UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

MESURE DES CT D'INACTIVATION DES BACTÉRIES SPORULANTES AÉROBIES PAR OZONATION

NATHALIE FACILE
DÉPARTEMENT DES GÉNIES CIVIL, GÉOLOGIQUE ET DES MINES
ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

MÉMOIRE PRÉSENTÉ EN VUE DE L'OBTENTION
DU DIPLÔME DE MAÎTRISE ÈS SCIENCES APPLIQUÉES
(GÉNIE CIVIL)
OCTOBRE 1998

© Nathalie Facile, 1998.

National Library of Canada
Bibliothèque nationale du Canada

Acquisitions and Bibliographic Services
Acquisitions et services bibliographiques

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file Votre référence

Our file Notre référence

The author has granted a non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of this thesis in microform, paper or electronic formats.

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de cette thèse sous la forme de microfiche/film, de reproduction sur papier ou sur format électronique.

The author retains ownership of the copyright in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

0-612-38678-3

Canada

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

Ce mémoire intitulé :

MESURE DES CT D'INACTIVATION DES BACTÉRIES SPORULANTES AÉROBIES PAR OZONATION

présenté par : Nathalie FACILE

en vue de l'obtention du diplôme de : Maîtrise ès sciences appliquées

a été dûment accepté par le jury d'examen constitué de :

M. Raymond DESJARDINS, M. Ing., président

Mme Michèle PRÉVOST, Ph. D., membre et directrice de recherche

M. Peter HUCK, Ph. D., membre

A mes parents,
à mon frère, Laurent.

Remerciements

En tout premier lieu, je tiens à remercier Michèle Prévost, ma directrice de recherche, pour m'avoir accueillie à la Chaire Industrielle en Eau Potable, il y a trois ans, pour mon PFE et pour m'avoir de nouveau fait confiance pour une maîtrise. A chacune de nos discussions, j'ai pu apprécier son expertise dans le domaine ainsi que sa compétence à mener les projets. Son énergie, son optimisme et sa curiosité ont été de véritables moteurs à bien des égards tout au long de ce projet.

Je tiens aussi à remercier Raymond Desjardins, pour ses remarques et ses conseils judicieux, ainsi que pour les nombreuses anecdotes rattachées à ses métiers d'ingénieur et d'enseignant qui ont ponctué nos discussions.

Je voudrais remercier Monsieur Peter Huck pour avoir accepté du juger mon travail et pour s'être déplacé jusqu'à Montréal pour la présentation de ce mémoire. En outre, je voudrais remercier Monsieur Bernard Clément, professeur de Mathématiques à l'École Polytechnique de Montréal, pour l'aide qu'il m'a fournie sur la partie statistique de l'étude.

Mon année de recherche dans les laboratoires de la Chaire en Eau Potable n'aurait pas été aussi agréable et mon travail n'aurait pas été aussi enrichissant sans la présence d'une équipe compétente, dynamique, sachant créer une atmosphère de travail stimulante et détendue. Je tiens ici à les en remercier tous : Benoit Barbeau, pour m'avoir suivie au cours de mon PFE, et avoir renouvelé l'expérience pour ma maîtrise : sa patience sans faille est particulièrement à souligner ; la patience de Boniface Koudjonou a, elle aussi, été mise à rude épreuve. Je suis touchée de l'intérêt constant qu'ils ont porté à mon projet. Leurs questions et leurs remarques ont enrichi et fait progresser mon travail. Je tiens aussi à remercier Josée Coallier, pour m'avoir éclairée sur la partie microbiologique de mon projet et pour avoir analysé des lames pour moi, ainsi que Denis Allard sans qui le montage d'ozonation n'aurait pas existé. Je voudrais

dire un très grand merci à Jacinthe et Julie, sans qui travailler dans ces laboratoires n'aurait pas été un si grand plaisir : j'ai apprécié non seulement leur professionnalisme, mais encore leur bonne humeur communicative, leur dynamisme et toutes les pauses-café partagées avec elles !

L'équipe de la Chaire au complet ne se trouve pas à l'École Polytechnique, et je voudrais ici souligner combien j'ai apprécié de retrouver ses autres membres au cours de diverses réunions telles que le party de Noël, les shower et les fins de mémoires ou de thèses ; et je n'oublie pas à l'école : Shokoufeh et Rima pour leur soutien, Jean-François et John pour leurs encouragements, Anouk et Patrick pour le camping, les grillades et le jeu du dictionnaire !

Merci surtout à Nicolas pour sa confiance en moi. L'amour qu'il me porte est la plus grande des motivations et son optimisme sans faille, le plus grand des soutiens. Ses questions ont été la source de longues discussions qui ont poussé plus loin ma réflexion ; je suis admirative de sa rigueur scientifique et de sa précision orthographique et grammaticale, mises au service de la relecture de mon mémoire.

Enfin, je voudrais remercier mes parents qui, tout au long de mes études, que ce soit à Paris ou à Montréal, ont su m'encourager et me soutenir, sans jamais entraver mes choix. Ce mémoire est l'aboutissement de plusieurs années d'études qu'ils ont rendues possibles tout en me laissant libre de les conduire à ma guise. Je leur suis infiniment reconnaissante de m'avoir donné cette liberté.

Résumé

La détection des (oo)cystes de protozoaires est essentielle afin d'éviter de nouvelles épidémies de gastro-entérites comme celle qui toucha Milwaukee en 1993 (près de 400 000 cas recensés et 112 cas de décès attribués à la cryptosopridiase). Or leur détection directe relève de techniques complexes, coûteuses et non transposables en usine comme routine d'analyse en laboratoire de contrôle. En outre, aucune corrélation n'a pu être établie entre la présence de ces organismes et celle des indicateurs traditionnels de l'eau potable.

Dans l'optique d'utiliser les spores de bactéries aérobies comme indicateur de l'inactivation des (oo)cystes potentiellement présents dans l'eau, il convient de caractériser précisément la résistance des spores aux divers traitements d'une filière de potabilisation de l'eau. Même si l'inactivation chimique ne constitue pas le procédé le plus efficace pour l'abattement des (oo)cystes de protozoaires, elle demeure néanmoins une étape importante, quelle que soit la filière, puisqu'elle constitue généralement la dernière barrière de protection des consommateurs contre les organismes pathogènes avant le réseau de distribution.

L'objectif de ce projet était de caractériser l'inactivation des spores de bactéries aérobies par l'ozone ; deux paramètres ont été analysés pour la description des cinétiques d'inactivation : l'effet du pH et l'influence de la souche bactérienne utilisée.

Les essais ont été réalisés dans un réacteur en cuvée, parfaitement mélangé, à température ambiante et constante. Les tests ont couvert des doses croissantes d'ozone, pour des pH de 6,3 et 8,2. L'utilisation de deux tampons différents (tampon phosphate et tampon borate) a permis de préciser le mode d'action de l'ozone. Les souches testées étaient une souche commerciale de *B. subtilis* (souche de référence), et une souche environnementale provenant de la rivière des Mille-Iles (Ville de Laval).

L'ozone est une molécule instable en solution aqueuse qui se décompose pour former des radicaux, notamment les radicaux hydroxyles ($OH^{\bullet}$), espèce chimique très réactive, mais peu spécifique. La cinétique de décomposition de l'ozone a été étudiée. Pour les deux conditions de pH, l'évolution du résiduel d'ozone est décrite par une décroissance exponentielle ; des conditions basiques sont favorables à une plus forte décomposition car celle-ci est catalysée par les ions OH^-.

L'effet du pH a pu être caractérisé : pour une dose d'ozone donnée, le taux d'inactivation augmente dans des conditions acides, car elles privilégient la stabilisation de l'ozone moléculaire en limitant son auto décomposition. Cependant, l'hypothèse d'un effet du pH sur les micro-organismes n'est pas à écarter.

Les essais réalisés ont montré que le processus d'inactivation est principalement moléculaire : la présence ou l'absence de pièges à radicaux dans le milieu réactionnel (tampon phosphate et tampon borate, respectivement) n'a pas entraîné de différences significatives sur les efficacités d'inactivation atteintes. L'oxydation radicalaire due aux radicaux $OH^{\bullet}$ existe à pH élevé, mais son impact demeure faible.

La nature des micro-organismes influence l'efficacité d'inactivation : la souche environnementale testée est moins résistante que *B. subtilis* à l'ozonation. Il est probable que des différences structurelles au niveau membranaire soient en cause, entraînant des susceptibilités différentes au pH et des réactivités plus ou moins grandes par rapport à l'ozone.

Pour les conditions testées, le modèle de Hom intégrant la décroissance exponentielle du résiduel d'ozone s'est révélé le meilleur pour la description des données. Cependant, il n'est pas bien adapté à la modélisation de l'inactivation d'organismes très résistants.

Finalement, la comparaison des résultats obtenus avec ceux rencontrés dans la littérature pour les (oo)cystes de protozoaires a permis de conclure que les bactéries sporulantes aérobies sont de bons indicateurs de l'efficacité d'ozonation des (oo)cystes de *G. lamblia* et de *C. parvum* : des conditions permettant l'inactivation des 3 log de spores devraient permettre d'inactiver plus de 3 log de (oo)cystes de protozoaires.

Le choix d'un indicateur pour la détection indirecte des (oo)cystes de protozoaires est une entreprise nécessitant l'analyse de nombre d'influences. La détermination de l'efficacité d'ozonation des spores bactériennes aérobies a permis de mettre en valeur l'interdépendance des paramètres étudiés. Ce projet n'est qu'une étape de la démarche globale entreprise. Il importe donc de poursuivre ces études, surtout à pleine échelle, afin de mieux cerner tous les éléments entrant en ligne de compte dans le processus d'inactivation par ozonation, notamment l'impact des populations mixtes, ainsi que les effets de la température. En outre, le développement d'un modèle de prédiction d'inactivation mieux adapté à des organismes très résistants devrait être entrepris.

Abstract

Detection of pathogenic protozoan (oo)cysts is essential so gastroenteritis outbreaks such as the 1993 Milwaukee crisis can be avoided (400 000 people reported ill and 112 death cases attributed to cryptosporidiosis). However, direct detection methods are non-applicable as control routine for water facilities for they remain complex and expensive. Furthermore, no correlation has been established between these pathogens and water quality indicators.

Bacterial aerobic spores are to thought to be used as surrogate indicators of protozoan cysts. That is why their resistance to water treatments must be characterized. Even if chemical inactivation does not provide the best removal of such organisms, it remains essential, as it is the last protection for tap water consumers against pathogens before distribution systems.

The main objective of the project was to characterize inactivation of bacterial aerobic spores by calculating their ozonation CT values. Two parameters were investigated: pH effect and influence of the bacterial strain.

Trials were performed in a perfectly stirred batch reactor, at room temperature. Ranges of increasing applied ozone dosages were tested, at pH 6,3 and 8,2. Two different buffers were investigated (phosphate and borate). Two bacterial strains were assessed: reference strain of *B. subtilis*, and environmental strain of Mile-Iles river (Ville de Laval).

Molecular ozone is unstable in water and its decomposition results in radicals' formation, especially highly reactive but non-selective $OH^{\bullet}$ hydroxyle radicals. Kinetics of ozone decomposition were first analyzed. For both pH levels, ozone residual

evolution was well described by exponential decay. Decay rate increased with increasing pH since OH^- ions are catalyzing agents for ozone decomposition.

The effect of pH was characterized: for a given applied ozone dose, lower pH provides greater inactivation rates because it promotes molecular ozone stabilization, by limiting the oxidant decomposition. However, it is possible pH also influences microorganisms resistance.

Oxidation pathway was clarified: presence or lack of radical scavengers (in phosphate or borate buffer respectively) did not provide any significant differences between inactivation efficiencies. Thus, it was clearly demonstrated molecular ozone is mainly responsible for microorganisms' inactivation. Higher pH allows radical oxidation, but its yield remains poor.

Bacterial strain is a factor of influence when one wants to assess ozonation efficiency: the environmental strain exhibited less resistance to ozone than the reference strain of *B. subtilis*. This effect could be attributed to differences between structural membrane components resulting in more or less reactivity towards ozone.

In our experimental conditions, Hom model with exponential decay of ozone residual provided the best results for the description of inactivation data. However, it did not proved to be well adapted to modeling of resistant microorganisms' inactivation.

In the end, by comparing our results with results for protozoan (oo)cysts ozonation, we came to the conclusion that bacterial aerobic spores are a reliable surrogate indicator for *G. lamlia* and *C. parvum* (oo)cysts: conditions leading to 3 log inactivation of bacterial aerobic spores should yield more than 3 log for protozoan (oo)cysts.

Surrogate indicator selection for indirect detection of protozoan cysts requires analyses of a great amount of data. Determination of ozonation efficiency for spores' inactivation highlighted interdependence of the parameters under study. As this project is part of a global process, it is important studies be followed, especially full-scale studies, in order to (1) assess all factors influencing ozone inactivation and (2) better

understand their impact, especially mixed populations and temperature effects. Finally, customized inactivation model should be developed for accurate description of resistant microorganisms' inactivation.

Table des matières

Remerciements v

Résumé vii

Abstract x

Table des matières xiii

Liste des tableaux xvii

Liste des figures xix

Liste des sigles et abréviations xxi

Liste des annexes xxii

Chapitre 1 Introduction et objectifs 1

1.1. Introduction 1

1.2. Objectifs 3

Chapitre 2 Revue de littérature 4

2.1. La problématique des (oo)cystes de protozoaires 4

2.1.1. *Giardia lamblia* et *Cryptosporidium parvum* 4

2.1.1.1. *Giardia lamblia* 5

2.1.1.2. *Cryptosporidium parvum* 6

2.1.1.3. Généralités sur la giardiase et la cryptosporidiase 6

2.1.1.4. Les différentes réglementations existantes 7

2.1.2. Les indicateurs traditionnels de la contamination des eaux 8

2.1.3. Indicateurs de (oo)cystes de protozoaires 9
2.1.3.1. Un indicateur non biologique : les micro-sphères de polystyrène 9
2.1.3.2. *Clostridium perfringens* 10
2.1.3.3. *Bacillus* 10
2.2. La désinfection : une barrière chimique contre les micro-organismes pathogènes 11
2.2.1. Comparaison des efficacités des principaux désinfectants utilisés 11
2.2.2. Les principes généraux de la désinfection 12
2.2.2.1. Le modèle de Chick-Watson 12
2.2.2.2. Les déviations par rapport à la loi de Chick-Watson 13
2.2.2.3. Le modèle de Hom 15
2.2.2.4. Le modèle de Hom modifié par Haas 15
2.2.3. Le Ct comme mesure d'efficacité de la désinfection 16
2.3. Applications de l'ozone 18
2.3.1. Les propriétés chimiques de l'ozone 18
2.3.1.1. Description générale 18
2.3.1.2. Le cycle de décomposition de l'ozone 18
2.3.1.3. Les différents modes d'oxydation 20
2.3.2. Les Ct d'inactivation de Giardia et de Cryptosporidium 20
2.3.2.1. Les Ct d'inactivation de *Giardia lamblia* 21
2.3.2.2. Les Ct d'inactivation de *Cryptosporidium parvum* 22
2.3.3. Les facteurs influençant l'efficacité d'ozonation 22
2.3.3.1. La température et le pH 23
2.3.3.2. La matière organique et l'alcalinité 23
2.3.3.3. La nature des micro-organismes 24
2.3.3.4. Conclusion 25

Chapitre 3 Matériel et méthodes 27

3.1. Description sommaire de la procédure expérimentale 27

3.2. Matériel utilisé 28
3.2.1. Production de l'ozone et de la solution mère 28
3.2.2. Le réacteur 29
3.2.3. Préparation du matériel 30
3.2.3.1. La verrerie et le matériel de prélèvement des échantillons 30
3.2.3.2. Les solutions d'indigo trisulfonate de potassium 31
3.2.3.3. Les solutions tampon 31
3.2.3.4. Les cultures bactériennes 32
3.3. Méthodes analytiques 34
3.3.1. Mesure du résiduel d'ozone 34
3.3.2. Mesure de la viabilité des spores 35
3.4. Analyses statistiques 35
3.4.1. Cinétique de décroissance de l'ozone : évaluation de k* 35
3.4.1.1. Description des courbes de décroissance du résiduel d'ozone 35
3.4.1.2. Ajustement du paramètre k^* 35
3.4.2. Modèle de Hom modifié par Haas : évaluation de n, m et k 36
3.5. Vérifications et essais préliminaires 36
3.5.1. Pouvoir tampon des solutions diluées 36
3.5.2. Influence des tampons sur la viabilité des spores 37
3.5.3. Adsorption des spores sur les parois des réacteurs 38
3.5.4. Influence des suspensions de spores sur la lecture spectrophotométrique 39
3.5.5. Température de la solution dans les réacteurs 40
3.5.6. Cinétique de décroissance de l'ozone : mesure du résiduel à 15 s 41

Chapitre 4 Résultats et discussion 43

4.1. Introduction 43
4.2. Inactivation de spores bactériennes aérobies par l'ozone : impact du pH et de la souche bactérienne (INACTIVATION OF BACTERIAL AEROBIC SPORES BY OZONE: IMPACT OF pH AND BACTERIAL STRAIN) 44

4.2.1. Abstract 44
4.2.2. Introduction 45
4.2.3. Materials and methods 46
4.2.3.1. Laboratory waters 46
4.2.3.2. Ozonation 47
4.2.3.3. Bacterial culture 47
4.2.3.4. Glassware and other materials 48
4.2.3.5. Analytical methods 48
4.2.3.6. Statistical analysis 49
4.2.3.7. Experimental procedure 49
4.2.3.8. Inactivation models and Ct calculations 50
4.2.4. Results and discussion 52
4.2.4.1. Ozone decomposition and CT computation method 52
4.2.4.2. Results of inactivation kinetics 55
4.2.4.3. Influence of pH and buffer 58
4.2.4.4. Influence of the strain 61
4.2.4.5. Influence of the inactivation model 63
4.2.5. Conclusions 65
4.2.6. Acknowledgments 66
4.2.7. References 67

Chapitre 5 Conclusions et recommandations 71

5.1. Synthèse des résultats 71
5.2. Prochaines avenues 73
5.3. Conclusion générale 76

Références 78

Annexes 86

Liste des tableaux

Tableau 2.1 : Norme du « Enhanced Surface Water Treatment Rule ».(USEPA, 1994) pour l'enlèvement des (oo)cystes de *Giardia* et de *Cryptosporidium* 8

