sédiments, il ressort une similitude des valeurs d'abondance durant les trois phases du suivi (p-value > 0,05). A l'opposé pour l'eau, une variabilité a été mise en évidence. En effet, si entre la période pré-injection et la période de traitement, on n'observe pas de variation, la phase post-injection se distingue des deux autres (p-value < 0,001).

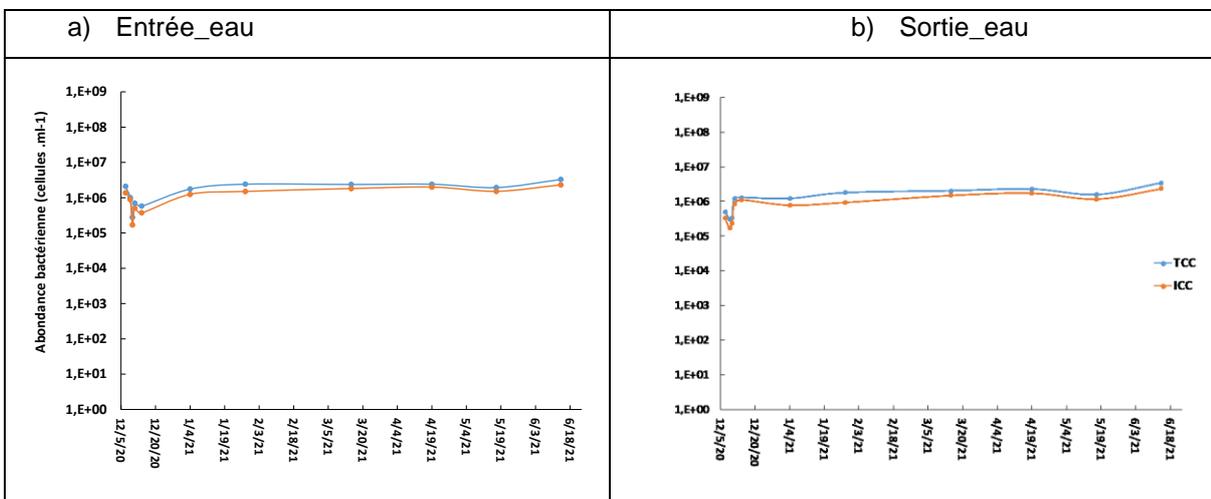


Figure 32 : abondance des cellules totales (TCC) et intactes (ICC) dans les échantillons d'eau en entrée (a) et en sortie (b) de la lagune en cellules.ml⁻¹

Ces résultats soulignent que lors du traitement, le PFA résiduel ne présente pas d'effet significatif sur l'abondance des cellules bactériennes dans les sédiments. Le traitement au PFA n'apparaît pas non plus comme un facteur primordial explicatif des différences observées au niveau des échantillons d'eau car c'est la période post-traitement qui se distingue. Un test de corrélation de Pearson a été effectué pour évaluer l'influence des facteurs environnementaux comme la température et la pluviométrie sur le nombre de cellules observées au cours du temps. Alors que les nombres de cellules totales et intactes quantifiés dans l'eau étaient positivement corrélés à la température de l'eau ($p < 0,001$, $r = 0,5$) et négativement corrélés à la pluviométrie ($p = 0,03$, $r = 0,2$), aucune corrélation significative n'a été observée entre l'abondance bactérienne dans les sédiments et ces facteurs environnementaux (Tableau 2).

Tableau 2 : corrélation de Pearson entre l' α -diversité de l'eau et des sédiments et les paramètres environnementaux

3.2. Activité métabolique des communautés

Les valeurs d'AWCD moyen, décrivant l'activité métabolique des microorganismes, sont présentées dans le Tableau 3. Pour les échantillons de sédiments, elles sont comprises entre 0,34 (T4 en entrée, conditions pluvieuses) et 1,44 (T10 en entrée, température élevée). Bien que non significative ($p > 0,5$), ces activités sont plus élevées en sortie de lagune qu'en entrée avec une moyenne de $0,56 \pm 0,33$ en entrée et $0,65 \pm 0,19$ en sortie. Les AWCD obtenues pendant les phases de traitement au PFA et après l'arrêt de ce dernier mettent en évidence des activités plus importantes en phase post-injection. Au contraire aucune différence ne ressort entre les deux premières phases de pré-injection et de désinfection au PFA. Cela soulignerait que les différences observées ne sont pas liées à l'utilisation du PFA. La température ambiante pourrait expliquer ces différences. En effet, les échantillons prélevés durant la phase post-injection l'ont été alors que la température extérieure (25°C) était significativement plus élevée que celle observée durant les deux premières phases (comprise entre 10 et 16°C).

Pour l'eau, les valeurs moyennes d'AWCD étaient de $0,18 \pm 0,01$ et $0,23 \pm 0,1$, respectivement en entrée et en sortie de lagune toutes phases confondues. Durant la phase de traitement au PFA, une baisse de l'activité métabolique a été observée. En effet, les phases de pré-injection, de traitement et de post-injection présentaient des valeurs moyennes d'AWCD (en regroupant entrée et sortie) de $0,26 \pm 0,17$, $0,13 \pm 0,02$, et $0,23 \pm 0,06$, respectivement.

Tableau 3 : suivi des indices de la diversité fonctionnelle des échantillons de sédiment (a) et d'eau (b)

L'utilisation des substrats carbonés par les communautés bactériennes a permis d'évaluer différents indices de diversité fonctionnelle : indice de Shannon-Wiener (H'), de richesse fonctionnelle, (S) et d'uniformité (E). La richesse fonctionnelle des sédiments (S) était comprise entre 14 (T4 en entrée) et 26 (T10 en sortie) ; l'indice de Shannon-Wiener (H') entre 1,6 (T4 en entrée) et 4,7 (T10 en entrée), et l'indice d'uniformité (E) entre 0,6 (T4 en entrée) et 1,5 (T10 en entrée). Les valeurs (min-max) de ces mêmes indices pour l'eau étaient comprises entre 4 et 17, 1,9 et 3,1 et 1,1 et 1,6 pour respectivement la S, H' et E. Aucune variabilité spatiale significative de ces indices n'a été observée entre l'entrée et la sortie de la lagune pour les deux matrices. De même, la comparaison de ces indices entre les différentes phases de traitement n'a pas mis en évidence de variabilité significative.

Les 31 sources de carbones utilisées dans les Ecoplates appartiennent à six groupes fonctionnels : les hydrates de carbone, les acides carboxyliques, les acides aminés, les amines/amides, les polymères de carbone, les composés phénoliques (Ge et al., 2018). Pour les échantillons d'eau, bien que les valeurs obtenues pour la consommation des différents groupes ne varient pas significativement, l'utilisation des différents groupes de substrats varient entre les différentes phases du suivi. En effet, de façon globale, les microorganismes présents dans les eaux ont consommé majoritairement les substrats appartenant aux carbohydrates, acides aminés polymères (Tableau 4). Durant la période de désinfection, on observe globalement une baisse de la dégradation des différents substrats.

Tableau 4 : dégradation des groupes de substrats par les communautés présentes dans les sédiments (a) et la colonne d'eau (b)

La dégradation des groupes de substrats par les microorganismes des sédiments est similaire entre l'entrée et la sortie de la lagune. Cependant, entre les phases de traitement, une variation est observée au niveau de la dégradation des carbohydrates et des acides aminés qui augmentent en période post-injection en particulier pour les échantillons collectés en fin de suivi. Comme pour les indices de diversité fonctionnelle, il semblerait que la température soit le facteur qui pilote la dégradation des substrats organiques. Le PFA ne joue pas un rôle significatif. L'augmentation de l'activité métabolique totale (AWCD) s'explique par la forte dégradation des substrats carbohydrates, acides carboxyliques et acides aminés. Ainsi, en termes de diversité métabolique, avec l'utilisation des Ecoplates de BIOLOG, la période de traitement des rejets ne se distingue pas significativement des autres périodes de suivi pour les échantillons de sédiment. Pour la matrice « eau », une légère baisse de la capacité de dégradation est observée durant la période de traitement à l'acide performique.

3.3. Diversité taxonomique de la communauté bactérienne

Variations des indices de diversité dans les échantillons d'eau et de sédiment lors des trois phases de traitement

A partir des résultats du séquençage, une analyse de l'alpha-diversité a été réalisée en calculant les indices de Shannon et de Chao1 (Tableau 5). Avant la désinfection, entrée et sortie confondues, les valeurs moyennes de l'indice de Chao1 et de Shannon sont respectivement de $21\ 190 \pm 848$ et $6,0 \pm 0,2$ pour les échantillons de sédiment et de $32\ 207 \pm 5\ 194$ et $6,1 \pm 0,6$ pour les échantillons d'eau. En générale, les indices de diversité, notamment Chao1 et Shannon dans la colonne d'eau sont supérieurs à ceux du sédiment indiquant une plus grande diversité. La comparaison entre l'entrée et la sortie de la lagune n'a pas permis de mettre en évidence de différence significative ($n^{\circ}p > 0,5$).

Tableau 5 : Indices de Chao1 et de Shannon dans les échantillons d'eau et de sédiment de la lagune à l'entrée et à la sortie durant les trois phases de traitement (pré-injection, injection et post-injection)

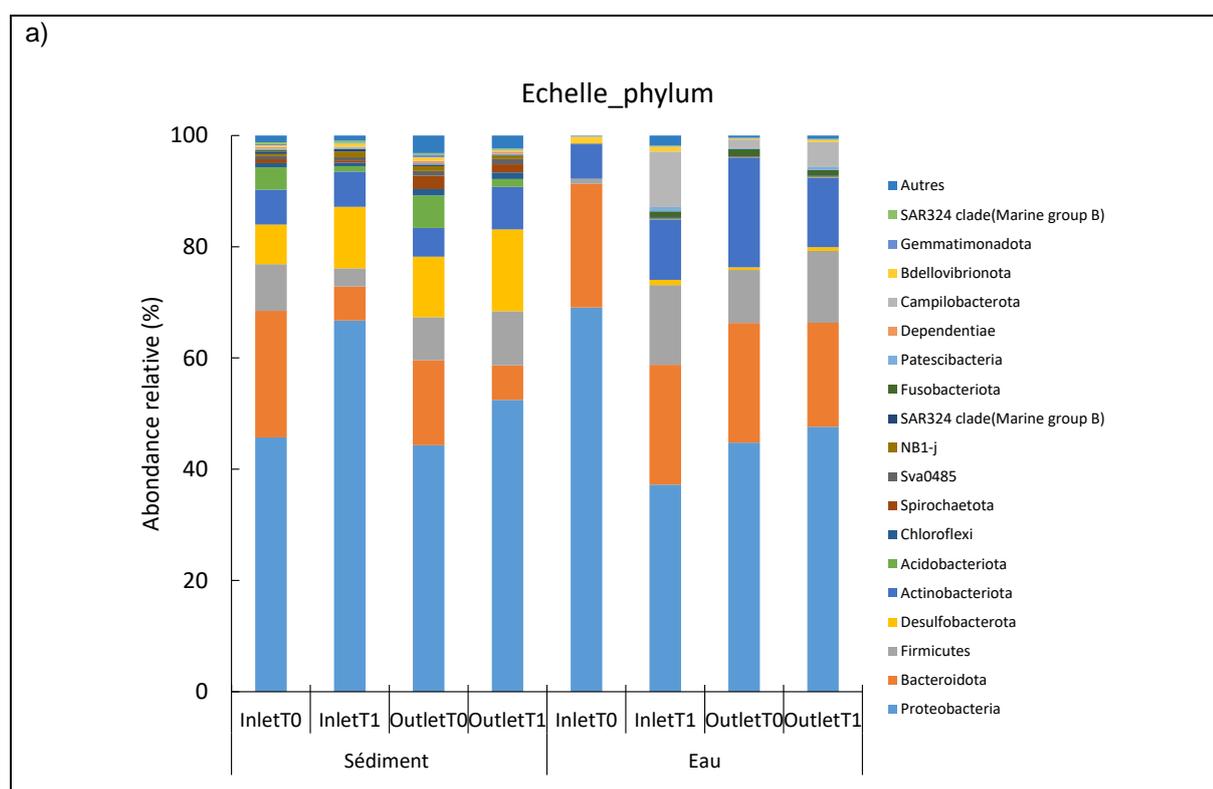
Lorsqu'on compare les différentes phases de traitement : pré-injection, injection et post-injection, on constate que Chao1 pour les sédiments est plus bas durant la période post-injection par rapport aux deux autres phases. En revanche, l'indice de Shannon ne présente pas de variation significative. Pour la colonne d'eau, les valeurs de ces deux indices diffèrent entre les phases de traitement. En effet, une variation significative de l'indice de Shannon est observée entre les phases pré-injection, injection et post-injection ($*p < 0,05$), avec une diminution de 6,1 (pré-injection) à 5,1 (injection) puis à 4,6 (post-injection). De même, l'indice de Chao1 présente une diminution significative, passant de 32 207 à 16 945, respectivement lors des phases de pré-injection et post-injection. Globalement, les résultats montrent que la phase de post-injection se distingue des

Résultats

phases de pré-injection et injection par une réduction de sa diversité, les deux de pré-injection et injection ne présentent pas de différences significatives entre elles. Le test de la corrélation de matrice de Pearson a été réalisé pour examiner les relations entre la température, la pluviométrie et les indices de Shannon et Chao1 (Tableau 2). Les indices de Chao1 pour les sédiments et la colonne d'eau sont négativement corrélés à la température avec des *p-values* respectives de 0,009 et 0,015. Inversement, ces indices sont positivement corrélés à la pluviométrie (**p* < 0,05). Seuls les indices de Shannon pour la colonne d'eau présentent une corrélation négative avec la température (***p* < 0,05) alors qu'aucune corrélation n'a été observée avec la pluviométrie.

Composition de la communauté bactérienne dans les échantillons d'eau et de sédiment de la lagune avant la réception des rejets traités au PFA

Avant la mise en place du processus de désinfection, les échantillons d'eau et de sédiment prélevés dans la lagune ont révélé la présence de 44 phyla pour les échantillons de sédiment et de 39 pour les échantillons d'eau, comme illustré Figure 33. Les phyla dominants dans la colonne d'eau en entrée et en sortie de lagune sont identiques, mais leurs abondances relatives diffèrent. Les abondances relatives de ces phyla dans les échantillons à l'entrée et à la sortie sont les suivants : *Proteobacteria* (37,2-69,1 %), *Bacteroidota* (18,7-22,2 %), *Actinobacteriota* (6,2-19,7 %), *Firmicutes* (1-20,3 %) et *Campilobacterota* (0,1-13,3 %), *Myxococcota* (0,1-0,6 %), *Desulfobacterota* (0,1-1,1 %), *Bdellovibrionota* (0,2-1,2 %), *Patescibacteria* (0,03-1,1 %), et *Fusobacteriota* (0,01-1,3%). Pour les sédiments, les phyla dominants sont les *Proteobacteria* (44,3-66,7 %), *Bacteroidota* (6,1-22,8 %), *Firmicutes* (3,2-9,7 %), *Desulfobacterota* (7,1-14,9 %), *Actinobacteriota* (5,2-7,7 %), *Acidobacteriota* (1,0-5,8 %), *Chloroflexi* (0,6-1,2 %), et *Spirochaetota* (0,4-2,4 %). Bien que présentant des distributions différentes, la colonne d'eau et les sédiments ont en commun certains phyla dominants : *Proteobacteria*, *Bacteroidota*, *Actinobacteriota*, et *Firmicutes*, pour lesquels la différence entre les deux matrices n'est pas significative (*nsp* > 0,5). A l'opposé, ils se distinguent significativement pour certains phyla comme *Acidobacteria* et *Chloroflexi* (***p* < 0,001).



Résultats

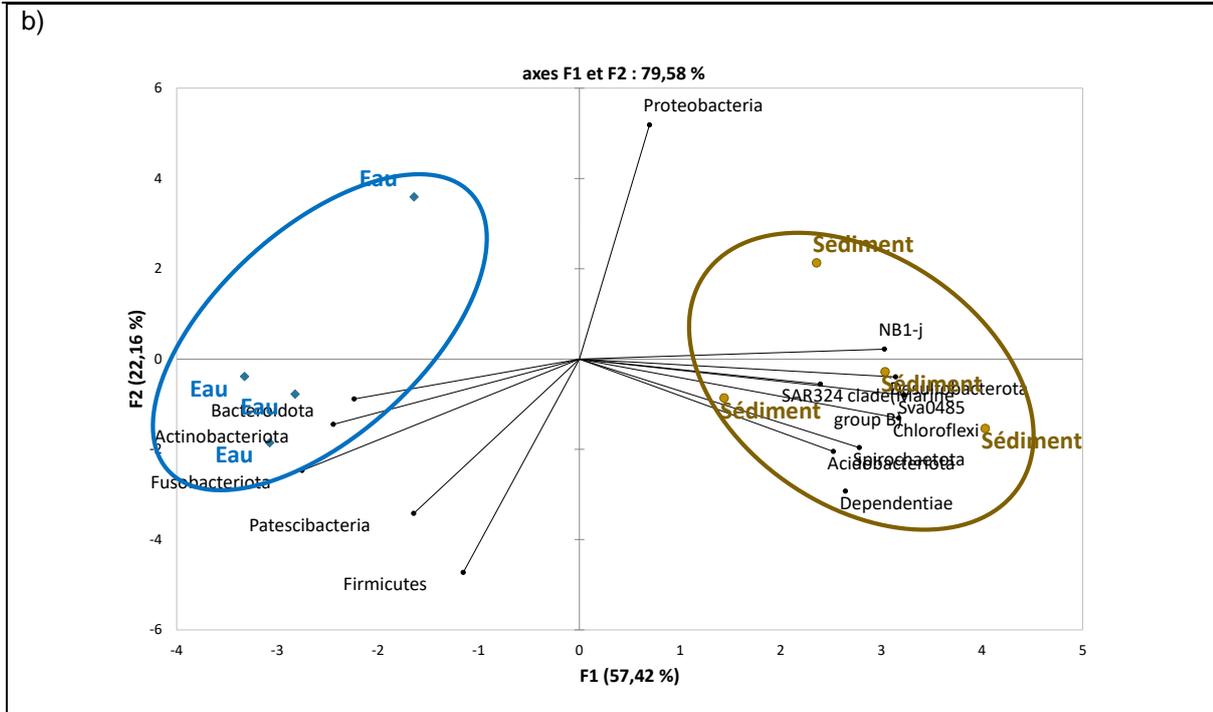


Figure 33 : Abondance relative de la communauté bactérienne au niveau du phylum (a) et analyse en composantes principales (ACP) (b) des phylums identifiés dans la matrice de sédiments et d'eau avant désinfection

On constate également une importante variation de l'abondance relative des phyla tels que *Proteobacteria*, *Bacteroidota* et *Campilobacterota* entre T0 et T1 (24 h après) à la fois dans les échantillons d'eau et de sédiment, tant à l'entrée qu'à la sortie. Par exemple, l'abondance relative de *Proteobacteria* augmente pour le sédiment passant de 45 % (T0, à l'entrée et à la sortie) à 68 % (T1, à l'entrée), et diminue dans la colonne d'eau passant de 68 % (T0, à l'entrée) à 38 % (T1, à l'entrée).