Tableau 2.2 : : Valeurs de Λ à 5°C pour différents oxydants et organismes (l/mg. min). (Morris, 1975)..... 12

Tableau 2.3 : Résumé des valeurs des Ct d'inactivation pour *G. lamblia* 21

Tableau 2.4 : Résumé des valeurs des Ct d'inactivation pour *C. parvum*..... 22

Tableau 3.1 : Tampon phosphate : quantités de produits chimiques pour 1 l de solution mère (pKa = 7,12 à 25°C) 32

Tableau 3.2 : Tampons borate : quantités de produits chimiques pour 1 l de solution mère (pKa = 9,14 à 25°C) 32

Tableau 3.3 : Pouvoir tampon des solutions diluées : stabilité du pH en fonction des doses d'ozone utilisées..... 37

Tableau 3.4 : Effet des tampons et de leur forces ioniques sur la viabilité des spores sur une période de 24 h. Les forces ioniques sont exprimées en mol/l. Les résultats sont exprimés en log/ml 37

Tableau 3.5 : Adsorption des spores de *B. subtilis* et de la souche environnementale sur les parois des réacteurs pour les différents tampons utilisés..... 38

Tableau 3.6 : Absorbance à 600 nm de suspensions de spores bactériennes de *B. subtilis* à plusieurs concentrations 39

Tableau 3.7 : Absorbance à 600 nm de suspensions de spores bactériennes de *B. subtilis* à plusieurs concentrations dans une solution de potassium d'indigo trisulfonate ... 40

Table 4.1: Summary of transferred ozone dosage ranges (mg O_3/l) investigated to determine the inactivation kinetics of spores of *B. subtilis* and of an environmental strain in aqueous conditions using a batch reactor 52

Table 4.2 : Summary of the kinetic parameters for the Hom model with exponential decay of ozone residual, conducted in a batch reactor at 20°C 55

Liste des figures

Figure 2.1 : Cystes de *G. lamblia* et oocystes de *C. parvum*. Échelle : la barre en bas à droite est de 10 µm. (Dr H. D. A. Lindquist, USEPA) 5

Figure 2.2 : Trophozoïtes de *Giardia lamblia* (échelle non disponible) 6

Figure 2.3 : Oocystes de *Cryptosporidium parvum* et excystation de certains oocystes (échelle non disponible) 6

Figure 2.4 : Déviations observées par rapport à la loi de Chick-Watson pour l'inactivation chimique de micro-organismes. 14

Figure 2.5 : Cycle simplifié de la décomposition de l'ozone en solution aqueuse. Adapté de Nickols et Varas (1992) 19

Figure 3.1 : Montage de production de l'ozone et de la solution mère d'oxydant 29

Figure 3.2 : Schéma du montage expérimental pour la détermination des Ct d'inactivation par l'ozone 30

Figure 3.3: Relations entre les résiduels d'ozone mesurés à 15 secondes et les doses d'ozone appliquées, pour le tampon phosphate (■) et le tampon borate (□) 41

Figure 4.1 : Relationships between measured ozone residuals at 15 seconds of contact time and applied ozone doses, in phosphate buffer (□) and in borate buffer (■), for pH 6.3 and pH 8.2 50

Figure 4.2: Typical ozone decomposition curves obtained in phosphate buffer at pH 6.3 (■) and pH 8.2 (□), at 20°C in a batch reactor 53

Figure 4.3 : Typical inactivation curves for spores of *B. subtilis*, in phosphate buffer, at pH 6.3 (■) and pH 8.2 (□), in a batch reactor at 20°C. (Applied ozone dose in mg O_3/l) 54

Figure 4.4 : Example of lower and upper bounds of the modified Hom model (dashed lines), compared with the experimental (■) and predicted (solid line) curves 56

Figure 4.5 : CT calculated with Hom model with exponential decay, for *B. subtilis* and an environmental strain, in phosphate (solid lines) and borate (dashed lines) buffers, in a batch reactor at 20°C 56

Figure 4.6: CT values for *B. subtilis* at pH 6.3 (dashed lines) and pH 8.2 (solid lines) in phosphate buffer for the same applied ozone dose of 1.16 mg O_3/l, in a batch reactor at 20°C 59

Figure 4.7: CT values against ozone dose obtained for *B. subtilis*, in phosphate buffer (solid lines) and in borate buffer (dashed lines) at pH 8.2, at room temperature in a batch reactor 61

Figure 4.8: CT values obtained for reference strain of *B. subtilis* (solid lines) and environmental strain (dashed lines) in phosphate buffer at pH 8.2, at room temperature, in a batch reactor at 20°C 62

Figure 4.9: Comparison of predicted CT values for *B. subtilis* using Hom model with exponential decay and Chick-Watson model at pH 6.3 (□) and at pH 8.2 (■) 64

Figure 5.1: Courbes d'abattement de *B. subtilis*, pour un niveau d'inactivation donné, en fonction de la dose d'ozone appliquée et du temps de contact, dans un tampon phosphate à pH 8,2 (dans un réacteur en cuvée et à température ambiante)..... 76

Figure II. 1: Souche de *B. subtilis*, tampon phosphate, pH = 6.3 92

Figure II. 2: Souche de *B. subtilis*, tampon phosphate, pH = 8.2 92

Figure II. 3: Souche de *B. subtilis*, tampon borate, pH = 6.3 93

Figure II. 4: Souche de *B. subtilis*, tampon borate, pH = 8.2 93

Figure II. 5: Souche environnementale, tampon phosphate, pH = 6.3 94

Figure II. 6: Souche environnementale, tampon phosphate, pH = 8.2 94

Liste des sigles et abréviations

BHA : Bactéries hétérotrophes aérobies ;

BSA : Bactéries sporulantes aérobies ;

CMA : Concentration maximale admise ;

DI_{50} : Dose infectieuse pour infecter 50% des patients testés ;

OMS : Organisation mondiale de la santé ;

SIDA : Syndrome d'immuno-déficience acquise ;

SWTR : Surface water treatment rule ;

UFC : Unité formatrice de colonie ;

USEPA : United states environmental protection agency ;

UTN : Unité de turbidité néphélométrique.

Liste des annexes

Annexe I : Différentes méthodes de préparation des suspensions bactériennes 86
Annexe II : Courbes d'inactivation de *B. subtilis* et de la souche environnementale testée..... 91

Chapitre 1
Introduction et objectifs

1.1. Introduction

Depuis la fin des années 1980, les États-Unis ont connu de nombreuses épidémies de gastro-entérites dues à la présence de (oo)cystes de protozoaires dans les eaux potables. Les maladies entériques responsables de ces épidémies sont la giardiase et la cryptosporidiase, causées respectivement par les cystes de *Giardia* et les oocystes de *Cryptosporidium*. Pour les seules années 1993 et 1994, le groupe « Surveillance for waterborne-disease outbreaks » (de l'USEPA) rapporte 30 épidémies d'origine hydriques, dont 10 ont été attribuées aux (oo)cystes de *Giardia* et de *Cryptosporidium*. Plus récemment, une étude a montré que pour la période 1971-1994, les (oo)cystes de protozoaires étaient les agents pathogènes les plus fréquemment identifiés pour les épidémies de gastro-entérites apparues aux Etats-Unis, en Angleterre et au Canada (Craun et al., 1998).

Ces épidémies se sont déclenchées malgré le fait que les usines de traitement respectaient les normes microbiologiques de qualité fondées sur l'absence des indicateurs traditionnels de l'eau potable : les coliformes totaux et fécaux. En outre, dans son étude de 187 cas d'épidémies de gastro-entérites causées par plusieurs agents pathogènes (bactéries, virus et (oo)cystes de protozoaires), Craun a montré qu'il n'existait aucune corrélation entre la présence de coliformes dans l'eau et l'apparition de ces épidémies (Craun et al., 1997).

Ce manque de corrélation est renforcé par le fait que les (oo)cystes de protozoaires sont plus facilement enlevés par voie physique que les bactéries coliformes (du fait de leur plus petite taille), mais beaucoup plus résistants à la désinfection (de part leur structure).

L'envergure des épidémies de gastro-entérites telles que celles qui touchèrent Milwaukee en 1993 (près de 403 000 cas déclarés et 112 morts) ou Las Vegas en 1994 (58 morts attribuées à la cryptosporidiase), ainsi que le resserrement des normes d'abattement des (oo)cystes de protozoaires[1] confirment l'urgence de trouver un moyen de détection de ces pathogènes plus simple que les méthodes actuelles telles que l'immunofluorescence ou la cytométrie de flux décrites par Jakubowski et al . (1996). Les études se sont donc orientées vers la détection indirecte, par la recherche d'indicateurs de ces parasites. Ainsi, plusieurs études ont démontré la résistance importante des spores des bactéries sporulantes aérobies (BSA), notamment les spores de *Bacillus*, aux enlèvements physiques et chimiques. Cette résistance étant supérieure à celles des (oo)cystes, l'abattement des spores au cours du traitement confirmerait celui des parasites pathogènes potentiellement présents dans l'eau.

Pour ce qui est de l'enlèvement physique, les études les plus récentes indiquent que les spores de BSA sont de bons indicateurs de l'efficacité d'une filière de traitement. En effet, quelle que soit la filière de traitement utilisée, les spores se révèlent être très sensibles aux variations des caractéristiques de l'eau et du traitement (pH, température, nature et dose du coagulant), et sont en cela, une mesure conservatrice des performances d'une usine (Lytle et al., 1996).

En ce qui concerne l'inactivation chimique, les effets des désinfectants sur les spores bactériennes sont peu documentés. Cependant, la plus grande résistance des spores vis-à-vis des principaux oxydants par rapport à d'autres organismes a déjà été démontrée (Kawamura et al., 1986). Barbeau a déterminé les Ct de spores de *Bacillus* pour le chlore. Les comparaisons avec les Ct requis pour l'inactivation des cystes de *Giardia* confirment cette résistance des spores (Barbeau, 1996). Il est donc nécessaire de poursuivre les recherches pour déterminer l'efficacité des autres oxydants, et notamment celle de l'ozone, oxydant le plus puissant utilisé dans les filières de

---

[1] Actuellement en cours de révision à l'USEPA

potabilisation de l'eau et donc le plus à même d'inactiver les (oo)cystes de protozoaires (Miller, 1994 ; Sous Comité fédéral-provincial sur l'eau potable, 1997).

1.2. Objectifs

Etant donné que les spores de BSA sont plus résistantes à l'inactivation chimique que les (oo)cystes de protozoaires (tels *Giardia* et *Cryptosporidium*), elles pourraient servir d'indicateurs de l'efficacité des traitements appliqués dans différentes filières de potabilisation de l'eau (Barbeau, 1996 ; Coallier et al., 1996; Lytle et al., 1996). Cependant, il est nécessaire de préciser les corrélations qui existent entre l'inactivation des spores de BSA et celle des organismes pathogènes visés afin de mieux cibler les traitements à mettre en œuvre (doses de désinfectant et temps de contact, donc Ct, requis).

L'objectif principal de cette étude est donc de déterminer les Ct d'inactivation des spores de BSA par ozonation et d'analyser dans quelle mesure il est possible de les corréler avec ceux des (oo)cystes de protozoaires disponibles dans la littérature scientifique.

En marge de cette étude, il est apparu intéressant d'étudier plusieurs facteurs pouvant avoir une influence sur l'efficacité d'ozonation. Le premier de ces facteurs est le pH, dont l'effet est encore controversé (Farooq et al., 1977 ; Wickramanayake et al., 1984). Dans le cadre d'une possible utilisation des BSA en usine comme indicateur des (oo)cystes de protozoaires, nous avons aussi voulu évaluer l'impact de la souche de BSA utilisée, en faisant des essais avec une souche environnementale.

Chapitre 2
Revue de littérature

2.1. La problématique des (oo)cystes de protozoaires

2.1.1. *Giardia lamblia* et *Cryptosporidium parvum*

Giardia lamblia et *Cryptosporidium parvum* sont des protozoaires. Ce sont des eucaryotes qui n'ont généralement pas de paroi cellulaire. Ils sont hétérotrophes et se nourrissent par ingestion de macromolécules, de particules ou de cellules. Ils sont aussi caractérisés par leur cycle de vie dans lequel les cellules végétatives sont appelées trophozoïtes. Les formes au repos sont des (oo)cystes ; il en existe de deux sortes :

- les (oo)cystes reproducteurs ;
- les (oo)cystes protecteurs : résistants, morphologiquement semblables à des spores, leur fonction est de survivre.

L'apparition de ces formes de résistance est déclenchée par la détérioration des conditions environnementales : la mise à sec, le manque de nutriments, la chaleur, le froid, la composition chimique du milieu font partie des facteurs conduisant à l'enkystement. Le protozoaire se met en boule, perd ses organites externes et secrète une série de parois externes. Les (oo)cystes sont extrêmement résistants aux facteurs environnementaux et restent viables de plusieurs mois à plusieurs années. Le retour à des conditions favorables induit très rapidement le processus inverse (Champiat, 1988). La Figure 2.1 présente des cystes de *G. lamblia* et des oocystes de *C. parvum*.

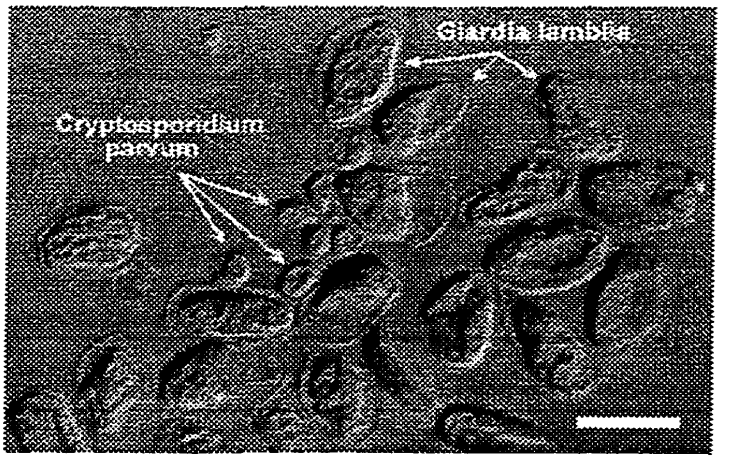

Figure 2.1 : Cystes de *G. lamblia* et oocystes de *C. parvum*. Échelle : la barre en bas à droite est de 10 µm. (Dr H. D. A. Lindquist, USEPA)

Jusqu'à récemment, on pensait que seules les eaux de surface (lacs, rivières et fleuves) pouvaient être contaminées par les (oo)cystes de protozoaires, et on supposait en outre que les sources souterraines étaient relativement bien protégées (Pontius, 1998). Or, de récentes études ont montré que les eaux souterraines pouvaient elles aussi être contaminées par ces organismes, de manière occasionnelle ou permanente (Hancock et al., 1998). De plus, elles sont à l'origine d'approximativement la moitié des épidémies de gastro-entérites aux États-Unis depuis 1984 ; mais celles-ci sont de plus petite envergure (Solo-Gabriele et Neumeister, 1996).

2.1.1.1. Giardia lamblia

Giardia lamblia est un protozoaire flagellé, mesurant de 6 à 20 µm (Figure 2.2). Son cyste (voir Figure 2.1) est à l'origine de la giardiase, maladie intestinale. Il est de forme ovale, d'une longueur de 8 à 12 µm et d'un diamètre 7 à 10 µm. L'épaisseur de la paroi cellulaire varie entre 0,3 et 0,5 µm et la microscopie électronique a montré qu'elle est composée d'éléments fibreux mêlés à de fines particules (Sheffield, 1979).

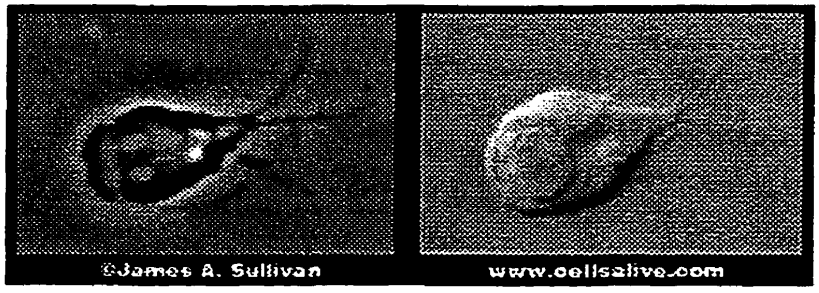

Figure 2.2 : Trophozoïtes de *Giardia lamblia* (échelle non disponible)

2.1.1.2. Cryptosporidium parvum

Cryptosporidium parvum est aussi un parasite, de forme ovale, mesurant de 4 à 6 µm (voir Figure 2.3). L'oocyste de *C. parvum* a un diamètre d'environ 5 µm, variant en fonction des espèces (voir Figure 2.1). Certains sont capables de traverser la membrane d'un filtre de 1 µm de porosité (Bitton, 1994).

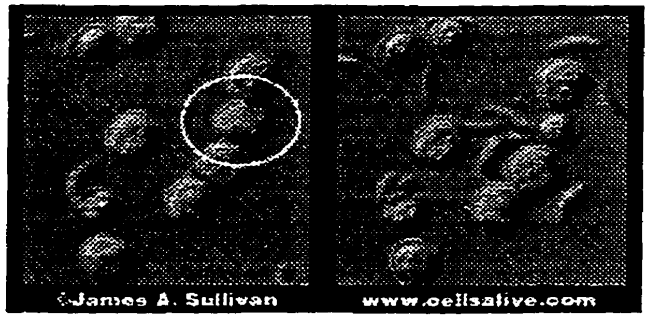

Figure 2.3 : Oocystes de *Cryptosporidium parvum* et excystation de certains oocystes (échelle non disponible)

2.1.1.3. Généralités sur la giardiase et la cryptosporidiase

Pour ce qui est de la giardiase, la dose minimale infectieuse rapportée est de 1 à 10 cystes, et la DI_{50} pour l'homme (nombre de cystes ingérés ayant pour effet d'infecter 50% des sujets) est de 19 cystes (Rendtorff, 1978). La maladie est caractérisée par des nausées, des frissons et la diarrhée (Sous Comité fédéral-provincial sur l'eau potable, 1997). Elle peut être traitée par antibiotiques et certains patients peuvent devenir des porteurs sains.

En ce qui concerne le cryptosporidiase, la DI_{50} calculée sur 29 sujets humains est de 132 oocystes (DuPont et al., 1995). Le principal symptôme associé à la maladie est une diarrhée liquide, accompagnée de nausées, de vomissements, et d'une déshydratation (Sous Comité fédéral-provincial sur l'eau potable, 1997). Comme il n'existe actuellement aucun traitement contre cette maladie, la guérison des patients dépend essentiellement de leur système immunitaire : normalement, les symptômes disparaissent au bout de deux semaines. Pour les malades immuno-déficients (atteints du SIDA, par exemple), une guérison complète n'a jamais été constatée et durant les épidémies de gastro-entérites associées aux (oo)cystes de protozoaires, ils sont des cibles particulièrement à risque (Pontius, 1998).

2.1.1.4. Les différentes réglementations existantes

Au vu des faibles doses infectieuses rapportées pour les deux types de (oo)cystes de protozoaires, il importe d'établir des normes de traitement pour prévenir le passage de ces organismes dans l'eau de consommation et tout risque d'épidémie associée. Alertées par les dangers encourus, les diverses organisations publiques en charge de la protection des populations ont donc émis des recommandations ou des normes, et ce, à plusieurs niveaux.

L'Organisation mondiale de la santé (OMS) reconnaît l'impact sanitaire de *Giardia* et de *Cryptosporidium* (500 000 cas de giardiase et plus de 3 millions de décès dus à des diarrhées chez des enfants de moins de 5 ans en 1993). Elle n'émet cependant des recommandations que sur *E. coli* (0 organisme dans 100 ml), et sur le chlore résiduel ($\geq$ 0,5 mg/l après 30 min, pour un pH inférieur à 8,0).

En ce qui concerne le Canada et le Québec, le document le plus récent (émis en juillet 1997 pour consultation publique par le Sous-comité fédéral-provincial sur l'eau potable) recommande une Concentration maximale admise (CMA) de 0 (oo)cyste viable dans 1 000 l pour *Giardia* et pour *Cryptosporidium* ; cependant, aucune surveillance n'est recommandée de part le manque de fiabilité des techniques actuelles. Pour le

Québec, le Règlement sur l'eau potable en vigueur ne mentionne rien sur *Giardia*, ni sur *Cryptosporidium*.

L'organisme gouvernemental le plus avancé en matière de réglementation est sans aucun doute l'USEPA, à l'origine du « Surface Water Treatment Rule » (1989) qui impose des normes microbiologiques concernant *Giardia* : pour des eaux de surface filtrées ou non, les usines doivent réaliser un abattement minimal de 99,9% (3 log) des cystes de *Giardia*. On suppose ainsi qu'un traitement physique conventionnel (coagulation, décantation, filtration) aboutissant à une turbidité inférieure à 0,5 UTN dans 95% des échantillons, assure un enlèvement de 2,5 log de cystes de *Giardia* (dans le cas de conditions optimisées). Les exigences d'enlèvement sont ajustées en fonction des niveaux de qualité de l'eau brute. Les exigences totales d'enlèvement spécifiées par l'USEPA sont montrées Tableau 2.1.

Tableau 2.1 . Norme du « Enhanced Surface Water Treatment Rule » (USEPA, 1994) pour l'enlèvement des (oo)cystes de *Giardia* et de *Cryptosporidium*

Norme proposée (Giardia et Cryptosporidium)	
Eau brute (#/100 l)	Enlèvement (log)
<1	3
1 à 10	4
10 à 100	5
> 100	6

2.1.2. Les indicateurs traditionnels de la contamination des eaux

Les deux groupes de micro-organismes les plus utilisés comme indicateurs de la contamination bactérienne sont les coliformes totaux et les coliformes fécaux. On retrouve les bactéries coliformes fécales (notamment *Escherichia coli)* en grand nombre dans les intestins et les excréments des animaux à sang chaud. Elles sont de ce fait utilisées comme indicateurs de qualité des eaux brutes et de la présence potentielle d'organismes pathogènes à la source. Les coliformes totaux sont par contre largement répartis dans la nature et n'indiquent pas nécessairement une contamination d'origine

fécale. Comme ils sont plus résistants à la chloration que les bactéries pathogènes communes, on les utilise donc de préférence comme indicateurs de l'efficacité du traitement de l'eau potable (Jakubowski et al., 1996).

Selon Miller (1994), des comptes élevés de coliformes fécaux pourraient indiquer un risque accru de contamination aux (oo)cystes de protozoaires. Ces conclusions ont été remises en cause suite aux récentes épidémies de cryptosporidiase de Las Vegas et de Milwaukee notamment (Craun et al., 1997), pour lesquelles aucune corrélation claire n'a pu être établie entre les comptes de coliformes fécaux et la présence des oocystes de *Cryptosporidium*.

2.1.3. Indicateurs de (oo)cystes de protozoaires

Le manque de corrélation entre les indicateurs traditionnels et les (oo)cystes de protozoaires (Craun et al., 1997) ont amené les chercheurs à se tourner vers d'autres indicateurs. Des paramètres globaux physiques bien maîtrisés ont d'abord été testés, tels que la turbidité ou le compte de particules, mais les corrélations restent difficiles à établir pour l'étape de désinfection. Dans le cas des indicateurs microbiologiques, les bactéries hétérotrophes aérobies (BHA) possèdent l'avantage d'être facilement utilisables en usine mais la relation entre leur présence dans l'eau et celle des (oo)cystes de protozoaires n'a pas été clairement établie (Jakubowski et al. 1996 ; Nieminski, 1995 #2185). 5A l'heure actuelle, aucun indicateur n'a encore été trouvé, mais plusieurs possibilités existent ; elles sont décrites ci-dessous.

2.1.3.1. Un indicateur non biologique : les micro-sphères de polystyrène

En 1997, Chiou a exploré une nouvelle avenue en utilisant des micro-sphères colorées avec une solution fluorescente. L'ozonation des ces billes en polystyrène entraîne une baisse de la fluorescence qu'il a été possible de corréler avec l'inactivation de *Giardia* : il faut pour cela déterminer un seuil de fluorescence équivalent à une perte de viabilité pour des cystes de *Giardia* (Chiou et al., 1997). Si cette nouvelle technique semble prometteuse, il faut cependant noter qu'aucune expérimentation avec d'autres

oxydants (chlore, bioxyde de chlore et chloramines) n'a été rapportée. En outre, les équipements nécessaires sont coûteux, ce qui limite encore son application en usine.

2.1.3.2. Clostridium perfringens

Clostridium perfringens est une bactérie Gram-positive, anaérobie et sporulante. Organisme pathogène toxinogène, c'est un hôte habituel de l'intestin des animaux et des humains (Haslay et Leclerc,). Ses spores sont extrêmement résistantes à la chaleur. C'est un indicateur de pollution fécale récente ou ancienne (Jakubowski et al., 1996).

Des études effectuées en usine ont permis de corréler la présence de *C. perfringens* et celle de (oo)cystes de protozoaires dans les eaux brutes, mais pas dans les eaux filtrées ; néanmoins, *C. perfringens* est un indicateur potentiel des (oo)cystes de protozoaires d'origine fécale (Payment, 1993). Cependant, le caractère anaérobie de ces micro-organismes complique les procédures pour leur détection et limite fortement leur utilisation en laboratoire de contrôle comme analyse de routine.

2.1.3.3. Bacillus

Le genre *Bacillus* est constitué de bactéries Gram-positives, en forme de bacille, aérobies ou anaérobies facultatives, et sporulantes. On les retrouve principalement dans les sols, les boues pour les espèces anaérobies, et les intestins des animaux. Leur capacité à former des spores résistantes à la chaleur et à la sécheresse leur permet de survivre sans nutriments ou en milieu pauvre en eau. *B. anthracis* est pathogène pour l'homme ainsi que certains animaux et des cas de gastro-entérites véhiculées par la nourriture ont été associés à *B. cereus* (Bergey, 1986).

Les spores de *Bacillus* ont une taille de 1 à 2 µm. Elles sont très résistantes à l'inactivation par les produits chimiques (Kawamura et al., 1986), et ont à ce titre le potentiel de devenir de bons indicateurs de (oo)cystes de protozoaires. Leur nature aérobie permet une culture facile sur un tampon saturé de bouillon nutritif (Barbeau et al., 1997). De plus, elles peuvent être présentes en grande quantité dans les eaux de surface, ce qui en facilite la détection à toutes les étapes du traitement. L'inconvénient

est qu'elles ne sont pas spécifiques à la pollution fécale. Leur détection ne peut donc pas remplacer celles des coliformes fécaux.

Néanmoins, plusieurs auteurs (Barbeau, 1996 ; Lytle et al., 1996) ont étudié leur potentiel en tant qu'indicateur en étudiant l'évolution des populations de spores de BSA pour plusieurs filières de traitement : selon (Lytle et al., 1996), l'abattement des spores environnementales constitue une mesure conservatrice de l'efficacité d'une filière. De plus, les Ct d'inactivation obtenus par Barbeau révèlent la plus grande résistance des spores de BSA par rapport aux cystes de *Giardia* (pour des Ct calculés selon le modèle de Hom). Miltner conclut de la même façon, en comparant l'ozonation sur pilote d'oocystes de *C. parvum* et de spores environnementales (Miltner et al., 1997).

Les spores de BSA semblent donc être la meilleure alternative à la détection directe des (oo)cystes de protozoaires, d'autant plus que la technique d'analyse peut facilement être utilisée en usine. Cependant, très peu de données sont disponibles sur l'inactivation des spores de BSA par les principaux oxydants utilisés dans le traitement de l'eau potable. Il importe donc d'étudier plus en détails les mécanismes régissant l'inactivation chimique des spores de BSA pour mieux comprendre l'impact de la désinfection sur les organismes qui ont franchi les étapes précédentes de la filière de traitement. En effet, la désinfection constitue la dernière barrière contre les organismes pathogènes avant le réseau de distribution de l'eau.

2.2. La désinfection : une barrière chimique contre les micro-organismes pathogènes

2.2.1. Comparaison des efficacités des principaux désinfectants utilisés

Selon Desjardins (Desjardins, 1990) la désinfection est définie comme étant « un traitement qui permet de réduire ou d'éliminer les micro-organismes susceptibles de

transmettre des maladies ». Elle est donc fondamentalement différente de la stérilisation dont l'objectif est de détruire tous les organismes vivants dans un milieu donné.

Dans le traitement de l'eau potable, les produits chimiques les plus utilisés sont le chlore, le bioxyde de chlore et l'ozone. Il existe d'autres procédés utilisant le brome, l'iode, le permanganate de potassium, l'ébullition, les ultraviolets et les rayons gamma, mais pour des quantités d'eau beaucoup moins importantes.

Le taux d'inactivation des micro-organismes dépend de plusieurs facteurs, mais le premier d'entre eux est certainement la puissance de l'oxydant utilisé. Le Tableau 2.2 permet de comparer le coefficient de mortalité Λ[2] de plusieurs organismes pour différents oxydants. L'ozone constitue l'oxydant le plus puissant puisque les coefficients de mortalité qui lui sont imputables sont les plus importants quelle que soit la nature de l'organisme considéré.

Tableau 2.2 : : Valeurs de Λ à 5°C pour différents oxydants et organismes (l/mg. min). (Morris, 1975)

Désinfectant	O_3	$HOCl$	OCl^-	NH_2Cl
Bactérie entérique	500	20	50,2	0,1
(oo)cystes d'amibe	0,5	0,05	0,0005	0,02
Virus	5	1	< 0,02	< 0,0005
Spores	2	0,05	0,005	0,001

2.2.2. Les principes généraux de la désinfection

2.2.2.1. Le modèle de Chick-Watson

Le premier concept de cinétique de désinfection date de 1907. Il est attribué à Chick qui assimila l'inactivation chimique à une réaction où les réactifs sont d'une part,

---

[2] $\Lambda = 4.6 /(C.t_{99})$ avec C : concentration résiduelle (mg/l) et t_{99} : temps requis pour atteindre 2 log d'inactivation

les organismes et, d'autre part, l'oxydant. La réaction en cuvée (« batch ») est alors caractérisée par un taux de réaction :

$$r = -\frac{dN}{dt} = kN \tag{2.1}$$

où : N : nombre de micro-organismes ;

t : temps de contact ;

k : constante.

En 1908, Watson proposa de modifier ce modèle afin de tenir compte de la concentration du désinfectant :

$$k = k' C^n \tag{2.2}$$

où : n : coefficient de dilution ;

k' : constante indépendante de la concentration du désinfectant.

La concentration C étant considérée constante, il est possible d'intégrer l'équation (2.1) pour obtenir la relation suivante :

$$\ln \frac{N_t}{N_0} = k' C^n t \tag{2.3}$$

où : N_t : nombre d'organismes vivants à l'instant t ;

N_0 : nombre d'organismes vivants à l'instant initial.

2.2.2.2. Les déviations par rapport à la loi de Chick-Watson

Cependant, même quand les concentrations en oxydant sont maintenues constantes, l'inactivation des micro-organismes en cuvée ne suit pas toujours le modèle de décroissance exponentielle décrit par l'équation (2.3). En effet, on observe deux types de déviations montrées sur la Figure 2.4.

La première, communément appelée courbe à l'épaule (« shoulder curve »), indique la présence d'un temps de latence. La deuxième rend compte du phénomène opposé : après une période d'inactivation rapide, le taux d'inactivation ralentit (phénomène de « tailing-off »).

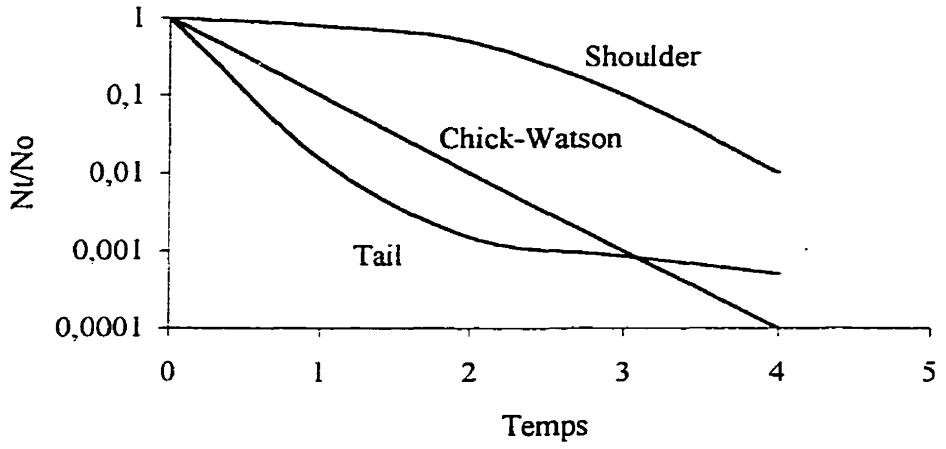

Figure 2.4 : Déviations observées par rapport à la loi de Chick-Watson pour l'inactivation chimique de micro-organismes.

Selon Carlson, les courbes à l'épaule sont observées lorsque les bactéries sont agglutinées (Carlson, 1991), alors que Finch attribue ce phénomène à l'effet de la lyse des organismes suite à l'action de l'oxydant (Finch et al., 1988). Cependant, l'explication la plus courante est celle de Haas, pour qui ce délai représente le temps requis par le désinfectant pour diffuser à travers la membrane cellulaire (Haas, 1980).

Pour ce qui est du phénomène de « tailing-off », la littérature fait état de plusieurs interprétations : selon la théorie vitaliste (Cerf, 1977) cette période de latence serait due aux disparités de résistance au sein d'une même population alors que Finch évoque plusieurs facteurs dont l'hétérogénéité de la population, la formation d'agrégats ainsi que l'état physiologique des organismes (Finch et al., 1993a).

Plusieurs auteurs ont complété des revues détaillées et exhaustives des différents modèles d'inactivation utilisés, en décrivant notamment leur mise en œuvre, leurs domaines d'applications et leurs limites (Barbeau et al., 1996 ; Bellamy et al., 1998 ; Finch et al., 1994a). Il ne s'agira donc pas ici d'appliquer la même démarche, mais plutôt d'analyser ce qui empêche ou motive l'utilisation des ces modèles dans le cas de l'ozone.

2.2.2.3. Le modèle de Hom

En 1972, Hom proposa un modèle qui permet de tenir compte de l'importance relative du résiduel par rapport au temps de contact :

$$\log \frac{N_t}{N_0} = -k\, C^n\, t^m \tag{2.4}$$

où m, n et k sont des constantes empiriques déterminées à partir des données expérimentales. Ainsi, l'ajustement des variables n et m permet de pondérer les importances relatives du résiduel par rapport au temps de contact ; le modèle devient alors plus souple que celui de Chick-Watson. Dans le cadre d'études sur *E. coli*, en cuvée (Finch et al., 1988) ou en continu et en semi-continu (Hunt et Marinas, 1997), des taux d'inactivation très rapides dans les 2 premières minutes des essais puis un ralentissement de la cinétique d'inactivation ont été observés : dans tous les cas, les taux d'inactivation obtenus après cette période deviennent indépendants du temps. Cela suggère donc que le résiduel d'ozone ou la dose initiale est le facteur prépondérant dans les cinétiques d'inactivation. De plus, le modèle devient plus flexible, puisque l'on rajoute un paramètre. Il s'adapte alors mieux aux données expérimentales et permet de distinguer et de décrire plus précisément des cinétiques d'inactivation différentes pour *G. lamblia* et pour *C. parvum* (Finch et al., 1994a).

Cependant, une des hypothèses de l'équation de Hom est que la concentration en oxydant reste constante dans le temps. Ainsi, dans le cas d'oxydants consommés durant la réaction d'inactivation, considérer une valeur unique de résiduel entraîne une sous-estimation de la dose réelle en contact avec les micro-organismes. Il est donc essentiel d'intégrer cette cinétique de décroissance dans le modèle d'inactivation.

2.2.2.4. Le modèle de Hom modifié par Haas

En 1994, une amélioration au modèle de Hom est proposée, par l'intégration d'un modèle de décomposition exponentiel de l'oxydant dans l'équation d'inactivation (Haas et Joffe, 1994) :

$$\ln\left(\frac{N_t}{N_0}\right) = -\left(\frac{m}{n\,k^*}\right)^m \cdot k\,C_0{}^n \cdot \left\{1 - \exp\left(\frac{-n\,k^*t}{m}\right)\right\}^m \qquad (2.5)$$

où : k^* : constante de cinétique de décroissance du résiduel ;

n, m et k : paramètres du modèle.