Une analyse des communautés microbiennes à l'échelle du genre bactérien a été effectuée. Dans les échantillons de sédiments, les genres bactériens dominants (>1%) sont *Actibacter*, *Thiobacillus*, *Dechloromonas*, *Subgroup 23*, *BD1-7 clade*, *Hyphomicrobium*, *Limnobacter*, *Sva0081* sediment group, et *Turicibacter*. La colonne d'eau est dominée par *Flavobacterium* (phylum *Bacteroidota*), *Methylotenera*, *Pseudomonas*, *Limnohabitans*, *Polynucleobacter*, et *GKS98 freshwater group* (abondance relative > 1%) appartenant au phylum *Proteobacteria*. La différence entre les communautés microbiennes des deux matrices (eau et sédiment) est clairement mise en évidence par ACP (Figure 33b).

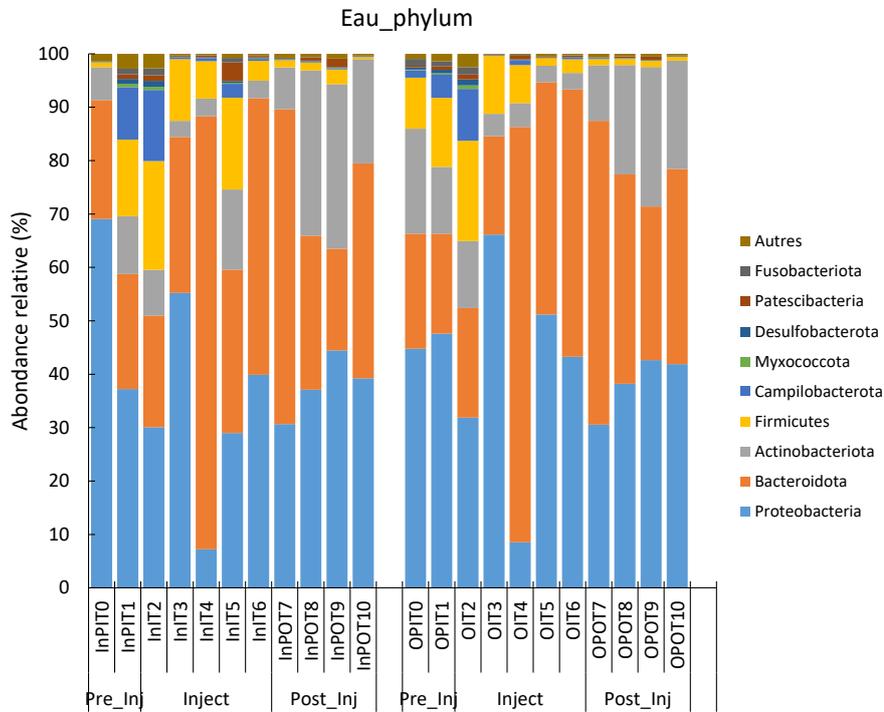
Etude de l'abondance relative au niveau phylum de la colonne d'eau au cours des trois phases

Les phyla dominants identifiés dans la colonne d'eau restent identiques pour les périodes injection et post-injection à ceux identifiés avant injection. On retrouve principalement *Proteobacteria*, *Bacteroidota*, *Actinobacteriota*, *Firmicutes* et *Campilobacterota* (Figure 35a). Une analyse de two-ways ANOVA a été effectuée pour évaluer les variations de l'abondance relative des différents phyla entre les trois périodes. Les résultats révèlent des différences significatives de l'abondance relative des *Actinobacteriota* et des *Firmicutes* (**p < 0,001). En effet, l'abondance relative des *Actinobacteriota* diminue durant la phase d'injection pour ensuite remonter dès l'arrêt du traitement au PFA. Une baisse de l'abondance des *Firmicutes* a été observée durant la période post injection. Aucune variation significative n'est notée entre l'entrée et la sortie. Ces

Résultats

observations sont confirmées par les résultats de l'analyse de la MDS effectuée qui montre une proximité entre les échantillons collectés en entrée et en sortie (Figure 34b). De plus, cette analyse MDS révèle globalement une similarité entre les différents échantillons de la colonne d'eau, à l'exception du T4 correspondant à 5 jours après le début du traitement à une période pluvieuse.

a)



b)

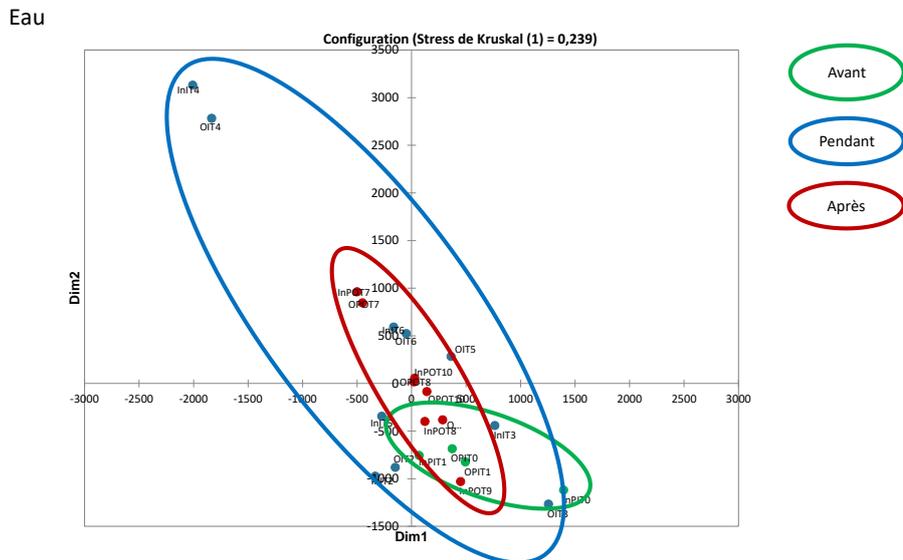


Figure 34 : abondance relative des phyla dominants dans la colonne d'eau (a) et analyse multidimensionnelle (MDS) sur la base de ces abondances (b)

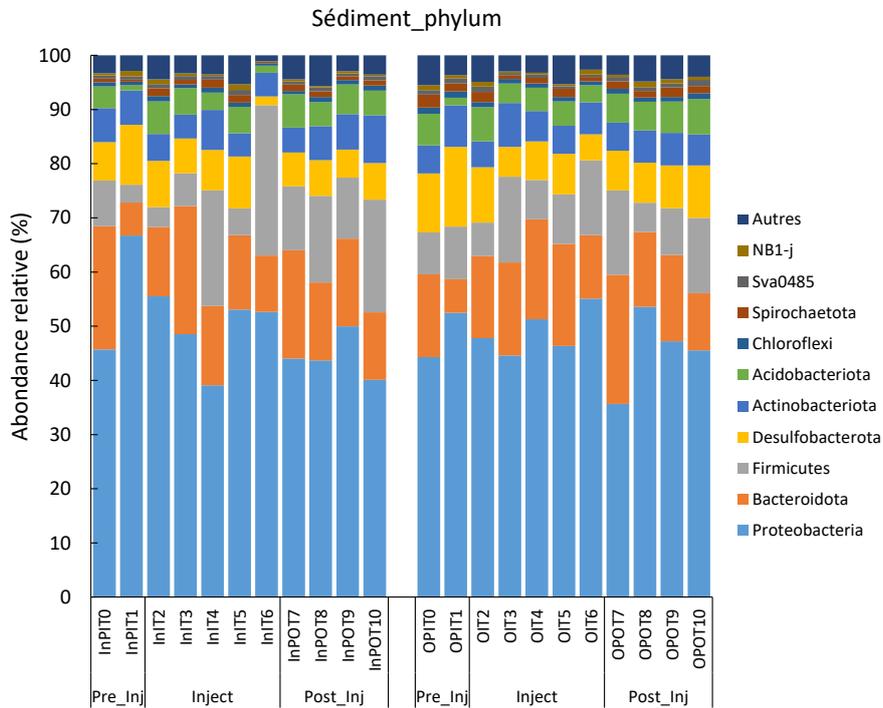
Etude de l'abondance relative au niveau phylum du sédiment de la lagune au cours des trois phases

Les échantillons de sédiments présentent quelques similitudes avec la colonne d'eau pour les phyla dominants *Proteobacteria*, *Bacteroidota*, *Actinobacteriota*, *Firmicutes*, *Desulfobacterota*, *Acidobacteriota*, *Chloroflexi*, et

Résultats

Spirochaetota. Leurs abondances relatives sont présentées Figure 34. Les phyla identifiés dans les sédiments ne présentent pas de variation significative spatiale entre l'entrée et la sortie ($nsp > 0,05$). L'homogénéité des abondances des phyla dominants ressort Figure 35.

a)



b)

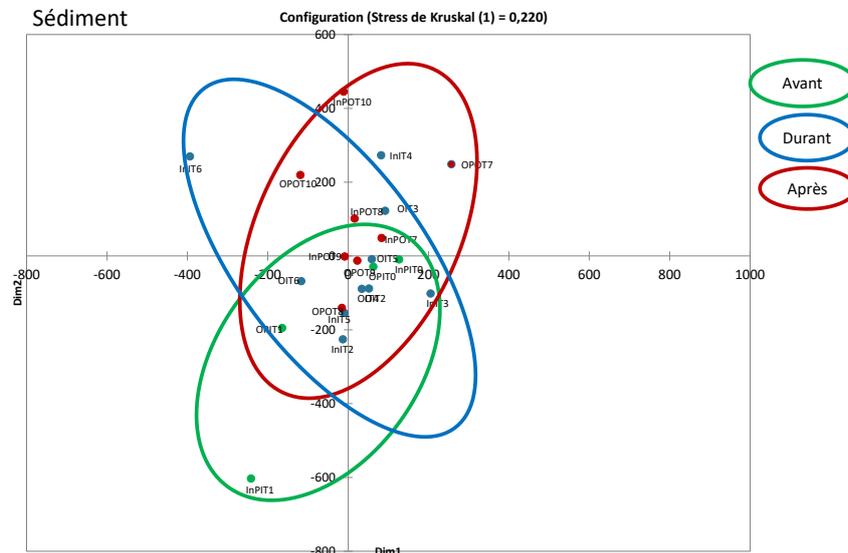


Figure 35 : abondance relative des phyla dominants de sédiment (a) et analyse multidimensionnelle (MDS) (b) sur la base de ces abondances

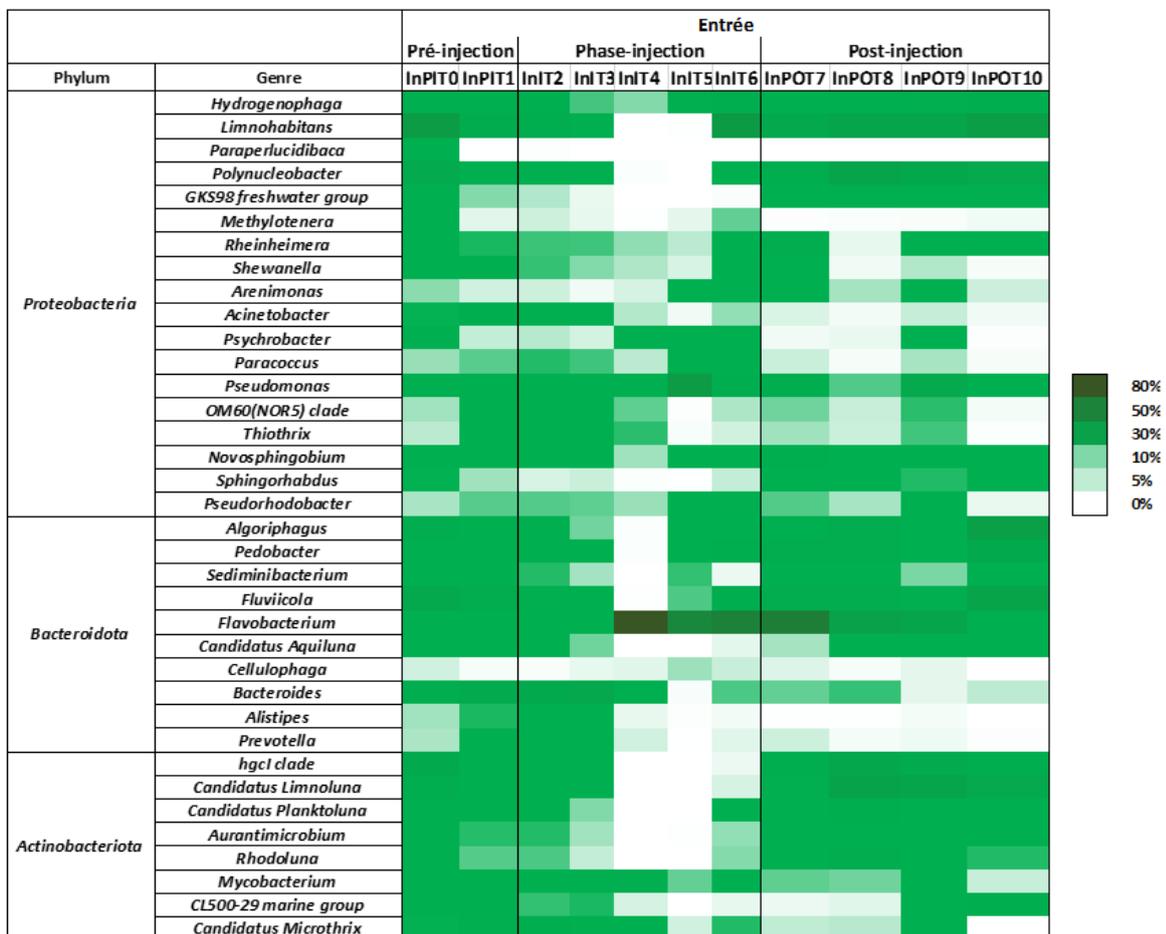
Au niveau des phyla, il apparaît donc que seule la matrice « eau » pourrait être sensible à l'action du PFA au regard du changement de l'abondance relative des *Actinobacteriota*. Cependant, une variation des *Firmicutes* a également été observée durant la phase post injection en lien avec les conditions météorologiques. Aussi,

Résultats

un test de corrélation de Pearson a été effectué pour identifier l'influence de la température de l'eau et de la pluviométrie sur les communautés bactériennes. Des corrélations positive entre température de l'eau et l'abondance des *Actinobacteriota* ($p < 0,05$) et négative entre température de l'eau avec l'abondance des *Firmicutes* ($p < 0,05$) ont été établies.

L'évolution des communautés bactériennes des sédiments et de la colonne d'eau ont été analysées à l'échelle du genre bactérien. Dans les échantillons d'eau, la phase d'injection à l'acide performique se caractérise par une forte présence des *Flavobacterium* et une diminution des *Limnohabitans*, *Polynucleobacter GKS98 freshwater group*, et *hgcl clade*. Durant les trois phases de traitement, l'abondance de certains genres bactériens comme les *Mycobacterium*, *Acinetobacter*, *Paracoccus* et *Pseudomonas* restent constantes (Figure 36). Toutefois, pour les genres bactériens présentant une diminution, cette baisse est plus prononcée en sortie qu'en entrée. En revanche, pour les sédiments, aucune variation significative n'a été mise en évidence.

a)



b)

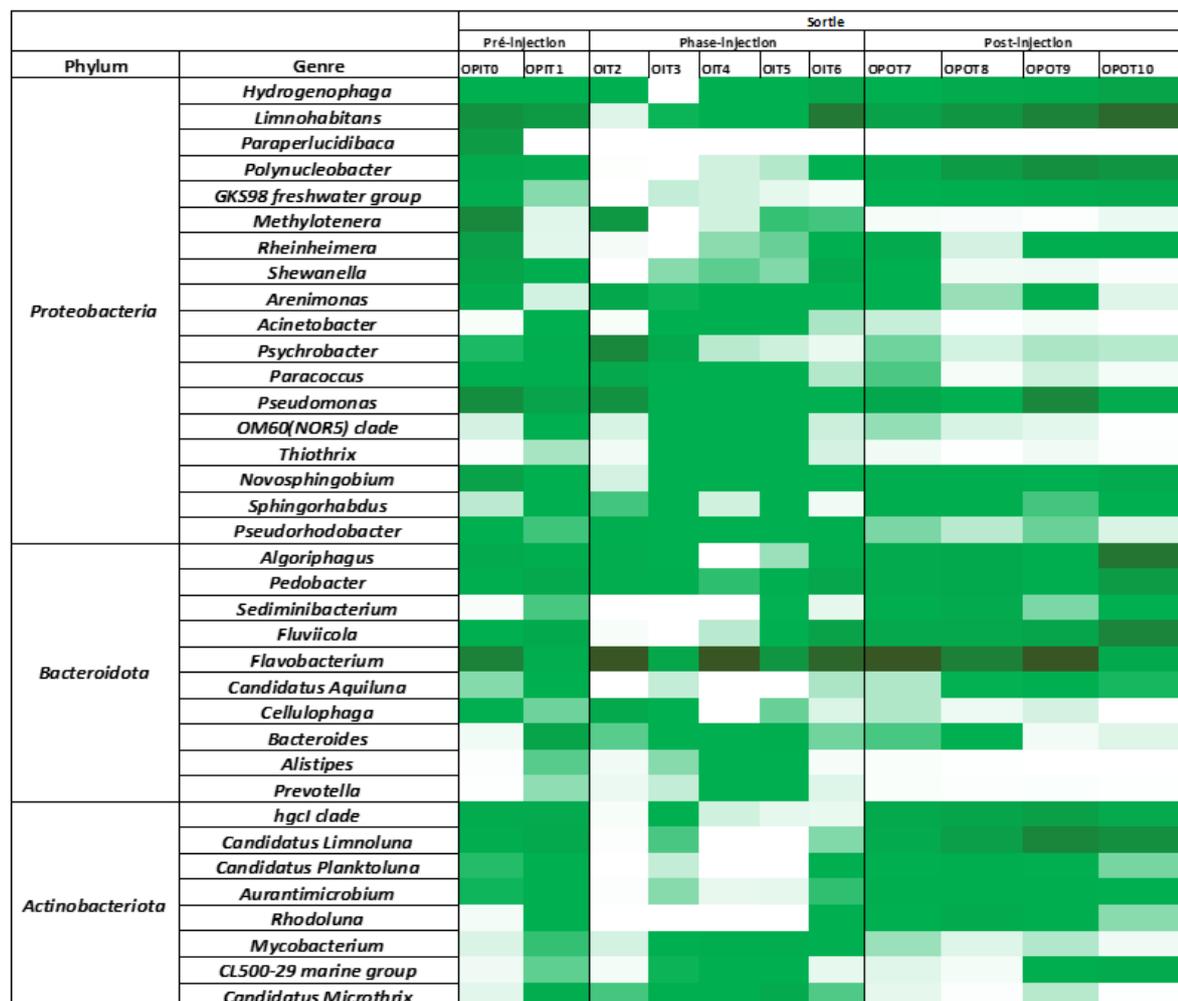


Figure 36 : Heatmap de la composition des genres dominants (> 1%) des échantillons de la colonne d'eau au cours du temps en entrée (a) et en sortie (b)

4. Discussion

L'objectif de cette étude était d'effectuer un suivi de l'abondance, des activités et de la diversité des communautés bactériennes de colonne d'eau et du sédiment en entrée et en sortie de la lagune de la STEP de Mèze (34) après désinfection du rejet au PFA. Les valeurs d'abondance bactérienne totale, de l'ordre de 10^6 cellules.ml⁻¹ obtenus pour les échantillons d'eau sont cohérents avec les résultats de [Huang et al. \(2016\)](#), pour les rejets d'une STEP possédant une étape de clarification avant rejet, et avec ceux des rejets d'une STEP dans l'agglomération parisienne ([Bagagnan et al., 2024a](#)). De même, l'abondance dans les sédiments (10^8 cellules.g⁻¹) est conforme à l'ordre de grandeur rapportés pour des boues de STEP ([Collado et al., 2017](#)). Une diminution de l'abondance est observée en T2, qui correspond au début de la désinfection au PFA, et fait suite à un épisode pluvieux. La corrélation positive entre l'abondance bactérienne et la température reflète une augmentation de l'abondance bactérienne lorsque la température augmente. Cette hausse de l'abondance bactérienne durant les périodes chaudes a déjà été documentée ([Prest et al., 2016](#); [Schleich et al., 2019](#)) suggérant l'effet significatif de la température de l'eau sur la croissance bactérienne. De plus, bien que non significatifs statistiquement, la pluviométrie et la désinfection au PFA semblent jouer un rôle dans la

diminution de l'abondance dans la colonne d'eau. Cependant, ces effets n'ont pas été observés sur l'abondance des cellules bactériennes dans les sédiments.