Ce modèle, en intégrant toutes les données relatives à l'oxydant et aux micro-organismes, est doté d'une très grande souplesse d'utilisation : suivant les conditions expérimentales, il est possible de considérer k^* comme une variable ou comme un constante, pour une meilleure description des données (Haas et al., 1995) ; la présence de trois paramètres permet en outre une meilleure adéquation entre les résultats expérimentaux et les prédictions du modèle. Dans son étude de 1995, Haas fait la preuve des avantages d'un tel modèle puisqu'il est applicable dans le cas de plusieurs eaux (eaux reconstituées et eaux naturelles), avec plusieurs oxydants (chlore, monochloramine et ozone) et pour des organismes aussi différents que *E. coli*, *G. muris* et le bactériophage MS2.

Le modèle de Hom modifié par Haas possède donc l'avantage, par rapport aux autres modèles, d'intégrer la cinétique de décomposition de l'ozone. De plus, la présence de trois paramètres que l'on peut ajuster en fonction des données expérimentales est un atout supplémentaire pour la description et la compréhension des phénomènes d'inactivation.

2.2.3. Le Ct comme mesure d'efficacité de la désinfection

La réglementation américaine est basée sur le « Surface Water Treatment Rule » (USEPA), dont le but est de prémunir les consommateurs contre tout risque microbiologique provenant de la consommation des eaux de surface. Un des paramètres centraux de cette réglementation est l'enlèvement de *G. lamblia*. Actuellement, le SWTR exige une performance d'enlèvement minimal de 3 log (99,9%) pour *Giardia* et de 4 log (99,99%) pour les virus entériques.

L'USEPA a utilisé la loi de Chick-Watson pour modéliser l'inactivation des micro-organismes. L'enlèvement de *Giardia* est évalué à l'aide du concept de Ct où C

est la concentration résiduelle du désinfectant et t, le temps de contact. Le manuel de référence du STWR fournit les Ct requis pour inactiver *Giardia* avec divers oxydants, et en fonction de plusieurs paramètres, tels que la température et le pH.

En réalité, les Ct sont calculés en utilisant le t_{10} qui représente le temps écoulé pour récupérer 10% du traceur à la sortie d'un contacteur ; cela signifie qu'en pratique, seule une fraction de l'eau est en contact avec le désinfectant pour une durée supérieure à t_{10} (ceci en fonction du degré de mélange). Lev et Regli ont étudié la caractérisation de t dans le cas de l'ozone, du fait de sa décomposition en solution aqueuse. Ils recommandent l'utilisation de t_{10} uniquement dans le cas de faibles taux d'inactivation à atteindre ; dans les autres cas, même l'utilisation de t_{50} n'assure pas d'atteindre les normes du STWR (Lev et Regli, 1992b).

En outre, utiliser la concentration résiduelle revient à sous estimer la quantité de désinfectant effectivement en contact avec les micro-organismes, surtout dans le cas d'oxydants ayant de forts taux de décomposition comme l'ozone. Dans leur étude sur le résiduel d'ozone à considérer dans le calcul des Ct, Lev et Regli ont émis des recommandations suivant les contacteurs utilisés. Par exemple, pour un système à contre courant, ils suggèrent de considérer une concentration moyenne C_m :

$$C_m = \frac{C_s}{S} \tag{2.6}$$

où C_s est le résiduel mesuré à la sortie du contacteur et S, un facteur de sécurité variant entre 2 à 3 (Lev et Regli, 1992a).

L'utilisation de la loi de Chick-Watson, on l'a vu, a des limites tant au niveau théorique qu'au niveau pratique. Il a donc fallu développer des modèles plus sophistiqués de prédiction de l'inactivation des micro-organismes tenant compte des propriétés des oxydants et des importances relatives du résiduel par rapport au temps de contact dans le processus d'inactivation, facteur négligé par ce modèle mais qui revêt une grande importance dans le cas d'oxydants puissants comme l'ozone.

2.3. Applications de l'ozone

2.3.1. Les propriétés chimiques de l'ozone

2.3.1.1. Description générale

Découvert en 1840 par Schonbein, l'ozone, de formule chimique O_3, est un gaz bleu, instable, odorant et produit commercialement par l'action d'un arc électrique sous haute tension (de 4 000 à 30 000 V) dans une atmosphère sèche et purifiée (Doré, 1989). En raison de sa grande instabilité, il doit être produit sur les lieux de son utilisation. En effet, à l'état gazeux, il se décompose très rapidement en oxygène au-delà de 35°C. La solubilité de l'ozone dans l'eau est un facteur qui affecte beaucoup le processus d'inactivation. A 20°C, sa solubilité est de seulement 4,7 mg/l (pour une teneur en ozone de l'air de 1% w/w) et diminue quand la température augmente (White, 1992).

2.3.1.2. Le cycle de décomposition de l'ozone

En solution aqueuse, l'ozone est très instable et se décompose suivant un ensemble de réactions constituant un cycle. En raison de sa réactivité importante et desa grande vitesse de réaction, la caractérisation des processus de décomposition s'est avérée délicate. Les recherches effectuées jusqu'à présent ont conduit à l'élaboration de modèles de décomposition tels ceux proposés par Staehelin (Staehelin et Hoigné, 1985) et Tomiyasu (Tomiyasu et al., 1985).

Ces modèles diffèrent sur les produits intermédiaires de la décomposition de la molécule, mais s'accordent sur un processus général comprenant essentiellement trois étapes : initiation, propagation et terminaison. La Figure 2.5 présente un cycle simplifié avec ces étapes.

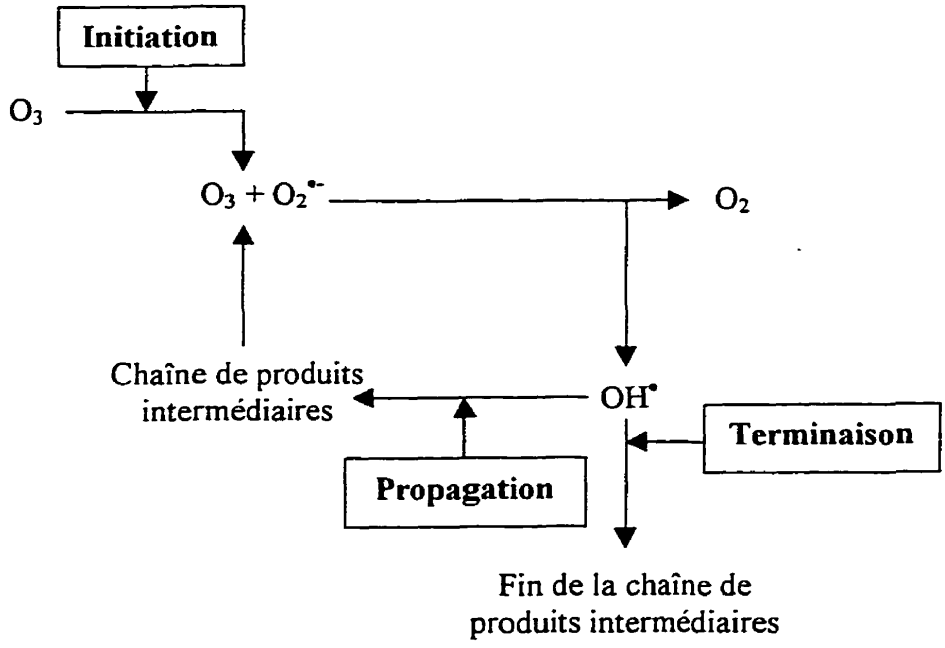

Figure 2.5 : Cycle simplifié de la décomposition de l'ozone en solution aqueuse. Adapté de Nickols et Varas (1992)

Pour une solution aqueuse dans laquelle on introduit de l'ozone (gazeux ou dissous en solution aqueuse), la décomposition de la molécule est catalysée par les ions OH^- qui jouent ainsi le rôle d'initiateur. Cette étape dépend donc du pH. Le déroulement du cycle génère plusieurs produits intermédiaires (réactions de propagation) qui ont pour but de régénérer l'espèce chimique $O_2^{\bullet-}$, afin d'entretenir le cycle. Le principal produit de la décomposition de l'ozone est le radical hydroxyle $OH^{\bullet}$, espèce chimique très réactive, mais peu spécifique. Dans le milieu réactionnel, certains composés, appelés pièges à radicaux, peuvent réagir avec les radicaux $OH^{\bullet}$ et freiner ou empêcher la décomposition de l'ozone. Ainsi, leur présence en solution stabilise l'ozone sous forme moléculaire. Ces espèces chimiques sont principalement les ions carbonates, bicarbonates et phosphates.

2.3.1.3. Les différents modes d'oxydation

Étant donnée la courte durée de vie des produits intermédiaires de la décomposition de l'ozone, l'espèce chimique la plus réactive vis à vis de la micro pollution aqueuse est le radical hydroxyle (Doré, 1989). Celui-ci est en outre beaucoup moins sélectif que la molécule d'ozone. On parlera d'oxydation radicalaire ou réaction indirecte, par opposition à l'oxydation moléculaire (réaction directe) dans le cas de l'ozone.

Ainsi, la matrice de l'eau, et notamment la présence de pièges à radicaux, pourra modifier le cours des réactions d'oxydation par compétition :

- des radicaux vis-à-vis des pièges à radicaux et de la matière à oxyder ;
- de la matière à oxyder vis-à-vis des deux types d'oxydation : directe ou indirecte.

Dans le cas de l'ozonation de micro-organismes, les théories diffèrent quant au mode d'oxydation : certains considèrent que l'oxydation directe est le mécanisme prépondérant (Finch et al., 1993b ; Hoigne et Bader, 1976 ; Labatiuk et al., 1994), alors que d'autres pensent que l'inactivation est principalement due à l'action des radicaux (Bancroft et al., 1984 ; Dahi, 1976).

2.3.2. Les Ct d'inactivation de *Giardia* et de *Cryptosporidium*

Depuis le début des années 1980, plusieurs chercheurs ont étudié l'ozonation des (oo)cystes de *Giardia* et de *Cryptosporidium* pour déterminer leur résistance en calculant les Ct associés à différents taux d'inactivation. Les deux paragraphes qui suivent synthétisent les résultats obtenus, en précisant, dans la mesure du possible, les conditions expérimentales. Une distinction est faite pour la mesure de viabilité des (oo)cystes car deux méthodes sont généralement utilisées :

- l'excystation in vitro qui consiste à dénombrer les (oo)cystes viables ;
- le modèle animal où l'on fait ingérer à des souris, l'ensemble des (oo)cystes soumis à l'oxydant ; on estime ensuite le niveau d'inactivation des (oo)cystes

en extrapolant à partir du nombre d'animaux contaminés par les organismes pathogènes.

Cette distinction est importante, l'excystation surestimant l'inactivation par rapport au modèle animal (Finch et al., 1993b). En effet, le modèle animal est une mesure de la capacité des (oo)cystes à poursuivre leur cycle de vie, alors que l'excystation in vitro est un compte des (oo)cystes viables et tous ne sont peut être pas infectieux (Black et al., 1996).

2.3.2.1. Les Ct d'inactivation de *Giardia lamblia*

Les conditions expérimentales telles que la température, le pH, la concentration et le temps de contact concernant l'inactivation de *Giardia* sont précisées au Tableau 2.3. Ce tableau met en évidence la différence de résultats entre les deux méthodes de mesure de viabilité des cystes (pour 2 log d'abattement). Un autre fait est à ne pas négliger : le protocole expérimental qui, dans le cas de l'ozonation en continu, maintient un résiduel constant alors que le résiduel d'ozone décroît dans un réacteur en cuvée. Cependant, il est difficile de dire dans quelle mesure ces différences affectent les résultats.

Tableau 2.3 : Résumé des valeurs des Ct d'inactivation pour *G. lamblia*

Enlèvement	*Ct (mg.min/l)*	*pH*	*T (°C)*	*Réacteur utilisé*	*Référence*
2 log[b]	0,55	7	25	Ozonation en continu	(Wickramanayake et al., 1985)
	0,17	7	5		
2 log[a]	0,65		22	Réacteur en cuvée	(Finch et al., 1993b)
3 log[a]	3,25		22		
2 log[a]	0,63	6,8	22	Réacteur en cuvée	(Finch et al., 1994a)
3 log[a]	0,95	6,8	22		

[a] : modèle animal

[b] : excystation in vitro

2.3.2.2. Les Ct d'inactivation de *Cryptosporidium parvum*

Tableau 2.4 : Résumé des valeurs des Ct d'inactivation pour *C. parvum*

Enlèvement	*Ct (mg.min/l)*	*pH*	*T (°C)*	*Réacteur utilisé*	*Référence*
2 log[a]	6,9	6,9	7	Réacteur en cuvée	(Finch et al., 1994a)
2 log[a]	7,24	6,9	22		
3 log[a]	10,3	6,9	7		
3 log[a]	3,7	6,9	22		
2 log[a]	2,5	6,9	22	Réacteur en cuvée	(Finch et al., 1994b)
3 log[a]	3				
4 log[a]	9,5				
3 log	3,3			Réacteur en cuvée	(Langlais et al., 1991)
4 log	4,4 - 4,9				
4 log[a]	6,6			Réacteur en cuvée	(Peeters et al., 1989b)

[a] : modèle animal

[b] : excystation in vitro

Une comparaison de ces valeurs de Ct avec celles de *G. lamblia* illustre la plus grande résistance de *C. parvum* (pour des conditions expérimentales équivalentes). En outre, on remarque la disparité entre les résultats obtenus. Cela peut tenir à plusieurs facteurs (énumérés de façon non exhaustive) : les protocoles utilisés pour nettoyer les suspensions d'organismes (voir l'annexe I), l'efficacité du mélange dans le réacteur, les procédures d'analyse du résiduel d'ozone, la méthode d'analyse de viabilité des (oo)cystes et la méthode utilisée pour calculer les Ct.

2.3.3. Les facteurs influençant l'efficacité d'ozonation

Les deux tableaux présentés précédemment illustrent l'importance des conditions expérimentales dans les essais d'inactivation par l'ozone. Plusieurs facteurs sont déterminant car ils influencent la cinétique de décomposition de l'oxydant. On peut ainsi citer les facteurs physico-chimiques (pH et température) et la matrice de l'eau (la

matière organique et l'alcalinité). Le type et l'état des micro-organismes sont aussi à prendre en compte.

2.3.3.1. La température et le pH

Pour ce qui est de la température, elle a une double action sur l'ozone : d'une part, elle diminue sa stabilité dans l'eau en augmentant son taux de décomposition (selon la loi de van't Hoff-Arrhénius) et d'autre part, elle augmente le taux de réaction entre l'oxydant et les micro-organismes. Mais globalement, l'efficacité de désinfection augmente avec la température (ceci est confirmé par les résultats des tableaux précédents). Cependant, Labatiuk obtient des résultats contradictoires, une hausse de température étant soit bénéfique, soit préjudiciable à l'inactivation de *G. muris* (Labatiuk et al., 1992). En outre, Wickramanayake a montré que le maintient des (oo)cystes de *Giardia* pendant plusieurs jours à 5°C augmente leur résistance à l'ozonation (Wickramanayake et al., 1985).

Dans le cas du pH, les mécanismes mis en jeu sont beaucoup moins clairs et les conclusions demeurent difficiles à établir. Une hausse du pH entraîne une augmentation de la décomposition de l'ozone en radicaux (il y a plus d'initiateurs du cycle). Pourtant, des essais effectués à différents pH et pour des résiduels constants ont montré que le degré d'inactivation demeurait quasi constant (Farooq et al., 1977). Wickramanayake est plus nuancé : même s'il relie l'augmentation d'efficacité d'inactivation à l'augmentation du pH (attribuable à des changements ayant lieu au niveau de la paroi des (oo)cystes), il suggère que les effets du pH sont étroitement liés aux organismes cibles (Wickramanayake et al., 1984).

2.3.3.2. La matière organique et l'alcalinité

Dans les eaux à traiter, les micro-organismes ne sont généralement pas dans un état libre. Ils sont le plus souvent sous forme d'agrégats, fixés sur de la matière organique ou sur des minéraux en solution, ou encore associés à des débris d'autres cellules. Ces effets sont difficilement quantifiables car la majorité des expériences utilisent des eaux de laboratoire, c'est-à-dire exemptes de toute matière en solution.

Cependant, en ne lavant pas les cellules végétatives de *B. cereus* après les avoir cultivées sur gélose, (Broadwater et al., 1973) montre que la matière organique a un effet protecteur car elle exerce une demande en ozone. Celui-ci est alors moins disponible pour les micro-organismes à inactiver (et il est nécessaire d'augmenter les doses initiales d'ozone pour atteindre un même taux d'inactivation).

Cependant l'ajout de bentonite dans une eau de laboratoire n'affecte que très peu l'inactivation de *G. muris*, mais par contre améliore l'enlèvement physique du protozoaire par floculation (Labatiuk et al., 1992). Pour des eaux naturelles, la présence de turbidité fait augmenter la dose d'ozone nécessaire. Il semble donc que les effets de la matière organique soient plus reliés au type de turbidité plutôt qu'à son niveau, même si cette étude montre que plus l'eau est turbide, plus la dose d'oxydant à utiliser est grande pour atteindre un taux d'inactivation donné.

L'alcalinité est principalement due aux ions carbonates et bicarbonates présents dans l'eau. Or, ces ions sont des pièges à radicaux qui ralentissent la décomposition de l'ozone. Mais l'effet de l'alcalinité n'est pas suffisamment documenté pour pouvoir tirer des conclusions claires. (Labatiuk et al., 1992) mentionne l'effet de l'alcalinité dans ses travaux en eaux naturelles : plus l'alcalinité est importante, plus les doses d'ozone requises augmentent pour un même taux d'inactivation car il faut compenser la plus grande décomposition de l'oxydant (même s'il faut prendre en considération les effets du pH et de la turbidité).

2.3.3.3. La nature des micro-organismes

Après avoir considéré les éléments intervenant au niveau de l'ozone et de son cycle de décomposition, il reste à analyser dans quelle mesure les micro-organismes ont eux aussi un impact sur les cinétiques d'inactivation.