En ce qui concerne la composition structurelle de la communauté bactérienne, les phyla dominants identifiés dans la colonne d'eau sont *Proteobacteria*, *Bacteroidota*, *Actinobacteriota*, et *Firmicutes*, c'est-à-dire des phyla caractéristiques de rejets de STEP (Hu et al., 2012; Plaza et al., 2021; Sekar et al., 2014; Sibanda et al., 2019; Wang et al., 2020; Wong et al., 2005; Zhang et al., 2019). Ce qui est assez cohérent dès lors que l'alimentation en eau de la lagune est le rejet de la STEP lui-même. Pour le sédiment, les phyla dominants observés sont *Proteobacteria*, *Bacteroidota*, *Firmicutes*, *Desulfobacterota*, *Actinobacteriota*, *Acidobacteriota*, et *Chloroflexi*. Ces résultats sont en accord avec ceux rapportés dans différentes études (Hu et al., 2012; Nascimento et al., 2018; Zhang et al., 2012). La prépondérance des *Proteobacteria* pourrait s'expliquer par leur capacité à s'adapter et à se développer facilement dans des environnements fortement contaminés comme le sont les eaux usées (Kaur et al., 2020; Selvarajan et al., 2021). Quant aux *Bacteroidota*, leur dominance peut s'expliquer par leur origine possible qui est le microbiote. Les *Firmicutes* sont connues pour leur capacité à s'adapter à des conditions environnementales extrêmes et sont fréquemment identifiées dans les boues des STEP (Garcia et al., 2011; Yang et al., 2014).

L'analyse de l'abondance relative des différents taxons révèle des différences entre les échantillons de sédiment et ceux d'eau. Cela s'explique, en partie, par la présence accrue de certains phyla, tels que les *Acidobacteria* et les *Chloroflexi*, fréquemment observés en quantités plus importantes dans les boues de STEP que dans les eaux de rejet (Xu et al., 2018; Zhao et al., 2014). Dans les échantillons d'eau, une diminution significative pour les *Actinobacteriota*, qui se traduit par une baisse importante des genres *Candidatus Limnoluna* et *hgcl clade* a été observée au cours des différentes phases de traitement. Bien que cette diminution aurait pu être attribuée à l'action du PFA, il est intéressant de noter que ce phylum présente une corrélation positive avec la température. Cette corrélation est cohérente avec des études antérieures (Sun et al., 2017) qui montrent une température optimale de croissance comprise entre 25° et 30°C (Steger et al., 2007). Cependant, des expérimentations en conditions contrôlées menées par Bagagnan et al., (2024a) ont révélé une résistance des *Actinobacteriota* à l'action du PFA pour des CT allant jusqu'à 240 mg/l•min, ce qui est en désaccord avec les observations cette étude où le CT était plus bas à 32 mg/l•min. Par ailleurs, la résistance des *Actinobacteriota* a également été observée lors de tests de désinfection au PFA (Wang et al. (2023)). Ces variations au sein de ce phylum pourraient donc être attribuées aux fluctuations de la température. Au niveau des genres bactériens, une réduction de l'abondance relative des genres bactériens *Limnohabitans*, *Polynucleobacter* et *GKS98 freshwater* affiliés au phylum *Proteobacteria*, et aussi des genres *Fluviicola*, *Algoriphagus* appartenant au phylum *Bacteroidota* est apparue durant la phase de traitement. Cette diminution suggère une possible sensibilité de ces groupes bactériens à l'action du PFA. Ces genres bactériens sont classés Gram négatif, ce qui pourrait expliquer leur plus grande sensibilité au PFA (Ding et al., 2023). D'après de récents travaux (Wang et al., 2023), les *Fluviicola* ont été identifiés comme étant sensibles à l'action du PFA à un CT de 60 mg/l•min, confirmant les observations de cette étude qui révèle une sensibilité similaire pour un CT de 32 mg/l•min. En revanche, certains genres tels que *Mycobacterium*, *Acinetobacter*, *Paracoccus* et *Pseudomonas* ont présenté une abondance constante durant toute l'expérimentation, voire en légère augmentation pour *Flavobacterium* pendant la phase d'utilisation du PFA. Ces observations indiqueraient une résistance des bactéries de ces genres à l'action du PFA. Les bactéries affiliées à ces genres sont Gram négatif (Allen et al., 2006; Bates and King, 2021; Chung et al., 2007; Towner, 2006) et peuvent être associées

aux infections nosocomiales (Bergogne-Bérézin and Towner, 1996; Ryan and Pembroke, 2018). La résistance observée de ces genres bactériens au PFA est concordante avec les résultats obtenus pour des essais conduits en conditions contrôlées (Bagagnan et al., 2024a). Par ailleurs, ces genres bactériens sont connus pour leur résistance à divers agents désinfectants en particulier le chlore (Karumathil et al., 2014). Contrairement aux résultats obtenus sur une STEP en agglomération parisienne, les *Flavobacterium* semblent présenter une certaine résistance à l'action du PFA dans le cas de cette étude. L'analyse des communautés microbiennes dans les sédiments, à la fois aux niveaux du phylum et du genre, n'a révélé aucun effet significatif de l'utilisation de l'acide performique. Cette étude visait à détecter d'éventuels effets à court et à long termes sur ces communautés, mais aucun impact notable n'a été observé.

Les communautés microbiennes, leur diversité et leur abondance peuvent considérablement influencer les fonctions et les activités des microorganismes (Hooper et al., 2005). La quantification de l'AWCD dans les échantillons de sédiment et d'eau a révélé une activité plus élevée dans les sédiments, suggérant une quantité plus importante de bactéries actives dans cette matrice. L'AWCD des sédiments a mis en exergue une variation saisonnière liée à l'élévation de la température, déjà constatées par Oest et al. (2018) et Urakawa et al. (2013). Ces deux études soulignent également une activité métabolique saisonnière, évaluée par des Ecoplates de Biolog, avec des similitudes entre l'hiver et le printemps, et des variations marquées en été, en relation avec la disponibilité de la biomasse active.

L'analyse de corrélation de Pearson entre l'AWCD et l'abondance bactérienne des sédiments n'a pas mis en évidence de corrélation significative. Les variations de température semblent être le facteur explicatif majeur des variations d'activité métabolique plutôt que la présence éventuelle de PFA résiduel dans les eaux rejetées dans la lagune. Les activités métaboliques des microorganismes ainsi que les indices de la diversité restent relativement similaires tout au long du suivi. Cela suggère que les eaux traitées au PFA n'ont pas d'impact significatif sur les communautés microbiennes réceptrices dans les sédiments, elles n'affectent pas leur capacité de dégradation de substrats. Par ailleurs, les profils de consommation des substrats dans les échantillons d'eau ont varié selon les saisons en accord avec des études antérieures (Grover et Chrzanowski, 2000 ; Woźniak et al., 2022). Il est intéressant de rappeler que les périodes de pré-injection et injection se sont déroulées en hiver alors que la période post-injection correspondait au début de l'été. Le substrat le plus consommé tant par les microorganismes présents dans l'eau que dans les sédiments est celui des carbohydrates. Cette observation rejoint les conclusions d'études précédentes (Dresler et al., 2021; Woźniak et al., 2022). Une augmentation de cette consommation pendant les périodes chaudes a été observée, expliquée en partie par le type de microorganismes spécifiques à ces périodes, comme le suggèrent les recherches de (Grover and Chrzanowski, 2000). Une analyse de corrélation de Pearson entre la consommation des différents groupes de substrats et l'abondance des phyla dominants des sédiments a été effectuée. Elle a montré une corrélation positive entre les *Chloroflexi* et la consommation des acides carboxyliques, et une corrélation positive entre les *Actinobacteriota* et la consommation des amines/amides. Pour les échantillons d'eau, une seule corrélation positive a été observée entre la dégradation des acides carboxyliques et les *Actinobacteria*. Ainsi, l'augmentation de la consommation des acides carboxyliques durant la période post-injection peut être expliquée par la plus grande abondance des *Actinobacteriota*, dont la présence est positivement corrélée à la température.

5. Conclusion

Cette étude visait à évaluer l'abondance, l'activité et la diversité des communautés microbiennes dans la colonne d'eau et le sédiment de la lagune de la STEP de Mèze (34) avant et après le traitement au PFA. Les résultats montrent une stabilité de l'abondance bactérienne dans les sédiments de la lagune quelle que soit la phase considérée alors que des variations ont été observées dans la colonne d'eau, notamment après la fin du traitement au PFA. Ces variations semblent être plus influencées par des facteurs environnementaux tels que la température et la pluviométrie que par l'action du PFA. L'étude met également en lumière des différences dans la diversité et la composition des communautés bactériennes entre les échantillons d'eau et de sédiment. Par exemple, certains phyla bactériens dominants *Proteobacteria*, *Bacteroidota*, et *Actinobacteria* varient entre les deux matrices. De plus, certains genres bactériens spécifiques montrent une réponse différente à l'action de l'acide performique, ce qui se reflète dans leur abondance relative. La lagune étudiée étant ouverte, ses communautés bactériennes restent sensibles aux variations saisonnières. Cette recherche souligne l'importance des facteurs environnementaux comme la température dans la dynamique des communautés bactériennes, ainsi que la variabilité de la réponse des différentes communautés à un traitement spécifique comme celui à l'acide performique.

6. Références

- Allen, T.D., Lawson, P.A., Collins, M.D., Falsen, E., Tanner, R.S., 2006. *Cloacibacterium normanense* gen. nov., sp. nov., a novel bacterium in the family Flavobacteriaceae isolated from municipal wastewater. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56, 1311–1316. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.64218-0>
- Bagagnan, S., Jusselme, M.D., Alphonse, V., Livet, A., Guerin, S., Moilleron, R., 2024a. Response of bacterial communities to disinfection with performic acid: bacterial diversity and abundance.
- Bagagnan, S., Jusselme, M.D., Alphonse, V., Livet, A., Guerin, S., Rocher, V., Moilleron, R., 2024b. Evaluation de l'effet potentiel de rejets de station d'épuration désinfectés à l'acide performique (PFA) sur les communautés microbiennes du milieu récepteur. TSM.
- Bates, K.A., King, K.C., 2021. *Leucobacter*. *Trends Microbiol.* 29, 1046–1047. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2021.06.010>
- Bergogne-Bérézin, E., Towner, K.J., 1996. *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: microbiological, clinical, and epidemiological features. *Clin. Microbiol. Rev.* 9, 148–165.
- Chhetri, R.K., Thornberg, D., Berner, J., Gramstad, R., Øjstedt, U., Sharma, A.K., Andersen, H.R., 2014. Chemical disinfection of combined sewer overflow waters using performic acid or peracetic acids. *Sci. Total Environ.* 490, 1065–1072. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.05.079>
- Chung, B.S., Ryu, S.H., Park, M., Jeon, Y., Chung, Y.R., Jeon, C.O., 2007. *Hydrogenophaga caeni* sp. nov., isolated from activated sludge. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57, 1126–1130. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.64629-0>
- Collado, S., Oulego, P., Alonso, S., Díaz, M., 2017. Flow cytometric characterization of bacterial abundance and physiological status in a nitrifying-denitrifying activated sludge system treating landfill leachate. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 24, 21262–21271. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-9596-y>
- Ding, N., Li, Z., Jiang, L., Liu, H., Zhang, Y., Sun, Y., 2023. Kinetics and mechanisms of bacteria disinfection by performic acid in wastewater: In comparison with peracetic acid and sodium hypochlorite. *Sci. Total Environ.* 878, 162606. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.162606>
- Dresler, S., Hawrylak-Nowak, B., Kováčik, J., Woźniak, M., Gałazka, A., Staniak, M., Wójciak, M., Sowa, I., 2021. Organic nitrogen modulates not only cadmium toxicity but also microbial activity in plants. *J. Hazard. Mater.* 402, 123887. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.123887>
- Garcia, S.L., Jangid, K., Whitman, W.B., Das, K.C., 2011. Transition of microbial communities during the adaptation to anaerobic digestion of carrot waste. *Bioresour. Technol.* 102, 7249–7256. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.04.098>
- Gehr, R., Chen, D., Moreau, M., 2009. Performic acid (PFA): tests on an advanced primary effluent show promising disinfection performance. *Water Sci. Technol.* 59, 89–96. <https://doi.org/10.2166/wst.2009.761>
- Grover, J., Chrzanowski, T., 2000. Seasonal patterns of substrate utilization by bacterioplankton: case studies in four temperate lakes of different latitudes. *Aquat. Microb. Ecol.* 23, 41–54. <https://doi.org/10.3354/ame023041>

- Hooper, D.U., Chapin, F.S., Ewel, J.J., Hector, A., Inchausti, P., Lavorel, S., Lawton, J.H., Lodge, D.M., Loreau, M., Naeem, S., Schmid, B., Setälä, H., Symstad, A.J., Vandermeer, J., Wardle, D.A., 2005. EFFECTS OF BIODIVERSITY ON ECOSYSTEM FUNCTIONING: A CONSENSUS OF CURRENT KNOWLEDGE. *Ecol. Monogr.* 75, 3–35. <https://doi.org/10.1890/04-0922>
- Hu, M., Wang, X., Wen, X., Xia, Y., 2012. Microbial community structures in different wastewater treatment plants as revealed by 454-pyrosequencing analysis. *Bioresour. Technol.* 117, 72–79. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.04.061>
- Huang, X., Zhao, Z., Hernandez, D., Jiang, S.C., 2016. Near Real-Time Flow Cytometry Monitoring of Bacterial and Viral Removal Efficiencies during Water Reclamation Processes. *Water* 8, 464. <https://doi.org/10.3390/w8100464>
- Karumathil, D.P., Yin, H.-B., Kollanoor-Johny, A., Venkitanarayanan, K., 2014. Effect of Chlorine Exposure on the Survival and Antibiotic Gene Expression of Multidrug Resistant *Acinetobacter baumannii* in Water. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 11, 1844–1854. <https://doi.org/10.3390/ijerph110201844>
- Kaur, R., Yadav, B., Tyagi, R.D., 2020. 4 - Microbiology of hospital wastewater, in: Tyagi, R.D., Sellamuthu, B., Tiwari, B., Yan, S., Drogui, P., Zhang, X., Pandey, A. (Eds.), *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering*. Elsevier, pp. 103–148. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819722-6.00004-3>
- Maffettone, R., Manoli, K., Santoro, D., Passalacqua, K.D., Wobus, C.E., Sarathy, S., 2020. Performic Acid Disinfection of Municipal Secondary Effluent Wastewater: Inactivation of Murine Norovirus, Fecal Coliforms, and Enterococci. *Env. Sci Technol* 54, 12761–12770. <https://doi.org/10.1021/acs.est.0c05144>
- Mounts, A.W., Ando, T., Koopmans, M., Bresee, J.S., Noel, J., Glass, R.I., 2000. Cold weather seasonality of gastroenteritis associated with Norwalk-like viruses. *J. Infect. Dis.* 181 Suppl 2, S284-287. <https://doi.org/10.1086/315586>
- Nascimento, A.L., Souza, A.J., Andrade, P.A.M., Andreote, F.D., Coscione, A.R., Oliveira, F.C., Regitano, J.B., 2018. Sewage Sludge Microbial Structures and Relations to Their Sources, Treatments, and Chemical Attributes. *Front. Microbiol.* 9.
- Oest, A., Alsaffar, A., Fenner, M., Azzopardi, D., Tiquia-Arashiro, S.M., 2018. Patterns of Change in Metabolic Capabilities of Sediment Microbial Communities in River and Lake Ecosystems. *Int. J. Microbiol.* <https://doi.org/10.1155/2018/6234931>
- Plaža, G., Jałowicki, Ł., Głowacka, D., Hubeny, J., Harnisz, M., Korzeniewska, E., 2021. Insights into the microbial diversity and structure in a full-scale municipal wastewater treatment plant with particular regard to Archaea. *PLOS ONE* 16, e0250514. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0250514>
- Prest, E.I., Weissbrodt, D.G., Hammes, F., Loosdrecht, M.C.M. van, Vrouwenvelder, J.S., 2016. Long-Term Bacterial Dynamics in a Full-Scale Drinking Water Distribution System. *PLOS ONE* 11, e0164445. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0164445>
- Ragazzo, P., Chiuchini, N., Piccolo, V., Ostoich, M., 2013. A new disinfection system for wastewater treatment: performic acid full-scale trial evaluations. *Water Sci. Technol.* 67, 2476–2487. <https://doi.org/10.2166/wst.2013.137>
- Ragazzo, P., Chiuchini, N., Piccolo, V., Spadolini, M., Carrer, S., Zanon, F., Gehr, R., 2020. Wastewater disinfection: long-term laboratory and full-scale studies on performic acid in comparison with peracetic acid and chlorine. *Water Res.* 184, 116169. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.116169>
- Ryan, M.P., Pembroke, J.T., 2018. *Brevundimonas* spp: Emerging global opportunistic pathogens. *Virulence* 9, 480–493. <https://doi.org/10.1080/21505594.2017.1419116>
- Schleich, C., Chan, S., Pullerits, K., Besmer, M.D., Paul, C.J., Rådström, P., Keucken, A., 2019. Mapping Dynamics of Bacterial Communities in a Full-Scale Drinking Water Distribution System Using Flow Cytometry. *Water* 11, 2137. <https://doi.org/10.3390/w11102137>
- Sekar, S., Zintchem, A.A.E.A., Keshri, J., Kamika, I., Momba, M.N.B., 2014. Bacterial profiling in brine samples of the Emalahleni Water Reclamation Plant, South Africa, using 454-pyrosequencing method. *FEMS Microbiol. Lett.* 359, 55–63. <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12557>
- Selvarajan, R., Sibanda, T., Pandian, J., Mearns, K., 2021. Taxonomic and Functional Distribution of Bacterial Communities in Domestic and Hospital Wastewater System: Implications for Public and Environmental Health. *Antibiotics* 10, 1059. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10091059>
- Sibanda, T., Selvarajan, R., Tekere, M., 2019. Targeted 16S rRNA amplicon analysis reveals the diversity of bacterial communities in carwash effluents. *Int. Microbiol.* 22, 181–189. <https://doi.org/10.1007/s10123-018-00038-0>
- Steger, K., Jarvis, Å., Vasara, T., Romantschuk, M., Sundh, I., 2007. Effects of differing temperature management on development of Actinobacteria populations during composting. *Res. Microbiol., Commemoration of Felix Herelle's discovery* 158, 617–624. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2007.05.006>
- Sun, W., Xia, C., Xu, M., Guo, J., Sun, G., 2017. Seasonality Affects the Diversity and Composition of Bacterioplankton Communities in Dongjiang River, a Drinking Water Source of Hong Kong. *Front. Microbiol.* 8.