Dans une première approche, il semble évident que la nature même des micro-organismes est un facteur déterminant dans le processus d'inactivation (voir paragraphe 2). Wickramanayake le confirme en étudiant l'ozonation de *Naegleria gruberis* et de *Giardia muris* : selon les conditions expérimentales de température et de

pH, les (oo)cystes de *N. gruberis* sont entre 2 et 7 fois plus résistants que ceux de *G. muris*. Cependant, une nuance est apportée : cette différence dépendrait essentiellement du pH et donc de la charge des parois des (oo)cystes (Wickramanayake et al., 1984).

Finch et al. (1994a) rapporte deux cinétiques d'inactivation bien distinctes pour les (oo)cystes de *G. lamblia* et les (oo)cystes de *C. parvum* : si un temps supérieur à 2 minutes n'est plus significatif pour l'inactivation de *Giardia*, ce temps passe à 5 minutes dans le cas de *Cryptosporidium* pour des doses d'oxydant appliquées allant de 1,1 à 2,52 mg O_3/l et de 0,6 à 2,9 mg O_3/l respectivement. Ici, la composition de la coque des (oo)cystes est directement impliquée.

Les facteurs physico-chimiques et la matrice de l'eau ont des influences sur l'efficacité d'ozonation en agissant soit au niveau du cycle de décomposition, soit en entrant en compétition avec les micro-organismes pour les réactions d'oxydation. En ce qui concerne les micro-organismes eux-mêmes, plusieurs hypothèses sont avancées sur les mécanismes d'inactivation, mais rien n'a été démontré jusqu'à présent.

2.3.3.4. Conclusion

Finalement, on constate qu'il est difficile de tirer des conclusions claires quant aux différents phénomènes mis en jeu dans l'inactivation des micro-organismes par ozonation. Les résultats parfois contradictoires rencontrés à propos de l'effet du pH, les conclusions divergentes sur les mécanismes d'oxydation et les hypothèses émises sur les phénomènes d'inactivation à l'échelle des micro-organismes illustrent la nécessité de définir précisément les conditions expérimentales, de travailler selon des protocoles clairs, d'utiliser des techniques permettant d'obtenir des résultats reproductibles, cela afin de pouvoir établir des comparaisons entre les résultats obtenus. C'est dans cette optique qu'un protocole a été établi pour l'ozonation des spores de BSA. Basé en grande partie sur le travail de Finch et al. (1994), il doit permettre de comparer les Ct d'inactivation des spores de BSA obtenus avec ceux des cystes de *G. lamblia* et les

oocystes de *C. parvum*. La mesure en continu du résiduel a été légèrement modifiée, et l'utilisation d'un modèle d'inactivation plus raffiné a permis de mieux caractériser les cinétiques d'inactivation des spores de BSA et de vérifier leur capacité à devenir un indicateur des (oo)cystes de protozoaires

Chapitre 3
Matériel et méthodes

3.1. Description sommaire de la procédure expérimentale

Ces essais ont pour objectif de calculer les Ct d'inactivation de différentes souches de BSA (souche de référence de *B. subtilis* et souche de BSA environnementale) par l'ozone afin de les comparer aux Ct des cystes de *Giardia* et oocystes de *Cryptosporidium*. Ils vont aussi permettre d'analyser l'influence du pH sur les valeurs obtenues. Pour cela, on réalise des essais dans un réacteur en cuvée (voir Figure 3.2).

La première étape de ces essais est la préparation d'une solution mère d'ozone. Un certain volume de cette solution est ajouté dans le réacteur contenant déjà l'eau tamponnée stérile et une suspension de spores bactériennes (concentration de 4,5 log/ml). Le tout est agité à l'aide d'un agitateur magnétique. Le moment de l'ajout de la solution ozonée constitue le temps t = 0 des expériences. Pour assurer l'homogénéité dans le réacteur, un mélange rapide est effectué en augmentant pendant un très cours laps de temps (3 à 4 s) la vitesse d'agitation.

A des temps de contact pré-déterminés, qui varient entre 1 et 10 minutes suivant les doses d'ozone injectées et les tampons utilisés, deux types d'échantillons sont prélevés du réacteur par l'intermédiaire du robinet en Téflon®. Le premier type d'échantillon est recueilli dans un tube à essais contenant du thiosulfate de sodium en excès, pour stopper la réaction d'oxydation. Ce type d'échantillon servira au dénombrement des organismes cultivables. La mesure de viabilité des spores se fait par la méthode de filtration sur membrane (après dilutions successives des échantillons), suivie d'une culture sur milieu nutritif (Barbeau et al., 1997). Les résultats sont exprimés en Unité formatrice de colonie (UFC)/ml.

Le deuxième type d'échantillon est pris manuellement toutes les minutes, par l'intermédiaire du robinet en Téflon® ; il sert à l'analyse du résiduel d'ozone, mesuré selon la méthode colorimétrique standard (APHA et al., 1992). Des échantillons de 1 ml sont déposés dans des tubes à essais contenant le réactif. Cette solution est plus ou moins diluée suivant les doses d'ozone injectées. En effet, pour obtenir une meilleure précision dans la détermination du résiduel d'ozone, il est important d'obtenir en tout temps au moins 10% de décoloration du réactif par rapport à l'échantillon témoin sans ozone (Bader et Hoigne, 1981).

3.2. Matériel utilisé

3.2.1. Production de l'ozone et de la solution mère

L'ozone est produit à partir d'air pur de qualité zéro (Air Liquide, Montréal, Qc), ayant un point de rosée inférieur à -50°C, pour éviter tout problème de corrosion dans l'appareil. L'ozoneur utilisé est un modèle Labo 76 (Emery-Trailigaz, Ozone Co), qui produit de l'ozone par décharge électrique dans l'air qui lui est envoyé. L'air ozoné, qui peut contenir jusqu'à 4% en masse d'ozone, passe dans un analyseur d'ozone (AFX model H1, INUSA Inc) qui donne la teneur du gaz en ozone, exprimée en g/Nm^3.

La solution mère d'eau ozonée est produite par barbotage de l'air ozoné dans 400 ml d'eau Milli-Q® contenant 50mg/l équivalent $CaCO_3$ de bicarbonate de sodium.

L'ozone en sortie du barboteur est neutralisé par une solution d'iodure de potassium à 2%. L'ozone dans les gaz d'évent est détruit dans un destructeur à chaleur. La Figure 3.1 présente le montage de génération d'ozone.

Le résiduel d'ozone de la solution mère varie en fonction de plusieurs paramètres :

- la puissance choisie pour la production d'ozone (déterminée par l'ampérage réglé sur l'ozoneur) ;
- la température de la solution ozonée : pour augmenter le taux de transfert de l'ozone gazeux dans l'eau, on utilise un bain réfrigéré à 6°C ;

- la quantité de bicarbonates de sodium dissous dans la solution stock d'ozone, ici 50 mg ($CaCO_3$)/l de $NaHCO_3$;
- le temps d'ozonation : on considère que la concentration en ozone dissous à l'équilibre est atteinte au bout d'une heure.

Dans les conditions expérimentales choisies, la valeur maximale de la concentration en ozone à l'équilibre se situe entre 18 et 20 mgO_3/l.

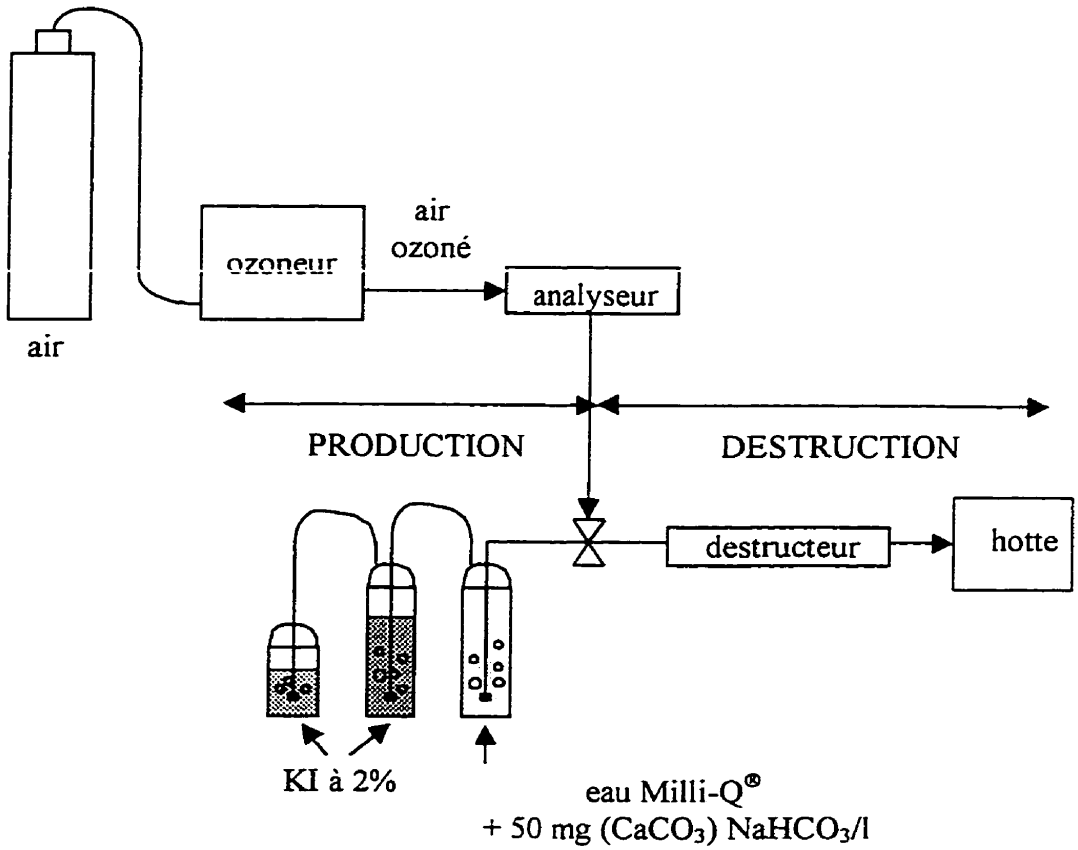

Figure 3.1 : Montage de production de l'ozone et de la solution mère d'oxydant

3.2.2. Le réacteur

Le réacteur utilisé pour les essais est un erlenmeyer de 250 ml légèrement modifié : un robinet en Téflon® a été rajouté à sa base pour un prélèvement manuel des échantillons (Figure 3.2). Selon (Labatiuk, 1992), un volume de 250 ml représente un

volume optimal si l'on considère le nombre d'organismes requis initialement (4 log/ml pour *G. lamblia* et 3,7 log/ml pour *G. muris*), celui que l'on recueille après l'essai, l'homogénéisation ainsi que la stabilité du résiduel d'ozone dans le réacteur.

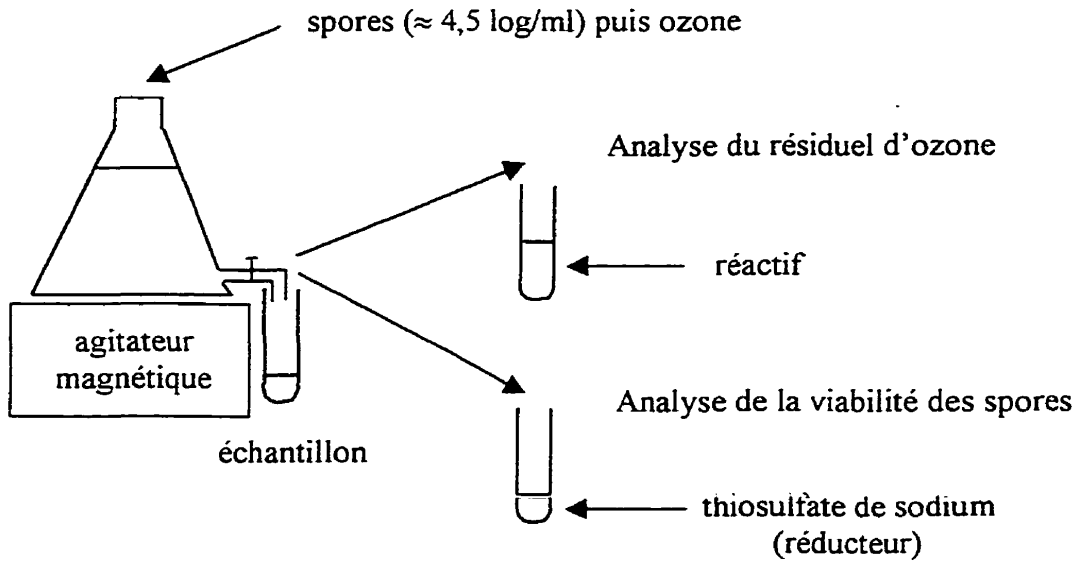

Figure 3.2 : Schéma du montage expérimental pour la détermination des Ct d'inactivation par l'ozone

3.2.3. Préparation du matériel

3.2.3.1. La verrerie et le matériel de prélèvement des échantillons

Avant chaque utilisation, les réacteurs sont trempés pendant au moins 1 h dans une solution ayant un résiduel d'ozone d'au moins 2 mg O_3/l, puis séchés à l'air libre. Les ouvertures des réacteurs sont ensuite recouvertes de papier aluminium pour éviter tout dépôt de poussière dans le réacteur.

Avant leur première utilisation, les seringues d'injection d'ozone en polypropylène ont été trempées pendant 24 h dans une solution chlorée à 100 mg/l, puis pendant au moins 1 h dans une solution ozonée à 20 mg O_3/l. Elles ont ensuite séché à l'air libre. Les seringues en verre ont uniquement subi la dernière étape du traitement.

Les seringues d'échantillonnage des spores (en polypropylène) sont lavées, rincées et séchées à l'air libre, puis passées à l'autoclave pour assurer leur stérilité.

Les tubes à essais utilisés pour le recueil des échantillons et les dilutions sont lavés, rincés, séchés à l'air libre puis autoclavés.

3.2.3.2. Les solutions d'indigo trisulfonate de potassium

L'analyse du résiduel d'ozone est faite selon la méthode standard (4500-B O_3) décrite dans le Standard Methods (APHA et al., 1992), et basée sur la méthode colorimétrique de Bader et Hoigné (Bader et Hoigné, 1981). Cette méthode nécessite la préparation d'une solution mère d'indigo trisulfonate de potassium (Aldrich) à 10^{-3} M. Pour les besoins de l'analyse, cette solution a été ensuite adéquatement diluée dans un tampon phosphate à pH 2.

3.2.3.3. Les solutions tampon

En solution aqueuse, l'ozone n'est pas stable et se décompose de façon plus ou moins importante selon les espèces chimiques présentes qui peuvent jouer le rôle d'initiateur de la décomposition (ions OH^-) ou de piège à radicaux (ions carbonate, bicarbonate et phosphates).

Les tampons les plus couramment utilisés en laboratoire pour des essais à pH constant sont les tampons phosphates ; or les ions phosphates sont des pièges à radicaux. Pour limiter leur effet sur la décomposition de l'ozone, nous avons procédé à la dilution des solutions mères des tampons phosphates, dans un rapport de 2:100. Les ions borate n'ont pas cet effet de pièges à radicaux et laissent donc toute possibilité à l'oxydation radicalaire d'avoir lieu (Gurol et Singer, 1982). Dans le cadre de nos essais, ces deux types de tampons ont été utilisés. Les deux tableaux ci-dessous donnent les compositions des tampons pour les pH auxquels nous avons travaillé.

Dans le cas des tampons phosphates, les solutions mères sont diluées dans un rapport de 2:100 (la force ionique finale est donc de 0,02 mol/l), puis autoclavées et conservées à 4°C. Pour les tampons borate, les solutions mères sont autoclavées et

conservées à 4°C (forces ioniques finales de 0,52 et 0,46 mol/l pour les pH 6,3 et 8,2, respectivement).

Tableau 3.1 : Tampon phosphate : quantités de produits chimiques pour 1 l de solution mère (pKa = 7,12 à 25°C)

	pH = 6,3 (μ = *1M*)	*pH = 8,2* (μ = *1M*)
Na_2HPO_4 (g)	34,12	56,38
KH_2PO_4 (g)	54,29	0,89

Tableau 3.2 : Tampons borate : quantités de produits chimiques pour 1 l de solution mère (pKa = 9,14 à 25°C)

	pH = 6,3 (μ = *0,52M*)	*pH = 8,2* (μ = *0,46M*)
H_3BO_3 (g)	31	25
NaOH (g)	0,84	2,29

Comme le montrent les deux tableaux précédents, les différents tampons utilisés n'ont pas la même force ionique : ils sont plus ou moins concentrés. Dans leur étude de la cinétique de décomposition de l'ozone, Gurol et Singer (1982) montrent que dans le cas des phosphates, le taux de décomposition est affecté par la force ionique des tampons, ce qui n'est pas le cas des tampons borate dans la gamme des forces ioniques testées, soit entre 0,1 et 1 M. Nous pourrons donc considérer, dans notre cas, que les différentes forces ioniques ne représentent pas des conditions différentes pour la décomposition de l'ozone. Cependant, on ne sait pas quel pourrait être l'effet de cette variation de force ionique sur les charges surfaciques des micro-organismes.

3.2.3.4. Les cultures bactériennes

La préparation des suspensions bactériennes est une étape essentielle qui nécessite rigueur et précautions pour obtenir des suspensions d'une grande pureté. L'annexe I fait état des différentes méthodes utilisées pour préparer des suspensions de

micro-organismes. Il n'apparaît pas de consensus sur la méthode à utiliser. Nous avons choisi de travailler selon la méthode employée par Barbeau, car elle est simple, rapide et efficace pour obtenir des suspensions très pures (Barbeau, 1996). Celle-ci peut se résumer en quelques points :

- après isolation d'une colonie et culture des bactéries sur milieu R2A (Difco) pendant une quinzaine de jours, grattage des Pétris pour récupérer les spores ;
- mise en suspension des spores dans une solution d'eau tamponnée ;
- homogénéisation sur vortex ;
- centrifugation à 10 000 g pendant 15 min ;
- rinçage du culot et resuspension des spores dans la solution tamponnée ;
- répétition des étapes d'homogénéisation, de centrifugation et de rinçage, 2 fois ;
- passage au bain-marie à 75°C pendant 15 min ;
- conservation des suspensions à 4°C.

Il est important de noter que les souches commerciales subissent le même traitement que les souches environnementales, afin de ne pas introduire de biais dans la mesure des Ct. En effet, les conditions de cultures (milieux et concentrations utilisés, température et durée d'incubation) induisent des changements au niveau des coques des spores, et modifient ainsi la résistance des micro-organismes (Setlow, 1994).

- *Souche de Bacillus subtilis*

Nous avons utilisé une souche commerciale de référence de *B. subtilis* (ATC 6633, 0453-52-9) des laboratoires Difco.

- *Souche environnementale*

Une colonie provenant d'un Pétri de spores environnementales de l'eau brute de l'usine Ste-Rose (Ville de Laval) a été isolée et cultivée dans les conditions décrites précédemment.

3.3. Méthodes analytiques

3.3.1. Mesure du résiduel d'ozone

Le résiduel d'ozone a été analysé selon la méthode colorimétrique à l'indigo trisulfonate de potassium (4500-O_3 B) décrite dans le Standard Methods (APHA et al., 1992). Des échantillons sont recueillis manuellement toutes les minutes de la façon suivante :

- purge du volume mort contenu dans le robinet en Téflon® ;
- recueil d'un échantillon dans un tube à essais ;
- à l'aide d'une pipette pré-calibrée, prélèvement de 1 ml de l'échantillon qui est ensuite injecté dans un volume de 5 ml de réactif dilué d'indigo contenu dans un tube à essai.

La réaction entre le réactif et l'ozone est instantanée et provoque une décoloration stable pendant 4h (Bader et Hoigné, 1981). L'absorbance de l'échantillon est lue sur un spectrophotomètre (Spectronic 401 de Milton-Roy), dans une cellule en quartz, de 1 cm de trajet optique (HELLMA, 14385902C). Le calcul du résiduel d'ozone est fait par différence avec la décoloration d'un témoin, selon l'équation suivante :

$$[O_3](mg\,O_3/l) = \frac{(Abs_B - Abs_E) \times V_E}{l \times V_T \times f} \qquad (3.1)$$

où : Abs_B : absorbance du témoin ;

Abs_E : absorbance de l'échantillon ;

V_E : volume de l'échantillon ;

l : trajet optique de la cellule ;

V_T : volume total (réactif et échantillon) ;

f = 0,42 (correspond à un coefficient d'absorption de l'ozone en phase aqueuse).

3.3.2. Mesure de la viabilité des spores

Celle-ci se fait par la méthode de filtration sur membrane. Après dilutions successives des échantillons dans de l'eau tamponnée stérile, on procède à la filtration des dilutions sur filtres de porosité 0,45 µm (HAWC 047S3, Millipore). Les filtres sont déposés sur des tampons (AP 10047S1, Millipore) imbibés de bouillon nutritif Triptycase Soy Broth (Becton Dickinson). Les boîtes de Pétri sont passées au bain-marie à 75°C pendant 15 min, puis incubées pendant 24 h à 35°C (Barbeau et al., 1997). Le dénombrement des colonies se fait par comptage direct. Les résultats sont donnés en Unité formatrice de colonie (UFC) par ml ou en log/ml.

3.4. Analyses statistiques

Toutes les analyses statistiques ont été réalisées avec différents modules du logiciel Statistica 5.0 (Statsoft, Tulsa, OK).

3.4.1. Cinétique de décroissance de l'ozone : évaluation de k*

3.4.1.1. Description des courbes de décroissance du résiduel d'ozone

Conformément aux recommandations émises par Haas et al. (1995), un modèle de régression non linéaire, utilisant le critère des moindres carrés, a permis de déterminer dans chacun des cas la valeur de la constante k^* du modèle de décroissance exponentielle :

$$C = C_0 e^{k^* t}, \tag{3.2}$$

où C_o : dose initiale théorique d'ozone ;

C : résiduel mesuré au temps t.

3.4.1.2. Ajustement du paramètre k^*

Dans un deuxième temps, une analyse ANOVA a été conduite pour déterminer le(s) facteur(s) influençant la valeur de k^*. Les facteurs étudiés étaient :

- la nature du tampon ;

- le pH ;
- la dose initiale d'ozone ;
- la souche bactérienne utilisée.

3.4.2. Modèle de Hom modifié par Haas : évaluation de n, m et k

Bellamy et al. (1998) fait une description détaillée et exhaustive des étapes à suivre pour la détermination des ces paramètres. C'est la méthode qui a été employée pour leur ajustement, avec la restriction faite concernant les études qui ne comportent pas de réplicats : il est alors impossible d'évaluer la précision du modèle. On ne peut que calculer qu'une première estimation de cette précision. On peut résumer les différentes étapes nécessaires :

- estimation des paramètres n, m et k ;
- vérifications statistiques pour les valeurs calculées des paramètres : distribution normale des résidus, leur indépendance vis-à-vis des variables du modèle ;

3.5. Vérifications et essais préliminaires

Afin de justifier les hypothèses concernant les méthodes utilisées, plusieurs essais préliminaires ont été réalisés. Ceux-ci concernent essentiellement les interférences aux méthodes de mesure.

3.5.1. Pouvoir tampon des solutions diluées

Dans le cas des tampons phosphates, les solutions utilisées sont des dilutions 2:100 des solutions mères. Pour les tampons borate, les solutions mères n'ont pas été diluées. Les tests effectués sur les solutions tampon ont confirmé la stabilité du pH de ces solutions dans les conditions montrées au Tableau 3.3 :

Tableau 3.3 : Pouvoir tampon des solutions diluées : stabilité du pH en fonction des doses d'ozone utilisées

	Borate pH = 6,4	*Borate pH = 8,3*	*Phosphate pH = 6,3*	*Phosphate pH = 8,2*
Volume total dans le réacteur (ml)	240	240	240	240
Volume de solution ozonée rajoutée (ml)	20	50	20	50
Résiduel d'ozone théorique (mgO_3/l)	1,47	4,26	1,62	3,68
pH initial	6,36	8,32	6,43	8,20
pH final	6,43	8,29	6,47	8,22

3.5.2. Influence des tampons sur la viabilité des spores

Afin de s'assurer que les tampons utilisés ne causent aucune mortalite, et ce quelle que soit leur force ionique, plusieurs essais ont été réalisés avec *B. subtilis*. Des spores ont été suspendues dans des tampons phosphate et borate (pH = 6,3), de forces ioniques 0,05 et 0,5. Un premier prélèvement a été fait après 15 min ; un deuxième, après 24 h. Dans les deux cas, la mesure de viabilité des spores s'est faite selon la méthode décrite au paragraphe 2. Le Tableau 3.4 résume les résultats obtenus.

Tableau 3.4 : Effet des tampons et de leur forces ioniques sur la viabilité des spores sur une période de 24 h. Les forces ioniques sont exprimées en mol/l. Les résultats sont exprimés en log/ml

	Témoin	*Tampon phosphate*		*Tampon borate*	
		μ = 0,05	*μ = 0,5*	*μ = 0,05*	*μ = 0,5*
Après 15 min	9,13	9,05	9,07	9,06	9,06
Après 24 h	9,22	9,12	9,07	9,16	9,14

Ces résultats montrent que les tampons utilisés entraînent une très légère baisse de la viabilité des spores. Un test t de Student a montré que les différences de viabilité observées n'étaient pas statistiquement significatives ($p<0,05$). La seule exception est le

cas du tampon phosphate avec μ = 0,5 mol/l mais l'écart en terme de perte de viabilité qui en résulte reste négligeable (< 0,15 log/ml). Les différences apparentes ne sont donc pas prises en compte dans l'analyse des résultats.

3.5.3. Adsorption des spores sur les parois des réacteurs

Ces essais ont pour objectif de vérifier et de quantifier le phénomène d'adsorption des spores sur les parois en verre des réacteurs utilisés. Des spores ont été ajoutés à 240 ml de tampon (phosphate et borate) afin d'obtenir une concentration de 6 log/ml de spores dans le réacteur. Tout au long de l'expérience, l'ensemble est posé sur un agitateur magnétique et agité avec un barreau magnétique recouvert de Téflon®. Après homogénéisation du mélange, soit 10 min, un échantillon de 1 ml est prélevé (t = 0). Un deuxième prélèvement est effectué après 30 min. Le dénombrement des organismes cultivables se fait selon la méthode décrite au paragraphe 2 Le Tableau 3.5 ci-dessous montre les résultats obtenus pour les quatre tampons utilisés avec *B. subtilis* et pour la souche environnementale dans les tampons phosphates.

Tableau 3.5 : Adsorption des spores de *B. subtilis* et de la souche environnementale sur les parois des réacteurs pour les différents tampons utilisés

Tampon utilisé	*Adsorption B.subtilis*	*Adsorption Souche environ.*
Borate, pH = 6,3	0,1 log/ml	
Borate, pH = 8,2	0,11 log/ml	
Phosphate, pH = 6,5	0,06 log/ml	0,1 log/ml
Phosphate, pH = 8,2	0,08 log/ml	0,05 log/ml

Les résultats ci-dessus mettent en évidence un phénomène d'adsorption des spores sur les parois du réacteur ; cependant, en pratique, il n'est pas suffisamment prononcé pour devoir en tenir compte dans les essais.

3.5.4. Influence des suspensions de spores sur la lecture spectrophotométrique

Dans ses essais d'ozonation sur *Escherichia coli*, Hunt et Marinas relatent une légère interférence dans la lecture spectrophotométrique du résiduel d'ozone avec la méthode à l'indigo trisulfonate, interférence due aux micro-organismes (Hunt et Marinas, 1997). Afin de déterminer l'importance de cette interférence dans notre cas, deux tests ont été réalisés. Le premier consistait à mesurer l'absorbance de suspensions de spores à plusieurs concentrations. Le Tableau 3.6 résume les conditions expérimentales et les résultats obtenus.

Tableau 3.6 : Absorbance à 600 nm de suspensions de spores bactériennes de *B. subtilis* à plusieurs concentrations

Concentration de spores	*Absorbance*	*Ecart-type*
2 log	0,001	0,001
3 log	*	*
4 log	0,002	0,0014
5 log	0,003	0,001
6 log	0,01	*

* : inférieur à la limite de détection de l'appareil

Le deuxième test consistait à mesurer l'absorbance d'une solution d'indigo trisulfonate à laquelle on a rajouté des spores à différentes concentrations. Le Tableau 3.7 résume les conditions expérimentales et les résultats obtenus.

Les deux séries de résultats montrent que les interférences dues aux spores sont minimes ; il n'a donc pas été jugé nécessaire d'appliquer un facteur de correction sur les absorbances lues au spectrophotomètre.

Tableau 3.7 : Absorbance à 600 nm de suspensions de spores bactériennes de *B. subtilis* à plusieurs concentrations dans une solution de potassium d'indigo trisulfonate

Échantillon	*Absorbance*	*Ecart-type*
Solution d'indigo	0,898	0,0028
Solution d'indigo +2 log	0,904	0,0014
Solution d'indigo +3 log	0,900	0,0014
Solution d'indigo +4 log	0,898	0,0010
Solution d'indigo +5 log	0,901	0,0014
Solution d'indigo +6 log	0,900	0,0014

3.5.5. Température de la solution dans les réacteurs

Pour se trouver dans le cas d'un réacteur complètement mélangé, celui-ci est placé sur un agitateur magnétique (Model 120MR, Fisher) et agite avec un barreau magnétique recouvert de Téflon®. Les essais réalisés ont pour but de quantifier l'élévation de température de l'eau du réacteur, car c'est un facteur important pour les cinétiques de décomposition de l'ozone d'une part, et d'inactivation d'autre part. Les différents tests réalisés à température ambiante et à des vitesses d'agitation comprises entre 2 et 4 (200 et 400 tr/min) indiquent une élévation de température de moins de 1°C sur une durée de 30 min (la plus forte élévation est obtenue pour la plus faible agitation, du fait des échanges thermiques moins importants avec l'atmosphère).

Shechter a étudié l'influence de l'agitation sur la stabilité du résiduel d'ozone et conclu que pour des essais durant une quinzaine de minutes, une agitation optimale est obtenue avec une vitesse de 80 tr/min (Shechter, 1973). Or, dans nos conditions expérimentales, une telle vitesse est trop faible pour obtenir une homogénéisation suffisamment rapide du milieu. On choisira donc une vitesse d'agitation de 200 tr/min.

3.5.6. Cinétique de décroissance de l'ozone : mesure du résiduel à 15 secondes

Le protocole expérimental de mesure du résiduel d'ozone tel que décrit dans le paragraphe 1 ne prévoit pas d'échantillonnage avant la première minute de temps de contact. Or il est apparu nécessaire de mieux caractériser les premiers instants des essais pour ce qui est de l'évolution du résiduel d'ozone, en raison du mélange rapide appliqué systématiquement. C'est pourquoi une série de mesures de résiduel à 15 s a été réalisée, pour toutes les conditions de résiduels d'ozone, de tampons et de pH étudiées.

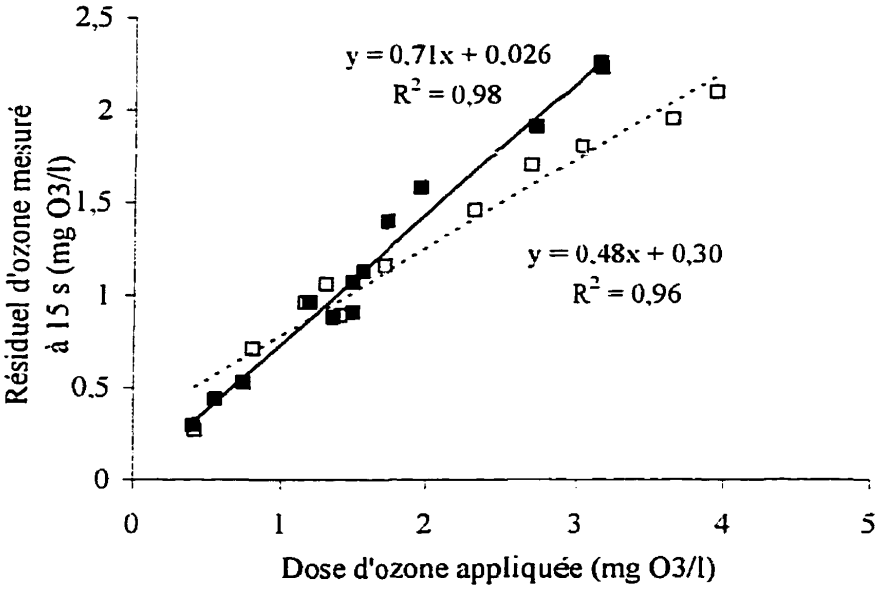

Figure 3.3: Relations entre les résiduels d'ozone mesurés à 15 secondes et les doses d'ozone appliquées, pour le tampon phosphate (■) et le tampon borate (□)

Les résultats obtenus sont synthétisés sous forme de courbes qui sont présentées par la Figure 3.3. Dans chaque cas de tampon, les résultats obtenus pour les deux pH sont très bien décrits par une seule et même régression linéaire. Pour les deux catégories de tampon, le résiduel mesuré à 15 s est donc indépendant du pH. Cela est attribué au phénomène de dégazage de l'ozone dû essentiellement au mélange rapide. Ainsi, dans

les 15 premières secondes, on perd par rapport à la dose initiale théorique, 25% d'ozone dans les tampons phosphate et 30% dans les tampons borate (en moyenne). Ces résultats ont donc été intégrés aux courbes de résiduel obtenues pendant les essais d'inactivation, en rajoutant une valeur de résiduel d'ozone à 15 s.

Chapitre 4

Résultats et discussion

4.1. Introduction

Les résultats de l'étude réalisée sont présentés dans la section suivante, sous la forme d'un article qui a été soumis à la revue *Water Research*. L'objectif principal de ces travaux est de caractériser la résistance de spores bactériennes aérobies à l'ozone afin de vérifier leur potentiel en tant qu'indicateur des (oo)cystes de protozoaires. Deux paramètres ont été étudiés pour la description et l'analyse des cinétiques d'inactivation : le pH et la souche bactérienne utilisée. La résistance des micro-organismes est déterminée par le calcul de leurs CT (résiduel d'ozone × temps de contact) pour différents niveaux d'inactivation (2, 3 et 4 log). Ces résultats sont comparés aux valeurs publiées dans la littérature pour l'inactivation des (oo)cystes de *G. lamblia* et de *C. parvum*.

4.2. Inactivation de spores bactériennes aérobies par l'ozone : impact du pH et de la souche bactérienne

(INACTIVATION OF BACTERIAL AEROBIC SPORES BY OZONE: IMPACT OF pH AND BACTERIAL STRAIN)

Nathalie FACILE, Michèle PRÉVOST,
Benoit BARBEAU, Boniface KOUDJONOU

Chaire Industrielle en Eau Potable
École Polytechnique de Montréal
C.P. 6079, succ. Centre-ville
Montréal (QC), Canada, H3C 3A7

4.2.1. Abstract

The kinetics of inactivation of two strains of bacterial aerobic spores were investigated in a batch reactor. Two buffers (phosphate and borate) and two pH levels (6.3 and 8.2) were tested. The kinetics of ozone decomposition were found to fit a first-order decay model, regardless of the buffer. CT values were calculated using the Hom equation with exponential decay of the ozone residual. Lower pH resulted in lower CT values. Although neither buffer affects the decomposition rates of ozone at the ionic strengths tested, significant differences among the estimated CT values were measured at high pH values. The environmental strain tested was not as resistant to ozone than the reference strain of *B. subtilis*. The overall results suggest that bacterial spores are a conservative surrogate for cysts of *G. lamblia* and oocysts of *C. parvum*.

KEY-WORDS: batch reactor; CT; ozone disinfection; inactivation kinetics; *Bacillus subtilis*; aerobic bacterial spores.

4.2.2. Introduction

Protozoan cysts constitute the more frequent identified cause of waterborne outbreaks in developed countries (Craun, 1998; Solo-Gabriele *et al.*, 1996). Several methods have been proposed for the direct detection of protozoan cysts (Jakubowski *et al.*, 1996). However, routine monitoring of (oo)cysts is not possible because of its high cost and serious methodological limitations (Fricker et Clancy, 1998).

The potential of several techniques such as particle counting, microscopic particulate analysis, or even coliform bacteria and heterotrophic plate counts, and techniques involving parameters such as turbidity, have been investigated. However, these techniques cannot be used for routine analysis in water facilities because of interferences in analytical methods, lack of indication of biological risk or high cost. (Jakubowski *et al.*, 1996). Moreover, physical parameters do not provide any information on viability. More recently, Barbeau assessed the use of bacterial aerobic spores to monitor treatment efficiency and concluded that aerobic spores are a reliable and simple indicator of overall treatment (Barbeau, 1996). Full-scale studies have concluded that, even if spores are not indicators of the presence of protozoan parasites (Lytle *et al.*, 1996), it is possible to correlate their removal with those of the protozoan (oo)cysts, provided their resistance to treatment is known. One of the promising use of aerobic spores is their application to monitoring the efficiency of disinfection in full-scale plants.