- Towner, K., 2006. The Genus *Acinetobacter*, in: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H., Stackebrandt, E. (Eds.), *The Prokaryotes: A Handbook on the Biology of Bacteria Volume 6: Proteobacteria: Gamma Subclass*. Springer, New York, NY, pp. 746–758. https://doi.org/10.1007/0-387-30746-X_25
- Urakawa, H., Ali, J., Ketover, R.D.J., Talmage, S.D., Garcia, J.C., Campbell, I.S., Loh, A.N., Parsons, M.L., 2013. Shifts of Bacterioplankton Metabolic Profiles along the Salinity Gradient in a Subtropical Estuary. *Int. Sch. Res. Not.* 2013, e410814. <https://doi.org/10.5402/2013/410814>
- Wang, B., Duran, R., Pigot, T., Cravo-Laureau, C., 2023. Safe reuse of wastewater: Effect of disinfection methods on microbial community. *J. Clean. Prod.* 419, 138291. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2023.138291>
- Wang, Q., Liang, J., Zhang, S., Yoza, B.A., Li, Q.X., Zhan, Y., Ye, H., Zhao, P., Chen, C., 2020. Characteristics of bacterial populations in an industrial scale petrochemical wastewater treatment plant: Composition, function and their association with environmental factors. *Environ. Res.* 189, 109939. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.109939>
- Wong, M.-T., Mino, T., Seviour, R.J., Onuki, M., Liu, W.-T., 2005. In situ identification and characterization of the microbial community structure of full-scale enhanced biological phosphorous removal plants in Japan. *Water Res.* 39, 2901–2914. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2005.05.015>
- Woźniak, M., Gałązka, A., Marzec-Grządziel, A., Frąc, M., 2022. Microbial Community, Metabolic Potential and Seasonality of Endosphere Microbiota Associated with Leaves of the Bioenergy Tree *Paulownia elongata* × *fortunei*. *Int. J. Mol. Sci.* 23, 8978. <https://doi.org/10.3390/ijms23168978>
- Xu, S., Yao, J., Ainiwaer, M., Hong, Y., Zhang, Y., 2018. Analysis of Bacterial Community Structure of Activated Sludge from Wastewater Treatment Plants in Winter. *BioMed Res. Int.* 2018, e8278970. <https://doi.org/10.1155/2018/8278970>
- Yang, Y., Yu, K., Xia, Y., Lau, F.T.K., Tang, D.T.W., Fung, W.C., Fang, H.H.P., Zhang, T., 2014. Metagenomic analysis of sludge from full-scale anaerobic digesters operated in municipal wastewater treatment plants. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98, 5709–5718. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5648-0>
- Zhang, L., Shen, Z., Fang, W., Gao, G., 2019. Composition of bacterial communities in municipal wastewater treatment plant. *Sci. Total Environ.* 689, 1181–1191. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.06.432>
- Zhang, T., Shao, M.-F., Ye, L., 2012. 454 Pyrosequencing reveals bacterial diversity of activated sludge from 14 sewage treatment plants. *ISME J.* 6, 1137–1147. <https://doi.org/10.1038/ismej.2011.188>
- Zhao, D., Huang, R., Zeng, J., Yu, Z., Liu, P., Cheng, S., Wu, Q.L., 2014. Pyrosequencing analysis of bacterial community and assembly in activated sludge samples from different geographic regions in China. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98, 9119–9128. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5920-3>

Résultats

Liste des Tableaux

Tableau 1 : planning d'échantillonnage

Traitement	Temps	Entrée_lagune	Sortie_lagune
Pre_Injection	07/12/2020	InPIT0	OPIT0
Pre_Injection	09/12/2020	InPIT1	OPIT1
Injection	10/12/2020	InIT2	OIT2
Injection	11/12/2020	InIT3	OIT3
Injection	14/12/2020	InIT4	OIT4
Injection	04/01/2021	InIT5	OIT5
Injection	28/01/2021	InIT6	OIT6
Post-Injection	15/03/2021	InPOT7	OPOT7
Post-Injection	19/04/2021	InPOT8	OPOT8
Post-Injection	17/05/2021	InPOT9	OPOT9
Post-Injection	14/06/2021	InPOT10	OPOT10

Table 2 : corrélation de Pearson entre l' α -diversité de l'eau et des sédiments et les paramètres environnementaux

Variables	Eau			
	Shannon	Chao1	Température	Pluviométrie
Shannon	1	0,3	-0,4	0,1
Chao1	0,3	1	** -0,6	*0,5
Température	-0,4	** -0,6	1	-0,3
Pluviométrie	0,1	*0,5	-0,3	1
Variables	Sédiment			
	Shannon	Chao1	Température	Pluviométrie
Shannon	1	0,4	0,1	0,1
Chao1	0,4	1	*-0,4	*0,4
Température	0,1	*-0,4	1	-0,3
Pluviométrie	0,1	*0,4	-0,3	1

Résultats

Tableau 3 : suivi des indices de la diversité fonctionnelle des échantillons de sédiment (a) et d'eau (b)

a)

	Entrée			Sortie			pvalue (Anova)		
	Pre_Inj	Injct	Post-Inj	Pre_Inj	Injct	Post-Inj	Traitement	Position	Traitementxposition
Shannon-Wiener (H')	2,9±0,002	2,01±0,3	3,35±1,9	3,05±0,02	2,43±0,2	3,2±1,1	<i>*0,02</i>	<i>ns0,54</i>	<i>ns0,16</i>
Richesse (S)	18±0,02	16± 1,5	21 ± 4	20,1± 0,03	18,8± 2,5	23,5± 3	<i>*0,03</i>	<i>ns0,73</i>	<i>*0,04</i>
Uniformité (E)	1,03±0,0003	0,72±0,08	1,08±0,01	1,01±0,01	0,83±0,04	1,02±0,3	<i>*0,04</i>	<i>ns0,69</i>	<i>ns0,19</i>
AWCD_Sédiment	0,45 ±0,012	0,44±0,08	0,93±0,7	0,65±0,15	0,57±0,05	0,82±0,39	<i>*0,048</i>	<i>ns0,51</i>	<i>ns0,28</i>

b)

	Entrée			Sortie			pvalue (Anova)		
	Pre_Inj	Injct	Post-Inj	Pre_Inj	Injct	Post-Inj	Traitement	Position	Traitementxposition
Shannon-Wiener (H')	2,3±0,02	2,3±0,15	2,4±0,62	3 ±0,12	2,3±0,13	2,7±0,35	<i>ns0,4</i>	<i>ns0,26</i>	<i>ns0,5</i>
Richesse (S)	5,3±0,3	4,7 ±0,38	7,2 ± 4,72	17 ± 0,2	5,7 ± 1,35	10 ± 5,5	<i>ns0,2</i>	<i>ns0,17</i>	<i>ns0,16</i>
Uniformité (E)	1,4±0,06	1,5±0,07	1,3±0,22	1,1±0,3	1,3±0,1	1,3±0,27	<i>ns0,3</i>	<i>ns0,16</i>	<i>ns0,49</i>
AWCD_Eau	0,14±0,03	0,13±0,01	0,21±0,06	0,38±0,002	0,14±0,02	0,24±0,08	<i>*0,02</i>	<i>*0,02</i>	<i>ns0,07</i>

Résultats

Tableau 4 : dégradation des groupes de substrats par les communautés présentes dans les sédiments (a) et la colonne d'eau (b)

a)

	Entrée			Sortie			pvalue (Anova)		
	Pre_Inj	Inject	Post_Inj	Pre_Inj	Inject	Post_Inj	Traitement	Position	Traitementxposition
Carbohydrates	0,11±0,002	0,11±0,02	0,26±0,18	0,15±0,002	0,14±0,02	0,21±0,12	*0,035	ns0,87	ns0,5
Polymères	0,05±0,003	0,06±0,03	0,11±0,08	0,07±0,05	0,07±0,02	0,12±0,06	ns0,08	ns0,5	ns0,9
Acides carboxyliques	0,14±0,004	0,13±0,05	0,24±0,23	0,24±0,06	0,17±0,04	0,24±0,13	ns0,23	ns0,36	ns0,7
Composés phénoliques	0,03±0,0003	0,03±0,02	0,04±0,01	0,03±0,01	0,04±0,01	0,05±0,04	ns0,45	ns0,45	ns0,9
Acides aminés	0,1±0,004	0,1±0,01	0,18±0,01	0,12±0,02	0,11±0,01	0,18±0,06	*0,035	ns0,6	ns0,9
Amines/Amides	0,02±0,0001	0,015±0,004	0,06±0,06	0,03±0,002	0,03±0,01	0,026±0,001	ns0,15	ns0,8	ns0,06
AWCD_SED	0,45 ±0,012	0,44±0,08	0,93±0,7	0,65±0,15	0,57±0,05	0,82±0,39	*0,048	ns0,51	ns0,28

b)

	Entrée			Sortie			pvalue (Anova)		
	Pre_Inj	Inject	Post_Inj	Pre_Inj	Inject	Post_Inj	Traitement	Position	Traitementxposition
Carbohydrates	0,12±0,01	0,1±0,02	0,26±0,15	0,48±0,04	0,12±0,01	0,24±0,14	ns0,08	ns0,5	ns0,08
Polymères	0,32±0,02	0,4±0,04	0,41±0,14	0,34±0,07	0,40±0,05	0,38±0,12	ns0,5	ns0,7	ns0,95
Acides carboxyliques	0,02±0,002	0,02±0,01	0,08±0,07	0,27±0,08	0,03±0,03	0,12±0,08	ns0,11	ns0,22	*0,04
Composés phénoliques	0,014±0,006	0,02±0,01	0,06±0,08	0,36±0,006	0,02±0,01	0,13±0,14	ns0,17	ns0,18	ns0,06
Acides aminés	0,37±0,06	0,2±0,03	0,29±0,24	0,5±0,09	0,3±0,08	0,5±0,03	ns0,14	ns0,08	ns0,18
Amines/Amides	0,05±0,001	0,06±0,03	0,39±0,43	0,4±0,1	0,04±0,01	0,15±0,14	ns0,15	ns0,6	ns0,36
AWCD_EAU	0,14±0,03	0,13±0,01	0,21±0,06	0,38±0,002	0,14±0,02	0,24±0,08	*0,02	*0,02	ns0,07

Résultats

Tableau 5 : Indices de Chao1 et de Shannon dans les échantillons d'eau et de sédiment de la lagune à l'entrée et à la sortie durant les trois phases de traitement (pré-injection, injection et post-injection)

	Chao1				Shannon			
	Sédiment		Eau		Sédiment		Eau	
Traitement	Entrée	Sortie	Entrée	Sortie	Entrée	Sortie	Entrée	Sortie
Pre_Inj	20088	21253	39639	29937	5,9	6,3	5,6	5,6
Pre_Inj	22156	21265	31523	27727	5,8	6,0	6,7	6,5
Inject	15767	21831	35960	30528	6,1	6,3	6,8	6,9
Inject	21658	21689	32417	62699	5,7	6,1	5,3	5,1
Inject	21107	22217	25246	32529	6,4	6,0	3,2	3,1
Inject	20891	23072	27530	39611	6,4	6,3	5,8	5,1
Inject	16351	12479	30153	40062	4,7	5,5	5,1	4,8
Post_Inj	14178	14991	37608	30821	5,9	5,8	4,9	4,9
Post_Inj	14152	12715	11253	10909	6,2	6,0	4,4	4,3
Post_Inj	14498	13863	12962	11172	5,7	6,0	5,3	4,8
Post_Inj	15871	13705	9902	10935	6,2	6,0	4,2	4,3

Moyennes	Chao1				Shannon			
	Sédiment		Eau		Sédiment		Eau	
Traitement	Entrée	Sortie	Entrée	Sortie	Entrée	Sortie	Entrée	Sortie
Pre_Inj	21122 ±1462	21259 ±9	35581 ±5730	28832 ±1562	5,9 ±0	6,2 ±0,2	6,2 ±0,7	6 ±0,6
Inject	19154 ±2847	20257 ±4382	30261 ±4176	41085 ±12798	5,9 ±1	6,05 ±0,3	5,26 ±1	5 ±1
Post_Inj	14674 ±813	13818 ±932	17931 ±13177	15959 ±9908	6 ±0,3	5,9 ±0,1	4,6 ±0,5	4,5 ±0,3

Conclusion et perspectives

Les travaux de cette thèse se sont inscrits dans deux projets de recherche : MeSeine Innovation, piloté par la Direction Innovation du SIAAP, et NOROVIRUS porté par le SMBT. Les objectifs étaient de :

- (i) Caractériser les communautés microbiennes de la Seine de l'amont à l'aval de l'agglomération parisienne afin d'établir un état de référence de ces communautés avant la mise en place de la désinfection au PFA des rejets de la STEP Seine Valenton
- (ii) Regarder les effets potentiels de rejets de STEP traités au PFA sur les communautés microbiennes du milieu récepteur. Deux approches ont été suivies : l'une en microcosme (conditions opératoires contrôlées), l'autre *in situ* (sur la lagune recevant les rejets traités au PFA de la STEP de Mèze (34).

Etude des communautés bactériennes de la Seine

Les variabilités spatiales et temporelles des communautés microbiennes de la Seine, conduites selon deux approches (4 saisons d'une même année vs. 2 saisons (été et automne) pour deux années (2020 et 2021)) ont mis en évidence les principaux phyla composant le microbiome des eaux de surface à savoir : *Proteobacteria*, *Actinobacteriota*, *Firmicutes* et *Bacteroidota*. Par ailleurs, la présence des *Alphaproteobacteria* et des *Gammaproteobacteria* (du phylum *Proteobacteria*) suggère que la Seine contient des composés organiques récalcitrants apportés probablement par les rejets des STEP. De plus, il est ressorti de nos observations une forte variabilité temporelle et une faible variabilité spatiale de la structure de la communauté bactérienne. Les communautés bactériennes évoluent peu d'un site à un autre à l'exception de quelques différences mineures entre l'amont et l'aval de l'agglomération parisienne en lien avec la température et les concentrations en nutriments (nitrates et orthophosphates) et en carbone organique. La comparaison entre 2020 et 2021 a montré la proportion de protéobactéries étaient plus faibles en 2020 qu'en 2021 alors qu'à l'inverse les cyanobactéries étaient plus présentes en 2020 qu'en 2021 pour les deux saisons. Aussi, la composition bactérienne de la Seine en 2020 était significativement différente de celle de 2021. Cette différence s'explique par des fluctuations de débit entre les deux années, les faibles débits en 2020 ont favorisé le développement des cyanobactéries.

Nos résultats montrent que notre premier site d'expérimentation (Juvisy-sur-Orge) est déjà soumis à une forte pression anthropique. Il serait donc intéressant de caractériser les communautés microbiennes sur des sites plus amont, en tête de bassin, pour identifier où l'impact anthropique sur les communautés microbiennes commence véritablement. Pour confirmer l'hypothèse de la variabilité évoquée précédemment des microorganismes liée à la présence de composés organiques récalcitrants et/ou micropolluants, nous envisageons de réaliser (i) des mesures des niveaux de contaminants émergents soit par screening ciblé (avec le risque de ne pas chercher les « bonnes » molécules) ou par screening non ciblé (par comparaison des empreintes observées entre l'amont et l'aval de point stratégiques) et (ii) une analyse par Fluo 3D de la matière organique. Cette dernière approche est envisagée dans le cadre de la 2^e phase du programme MeSeine Innovation avec le déploiement de sondes Fluocopée® sur la zone SIAAP. **Les résultats de la présente étude fournissent une base de données de référence sur la diversité microbienne de la Seine pour l'agglomération parisienne avant la mise en œuvre de la désinfection au PFA.**

Étude des communautés bactériennes de la Seine suite à la désinfection au PFA de rejets de STEP en conditions contrôlées

Les communautés bactériennes ont été caractérisés d'une part dans les rejets de la STEP Seine centre (92), avec et sans traitement au PFA, et d'autre part dans l'eau de Seine, avant et après mélange avec des rejets de STEP traités au PFA. Les plans d'expérience appliqués ont permis de

couvrir différentes situations pour évaluer finement l'efficacité de la désinfection à l'acide performique sur les communautés microbiennes : en faisant varier la concentration en PFA entre 0 et 4 mg/l et le temps de contact entre 0 et 60 min, couvrant ainsi une large gamme de CT s'échelonnant entre 0 et 240 mg/l•min. L'étude du mélange rejet traité au PFA – eau de Seine a été conduite aux conditions opérationnelles envisagées par le SIAAP : 2 mg/l pendant 10 min (équivalent à un CT de 20 mg/l•min).

L'effet du PFA sur les communautés microbiennes de l'effluent de Seine centre a été mis en évidence même à une faible valeur de CT de 8 mg/l•min, démontrant son efficacité à de faibles concentrations et à des temps de contact courts. Certains genres bactériens ont montré une sensibilité au PFA, notamment *Flavobacterium*, *Pedobacter*, *Massilia*, *Exiguobacterium* et *Sphingorhabdus*, tandis que d'autres ont montré une résistance, comme *Acinetobacter*, *Leucobacter*, *Thiothrix*, *Paracoccus*, *Cloacibacterium* et *Hydrogenophaga* au regard de leur structure membranaire Gram positive ou Gram négative. En conclusion, ces résultats soulignent l'efficacité du PFA dans la réduction de l'abondance microbienne et la modification des communautés bactériennes à de faibles concentrations et à des temps de contact courts.

L'étude cinétique des communautés microbiennes du mélange rejet traité au PFA – eau de Seine durant 60 min a mis en évidence, quinze minutes après le mélange, une diminution de l'abondance microbienne de 6 % due à la présence potentielle de PFA résiduel, cohérent avec le temps de demi-vie du PFA. Au-delà de ces quinze minutes, l'abondance microbienne ne varie plus soulignant la disparition complète du PFA et l'absence d'effet rémanent. Les autres paramètres suivis (activité et diversité microbiennes) présentent les mêmes profils pour les mélanges Eau de Seine-rejet traité ou non au PFA au-delà de 15 min. D'un point de vue opérationnel, il serait nécessaire de s'assurer, afin de minimiser tout impact du PFA sur les communautés microbiennes du milieu, que le transfert d'un rejet traité au PFA vers le milieu récepteur se fasse *a minima* 30 minutes après l'ajout du PFA. D'autres expériences et mesures sont nécessaires pour confirmer les effets mineurs observés durant les 15 premières minutes. ***Cette étude apporte un premier retour d'expérience dans des conditions d'exploitation soulignant l'impact réduit des rejets traités au PFA sur les communautés microbiennes du milieu récepteur.***

Étude des communautés bactériennes dans une lagune suite à la désinfection au PFA des rejets de la STEP de Mèze

Le projet NOROVIRUS, piloté par le SMBT, a été l'opportunité de faire un suivi sur le terrain des communautés microbiennes). L'impact écologique à court terme sur les microorganismes libres (matrice eau) ainsi que l'impact à long terme sur les microorganismes liés (matrice sédiment) ont été suivis durant six mois (de décembre 2020 à juin 2021). Trois phases ont été distinguées au cours du temps : (i) une phase avant l'injection du PFA pour caractériser les diversités microbiennes de référence pour la colonne d'eau et le sédiment, (ii) pendant la période de désinfection et, enfin (iii) à la suite de l'arrêt du traitement. Les mêmes approches que dans les études précédentes ont été utilisées pour permettre de comparer ces nouvelles données à celles déjà générées.