Because of its high efficiency, ozone is one of the most promising oxidants that can be used to chemically inactivate protozoan cysts (Craun, 1998; Miller, 1994; Sous Comité fédéral-provincial sur l'eau potable, 1997). A recent study by Dyksen *et al.* shows that ozone inactivation is still the most cost-effective chemical treatment (Dyksen *et al.*, 1998). Even though advanced UV technologies have shown great potential for the

inactivation of *Cryptosporidium* (Clancy *et al.*, 1998), it is too early to draw conclusions as to their perdformance in full-scale applications.

The purpose of this work was to measure the inactivation CT of two different strains of bacterial aerobic spores with ozone. A batch reactor was used and two factors were investigated: pH (6.3 and 8.2) and the bacterial strain (*Bacillus subtilis* and an environmental isolate).

4.2.3. Materials and methods

4.2.3.1. Laboratory waters

All laboratory waters were prepared with Milli-Q® water (Milli-Q UV Plus, Millipore Co., Bedford, MA) and an activated carbon cartridge (CPMQK05R1, Millipore Co., Bedford, MA). All chemical products were at least of analytical grade. Phosphate buffers with a ionic strength of 1 mol/l were prepared with Na_2HPO_4 (S374-500, Fisher, Montréal, QC) and KH_2PO_4 (P285-500, Fisher, Montréal, QC) at pH levels of 6.3 and 8.2. Borate buffers were prepared with HBO_3 (A74-500, Fisher, Montréal, QC) and NaOH (SS254-1, Fisher, Montréal, QC) at pH levels of 6.3 and 8.2 with ionic strengths of 0.52 and 0.46 mol/l respectively. The pH was calibrated using an Accumet 25 pH metre (FisherScientific, Fisher, Montréal, QC). Dilution water was prepared as described in Standard Methods (APHA *et al.*, 1992).

The influence of the buffer on the microorganism's viability was also investigated by comparing the impact of the buffers (phosphate and borate) and the ionic strengths (0.05 or 0.5 mol/l) after 15 minutes and 24 hours, at pH 6.3. The addition of the buffer solution to the spore suspension did result in slightly significant differences in the number of viable spores after contact time ($p<0.05$). Spore viability was influenced more by phosphate buffer, at pH 6.3.

4.2.3.2. Ozonation

Ozone was produced from ultra pure air (Air Liquide, Montréal, QC) using an Labo 76 ozone generator (Emery-Trailigaz, Ozone Co., Cincinnati, OH). The average concentration of ozone in the gas flow was continuously measured by an ozone analyser Model H1 (IN USA Inc, Needham, MA); an ozone concentration as high as 4% (w/w) could be attained by adjusting the amperage of the ozone generator. Ozone was bubbled for 1 hour in a 500-ml gas absorption flask filled with 400 ml Milli-Q® water in which 50 mg (CaCO3)/l of sodium bicarbonate (S233-500, Fisher, Montréal, QC) were added in order to obtain a higher residual in the ozone stock solution. The impact of sodium bicarbonate on the viability of spores was investigated by adding a 50-mg (CaCO3)/l concentration to a spore suspension. No measurable impact was observed ($p<0.05$). During bubbling, the gas absorption flask was kept in a 6°C refrigerated water bath. The gas events were trapped in a 2% potassium iodide solution (BP367-500, Fisher, Montréal, QC) in two 500 ml-gas absorption flasks. The three flasks were connected with Viton® tubing (E6412-17, Masterflex, Cole Parmer, Labcor, Anjou, QC).

4.2.3.3. Bacterial culture

Two different strains of bacterial aerobic spores were tested. The spores of the reference strain of *Bacillus subtilis* (ATTC 6633, 0453-52-9, Difco, Fisher, Montréal, QC) were inoculated on R2A media (1826-17-1, Difco) and placed in an incubator (Tempcon Incubator, Baxter, Fisher, Montréal, QC) for 15 days at 35°C. Spores were collected by rinsing the agar with a sterile phosphate buffer. They were harvested at 10 000 g for 15 minutes (Beckman J2-HS Centrifuge, Fisher, Montréal, QC), then washed with the sterile phosphate buffer. Harvest and washout were repeated twice more. The suspension was maintained in a water bath (Fisher Waterbath, Fisher, Montréal, QC) at 75°C for 15 minutes and refrigerated at 4°C. A single strain of environmental isolate (Mille Iles River, Ville de Laval, QC) was grown in the same conditions.

4.2.3.4. Glassware and other materials

Before each use, the reactor vessel (250 ml Erlenlmeyer, Kimax, Fisher, Montréal, QC) was soaked for at least 1 hour in an ozone solution with a residual of 2 mg O_3/ l or more. It was rinsed with Milli-Q® water and dried, and then covered with aluminium foil to protect it from dust. All the test tubes used for sampling or dilution were washed with laboratory soap (Versa Clean, 04-343, Fisherbrand, Fisher, Montréal, QC), rinsed with Milli-Q® water, dried and autoclaved. Before their first use, the 60-ml polypropylene seringes (Becton Dickinson, Fisher, Montréal, QC) used for stock ozone injection were soaked for 24 h in a 100 mg/l chlorine solution, rinsed, and soaked for at least 1 h in a 20 mg O_3/l ozone solution. Then, before their use, they were soaked for at least 1 h in an ozone solution with a residual of 2 mg O_3/l or more. They were rinsed, dried, and covered with aluminium foil to prevent any dust deposit.

4.2.3.5. Analytical methods

Ozone residual analyses were conducted following the standard colorimetric method (APHA *et al.*, 1992). The stock solution of indigo was prepared from potassium indigo trisulphonate (02538KZ, Aldrich, Sigma-Aldrich, Mississauga, ON), concentrated phosphoric acid (A242-1, Fisher, Montréal, QC) and anhydrous monobasic sodium phosphate (S374-500, Fisher, Montréal, QC). We used Reagent II, prepared with the same chemicals. A 1:5 or 1:4 dilution of Reagent II was prepared in order to obtain greater decoloration of the solution for better precision in the ozone residual determination. Samples were analysed at 600 nm with a Spectronic 401 (Milton Roy, Fisher, Montréal, QC), in a quartz cell of 1 cm light path (14385902C, HELLMA, Fisher, Montréal, QC).

Spore viability measurements were taken following the procedure described by Barbeau (Barbeau *et al.*, 1997). This technique is based on a membrane filtration of diluted samples. The 0.45 µm porosity filters (HAWG04753, Millipore Co., Bedford, MA) were placed in Petri dish-pads (PD1004755, Millipore Co., Bedford, MA) saturated with 1.5 ml of TSB nutrient broth (Becton Dickinson, Fisher, Montréal, QC).

These were then placed in a water bath (Fisher Waterbath, FisherScientific, Fisher, Montréal, QC) at 75°C for 15 min to promote germination, and incubated at 35°C for 24 h. Each sample was analysed in duplicate over two decimal dilutions. Results are given in unity forming colonies (UFC)/ml.

4.2.3.6. Statistical analysis

All results were analysed with Statistica 5.0 (Statsoft, Tulsa, OK). Ozone decomposition (decay rate) and inactivation kinetics (model's parameters) were analysed with non-linear regression of experimental data.

4.2.3.7. Experimental procedure

All experiments were conducted at room temperature. A spore suspension was added to the reactor vessel containing about 200 ml of sterile buffered water to reach an average spore concentration of $10^{4.5}$/ml. This suspension was gently stirred for 10 minutes to increase homogeneity in the reactor. A predetermined volume of the ozone stock solution was then added. Just after the addition of the ozone, the stock solution in the vessel was flash-mixed for 3 or 4 seconds to rapidly disperse the ozone. The short flash-mix period will have resulted in the rapid loss of some of the dissolved ozone to the gas phase, since the reactor was not head-space-free. This loss was quantified by testing the degasing of ozone in the gas phase within the first 15 seconds after the addition of the stock solution, for both buffers, at each pH and for doses applied in the range used for the inactivation experiments. Figure 4.1 shows the ozone residuals measured after 15 seconds plotted against applied ozone doses. Values for both pH values are well within the regression lines. These linear regressions allowed a better fit of exponential decay to our ozone residual data, and thus a better determination of the first-order decay constant k^*.

At predetermined contact times, samples were taken via a Teflon® tap placed at the bottom of the reactor. A volume of 1 ml was taken with an Eppendorf mass calibrated pipette (model 4810, 100-1000 µl) for the ozone residual analysis (APHA *et al.*, 1992). Unlike Hunt (Hunt et Marinas, 1997), we found no significant interference

due to micoorganisms for the spectrophotometric ozone residual analysis ($p<0.05$). A volume of 1 to 10 ml was taken with a polypropylene seringe for the spore viability analysis (Barbeau *et al.*, 1997). This sample was quenched with 1 ml of a 10% (w/w) sodium thiosulfate solution (SS364-1, Fisher, Montréal, QC). Throughout the experiments, the solution in the reactor vessel was stirred with a Teflon-coated stir bar and a magnetic stirrer (Model 120 MR, FisherScientific, Fisher, Montréal, QC).

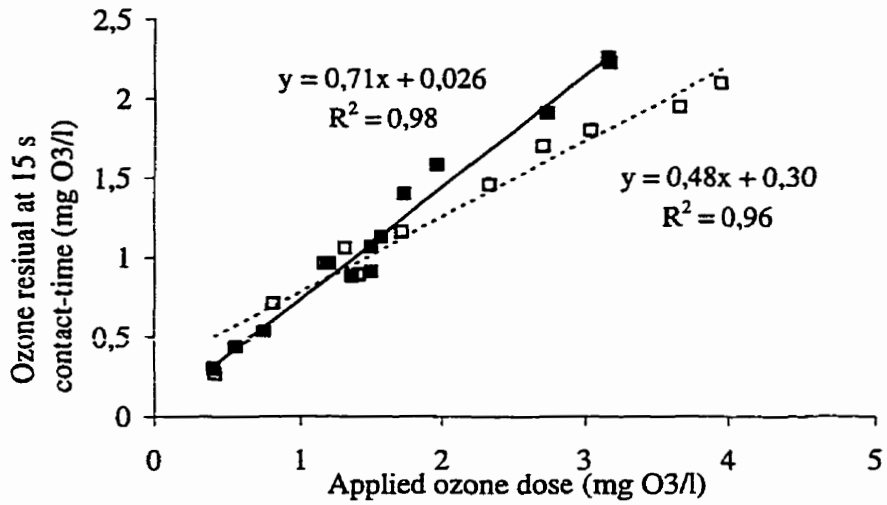

Figure 4.1 : Relationships between measured ozone residuals at 15 seconds of contact time and applied ozone doses, in phosphate buffer ( ) and in borate buffer (■), for pH 6.3 and pH 8.2

4.2.3.8. Inactivation models and Ct calculations

The Surface Water Treatment Rule (USEPA) uses the Chick-Watson law (Equation 4.1) to define the CT required to obtain a certain inactivation level of *Giardia* cysts and other microorganisms. Adjustments are made depending on the pH, the temperature and the oxidant used in water treatment plants:

$$\ln\left(\frac{N_T}{N_0}\right) = -k\, C^n T\,, \tag{4.1}$$

where n is the dilution coefficient, and k depends on the microorganism.

Several authors have questioned the ability of this model to describe inactivation since deviations from this law are frequently observed (Haas et Joffe, 1994; Finch *et al.*,

1988; Labatiuk, 1992). Furthermore, hypotheses underlying the model are not always verified (Barbeau, 1996). Hom proposed another model which describes the kinetics of inactivation better (Equation 4.2). Finch *et al.*, found this model to be more precise in the description of non-linear inactivation curves and in the prediction of inactivation levels (Finch *et al.*, 1994). The improvement results from an additional parameter, *m*, which takes into account the relative weights of C and T. This is particularly useful for fitting the varying inactivation kinetics found for *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts, as demonstrated by (Finch *et al.*, 1994).

$$\ln\left(\frac{N_T}{N_0}\right) = -k\,C^n T^m, \tag{4.2}$$

One of the assumptions of this model, common to the Chick-Watson equation, is that the concentration of oxidant remains constant over time, which does not hold in the case of ozone. Depending on the type of reactor (hydraulic or injection), (Lev et Regli, 1992) proposed using a single-value approximation for the ozone residual. But the use of a single value estimates the actual dose for the microorganism's inactivation. In 1994, assuming a first-order decay, Haas integrated the ozone decomposition kinetics in the inactivation model (Equation 3):

$$\ln\left(\frac{N_T}{N_0}\right) = -\left(\frac{m}{n\,k^*}\right)^m \cdot k\,C_0^{\,n} \cdot \left\{1 - \exp\left(\frac{-n\,k^* T}{m}\right)\right\}^m, \tag{4.3}$$

where C_0 is the applied ozone dose; k^* the first-order decay constant; and *n*, *m* and *k* the three parameters of the model (Haas et Joffe, 1994). As described by Haas, the use of this model requires: (1) the determination of the k^* value, and (2) the adjustment of the parameters *n*, *m* and *k* (Haas *et al.*, 1995). Barbeau applied this model to the data of bacterial spore inactivation with chlorine. It was found to give significantly higher estimates of CT values than the Chick-Watson law. In spite of being flexible, it was not well adapted to changes in experimental conditions, especially temperature, and showed great sensitivity to a change in the k^* value (Barbeau, 1996). Haas showed better results when using a fixed k^* value instead of treating it as a parameter: lower error sums of squares were obtained in the fit with inactivation data (Haas et Joffe, 1994).

This model was used to calculate the ozone inactivation CT for the spores of *B. subtilis* and of the environmental strain. The Chick-Watson equation was also used, but for comparison purposes only.

4.2.4. Results and discussion

4.2.4.1. Ozone decomposition and CT computation method

Batch experiments were conducted at room temperature (20°C), under conditions listed in Table 4.1.

Table 4.1: Summary of transferred ozone dosage ranges (mg O_3/l) investigated to determine the inactivation kinetics of spores of *B. subtilis* and of an environmental strain in aqueous conditions using a batch reactor

Buffer	*Test organism*	*pH = 6.3*	*pH = 8.2*
Phosphate buffer	*B. subtilis*	0.45-1.16	1.16-2.63
	Environmental isolate	0.45-1.29	1.11-2.04
Borate buffer	*B. subtilis*	0.45-1	1.4-2.34

As shown in Figure 4.2 and in accordance with other studies (Haas et Joffe, 1994; Labatiuk, 1992), ozone decomposition kinetics were described well by a first-order decay model:

$$C = C_0 e^{k^* t}, \tag{4.4}$$

where k^* is the first-order constant which was determined for each plot of residual ozone against time using a non-linear regression (least squares method). As observed in Figure 4.2, ozone decomposition rates increased with increasing pH, and this translates into a larger value of k^*.

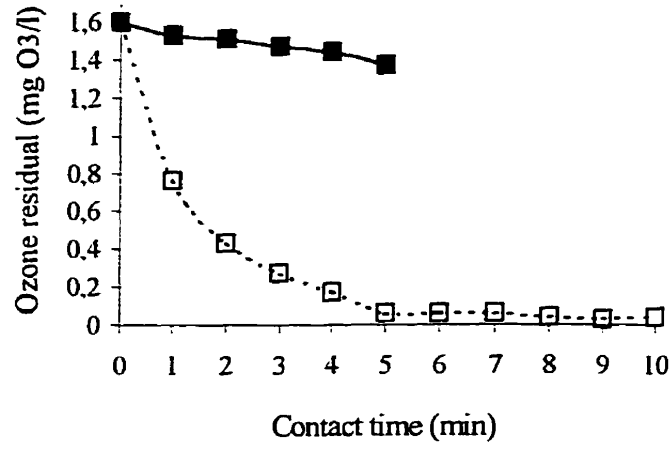

Figure 4.2: Typical ozone decomposition curves obtained in phosphate buffer at pH 6.3 (■) and pH 8.2 (□), at 20°C in a batch reactor

Applied ozone dosage, pH, temperature and radical hydroxyl scavengers have been reported as the major factors driving the kinetics of ozone decomposition (Doré, 1989; Labatiuk *et al.*, 1992). The results of the ANOVA on our decomposition data also demonstrate that pH and applied ozone dosages were the significant factors affecting the decomposition rates, under our experimental conditions ($p<0.05$). In the range of buffer ionic strength used, the buffer was not found to be a significant factor by Gurol and Singer (1982). On this basis, a single common k^* value was used for each pH, computed on the complete data set, including all tests using either the borate or phosphate buffers. Combined k^* values of 0.059 min^{-1} and 0.34 min^{-1} were used for pH values of 6.3 and 8.3 respectively. These values compare well with the value of 0.073 min^{-1} reported by Haas at pH 6.9 for laboratory water in a batch reactor operated at 18°C (Haas *et al.*, 1995). Additional testing in the laboratory showed that the presence of spores ($10^{4.5}$ log/ml concentration) did not alter the k^* value in the phosphate buffer at either pH level.

Typical spore inactivation curves obtained in the phosphate buffer at pH levels of 6.3 and 8.2 are plotted on Figure 4.3. Most inactivation curves of *B. subtilis* included a lag phase whose duration decreased with increasing ozone dosage and higher pH. The

inactivation curves at pH 8.2 showed some tailing behaviour at lower applied ozone dosages. After 8 to 10 minutes of contact time, only very low residuals were present following rapid ozone decay, and very little incremental spore inactivation was measured.

CT calculations were computed in two steps: first, the parameters (k, n and m) of the inactivation model were estimated for each set of data combining results from several tests (buffer, pH and bacterial strain) using the best-fit least-squares method of non-linear regression (see Table 4.2). CTs were then computed for 2, 3 and 4 log of inactivation assuming the precision on parameter determination to have been acceptable.