Les résultats de cette étude ont montré une stabilité de l'abondance bactérienne dans les sédiments de la lagune quelle que soit la phase considérée alors que des variations ont été observées dans la colonne d'eau, notamment après la fin du traitement au PFA. Ces variations semblent être plus influencées par des facteurs environnementaux tels que la température et la pluviométrie que par l'action du PFA. L'étude a mis également en lumière des différences dans la diversité et la composition des communautés bactériennes entre les échantillons d'eau et de sédiment. Par exemple, certains phyla bactériens dominants *Proteobacteria*, *Bacteroidota*, et *Actinobacteria*

varient entre les deux matrices. De plus, certains genres bactériens spécifiques montrent une réponse différente à l'action de l'acide performique, ce qui se reflète dans leur abondance relative. La lagune étudiée étant ouverte, ses communautés bactériennes restent sensibles aux variations saisonnières. ***Cette recherche souligne l'importance des facteurs environnementaux comme la température dans la dynamique des communautés bactériennes, ainsi que la variabilité de la réponse des différentes communautés à un traitement spécifique comme celui à l'acide performique.***

Références

- Acosta, F., Bravo, J., Monzón-Atienza, L., Galindo-Villegas, J., Torrecillas, S., Montero, D., 2022. Peracetic acid can be used as a disinfectant for gilthead sea bream (*Sparus aurata*) juveniles without affecting fish welfare. *Aquac. Rep.* 24, 101107. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2022.101107>
- Adam, G., Duncan, H., 2001. Development of a sensitive and rapid method for the measurement of total microbial activity using fluorescein diacetate (FDA) in a range of soils. *Soil Biol. Biochem.* 33, 943–951. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(00\)00244-3](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(00)00244-3)
- Amblard, C., Boisson, J.C., Bourdier, G., Fontvieille, D., Gayte, X., Sime-Ngando, T., 2005b. Écologie microbienne en milieu aquatique: des virus aux protozoaires. *Rev. Sci. Eau* 11, 145–162. <https://doi.org/10.7202/705336ar>
- Angelotti, N., 2022. Open water swimming in urban areas *E. coli* distribution with TELEMAC-3D.
- Aslan, A., Xagorarakis, I., Simmons, F.J., Rose, J.B., Dorevitch, S., 2011. Occurrence of adenovirus and other enteric viruses in limited-contact freshwater recreational areas and bathing waters. *J. Appl. Microbiol.* 111, 1250–1261. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2011.05130.x>
- Baldry, M. G. C., 1983. The bactericidal, fungicidal and sporicidal properties of hydrogen peroxide and peracetic acid. *J. Appl. Bacteriol.* 54, 417–423. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1983.tb02637.x>
- Baldry, M.G.C., French, M.S., Slater, D., 1991. The Activity of Peracetic Acid on Sewage Indicator Bacteria and Viruses. *Water Sci. Technol.* 24, 353–357. <https://doi.org/10.2166/wst.1991.0089>
- Barka, E.A., Vatsa, P., Sanchez, L., Gaveau-Vaillant, N., Jacquard, C., Klenk, H.-P., Clément, C., Ouhdouch, Y., van Wezel, G.P., 2015. Taxonomy, Physiology, and Natural Products of Actinobacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 80, 1–43. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00019-15>
- Behera, S.K., Kim, H.W., Oh, J.-E., Park, H.-S., 2011. Occurrence and removal of antibiotics, hormones and several other pharmaceuticals in wastewater treatment plants of the largest industrial city of Korea. *Sci. Total Environ.* 409, 4351–4360. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2011.07.015>
- Benarde, M.A., Snow, W.B., Olivieri, V.P., Davidson, B., 1967. Kinetics and Mechanism of Bacterial Disinfection by Chlorine Dioxide. *APPL MICROBIOL.*
- Berthe, T., Ratajczak, M., Clermont, O., Denamur, E., Petit, F., 2013. Evidence for Coexistence of Distinct *Escherichia coli* Populations in Various Aquatic Environments and Their Survival in Estuary Water. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 4684–4693. <https://doi.org/10.1128/AEM.00698-13>
- Beshiru, A., Igbinosa, I.H., Omeje, F.I., Ogofure, A.G., Eyong, M.M., Igbinosa, E.O., 2017. Multi-antibiotic resistant and putative virulence gene signatures in *Enterococcus* species isolated from pig farms environment. *Microb. Pathog.* 104, 90–96. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.01.020>
- Bettarel, Y., Sime-Ngando, T., Amblard, C., Carrias, J.-F., Portelli, C., 2003. Virioplankton and microbial communities in aquatic systems: a seasonal study in two lakes of differing trophic: *Virus dynamics in aquatic systems*. *Freshw. Biol.* 48, 810–822. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2427.2003.01064.x>
- Bettarel, Y., Sime-Ngando, T., Amblard, C., Laveran, H., 2000. A Comparison of Methods for Counting Viruses in Aquatic Systems. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 2283–2289.
- Bitton, G., 2005. *Wastewater Microbiology*. John Wiley & Sons.
- Block, S.S., 1983. *Disinfection, sterilization and preservation*. 3rd edition. *Disinfect. Steriliz. Preserv.* 3rd Ed.
- Bonin, D.J., Travers, M., 1992. A critical examination of present methods for estimating biomass and activity of microorganisms in aquatic environments.
- Borrego, J.J., Moriñigo, M.A., de Vicente, A., Córnaix, R., Romero, P., 1987. Coliphages as an indicator of faecal pollution in water. Its relationship with indicator and pathogenic microorganisms. *Water Res.* 21, 1473–1480. [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(87\)90130-8](https://doi.org/10.1016/0043-1354(87)90130-8)
- Brasileiro, L.B., Colodette, J.L., Piló-Veloso, D., 2001. A utilização de perácidos na deslignificação e no branqueamento de polpas celulósicas. *Quím. Nova* 24, 819–829. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422001000600020>
- Broutin, M., Caffier, G., Madi, F., Artigas, L.F., 2011. Synthèse bibliographique sur les techniques de suivi de l'abondance, biomasse et diversité du phytoplancton en eaux marines 30.

Références

- Cai, Y., Zhao, Y., Yadav, A.K., Ji, B., Kang, P., Wei, T., 2023. Ozone based inactivation and disinfection in the pandemic time and beyond: Taking forward what has been learned and best practice. *Sci. Total Environ.* 862, 160711. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.160711>
- Callieri, C., 2008. Picophytoplankton in Freshwater Ecosystems: The Importance of Small-Sized Phototrophs. *Freshw. Rev.* 1, 1–28. <https://doi.org/10.1608/FRJ-1.1.1>
- Campo, N., De Flora, C., Maffettone, R., Manoli, K., Sarathy, S., Santoro, D., Gonzalez-Olmos, R., Auset, M., 2020. Inactivation kinetics of antibiotic resistant *Escherichia coli* in secondary wastewater effluents by peracetic and performic acids. *Water Res.* 169, 115227. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.115227>
- Caniani, D., Caivano, M., Mazzone, G., Masi, S., Mancini, I.M., 2021. Effect of site-specific conditions and operating parameters on the removal efficiency of petroleum-originating pollutants by using ozonation. *Sci. Total Environ.* 800, 149393. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.149393>
- Carré, C., 2000 L'impact des orages sur la gestion des réseaux d'eau potable et d'assainissement dans l'agglomération parisienne en 1999 In : Les orages dans l'espace francilien [en ligne]. Paris : Éditions de la Sorbonne. Disponible sur Internet : <<http://books.openedition.org/psorbonne/31299>>. ISBN : 9791035101237. DOI : <https://doi.org/10.4000/books.psorbonne.31299>.
- Castro-Hermida, J.A., García-Presedo, I., Almeida, A., González-Warleta, M., Correia Da Costa, J.M., Mezo, M., 2008. Contribution of treated wastewater to the contamination of recreational river areas with *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis*. *Water Res.* 42, 3528–3538. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2008.05.001>
- Cataldo, F., 2006. Ozone Degradation of Biological Macromolecules: Proteins, Hemoglobin, RNA, and DNA. *Ozone Sci. Eng.* 28, 317–328. <https://doi.org/10.1080/01919510600900290>
- Chamier, A.-C., 1987. Effect of pH on Microbial Degradation of Leaf Litter in Seven Streams of the English Lake District. *Oecologia* 71, 491–500.
- Chelkowska, K., Grasso, D., Fábíán, I., Gordon, G., 1992. Numerical Simulations of Aqueous Ozone Decomposition. *Ozone Sci. Eng.* 14, 33–49. <https://doi.org/10.1080/01919519208552316>
- Chhetri, R.K., Thornberg, D., Berner, J., Gramstad, R., Öjstedt, U., Sharma, A.K., Andersen, H.R., 2014. Chemical disinfection of combined sewer overflow waters using performic acid or peracetic acids. *Sci. Total Environ.* 490, 1065–1072. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.05.079>
- Cho, M., Kim, J., Kim, J.Y., Yoon, J., Kim, J.-H., 2010. Mechanisms of *Escherichia coli* inactivation by several disinfectants. *Water Res.* 44, 3410–3418. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.03.017>
- Chocat, B. (1997). *Encyclopédie de l'hydrologie urbaine et de l'assainissement*, Éditions TEC ET DOC (Lavoisier), 1124 p
- Chróst, R.J., 1991. Environmental Control of the Synthesis and Activity of Aquatic Microbial Ectoenzymes, in: Brock, T.D., Chróst, R.J. (Eds.), *Microbial Enzymes in Aquatic Environments*. Springer New York, New York, NY, pp. 29–59. https://doi.org/10.1007/978-1-4612-3090-8_3
- Cornelisen, C., Gillespie, P., Kirs, M., Young, R., Forrest, R., Barter, P., Knight, B., Harwood, V., 2011. Motueka River plume facilitates transport of ruminant faecal contaminants into shellfish growing waters, Tasman Bay, New Zealand. *N. Z. J. Mar. Freshw. Res.* 45, 477–495. <https://doi.org/10.1080/00288330.2011.587822>
- Corre, E., 2000. *Approches moléculaires de la diversité microbienne de deux environnements extrêmes: les sources hydrothermales profondes et les réservoirs pétroliers*. Thèse Univ. Bretagne Occident. 187.
- Crump, J.A., Okoth, G.O., Slutster, L., Ogaja, D.O., Keswick, B.H., Luby, S.P., 2004. Effect of point-of-use disinfection, flocculation and combined flocculation - Disinfection on drinking quality in western Kenya. *J. Appl. Microbiol.* 97, 225–231. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02309.x>
- da Silva, W.P., Carlos, T.D., Cavallini, G.S., Pereira, D.H., 2020. Peracetic acid: Structural elucidation for applications in wastewater treatment. *Water Res.* 168, 115143. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.115143>
- Degrémont (1989). *Mémento technique de l'eau*. Edition Lavoisier, tome 2, 1459 p
- Delmas, M., Saby, N., Arrouays, D., Dupas, R., Lemercier, B., Pellerin, S., Gascuel-Oudou, C., 2015. Explaining and mapping total phosphorus content in French topsoils. *Soil Use Manag.* 31, 259–269. <https://doi.org/10.1111/sum.12192>

Références

- Deshayes S. (2015) Identification des sources de phtalates et d'alkylphénols (polluants émergents) en milieu urbain et compréhension des processus d'élimination. Thèse de doctorat en sciences et techniques de l'environnement, Université Paris-Est, 252 p
- Di Paolo, N., Bocci, V., Gaggiotti, E., 2004. Ozone Therapy. *Int. J. Artif. Organs* 27, 168–175. <https://doi.org/10.1177/039139880402700303>
- Digabel, Y.L., 2013. Etude de la diversité bactérienne et génétique dans des cultures dégradant l'ETBE ou le MTBE. Thèse Univ. Lyon 177.
- Ding, N., Li, Z., Jiang, L., Liu, H., Zhang, Y., Sun, Y., 2023. Kinetics and mechanisms of bacteria disinfection by performic acid in wastewater: In comparison with peracetic acid and sodium hypochlorite. *Sci. Total Environ.* 878, 162606. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.162606>
- Drury, B., Rosi-Marshall, E., Kelly, J.J., 2013. Wastewater Treatment Effluent Reduces the Abundance and Diversity of Benthic Bacterial Communities in Urban and Suburban Rivers. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 1897–1905. <https://doi.org/10.1128/AEM.03527-12>
- DuPont, H.L., Levine, M.M., Hornick, R.B., Formal, S.B., 1989. Inoculum size in shigellosis and implications for expected mode of transmission. *J. Infect. Dis.* 159, 1126–1128. <https://doi.org/10.1093/infdis/159.6.1126>
- Eymard, S., 2010. Evaluation de la qualité bactériologique de la Marne et proposition d'un protocole de suivi dans l'optique de la réouverture des baignades en Marne dans le département du Val-de-Marne.
- Falsanisi, D., Gehr, R., Santoro, D., Dell'Erba, A., Notarnicola, M., Liberti, L., 2006. Kinetics of PAA Demand and its Implications on Disinfection of Wastewaters. *Water Qual. Res. J.* 41, 398–409. <https://doi.org/10.2166/wqrj.2006.043>
- Fenner, N., Freeman, C., Reynolds, B., 2005. Hydrological effects on the diversity of phenolic degrading bacteria in a peatland: implications for carbon cycling. *Soil Biol. Biochem.* 37, 1277–1287. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2004.11.024>
- Flipo, N., Lestel, L., Labadie, P., Meybeck, M., Garnier, J., 2021. Trajectories of the Seine River Basin, in: Flipo, N., Labadie, P., Lestel, L. (Eds.), *The Seine River Basin, The Handbook of Environmental Chemistry*. Springer International Publishing, Cham, pp. 1–28. https://doi.org/10.1007/698_2019_437
- Fraser, J.A.L., Godfree, A.F., Jones, F., 1985. Use of Peracetic Acid in Operational Sewage Sludge Disposal to Pasture. *Water Sci. Technol.* 17, 451–466. <https://doi.org/10.2166/wst.1985.0151>
- Fridovich, I., 2022. Reprint of: Biological Effects of the Superoxide Radical. *Arch. Biochem. Biophys.*, Celebrating Eighty Years of Archives of Biochemistry and Biophysics 726, 109228. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2022.109228>
- Friedberg, E.C., Friedberg, E.C. (Eds.), 2006. *DNA repair and mutagenesis*, 2nd ed. ed. ASM Press, Washington, D.C.
- Fuhrman, J.A., 1999. Marine viruses and their biogeochemical and ecological effects. *Nature* 399, 541–548. <https://doi.org/10.1038/21119>
- Gallas-Lindemann, C., Sotiriadou, I., Plutzer, J., Karanis, P., 2013. Prevalence and distribution of *Cryptosporidium* and *Giardia* in wastewater and the surface, drinking and ground waters in the Lower Rhine, Germany. *Epidemiol. Infect.* 141, 9–21. <https://doi.org/10.1017/S0950268812002026>
- Gao, Y., Wang, C., Zhang, W., Di, P., Yi, N., Chen, C., 2017. Vertical and horizontal assemblage patterns of bacterial communities in a eutrophic river receiving domestic wastewater in southeast China. *Environ. Pollut.* 230, 469–478. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.06.081>
- García-Aljaro, C., Martín-Díaz, J., Viñas-Balada, E., Calero-Cáceres, W., Lucena, F., Blanch, A.R., 2017. Mobilisation of microbial indicators, microbial source tracking markers and pathogens after rainfall events. *Water Res.* 112, 248–253. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.02.003>
- Garcia-Pichel, F., 2009. Cyanobacteria, in: Schaechter, M. (Ed.), *Encyclopedia of Microbiology (Third Edition)*. Academic Press, Oxford, pp. 107–124. <https://doi.org/10.1016/B978-012373944-5.00250-9>
- Gardoni, D., Vailati, A., Canziani, R., 2012. Decay of Ozone in Water: A Review. *Ozone Sci. Eng.* 34, 233–242. <https://doi.org/10.1080/01919512.2012.686354>

Références

- Garnier, F., n.d. Contribution à l'évaluation biogéochimique des impacts liés à l'exploitation géothermique des aquifères superficiels: Expérimentations et simulations à l'échelle d'un pilote et d'installations réelles 315.
- Gehr, R., Chen, D., Moreau, M., 2009. Performic acid (PFA): tests on an advanced primary effluent show promising disinfection performance. *Water Sci. Technol.* 59, 89–96. <https://doi.org/10.2166/wst.2009.761>
- Gehr, R., Cochrane, D., 2002. Peracetic acid (PAA) as a disinfectant for municipal wastewaters: encouraging performance results from physicochemical as well as biological effluents. Presented at the Disinfection and Reuse Symposium 2002, Water Environment Federation, pp. 182–198.
- Gendrin, M., 2010. Cooperation between local and systemic responses in the antibacterial defenses of *Drosophila*.
- George, I., Anzil, A., Lanckman, R., Meyer, N., Berthe, T., Petit, F., Fechner, L., Servais, P., 2012. Axe 4 Bloc 2A : Communautés microbiennes dans les rivières du bassin de la Seine: diversité et lien avec la présence de polluants chimiques 10.
- Gesto, M., Liu, D., Pedersen, L.-F., Meinelt, T., Straus, D.L., Jokumsen, A., 2018. Confirmation that pulse and continuous peracetic acid administration does not disrupt the acute stress response in rainbow trout. *Aquaculture* 492, 190–194. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.04.009>
- Gilbert-Pawlik S (2011). Devenir des polybromodiphényl ethers et des alkylphenols dans les filières de traitement des eaux usées. Cas des fonctionnements optimisés par temps sec et dégradés par temps de pluies. Thèse de doctorat en sciences et techniques de l'environnement, Université Paris-Est, 298 p
- Goetghebuer, L., 2019. Les communautés bactériennes de rivières: étude de la dynamique des espèces au sein d'une communauté modèle. Université Libre de Belgique.
- Got, P., Baleux, B., Troussellier, M., 1993. Dénombrements directs des bactéries des milieux aquatiques par microscopie en épifluorescence : comparaison entre un système d'analyse d'images automatisé (Mudicam®) et l'observation visuelle. *Rev. Sci. Eau* 6, 269–284. <https://doi.org/10.7202/705176ar>
- Green, V.S., Stott, D.E., Diack, M., 2006. Assay for fluorescein diacetate hydrolytic activity: Optimization for soil samples. *Soil Biol. Biochem.* 38, 693–701. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2005.06.020>
- Grunditz, C., Dalhammar, G., 2001. Development of nitrification inhibition assays using pure cultures of nitrosomonas and nitrobacter. *Water Res.* 35, 433–440. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(00\)00312-2](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(00)00312-2)
- Guiselin, N., 2010. Etude de la dynamique des communautés phytoplanctoniques par microscopie et cytométrie en flux, en eaux côtières de la Manche orientale. Thèse Univ. Littoral CÔTE D'OPALE 237.
- Handelsman, J., 2004. Metagenomics: Application of Genomics to Uncultured Microorganisms. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 68, 669–685. <https://doi.org/10.1128/MMBR.68.4.669-685.2004>
- Hara, S., Terauchi, K., Koike, I., 1991. Abundance of Viruses in Marine Waters: Assessment by Epifluorescence and Transmission Electron Microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 2731–2734. <https://doi.org/10.1128/AEM.57.9.2731-2734.1991>
- Heinonen-Tanski, H., Miettinen, H., 2010. PERFORMIC ACID AS A POTENTIAL DISINFECTANT AT LOW TEMPERATURE: PERFORMIC ACID AS POTENTIAL DISINFECTANT. *J. Food Process Eng.* 33, 1159–1172. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4530.2008.00332.x>
- Helmi, K., 2016. Application de la cytométrie en flux pour le contrôle microbiologique de l'efficacité de traitements de l'eau. Thèse Univ. Cergy-Pontoise 161.
- Hennes, K.P., Suttle, C.A., 1995. Direct counts of viruses in natural waters and laboratory cultures by epifluorescence microscopy. *Limnol. Oceanogr.* 40, 1050–1055. <https://doi.org/10.4319/lo.1995.40.6.1050>
- Herndl, G.J., Faganeli, J., Fanuko, N., Peduzzi, P., Turk, V., 1987. Role of Bacteria in the Carbon and Nitrogen Flow between Water-Column and Sediment in a Shallow Marine Bay (Bay of Piran, Northern Adriatic Sea). *Mar. Ecol.* 8, 221–236. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0485.1987.tb00185.x>

Références

- Hijnen, W.A.M., Beerendonk, E.F., Medema, G.J., 2006. Inactivation credit of UV radiation for viruses, bacteria and protozoan (oo)cysts in water: A review. *Water Res.* 40, 3–22. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2005.10.030>
- Hijnen, W.A.M., van der Veer, A.J., Beerendonk, E.F., Medema, G.J., 2004. Increased resistance of environmental anaerobic spores to inactivation by UV. *Water Supply* 4, 55–61. <https://doi.org/10.2166/ws.2004.0028>
- Hooper, D.U., Chapin, F.S., Ewel, J.J., Hector, A., Inchausti, P., Lavorel, S., Lawton, J.H., Lodge, D.M., Loreau, M., Naeem, S., Schmid, B., Setälä, H., Symstad, A.J., Vandermeer, J., Wardle, D.A., 2005. EFFECTS OF BIODIVERSITY ON ECOSYSTEM FUNCTIONING: A CONSENSUS OF CURRENT KNOWLEDGE. *Ecol. Monogr.* 75, 3–35. <https://doi.org/10.1890/04-0922>
- Hrudey, S.E., Hrudey, E.J., 2007. Published Case Studies of Waterborne Disease Outbreaks—Evidence of a Recurrent Threat. *Water Environ. Res.* 79, 233–245. <https://doi.org/10.2175/106143006X95483>
- Hunter, P.R., 2003. Climate change and waterborne and vector-borne disease. *J. Appl. Microbiol.* 94 Suppl, 37S-46S. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.94.s1.5.x>
- Imam, T.S., 2009. The complexities in the classification of protozoa: a challenge to parasitologists. *Bayero J. Pure Appl. Sci.* 2, 159–164. <https://doi.org/10.4314/bajopas.v2i2.63805>
- Ittner, L.D., Junghans, M., Werner, I., 2018. Aquatic Fungi: A Disregarded Trophic Level in Ecological Risk Assessment of Organic Fungicides. *Front. Environ. Sci.* 6.
- Jin, Q., Kirk, M.F., 2018. pH as a Primary Control in Environmental Microbiology: 1. Thermodynamic Perspective. *Front Env. Sci* 6, 21. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2018.00021>
- Jobard-Portas, M.J., 2013. Diversité phylogénétique et fonctionnelle des Eumycètes dans les écosystèmes pélagiques.
- Jolivet-Gougeon, A., Braux, A.S., Sauvager, F., Arturo-Schaan, M., Cormier, M., 1996. Influence of peracetic acid on *Escherichia coli* H10407 strain in laboratory microcosms. *Can. J. Microbiol.* 42, 60–65. <https://doi.org/10.1139/m96-008>
- Karpova, T., Pekonen, P., Gramstad, R., Öjstedt, U., Laborda, S., Heinonen-Tanski, H., Chávez, A., Jiménez, B., 2013. Performic acid for advanced wastewater disinfection. *Water Sci. Technol.* 68, 2090–2096. <https://doi.org/10.2166/wst.2013.468>
- Kaur, H., Hippargi, G., Pophali, G.R., Bansiwali, A.K., 2019. 6 - Treatment methods for removal of pharmaceuticals and personal care products from domestic wastewater, in: Prasad, M.N.V., Vithanage, M., Kapley, A. (Eds.), *Pharmaceuticals and Personal Care Products: Waste Management and Treatment Technology*. Butterworth-Heinemann, pp. 129–150. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816189-0.00006-8>
- Kay, D., Fleisher, J.M., Salmon, R.L., Jones, F., Wyer, M.D., Godfree, A.F., Zelenauach-Jacquotte, Z., Shore, R., 1994. Predicting likelihood of gastroenteritis from sea bathing: results from randomised exposure. *Lancet Lond. Engl.* 344, 905–909. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(94\)92267-5](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(94)92267-5)
- Kenzaka, T., Yamaguchi, N., Prapagdee, B., Mikami, E., Nasu, M., 2001. Bacterial Community Composition and Activity in Urban Rivers in Thailand and Malaysia. *J. Health Sci.* 47, 353–361. <https://doi.org/10.1248/jhs.47.353>
- Kim, K.H., Yoon, Y., Hong, W.-Y., Kim, J., Cho, Y.-C., Hwang, S.-J., 2018. Application of metagenome analysis to characterize the molecular diversity and saxitoxin-producing potentials of a cyanobacterial community: a case study in the North Han River, Korea. *Appl. Biol. Chem.* 61, 153–161. <https://doi.org/10.1007/s13765-017-0342-4>
- Kistemann, T., Schmidt, A., Flemming, H.-C., 2016. Post-industrial river water quality—Fit for bathing again? *Int. J. Hyg. Environ. Health* 219, 629–642. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2016.07.007>
- Kitis, M., 2004. Disinfection of wastewater with peracetic acid: a review. *Environ. Int.* 30, 47–55. [https://doi.org/10.1016/S0160-4120\(03\)00147-8](https://doi.org/10.1016/S0160-4120(03)00147-8)
- Kong, J., Lu, Y., Ren, Y., Chen, Z., Chen, M., 2021. The virus removal in UV irradiation, ozonation and chlorination. *Water Cycle* 2, 23–31. <https://doi.org/10.1016/j.watcyc.2021.05.001>

Références

- Kruihof, J.C., Kamp, P.C., Martijn, B.J., 2007. UV/H₂O₂ Treatment: A Practical Solution for Organic Contaminant Control and Primary Disinfection. *Ozone Sci. Eng.* 29, 273–280. <https://doi.org/10.1080/01919510701459311>
- Lamontagne, S., 2002. Groundwater delivery rate of nitrate and predicted change in nitrate concentration in Blue Lake, South Australia. *Mar. Freshw. Res.* 53, 1129–1142. <https://doi.org/10.1071/mf01239>
- LAMPERT, L., 2001. SEASONAL VARIABILITY AND PIGMENT DYNAMIC OF PHYTOPLANKTON POPULATIONS IN NORTH ATLANTIC (BAY OF BISCAY) (Theses). UNIVERSITE DE BRETAGNE OCCIDENTALE.
- LANG, J., CREW, B., Fast, J.P., Becker, A., Lundberg, S., 2018. Bleaching using peroxyformic acid and an oxygen catalyst. WO2018237255A1.
- Le Hyaric R (2009). Caractérisation, traitabilité et valorisation des refus de dégrillage des stations d'épuration. Thèse de doctorat en sciences de l'environnement industriel et urbain, Institut National des Sciences Appliquées de Lyon, 190 p
- Lehours, A.-C., 2006. La communauté procaryotique dans les zones anoxiques de deux écosystèmes lacustres: structure et diversité. Etude plus particulière de son rôle fonctionnel dans le monimolimnion. Thèse Univ. Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II 500.
- Lemaire, M.E., 2002. Biomarqueurs pigmentaires dans les estuaires macrotidaux européens. Thèse Univ. Bordx. 236.
- Lestel, L. (dir.) ; Carré, Catherine (dir.), 2017. Les rivières urbaines et leur pollution. Nouvelle édition [en ligne]. Versailles : Éditions Quæ. Disponible sur Internet : <<http://books.openedition.org/quæ/27697>>. ISBN : 9782759231355.
- Li, H., Yang, Q., Li, J., Gao, H., Li, P., Zhou, H., 2015. The impact of temperature on microbial diversity and AOA activity in the Tengchong Geothermal Field, China. *Sci Rep* 5, 17056. <https://doi.org/10.1038/srep17056>
- Liao, C., Huang, X., Wang, Q., Yao, D., Lu, W., 2022. Virulence Factors of *Pseudomonas Aeruginosa* and Antivirulence Strategies to Combat Its Drug Resistance. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 12.
- Liao, K., Bai, Y., Huo, Y., Jian, Z., Hu, W., Zhao, C., Qu, J., 2019. Use of convertible flow cells to simulate the impacts of anthropogenic activities on river biofilm bacterial communities. *Sci. Total Environ.* 653, 148–156. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.10.363>
- Lin, D., Bohui, X., Fanfang, Z., Prasad, S.R., 2021. Effects of nitrate and glucose on the formation of chloronitromethane (CNM) under UV/chlorine treatment. *J. Water Reuse Desalination* 11, 475–489. <https://doi.org/10.2166/wrd.2021.010>
- Lin, D., Bohui, X., Fanfang, Z., Prasad, S.R., 2021. Effects of nitrate and glucose on the formation of chloronitromethane (CNM) under UV/chlorine treatment. *J. Water Reuse Desalination* 11, 475–489. <https://doi.org/10.2166/wrd.2021.010>
- Lin, Y., Xu, X., Tian, S., Wang, J., Cao, S., Huang, T., Xie, W., Ran, Z., Wen, G., 2023. Inactivation of fungal spores by performic acid in water: Comparisons with peracetic acid. *J. Hazard. Mater.* 458, 131929. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2023.131929>
- Liu, J., Tu, T., Gao, G., Bartlam, M., Wang, Y., 2019. Biogeography and Diversity of Freshwater Bacteria on a River Catchment Scale. *Microb. Ecol.* 78, 324–335. <https://doi.org/10.1007/s00248-019-01323-9>
- Liu, T., Zhang, A.N., Wang, J., Liu, Shufeng, Jiang, X., Dang, C., Ma, T., Liu, Sitong, Chen, Q., Xie, S., Zhang, T., Ni, J., 2018. Integrated biogeography of planktonic and sedimentary bacterial communities in the Yangtze River. *Microbiome* 6. <https://doi.org/10.1186/s40168-017-0388-x>
- Lodder, W.J., de Roda Husman, A.M., 2005. Presence of Noroviruses and Other Enteric Viruses in Sewage and Surface Waters in The Netherlands. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 1453–1461. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.3.1453-1461.2005>
- Lu, Y., Shen, Y., Warren, W., Walter, R., 2016. Next Generation Sequencing in Aquatic Models, in: Kulski, J.K. (Ed.), *Next Generation Sequencing - Advances, Applications and Challenges*. InTech. <https://doi.org/10.5772/61657>
- Lucas, F., 2011. Diversité microbienne en milieu aquatique urbain. HDR Univ. Paris-Est 77.

Références

- Luo, J., Yin, J., Cai, L., Zhang, K., Hyde, K.D., 2004. Freshwater fungi in Lake Dianchi, a heavily polluted lake in Yunnan, China. *Fungal Divers.*
- Luo, Y., Guo, W., Ngo, H.H., Nghiem, L.D., Hai, F.I., Zhang, J., Liang, S., Wang, X.C., 2014. A review on the occurrence of micropollutants in the aquatic environment and their fate and removal during wastewater treatment. *Sci. Total Environ.* 473–474, 619–641. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.12.065>
- Luukkonen, T., Heynink, T., Rämö, J., Lassi, U., 2015. Comparison of organic peracids in wastewater treatment: Disinfection, oxidation and corrosion. *Water Res.* 85, 275–285. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2015.08.037>
- Luukkonen, T., Pehkonen, S.O., 2017. Peracids in water treatment: A critical review. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 47, 1–39. <https://doi.org/10.1080/10643389.2016.1272343>
- Macagnan, D., Romeiro, R. da S., de Souza, J.T., Pomella, A.W.V., 2006. Isolation of actinomycetes and endospore-forming bacteria from the cacao pod surface and their antagonistic activity against the witches' broom and black pod pathogens. *Phytoparasitica* 34, 122–132. <https://doi.org/10.1007/BF02981312>
- Mannu, L., Paba, A., Daga, E., Comunian, R., Zanetti, S., Duprè, I., Sechi, L.A., 2003. Comparison of the incidence of virulence determinants and antibiotic resistance between *Enterococcus faecium* strains of dairy, animal and clinical origin. *Int. J. Food Microbiol.* 88, 291–304. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00191-0](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00191-0)
- Mansfeldt, C., Deiner, K., Mächler, E., Fenner, K., Eggen, R.I.L., Stamm, C., Schönenberger, U., Walser, J.-C., Altermatt, F., 2020. Microbial community shifts in streams receiving treated wastewater effluent. *Sci. Total Environ.* 709, 135727. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135727>
- Mardis, E.R., 2008. The impact of next-generation sequencing technology on genetics. *Trends Genet.* 24, 133–141. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2007.12.007>
- Martin, M., 2011. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads 3.
- Martins, G., 2012. Communautés microbiennes de la baie de raisin Incidence des facteurs biotiques et abiotiques. Thèse Univ. Bordx. 2.
- McCarthy, N., de Jong, B., Ziese, T., Sjölund, R., Hjalt, C.A., Giesecke, J., 1998. Epidemiological explanation of an outbreak of gastro-enteritis in Sweden in the absence of detailed microbiological information. *Eur. J. Epidemiol.* 14, 711–718. <https://doi.org/10.1023/a:1007490119187>
- Mella-Flores, D., Six, C., Ratin, M., Partensky, F., Boutte, C., Le Corguillé, G., Marie, D., Blot, N., Gourvil, P., Kolowrat, C., Garczarek, L., 2012. *Prochlorococcus* and *Synechococcus* have Evolved Different Adaptive Mechanisms to Cope with Light and UV Stress. *Front. Microbiol.* 3, 285. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00285>
- Mercoiret, L., 2009. Application aux agglomérations d'assainissement inférieures à 2 000 Equivalent Habitants 55.
- Ministère de la Transition écologique et solidaire, 2018. Guide relatif aux règles d'évaluation de l'état des eaux littorales dans le cadre de la DCE.
- Monarca, S., Richardso, S.D., Feretti, D., Grottolo, M., Thruston Jr, A.D., Zani, C., Navazio, G., Ragazzo, P., Zerbini, I., Alberti, A., 2002. Mutagenicity and disinfection by-products in surface drinking water disinfected with peracetic acid. *Environ. Toxicol. Chem.* 21, 309–318. <https://doi.org/10.1002/etc.5620210212>
- Morel, J., 2007. Les ressources en eau sur Terre: origine, utilisation et perspectives dans le contexte du changement climatique – un tour d'horizon de la littérature 30.
- Münster, U., 1991. Extracellular Enzyme Activity in Eutrophic and Polyhumic Lakes, in: Brock, T.D., Chróst, R.J. (Eds.), *Microbial Enzymes in Aquatic Environments*. Springer New York, New York, NY, pp. 96–122. https://doi.org/10.1007/978-1-4612-3090-8_6
- Nicol, G.W., Leininger, S., Schleper, C., Prosser, J.I., 2008. The influence of soil pH on the diversity, abundance and transcriptional activity of ammonia oxidizing archaea and bacteria. *Environ. Microbiol.* 10, 2966–2978. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2008.01701.x>

Références

- Nwachcuku, N., Gerba, C.P., 2004. Emerging waterborne pathogens: can we kill them all? *Curr. Opin. Biotechnol.* 15, 175–180. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2004.04.010>
- Obst, U., 1985. Test instructions for measuring the microbial metabolic activity in water samples. *Fresenius Z. Für Anal. Chem.* 321, 166–168. <https://doi.org/10.1007/BF01117757>
- Oguma, K., Katayama, H., Mitani, H., Morita, S., Hirata, T., Ohgaki, S., 2001. Determination of Pyrimidine Dimers in *Escherichia coli* and *Cryptosporidium parvum* during UV Light Inactivation, Photoreactivation, and Dark Repair. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 4630–4637. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.10.4630-4637.2001>
- Oguma, K., Katayama, H., Ohgaki, S., 2004. Photoreactivation of *Legionella pneumophila* after inactivation by low- or medium-pressure ultraviolet lamp. *Water Res.* 38, 2757–2763. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2004.03.024>
- Ona-Nguema, G., Roose-Amsaleg, C., Paolozzi, L., Liébart, J.-C., Bauda, P., Bodilis, J., Dussurget, O., Forterre, P., Gutierrez, C., LATIFI, A., 2015. *Microbiologie*. Dunod.
- Ouyang, L., Chen, H., Liu, X., Wong, M.H., Xu, F., Yang, X., Xu, W., Zeng, Q., Wang, W., Li, S., 2020. Characteristics of spatial and seasonal bacterial community structures in a river under anthropogenic disturbances. *Environ. Pollut.* 264, 114818. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114818>
- Pechacek, N., Osorio, M., Caudill, J., Peterson, B., 2015. Evaluation of the toxicity data for peracetic acid in deriving occupational exposure limits: A minireview. *Toxicol. Lett.* 233, 45–57. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2014.12.014>
- Peet, R.K., 1974. The Measurement of Species Diversity. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 5, 285–307. <https://doi.org/10.1146/annurev.es.05.110174.001441>
- Personnic, S., Duhamel, S., Bettarel, Y., Sime-Ngando, T., Jacquet, S., 2006. les virus planctoniques : un compartiment biologique clé des milieux aquatiques 16.
- Pétavy, F (2011). *Fonctionnement et dimensionnement des stations d'épuration*. Ecole des métiers de l'environnement
- Pettersson, M., Baath, E., 2003. Temperature-dependent changes in the soil bacterial community in limed and unlimed soil. *FEMS Microbiol. Ecol.* 45, 13–21. [https://doi.org/10.1016/S0168-6496\(03\)00106-5](https://doi.org/10.1016/S0168-6496(03)00106-5)
- Picard C (2011). *Transfert de matière dans un biofilm aéré sur membrane*. Thèse de doctorat en génie des procédés et de l'environnement. Université de Toulouse, 211 p
- Pietryczuk, A., Cudowski, A., Hauschild, T., Świśłocka, M., Więcko, A., Karpowicz, M., 2018. Abundance and Species Diversity of Fungi in Rivers with Various Contaminations. *Curr. Microbiol.* 75, 630–638. <https://doi.org/10.1007/s00284-017-1427-3>
- Pitkänen, T., 2013. Review of *Campylobacter* spp. in drinking and environmental waters. *J. Microbiol. Methods, Update On Methodologies To Study Campylobacter Species* 95, 39–47. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2013.06.008>
- Pomeroy, L.R., 2001. Temperature and substrates as interactive limiting factors for marine heterotrophic bacteria. *Aquat. Microb. Ecol.* 23, 187–204. <https://doi.org/10.3354/AME023187>
- Prescott, L.M., Harley, J.P., Klein, D.A., 1996. *Microbiology, Microbiology*. Wm. C. Brown Publishers.
- Radinger, J., Wolter, C., 2014. Patterns and predictors of fish dispersal in rivers. *Fish Fish* 15, 456–473. <https://doi.org/10.1111/faf.12028>
- Ragazzo, P., Chiucchini, N., Piccolo, V., Ostoich, M., 2013. A new disinfection system for wastewater treatment: performic acid full-scale trial evaluations. *Water Sci. Technol.* 67, 2476–2487. <https://doi.org/10.2166/wst.2013.137>
- Raimonet, M., Cazier, T., Rocher, V., Laverman, A.M., 2017. Nitrifying Kinetics and the Persistence of Nitrite in the Seine River, France. *J. Environ. Qual.* 46, 585–595. <https://doi.org/10.2134/jeq2016.06.0242>
- Raoult, D., Audic, S., Robert, C., Abergel, C., Renesto, P., Ogata, H., La Scola, B., Suzan, M., Claverie, J.-M., 2004. The 1.2-Megabase Genome Sequence of Mimivirus. *Science* 306, 1344–1350. <https://doi.org/10.1126/science.1101485>
- RAOUS, A.-S., 2013. *LE SÉQUENÇAGE HAUT DÉBIT : PRINCIPE ET APPLICATIONS EN VIROLOGIE*. Thèse Ecole Vétérinaire Alfort.

Références

- Rathnayake, I.U., Hargreaves, M., Huygens, F., 2012. Antibiotic resistance and virulence traits in clinical and environmental *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolates. *Syst. Appl. Microbiol.* 35, 326–333. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2012.05.004>
- Rhymes, J., Jones, L., Lapworth, D.J., White, D., Fenner, N., McDonald, J.E., Perkins, T.L., 2015. Using chemical, microbial and fluorescence techniques to understand contaminant sources and pathways to wetlands in a conservation site. *Sci. Total Environ.* 511, 703–710. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.12.085>
- Rillig, M.C., Antonovics, J., Caruso, T., Lehmann, A., Powell, J.R., Veresoglou, S.D., Verbruggen, E., 2015. Interchange of entire communities: microbial community coalescence. *Trends Ecol. Evol.* 30, 470–476. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2015.06.004>
- Rinninella, E., Raoul, P., Cintoni, M., Franceschi, F., Miggiano, G.A.D., Gasbarrini, A., Mele, M.C., 2019. What is the Healthy Gut Microbiota Composition? A Changing Ecosystem across Age, Environment, Diet, and Diseases. *Microorganisms* 7, 14. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7010014>
- Rochelle-Newall, E., Nguyen, T.M.H., Le, T.P.Q., Sengtaheuanghoung, O., Ribolzi, O., 2015. A short review of fecal indicator bacteria in tropical aquatic ecosystems: knowledge gaps and future directions. *Front. Microbiol.* 6.
- Rocher, V., Azimi, S. (Eds.), 2021. Effectiveness of Disinfecting Wastewater Treatment Plant Discharges: Case of chemical disinfection using performic acid. IWA Publishing. <https://doi.org/10.2166/9781789062106>
- Rocher, V., Azimi, S., 2016. Qualité microbiologique des eaux en agglomération parisienne | Éditions Johanet. Editions JOHANET.
- Rousk, J., Bååth, E., Brookes, P.C., Lauber, C.L., Lozupone, C., Caporaso, J.G., Knight, R., Fierer, N., 2010. Soil bacterial and fungal communities across a pH gradient in an arable soil. *ISME J* 4, 1340–1351. <https://doi.org/10.1038/ismej.2010.58>
- Roy, D., Wong, P.K., Engelbrecht, R.S., Chian, E.S., 1981. Mechanism of enteroviral inactivation by ozone. *Appl. Environ. Microbiol.* 41, 718–723.
- Ruiz-González, C., Niño-García, J.P., del Giorgio, P.A., 2015. Terrestrial origin of bacterial communities in complex boreal freshwater networks. *Ecol Lett* 18, 1198–1206. <https://doi.org/10.1111/ele.12499>
- Santacesaria, E., Russo, V., Tesser, R., Turco, R., Di Serio, M., 2017. Kinetics of Performic Acid Synthesis and Decomposition. *Ind Eng Chem Res* 56, 12940–12952. <https://doi.org/10.1021/acs.iecr.7b00593>
- Sassi J, Viitasalo S, Ryttonen J, Leppakoski E., 2005. Experiments with ultraviolet light, ultrasound and ozone technologies for onboard ballast water treatment. VTT TIEDOTTEITA. Turku, Finland: Åbo Akademi University.
- Savio, D., Sinclair, L., Ijaz, U.Z., Parajka, J., Reischer, G.H., Stadler, P., Blaschke, A.P., Blöschl, G., Mach, R.L., Kirschner, A.K.T., Farnleitner, A.H., Eiler, A., 2015a. Bacterial diversity along a 2600 km river continuum: River bacterioplankton diversity. *Environ. Microbiol.* 17, 4994–5007. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12886>
- Savio, D., Sinclair, L., Ijaz, U.Z., Parajka, J., Reischer, G.H., Stadler, P., Blaschke, A.P., Blöschl, G., Mach, R.L., Kirschner, A.K.T., Farnleitner, A.H., Eiler, A., 2015b. Bacterial diversity along a 2600 km river continuum: River bacterioplankton diversity. *Env. Microbiol* 17, 4994–5007. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12886>
- Sazhina, N.N., Evteeva, N.M., Titov, V.N., 2018. Experimental Evaluation of Velocity Constants for Ozone Interaction with Individual Fatty Acids. *Bull. Exp. Biol. Med.* 165, 356–359. <https://doi.org/10.1007/s10517-018-4169-8>
- Schleifer, K.H., Kandler, O., 1972. Peptidoglycan .Types of Bacterial Cell Walls and their Taxonomic Implications. *BACTERIOL REV* 71.
- Schloss, P.D., Westcott, S.L., 2011. Assessing and Improving Methods Used in Operational Taxonomic Unit-Based Approaches for 16S rRNA Gene Sequence Analysis ▽. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 3219–3226. <https://doi.org/10.1128/AEM.02810-10>
- Schmidt, O., Ruecker, K.H., 1967. Production of a bleaching liquor containing performic acid. GB1064534A.
- Schmidt, T.M., 2006. The maturing of microbial ecology. *Microb. Ecol., INTERNATIONAL MICROBIOLOGY* 17–223.

Références

- Schnurer, J., Rosswall, T., 1982. Fluorescein Diacetate Hydrolysis as a Measure of Total Microbial Activity in Soil and Litter. *Appl. Environ. Microbiol.* 43, 1256–1261. <https://doi.org/10.1128/aem.43.6.1256-1261.1982>
- Schroeder, G.N., Hilbi, H., 2008. Molecular Pathogenesis of *Shigella* spp.: Controlling Host Cell Signaling, Invasion, and Death by Type III Secretion. *Clin. Microbiol. Rev.* 21, 134–156. <https://doi.org/10.1128/CMR.00032-07>
- Schwermer, C.U., Uhl, W., 2021. Calculating expected effects of treatment effectivity and river flow rates on the contribution of WWTP effluent to the ARG load of a receiving river. *J. Environ. Manage.* 288, 112445. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2021.112445>
- Sedlak, D.L., von Gunten, U., 2011. The Chlorine Dilemma. *Science* 331, 42–43. <https://doi.org/10.1126/science.1196397>
- Shearer, C.A., Descals, E., Kohlmeyer, B., Kohlmeyer, J., Marvanová, L., Padgett, D., Porter, D., Raja, H.A., Schmit, J.P., Thornton, H.A., Voglymayr, H., 2007. Fungal biodiversity in aquatic habitats. *Biodivers. Conserv.* 16, 49–67. <https://doi.org/10.1007/s10531-006-9120-z>
- Shin, N.-R., Whon, T.W., Bae, J.-W., 2015. Proteobacteria: microbial signature of dysbiosis in gut microbiota. *Trends Biotechnol.* 33, 496–503. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2015.06.011>
- Silberbach, M., Hüser, A., Kalinowski, J., Pühler, A., Walter, B., Krämer, R., Burkovski, A., 2005. DNA microarray analysis of the nitrogen starvation response of *Corynebacterium glutamicum*. *J. Biotechnol.* 119, 357–367. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2005.04.007>
- Sinha, R.P., Häder, D.-P., 2002. UV-induced DNA damage and repair: a review. *Photochem. Photobiol. Sci.* 1, 225–236. <https://doi.org/10.1039/b201230h>
- Snydman, D.R., Jacobus, N.V., McDermott, L.A., Golan, Y., Goldstein, E.J.C., Harrell, L., Jenkins, S., Newton, D., Pierson, C., Rosenblatt, J., Venezia, R., Gorbach, S.L., Queenan, A.M., Hecht, D.W., 2011. Update on resistance of *Bacteroides fragilis* group and related species with special attention to carbapenems 2006–2009. *Anaerobe, Highlights from Anaerobe 2010* 17, 147–151. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2011.05.014>
- Staley, C., Unno, T., Gould, T.J., Jarvis, B., Phillips, J., Cotner, J.B., Sadowsky, M.J., 2013. Application of Illumina next-generation sequencing to characterize the bacterial community of the Upper Mississippi River. *J Appl Microbiol* 115, 1147–1158. <https://doi.org/10.1111/jam.12323>
- Staley, J.T., Konopka, A., 1985. Measurement of in Situ Activities of Nonphotosynthetic Microorganisms in Aquatic and Terrestrial Habitats. *Annu. Rev. Microbiol.* 39, 321–346. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.39.100185.001541>
- Stohl, E.A., Brockman, J.P., Burkle, K.L., Morimatsu, K., Kowalczykowski, S.C., Seifert, H.S., 2003. *Escherichia coli* RecX Inhibits RecA Recombinase and Coprotease Activities in Vitro and in Vivo *. *J. Biol. Chem.* 278, 2278–2285. <https://doi.org/10.1074/jbc.M210496200>
- Stojanov, S., Berlec, A., Štrukelj, B., 2020. The Influence of Probiotics on the Firmicutes/Bacteroidetes Ratio in the Treatment of Obesity and Inflammatory Bowel disease. *Microorganisms* 8, 1715. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8111715>
- Su, Z., Dai, T., Tang, Y., Tao, Y., Huang, B., Mu, Q., Wen, D., 2018. Sediment bacterial community structures and their predicted functions implied the impacts from natural processes and anthropogenic activities in coastal area. *Mar. Pollut. Bull.* 131, 481–495. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2018.04.052>
- Sutherland, T., Horne, I., Weir, K., Coppin, C., Williams, M., Selleck, M., Russell, R., Oakeshott, J., 2004. ENZYMATIC BIOREMEDIATION: FROM ENZYME DISCOVERY TO APPLICATIONS. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 31, 817–821. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1681.2004.04088.x>
- Suttle, C.A., 2007. Marine viruses--major players in the global ecosystem. *Nat. Rev. Microbiol.* 5, 801–812. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1750>
- Suty, L., 2010. La lutte biologique: Vers de nouveaux équilibres écologiques. Editions Quae.
- Tang, J., Bu, Y., Zhang, X.-X., Huang, K., He, X., Ye, L., Shan, Z., Ren, H., 2016. Metagenomic analysis of bacterial community composition and antibiotic resistance genes in a wastewater treatment plant and its

Références

- receiving surface water. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 132, 260–269. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.06.016>
- Taylor, J.P., Wilson, B., Mills, M.S., Burns, R.G., 2002. Comparison of microbial numbers and enzymatic activities in surface soils and subsoils using various techniques. *Soil Biol. Biochem.* 34, 387–401. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(01\)00199-7](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(01)00199-7)
- Thomas, F., Hehemann, J.-H., Rebuffet, E., Czejek, M., Michel, G., 2011. Environmental and Gut Bacteroidetes: The Food Connection. *Front. Microbiol.* 2, 93. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00093>
- Tondera, K., Klaer, K., Koch, C., Hamza, I.A., Pinnekamp, J., 2016. Reducing pathogens in combined sewer overflows using performic acid. *Int. J. Hyg. Environ. Health, Safe Ruhr* 219, 700–708. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2016.04.009>
- UNESCO, 2003. The Natural Water Cycle, in: The 1st UN World Water Development Report: Water for People. Water for Life. United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization, Paris.
- van Elsas, J.D., Semenov, A.V., Costa, R., Trevors, J.T., 2011. Survival of *Escherichia coli* in the environment: fundamental and public health aspects. *ISME J.* 5, 173–183. <https://doi.org/10.1038/ismej.2010.80>
- van Oldenborgh, G.J., Philip, S., Aalbers, E., Vautard, R., Otto, F., Haustein, K., Habets, F., Singh, R., Cullen, H., 2016. Rapid attribution of the May/June 2016 flood-inducing precipitation in France and Germany to climate change (preprint). *Hydrometeorology/Modelling approaches*. <https://doi.org/10.5194/hess-2016-308>
- Vives-Rego, J., Lebaron, P., Nebe-von Caron, G., 2000. Current and future applications of flow cytometry in aquatic microbiology. *FEMS Microbiol. Rev.* 24, 429–448. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2000.tb00549.x>
- von Gunten, U., 2003. Ozonation of drinking water: Part I. Oxidation kinetics and product formation. *Water Res.* 37, 1443–1467. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(02\)00457-8](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(02)00457-8)
- von Sonntag, C., von Gunten, U., 2012. *Chemistry of Ozone in Water and Wastewater Treatment*. IWA Publishing.
- Wang, L., Zhang, J., Li, H., Yang, H., Peng, C., Peng, Z., Lu, L., 2018. Shift in the microbial community composition of surface water and sediment along an urban river. *Sci. Total Environ.* 627, 600–612. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.01.203>
- Wang, Y.-S., Tong, Z.-H., Fan, Y.-Y., 2021. Spatial and temporal patterns in bacterioplankton communities across a river-lake continuum. *Limnologica* 87, 125863. <https://doi.org/10.1016/j.limno.2021.125863>
- Ward, J.V., 1989. The Four-Dimensional Nature of Lotic Ecosystems. *J. North Am. Benthol. Soc.* 8, 2–8. <https://doi.org/10.2307/1467397>
- Watanabe, K., 2001. Microorganisms relevant to bioremediation. *Curr. Opin. Biotechnol.* 12, 237–241. [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(00\)00205-6](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(00)00205-6)
- Wessels, S., Ingmer, H., 2013. Modes of action of three disinfectant active substances: A review. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 67, 456–467. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2013.09.006>
- West, J.B., 2014. Carl Wilhelm Scheele, the discoverer of oxygen, and a very productive chemist. *Am. J. Physiol.-Lung Cell. Mol. Physiol.* 307, L811–L816. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00223.2014>
- Wilsey, B.J., Chalcraft, D.R., Bowles, C.M., Willig, M.R., 2005. Relationships Among Indices Suggest That Richness Is an Incomplete Surrogate for Grassland Biodiversity. *Ecology* 86, 1178–1184. <https://doi.org/10.1890/04-0394>
- Woese, C.R., Fox, G.E., 1977. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 74, 5088–5090.
- World Health Organization (Ed.), 2003. *Guidelines for safe recreational water environments*. World Health Organization, Geneva.
- World Health Organization, 2019. *Results of round II of the WHO international scheme to evaluate household water treatment technologies*. World Health Organization, Geneva.
- Wright, M.E., Solo-Gabriele, H.M., Elmir, S., Fleming, L.E., 2009. Microbial Load from Animal Feces at a Recreational Beach. *Mar. Pollut. Bull.* 58, 1649–1656. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2009.07.003>

Références

- Writer, J.H., Barber, L.B., Ryan, J.N., Bradley, P.M., 2011. Biodegradation and Attenuation of Steroidal Hormones and Alkylphenols by Stream Biofilms and Sediments. *Environ. Sci. Technol.* 45, 4370–4376. <https://doi.org/10.1021/es2000134>
- Xu, Z., Shen, J., Qu, Y., Chen, H., Zhou, X., Hong, H., Sun, H., Lin, H., Deng, W., Wu, F., 2022. Using simple and easy water quality parameters to predict trihalomethane occurrence in tap water. *Chemosphere* 286, 131586. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.131586>
- Yan, Q., Bi, Y., Deng, Y., He, Z., Wu, L., Van Nostrand, J.D., Shi, Z., Li, J., Wang, X., Hu, Z., Yu, Y., Zhou, J., 2015. Impacts of the Three Gorges Dam on microbial structure and potential function. *Sci. Rep.* 5, 8605. <https://doi.org/10.1038/srep08605>
- Ye, L., Zhang, T., 2011. Pathogenic Bacteria in Sewage Treatment Plants as Revealed by 454 Pyrosequencing. *Env. Sci Technol* 45, 7173–7179. <https://doi.org/10.1021/es201045e>
- Young, S.B., Setlow, P., 2003. Mechanisms of killing of *Bacillus subtilis* spores by hypochlorite and chlorine dioxide. *J. Appl. Microbiol.* 95, 54–67. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.01960.x>
- Yu, D., Ryu, K., Zhi, S., Otto, S.J.G., Neumann, N.F., 2022. Naturalized *Escherichia coli* in Wastewater and the Co-evolution of Bacterial Resistance to Water Treatment and Antibiotics. *Front. Microbiol.* 13, 810312. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.810312>
- Zeglin, L.H., 2015. Stream microbial diversity in response to environmental changes: review and synthesis of existing research. *Front. Microbiol.* 6.
- Zhang, J., Su, P., Chen, H., Qiao, M., Yang, B., Zhao, X., 2023. Impact of reactive oxygen species on cell activity and structural integrity of Gram-positive and Gram-negative bacteria in electrochemical disinfection system. *Chem. Eng. J.* 451, 138879. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2022.138879>
- Zhang, S., Jiang, L., Li, H., Zhang, J., Sun, T., Dong, Y., Ding, N., 2022. Disinfection kinetics of peracetic acid inactivation of pathogenic bacteria in water. *Water Cycle* 3, 79–85. <https://doi.org/10.1016/j.watcyc.2022.05.002>
- Zimmer, J.L., Slawson, R.M., 2002. Potential Repair of *Escherichia coli* DNA following Exposure to UV Radiation from Both Medium- and Low-Pressure UV Sources Used in Drinking Water Treatment. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 3293–3299. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.7.3293-3299.2002>
- Zolfaghari M, Drogui P, Seyhi B, Brar S K, Buelna G, Dubé R (2014). Occurrence, fate and effect of Di (2-ethylhexyl) phthalate in wastewater treatment plants: A review. *Environmental Pollution*, 194, 281-293
- Zuckermandl, E., Pauling, L., 1965. Molecules as documents of evolutionary history. *J. Theor. Biol.* 8, 357–366. [https://doi.org/10.1016/0022-5193\(65\)90083-4](https://doi.org/10.1016/0022-5193(65)90083-4)

Annexes

Annexe 1. Composition des familles de substrats carbonés des contenus dans une Eco-plate

Familles	Substrat	Position sur la plaque
Acides aminés (n = 6)	L-Arginine	A4
	L-Asparagine	B4
	L-Phénylalanine	C4
	L-Sérine	D4
	L-Thréonine	E4
	Acide β -Hydroxy-Glycyl-L-Glutamique	F4
Polymères (n = 4)	Tween 40	C1
	Tween 80	D1
	α - Cyclodextrine	E1
	Glycogène	F1
Carbohydrates (n = 10)	β - Méthyl-D-Glucoside	A2
	Acide D-Galactonique γ - Lactone	A3
	D-Xylose	B2
	i-Erythritol	C2
	D-Mannitol	D2
	N-Acétyle-D-Glucosamine	E2
	D-Cellobiose	G1
	Glucose-1-Phosphate	G2
	α - D-Lactose	H1
	D, L- α -Glycérol Phosphate	H2
Acides carboxyliques (n = 7)	Acide Pyruvique Méthyle Ester	B1
	Acide D- Galacturonique	B3
	Acide γ - Aminobutyrique	E3
	Acide D- Glucosaminique	F2
	Acide Itaconique	F3
	Acide α - Ketobutyrique	G3
	Acide D-Malique	H3
Amines/amides (n = 2)	Phényléthylamine	G4
	Putrescine	H4
Composés phénoliques (n = 2)	Acide 2- Hydroxybenzoïque	C3
	Acide 4- Hydroxybenzoïque	D3

Supplementary material**Spatial and temporal characteristics of microbial communities in the Seine River in the Greater Paris area under anthropogenic perturbation**

Sadia Bagagnan¹, Sabrina Guérin², Vincent Rocher², Vanessa Alphonse¹,
Régis Moilleron¹ and My Dung Jusselme^{1,*}

¹Leesu, Univ Paris Est Creteil, F-94010 Creteil, France

²SIAAP, Direction de l'Innovation, F-92700 Colombes, France

Table S1 : Physico-chemical parameters of surface water of the Seine at seven sampling points and four seasons

Sites	Rivers	Seasons	pH	NO ₂ ⁻	NO ₃ ⁻	NH ₄ ⁺	DOC	PO ₄ ³⁻	BOD	COD	T°C	EC	TSS
				mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	°C	µs/Cm	mg/L	
JSO	Seine river	Spring	8.27	0.03	27.6	0.03	2.0	0.01	1.1	7.5	10.6	503	6
		Summer	8.12	0.04	19.6	0.06	2.5	0.17	1.4	7.9	20.8	472	8
		Autumn	8.13	0.06	22.4	0.10	2.7	0.14	1.6	5.6	8.1	510	14
		Winter	8.11	0.04	26.6	0.13	2.3	0.14	1.7	7.0	5.2	544	9
CLR	Seine river	Spring	8.26	0.04	27.4	0.03	2.2	0.02	1.5	7.8	10.7	513	7
		Summer	8.14	0.04	19.4	0.01	2.3	0.17	1.5	8.1	21.0	476	10
		Autumn	8.14	0.06	21.8	0.10	2.7	0.15	1.7	2.0	8.0	514	6
		Winter	8.12	0.04	26.9	0.07	2.1	0.13	1.5	6.4	5.4	540	8
VSS	Seine river	Spring	8.02	0.08	29.3	0.24	2.2	0.26	1.3	7.9	10.4	559	2
		Summer	8.06	0.04	20.7	0.05	2.4	0.19	0.9	7.5	20.7	493	9
		Autumn	8.00	0.07	23.7	0.15	2.7	0.19	1.6	2.0	8.4	542	3
		Winter	8.10	0.04	28.1	0.07	2.1	0.16	1.2	6.8	5.4	551	9
CSM	Marne river	Spring	8.08	0.08	22.6	0.04	2.1	0.02	1.5	6.0	9.5	593	2
		Summer	8.05	0.11	16.1	0.11	2.4	0.27	1.1	7.4	21.1	580	12
		Autumn	8.14	0.1	17.3	0.16	2.3	0.17	1.3	2.0	7.1	591	6
		Winter	8.10	0.05	22.1	0.13	1.8	0.15	1.3	6.9	5.4	612	17
Boug	Seine river	Spring	8.15	0.11	26.3	0.10	2.2	0.07	1.3	7.2	11.6	590	7
		Summer	7.96	0.12	20.7	0.14	2.4	0.31	1.4	8.3	21.0	556	7
		Autumn	8.00	0.15	22.5	0.22	3.1	0.37	1.9	2.0	9.0	587	11
		Winter	8.08	0.09	26	0.11	2.3	0.18	2	7.7	5.9	544	15
CSH	Oise river	Spring	7.96	0.07	22.5	0.10	2.8	0.08	1.3	9.3	9.7	660	7
		Summer	8.07	0.05	18.5	0.07	3.7	0.28	0.8	11.6	20.9	613	9
		Autumn	8.09	0.07	21	0.09	3.5	0.18	1.9	2.0	8.2	696	12
		Winter	8.08	0.05	21.6	0.09	3.1	0.17	1.4	10.5	5.3	551	23
TSS	Seine river	Spring	7.72	0.25	25	1.10	3	0.13	5.1	15.1	10.5	649	9
		Summer	7.94	0.24	20	0.26	3.2	0.39	1.1	12.4	20.9	580	17
		Autumn	7.92	0.54	25.7	0.33	4	0.36	2.3	5.1	9.6	665	6
		Winter	8.03	0.13	25.3	0.16	2.8	0.22	2.1	8.5	6.3	606	18

NH₄⁺, ammonium; NO₂⁻, nitrite; NO₃⁻, nitrate; PO₄³⁻, orthophosphates; BOD, biochemical oxygen demand; COD, chemical oxygen demand; TSS, total suspended solids; EC, electrical conductivity

Table S2 : Hydrometeorological parameters

Sites	Seasons	Air temperature °C	Wind speed (km/h)	Humidity (%)	Solar radiation (w/m ²)	Water flow (m/s)
CLR	Spring	13.4	7	59	267	147.53
VSS	Spring	13.4	7	59	267	147.53
TSS	Spring	12.2	2	75	411	309.55
CLR	Summer	16.8	14	68	100	195.23
VSS	Summer	16.8	14	68	100	195.23
TSS	Summer	15.6	6	76	86	324.22
CLR	Autumn	3.9	18	63	136	107.88
VSS	Autumn	3.9	18	63	136	107.88
TSS	Autumn	3.6	8	74	127	212.72
CLR	Winter	0.0	7	98	14	289.82
VSS	Winter	0.0	7	98	14	289.82
TSS	Winter	0.0	2	94	32	586.82

Supplementary material**Overview of microbial communities in the surface water of the Seine River to understand their response to climate change and human activities**Sadia BAGAGNAN¹, Sabrina GUERIN², Anthony MARCONI², Vincent ROCHER², Stéphanie GIUSTI-MILLER³, Régis MOILLERON¹ and My Dung JUSSELME^{1,*}¹Leesu, Univ Paris Est Creteil, Ecole des ponts, Creteil, France²SIAAP, Direction de l'Innovation, F-92700 Colombes, France³IEES, Univ Paris Est Creteil, F-94010 Creteil, France

Table S3 : Physic-chemical properties of Seine water samples

Total organic carbon, TOC; biological oxygen demand, BOD; chemical oxygen demand, COD ; T°C, water temperature NH₄⁺, ammonium; NO₂⁻, nitrite; NO₃⁻, nitrate; PO₄³⁻, orthophosphates;

Sampling sites	Seasons	Year	pH	NO ₂ ⁻ mg/L	NO ₃ ⁻ mg/L	NH ₄ ⁺ mg/L	PO ₄ ³⁻ mg/L	TOC mg/L	BOD mg/L	COD mg/L	T°C
Juvisy-sur-Orge	summer	2020	7.84	0.45	26.6	0.09	0.11	3.1	1.7	10.2	20.1
	autumn	2020	8.09	0.07	24.2	0.08	0.04	2.6	1.3	8.0	10.8
	summer	2021	8.27	0.03	22.6	0.03	<0.02	2.1	1.1	7.5	20.8
	autumn	2021	8.12	0.04	16.1	0.06	0.17	2.6	1.4	7.9	8.1
Choisy-le-Roi	summer	2020	8.02	0.06	23.5	0.06	0.04	4.5	1.3	7.8	21.6
	autumn	2020	8.10	0.07	24.2	0.08	0.04	2.5	1.0	7.3	11.1
	summer	2021	8.26	0.04	27.4	0.03	0.02	2.4	1.5	7.8	21.0
	autumn	2021	8.14	0.04	19.4	0.03	0.17	2.5	<0.5	8.1	8.0
Vitry-sur-Seine	summer	2020	7.87	0.06	26.2	0.06	0.09	2.5	0.8	6.4	20.2
	autumn	2020	7.94	0.08	27.1	0.17	0.10	3.0	2.0	8.1	10.7
	summer	2021	8.02	0.08	29.3	0.14	0.26	2.5	1.3	7.9	20.7
	autumn	2021	8.06	0.04	20.7	0.05	0.19	2.7	0.9	7.5	8.4
Champigny-sur-Marne	summer	2020	8.02	0.07	17.4	0.07	0.05	2.2	1.1	5.8	20.0
	autumn	2020	8.19	0.10	16.9	0.08	0.05	2.2	1.7	6.9	11.0
	summer	2021	8.08	0.08	22.5	0.04	0.02	3.4	1.5	6.0	21.1
	autumn	2021	8.05	0.11	18.5	0.11	0.27	2.7	1.1	7.4	7.1
Bougival	summer	2020	7.94	0.09	25.2	0.08	0.11	2.7	1.0	7.1	19.9
	autumn	2020	8.05	0.10	24.4	0.11	0.10	2.7	0.8	7.4	11.5
	summer	2021	8.15	0.11	26.3	0.10	0.07	2.5	1.3	7.2	21.0
	autumn	2021	7.96	0.12	20.7	0.14	0.31	2.7	1.4	8.3	9.0
Conflans-Sainte-Honorine			8.04	0.08	19.3	0.09	0.07	3.2	0.8	8.1	
	summer	2020									21.9
	autumn	2020	8.08	0.11	19.8	0.10	0.07	3.5	1.0	8.4	11.1
	summer	2021	7.96	0.07	22.5	0.10	0.08	2.1	1.3	9.3	20.9
Triel-sur-Seine	autumn	2021	8.07	0.05	18.5	0.07	0.28	4.0	0.8	11.6	8.2
	summer	2020	8.04	0.50	27.1	0.27	0.12	3.2	1.2	8.4	20.0
	autumn	2020	8.00	0.84	26.3	0.16	0.14	3.3	1.1	9.1	11.4
	summer	2021	7.72	0.25	25.0	0.11	0.13	5.1	5.1	15.1	20.9
	autumn	2021	7.94	0.24	20.0	0.26	0.39	3.8	1.1	12.4	9.6

Supplementary data

Assessing the effectiveness of performic acid disinfection on effluents: focusing on bacterial abundance and diversity

BAGANAN Sadia¹, JUSSELME My Dung^{1*}, ALPHONSE Vanessa¹, GUERIN Sabrina², MARCONI Anthnoy², ROCHER Vincent², MOILLERON Régis^{1**}

¹Leesu, Univ Paris Est Creteil, Ecole des Ponts, Creteil, France

²SIAAP, Direction de l'Innovation, F-92700 Colombes, France

Table S1 : predicted functions of the microbial communities at level 2 as a function of CTs

Level 1	Level 2	0	8	20	40	48	120	240
Cellular Processes	Cell growth and death	1,32	1,33	1,32	1,31	1,32	1,32	1,30
	Cell motility	2,90	2,68	2,57	2,68	2,54	2,86	2,69
	Cellular community - eukaryotes	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	Cellular community - prokaryotes	0,25	0,22	0,21	0,21	0,21	0,23	0,21
	Transport and catabolism	0,48	0,45	0,45	0,44	0,45	0,45	0,45
Environmental Information Processing	Membrane transport	1,96	1,97	1,96	2,04	1,98	2,06	2,06
	Signal transduction	0,67	0,64	0,62	0,66	0,63	0,68	0,67
	Signaling molecules and interaction	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Genetic Information Processing	Folding, sorting and degradation	2,82	2,81	2,82	2,78	2,83	2,80	2,78
	Replication and repair	4,84	4,82	4,86	4,66	4,86	4,72	4,65
	Transcription	0,75	0,75	0,75	0,72	0,75	0,74	0,72
	Translation	2,23	2,30	2,32	2,24	2,33	2,25	2,23
Human Diseases	Cancer: overview	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04
	Cardiovascular disease	0,13	0,13	0,12	0,13	0,12	0,13	0,13
	Endocrine and metabolic disease	0,00	0,00	0,00	0,15	0,00	0,00	0,00
	Immune disease	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00
	Infectious disease: bacterial	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12
	Infectious disease: parasitic	0,14	0,12	0,12	0,13	0,12	0,13	0,13

Annexes

Level 1	Level 2	0	8	20	40	48	120	240
	Infectious disease: viral	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	Neurodegenerative disease	0,43	0,45	0,44	0,46	0,43	0,46	0,42
Metabolism	Amino acid metabolism	13,54	13,21	13,24	13,40	13,26	13,34	13,42
	Biosynthesis of other secondary metabolites	2,90	2,91	2,90	2,83	2,91	2,87	2,83
	Carbohydrate metabolism	13,10	13,24	13,23	13,13	13,19	13,12	13,16
	Energy metabolism	5,29	5,32	5,34	5,25	5,34	5,27	5,24
	Glycan biosynthesis and metabolism	3,58	3,32	3,32	3,08	3,23	3,11	3,06
	Lipid metabolism	6,26	6,11	6,14	6,19	6,13	6,14	6,18
	Metabolism of cofactors and vitamins	11,79	11,49	11,54	11,33	11,54	11,44	11,29
	Metabolism of other amino acids	5,17	4,91	4,89	5,07	4,90	5,04	5,11
	Metabolism of terpenoids and polyketides	9,14	9,36	9,47	9,23	9,52	9,13	9,27
	Nucleotide metabolism	1,56	1,58	1,59	1,52	1,59	1,54	1,51
	Xenobiotics biodegradation and metabolism	7,87	8,95	8,88	9,46	8,91	9,29	9,56
Organismal Systems	Circulatory system	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	Development and regeneration	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	Digestive system	0,04	0,04	0,04	0,03	0,04	0,04	0,03
	Endocrine system	0,38	0,41	0,40	0,43	0,41	0,41	0,43
	Environmental adaptation	0,18	0,19	0,18	0,18	0,18	0,19	0,18
	Excretory system	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	Immune system	0,11	0,10	0,11	0,10	0,11	0,10	0,10
	Nervous system	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	Sensory system	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Résumé

Les travaux de cette thèse se sont inscrits dans deux projets de recherche : MeSeine Innovation, piloté par la Direction Innovation du SIAAP, et NOROVIRUS porté par le SMBT. Les objectifs étaient de caractériser les communautés microbiennes de la Seine de l'amont à l'aval de l'agglomération parisienne afin d'établir un état de référence de ces communautés avant la mise en place de la désinfection à l'acide performique (PFA) des rejets de la station d'épuration (STEP) de Seine Valenton et de regarder les effets potentiels de rejets de STEP traités au PFA sur les communautés microbiennes du milieu récepteur. Deux approches ont été suivies : l'une en microcosme (conditions opératoires contrôlées), l'autre *in situ* (sur la lagune recevant les rejets traités au PFA de la STEP de Mèze (34)).

L'étude des variabilités spatiales et temporelles des communautés microbiennes de la Seine a mis en évidence les principaux phyla suivants : *Proteobacteria*, *Actinobacteriota*, *Firmicutes* et *Bacteroidota*. De plus, il est ressorti de nos observations une forte variabilité temporelle et une faible variabilité spatiale de la structure de la communauté bactérienne. Une base de données de référence sur la diversité microbienne de la Seine pour l'agglomération parisienne avant la mise en œuvre de la désinfection au PFA a été établie. Certains genres bactériens présents dans le rejet de la STEP Seine centre ont montré une sensibilité au PFA, notamment *Flavobacterium*, *Pedobacter*, *Massilia*, *Exiguobacterium* et *Sphingorhabdus*, alors que d'autres ont résisté au PFA *Acinetobacter*, *Leucobacter*, *Thiothrix*, *Paracoccus*, *Cloacibacterium* et *Hydrogenophaga* au regard de leur structure membranaire Gram positive ou Gram négative. Nos résultats ont souligné l'efficacité du PFA dans la réduction de l'abondance microbienne et la modification des communautés bactériennes à de faibles concentrations et à des temps de contact courts, à savoir un CT (concentration x temps) de 8 mg/l•min. Les résultats obtenus sur la lagune de Thau ont montré une stabilité de l'abondance bactérienne dans ses sédiments pendant ou en l'absence de traitement au PFA. Des variations ont été observées dans la colonne d'eau, notamment après la fin du traitement au PFA. Ces variations semblaient être plus influencées par des facteurs environnementaux tels que la température et la pluviométrie que par l'action du PFA lui-même. Ces travaux soulignent donc l'importance des facteurs environnementaux comme la température dans la dynamique des communautés bactériennes, ainsi que la variabilité de la réponse des différentes communautés à un traitement spécifique comme celui à l'acide performique.

Mots clés : Seine, diversité microbienne, activité microbienne, abondance microbienne, acide performique, désinfection, rejet de STEP

Abstract

This thesis was part of two research projects: MeSeine Innovation, managed by the SIAAP Innovation Department, and NOROVIRUS, managed by the SMBT. The objectives were to characterize the microbial communities of the Seine River from upstream to downstream of Paris conurbation, in order to establish a baseline of these communities prior to the implementation of performic acid (PFA) disinfection of discharges from Seine Valenton wastewater treatment plant (WWTP), and to examine the potential effects of PFA-treated WWTP discharges on microbial communities in the receiving environment. Two approaches were followed: one in microcosm (controlled operating conditions), the other *in situ* (on the lagoon receiving PFA-treated discharges from the Mèze WWTP (34)).

A study of the spatial and temporal variability of microbial communities in the Seine River revealed the following main phyla: *Proteobacteria*, *Actinobacteriota*, *Firmicutes* and *Bacteroidota*. In addition, our observations revealed high temporal variability and low spatial variability in bacterial community structure. A reference database on the microbial diversity of the Seine River in Paris conurbation prior to the implementation of PFA disinfection was established. Some bacterial genera present in the discharge from the Seine centre WWTP showed sensitivity to PFA, notably *Flavobacterium*, *Pedobacter*, *Massilia*, *Exiguobacterium* and *Sphingorhabdus*, while others were resistant to PFA *Acinetobacter*, *Leucobacter*, *Thiothrix*, *Paracoccus*, *Cloacibacterium* and *Hydrogenophaga* with regard to their Gram-positive or Gram-negative membrane structure. Our results highlighted the effectiveness of PFA in reducing microbial abundance and modifying bacterial communities at low concentrations and short contact times, namely a CT (concentration x time) of 8 mg/l•min. The results obtained on the Thau lagoon showed a stable bacterial abundance in its sediments during or in the absence of PFA treatment. Variations were observed in the water column, particularly after the end of PFA treatment. These variations seemed to be more influenced by environmental factors such as temperature and rainfall than by the action of the PFA itself. This work therefore highlights the importance of environmental factors such as temperature in bacterial community dynamics, as well as the variability in the response of different communities to a specific treatment such as performic acid.

Keywords: Seine River, microbial diversity, microbial activity, microbial abundance, performic acid, disinfection, WWTP discharge