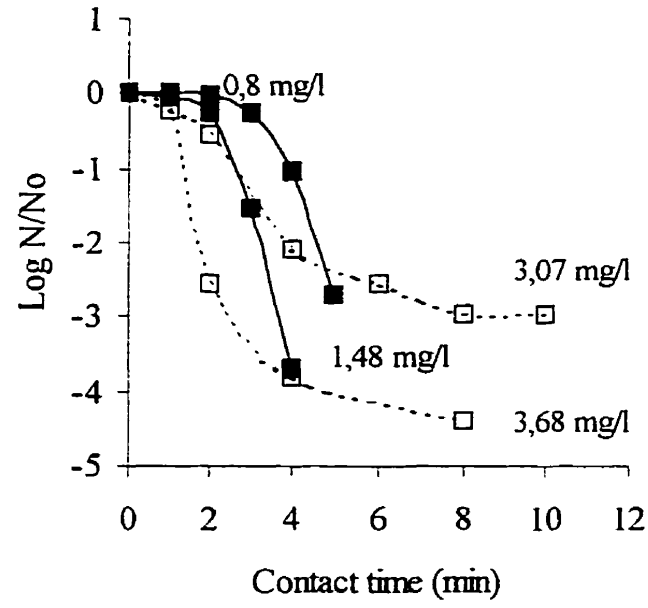

Figure 4.3 : Typical inactivation curves for spores of *B. subtilis*, in phosphate buffer, at pH 6.3 (■) and pH 8.2 (□), in a batch reactor at 20°C. (Applied ozone dose in mg O_3/l)

Table 4.2: Summary of the kinetic parameters for the Hom model with exponential decay of ozone residual, conducted in a batch reactor at 20°C

Experimental condition	*k*	*n*	*m*
B. subtilis			
Phosphate, pH = 6.3	0.25 ± 0.12	2,14 ± 0.4	2.07 ± 0.36
Phosphate, pH = 8.2	0.22 ± 0.07	1.58 ± 0.25	1.63 ± 0.18
Borate, pH = 6.3	0.18 ± 0.11	3.91 ± 0.56	2.41 ± 0.42
Borate, pH = 8.2	0.65 ± 0.2	0.96 ± 0.29	1 ± 0.16
Environmental isolate			
Phosphate, pH = 6.3	1.09 ± 0.12	0.47 ± 0.08	0.87 ± 0.07
Phosphate, pH = 8.2	0.81 ± 0.12	1.18 ± 0.17	1.05 ± 0.1

The parameters of the modified Hom model are given with the standard deviations provided by Statistica®. By varying each parameter within its standard deviation, it was possible to compute the lower and upper bounds for the predicted curves. As shown in Figure 4.4, such calculations resulted in unrealistic variations. It is important to consider that the precision of the model is not directly related to the extreme values of the parameters, but to its ability to describe accurately experimental data. From our experience, experimental and predicted values (in terms of log of inactivation) were always within satisfactory bounds in the region of interest (2 to 4 log).

4.2.4.2. Results of inactivation kinetics

Figure 4.5 summarizes the CT values computed with the modified Hom model (exponential decay of ozone residual) for *B. subtilis* and the environmental strain, in both buffers and at both pH levels.

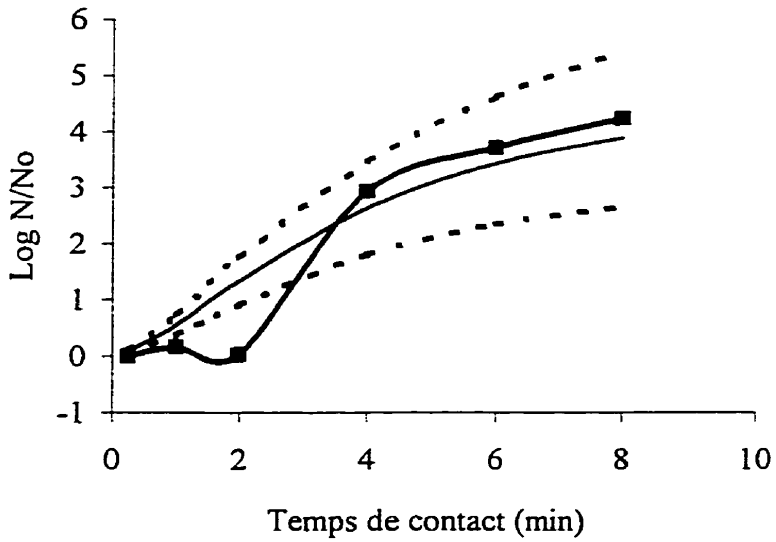

Figure 4.4 : Example of lower and upper bounds of the modified Hom model (dashed lines), compared with the experimental (■) and predicted (solid line) curves

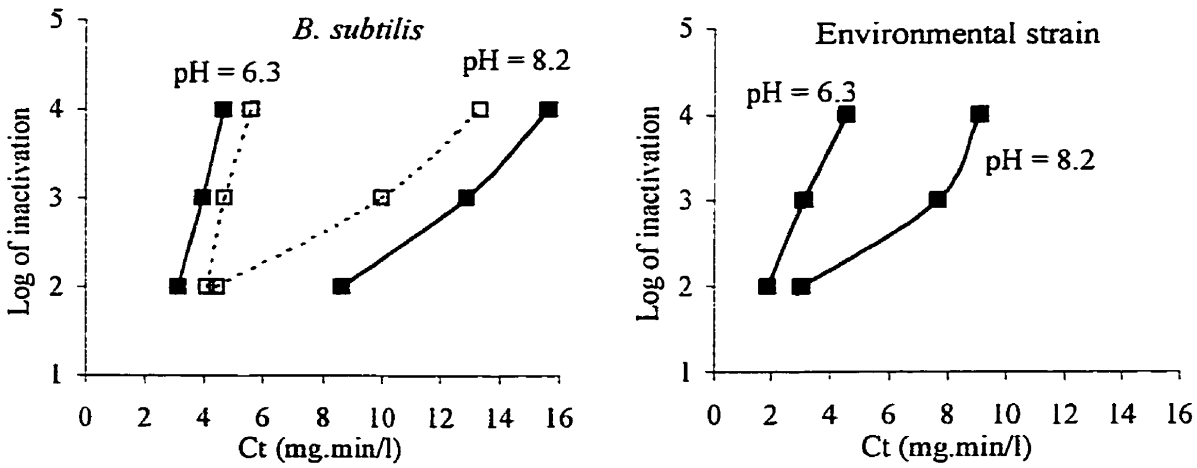

Figure 4.5 : CT calculated with Hom model with exponential decay, for *B. subtilis* and an environmental strain, in phosphate (solid lines) and borate (dashed lines) buffers, in a batch reactor at 20°C

One cannot help but notice the non-linearity of the results obtained at pH 8.2 given by the modified Hom model. This is in accordance with published results (Finch *et al.*, 1994a; Haas *et al.*, 1995; Hunt and Marinas, 1997).

The spore inactivation CT values of 3.15 and 3.96 mg.min/l for 2 and 3 log respectively can be compared to various published CT values for the inactivation of spores and (oo)cysts. Several factors may influence the estimation of the CT value: the test water, the type of reactor, the presence of radical scavengers, the nature and state of the test organism and the method of detection.

Our ability to compare CT values was limited given the significant difference in experimental procedures and the lack of complete information regarding the detailed experimental protocols. Lytle *et al.* (1996) studied the pilot-scale ozonation of indigenous endospores and calculated a CT value of 19 mg. min/l for 2 log inactivation. Mean pH, temperature, turbidity and alkalinity were 8.05, 23.8°C, 0.49 ntu and 59 mg $CaCO_3$/l respectively. The Chick-Watson equation was used. Different reactors, experimental conditions and mathematical models limit the comparison that can be made. Depending on the organisms tested, higher pH and temperature may be responsible for higher CT values (Wickramanayake *et al.*, 1985). Turbidity as a protective effect and though increases the CT values (Labatiuk *et al.*, 1992).

Our CT values for aerobic spores are significantly higher than the values of 0.63 and 2.4 mg.min/l for *G. lamblia* cysts and 0.95 and 3.27 mg.min/l for *C. parvum* oocysts at pH 6.9 (Finch *et al.*, 1994a). Haas *et al.* (1995) reports a value of 0.33 mg.min/l for 2 log inactivation in natural water (0.26-1.48 NTU, 1.0-1.7 mg/l TOC, pH 7-7.2, 4-16°C), while Wickramanayake *et al.* found 0.27 mg.min/l for 2 log inactivation at pH 7 (Wickramanayake *et al.*, 1984). Peeters *et al.* report a CT value of 6.66 mg.min/l for 4 log inactivation of *C. parvum* oocysts; pH and temperature are not specified (Peeters *et al.*, 1989a).

Finch *et al.* (1994) and Haas *et al.* (1995) used batch reactors and animal infectivity to assess CTs, while Wickramanayake *et al.* used a semi-batch reactor (gas bubbling) and in vitro excystation (Wickramanayake *et al.*, 1984). Gas bubbling

provides a constant residual in the reactor (in this case, the dose utilised was not given), instead of the exponential decrease in concentration found in a batch reactor. In vitro excystation may overestimate viability (Black *et al.*, 1996). As for inactivation in natural waters, organisms are protected by turbidity and organic matter (Labatiuk *et al.*, 1992), therefore CT values are expected to be higher than in laboratory waters for equivalent conditions of pH and temperature.

When comparing our CT results with those published for protozoan cysts, it appears that *B. subtilis* is a conservative surrogate for protozoan (oo)cysts since its CT values exceed those for *G. lamblia* or *C. parvum* cysts by a factor of 0.96 to 11.

4.2.4.3. Influence of pH and buffer

It is well known that pH is an important factor in the ozone decomposition process at pH values over 4 (Doré, 1989; Gurol et Singer, 1982). Since molecular ozone is a more effective biocide than free hydroxyl radicals, the latter being short-lived and non-selective (Bablon *et al.*, 1991; Hoigné et Bader, 1979), pH will directly influence CTs. Published CT results were obtained using various buffers and buffer combinations in order to adjust and stabilise pH, and to provide varying levels of radical scavenging. One of the main objectives of this study was to investigate the impact of two combinations of buffers and pH values on aerobic spore inactivation.

The ranges of ozone dosages applied were adjusted depending on the pH tested, since lower ozone doses were required at lower pH to achieve a given inactivation level. This is the direct result of the lower decomposition rate of ozone at lower pH. Molecular or direct oxidation takes place at low pH, whereas ozone rapidly decomposes at higher pH values (Farooq *et al.*, 1977).

Unlike Farooq (1977) who found that pH had minimal effect on inactivation kinetics, we came to the opposite conclusion on comparing results obtained in both buffers. As shown in Figure 4.6, the inactivation rates were greater at lower pH, and CT values at pH 6.3 were systematically lower than those found at pH 8.2. For instance, with an applied dose of 1.16 mg O_3/l, the time required for 2 log of inactivation was 2

min at pH 6.3, and more than 15 min at pH 8.2 (see Figure 4.6). Labatiuk also found that pH is a significant factor in a batch reactor (Labatiuk *et al.*, 1992), whereas Farooq (1977) used a semi-continuous reactor (continuous gas-bubbling), thus allowing no decrease in the ozone residual.

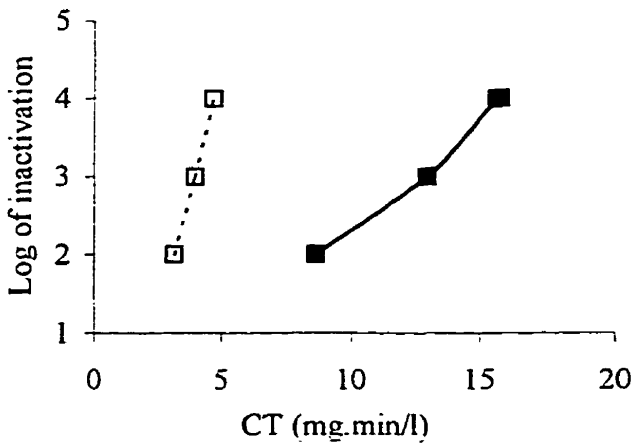

Figure 4.6: CT values for *B. subtilis* at pH 6.3 (dashed lines) and pH 8.2 (solid lines) in phosphate buffer for the same applied ozone dose of 1.16 mg O_3/l, in a batch reactor at 20°C

The fact that pH strongly influenced our results contradicts the current assumption made by the USEPA that pH does not have a great impact on the inactivation rates for *G. lamblia* using ozone. The CT values for *B. subtilis* at pH 8.2 range from 2.73 to 3.25 fold higher than those found at pH 6.3. The impact of pH was also noted for the environmental isolate, although it was not as pronounced for the high levels of inactivation. Even though most of this difference can be explained by the need to compensate ozone decay by increasing the applied dosage and by the poor inactivation efficiency of ozone decomposition by-products, it may be hypothesised that shifts in pH may alter the charges at the organism's outer surface and possibly its reactivity and permeability to ozone (Wickramanayake *et al.*, 1984).

The results obtained with the phosphate and borate buffers were not expected to differ very considerably, since neither buffer is considered to alter the rate of ozone decomposition. Phosphate can have a significant retardation effect on the rate of ozone

decomposition, at least when the phosphate concentration is sufficiently high ($\mu = 1.0$ mol/l) (Gurol and Singer, 1982). However, the phosphate buffer was used in lower concentration ($\mu = 0.02$ mol/l) and no significant impact of the buffer was expected. When comparing the CT obtained in the phosphate and borate buffers, we observe two trends: CT values are lower in the phosphate than in the borate buffer at pH 6.3, whereas the opposite trend is noted at pH 8.2. These trends are counterintuitive, since the phosphate buffer could have some small retardation effect on ozone decomposition at high pH, making molecular ozone is more available, and resulting in slightly lower CTs.

At low pH, it may be possible that the law small concentration of radical scavengers provided by the phosphate buffer contributes somewhat to slower ozone decomposition. At higher pH, as shown in Figure 4.7, the gap tends to lessen as the ozone dosage increases, the small quantity of scavengers becoming insignificant. Since the presence of scavengers should lead to lower CTs, the differences between the results using the two buffers may also be caused by the impact of the buffer on the surface charges of the organisms. This assumption is supported by the observations we made of the colonies after the incubation of the Petri dishes. There were significant differences in the aspect of the grown colonies depending on the buffer in which their spores had been ozonated.

(Hoigne and Bader, 1976) estimated that hydroxyl radicals represent 50% of the decomposed ozone at pH 8. Although $OH^{\bullet}$ radicals may contribute to inactivation, their presence, even in high concentration at high pH, does not contribute significantly to the inactivation of spores. Therefore, the inactivation process is mainly due to direct or molecular oxidation. This conclusion is consistent with those of other studies (Hoigne and Bader, 1976; Hunt and Marinas, 1997). Indeed, authors who stated that radicals were the proper oxidative agents (Dahi, 1976; Goepfert *et al.*, 1995) were operating in different conditions where radicals were the only oxidative agents actually present in the reactor (ozone and H_2O_2 were decomposed by ultrasonic treatment or the addition of

respectively). However, in the general case, when the two species are present, molecular ozone is the preponderant oxidative agent.

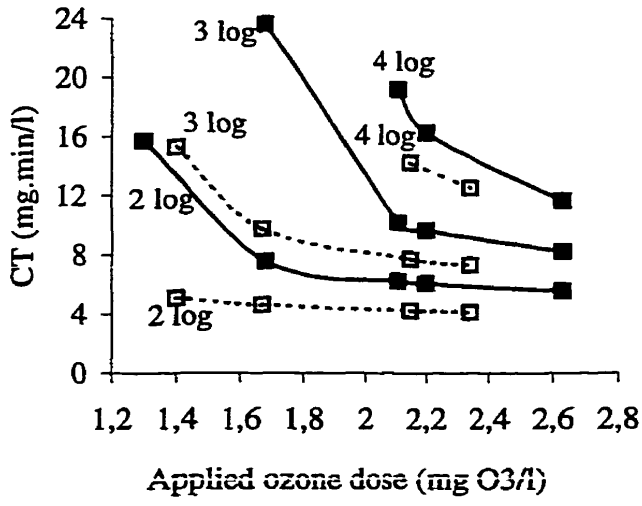

Figure 4.7: CT values against ozone dose obtained for *B. subtilis*, in phosphate buffer (solid lines) and in borate buffer (dashed lines) at pH 8.2, at room temperature in a batch reactor

4.2.4.4. Influence of the strain

The environmental strain isolated from surface water was less resistant to ozone than the reference strain of *B. subtilis*, as shown in Figure 4.8. For both pH levels tested in the phosphate buffer, the inactivation curves did not include a lag period: after 1 min of contact time, inactivation levels reached between 1.13 and 1.9 log at pH 8.2, and between 0.15 and 1.07 log at pH 6.3. However, as shown in Figure 4.8, as the applied ozone dosages increase, the CT values for a given inactivation level merge.

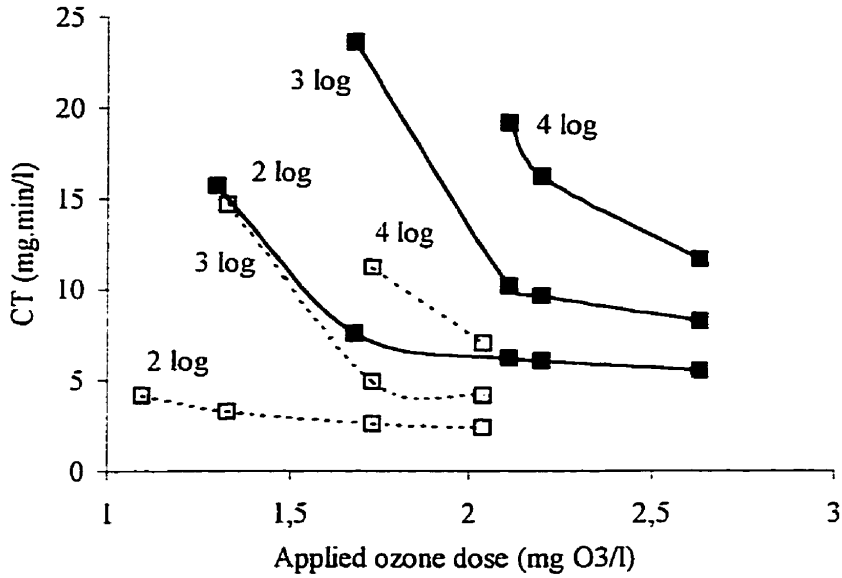

Figure 4.8. CT values obtained for reference strain of *B. subtilis* (solid lines) and environmental strain (dashed lines) in phosphate buffer at pH 8.2, at room temperature, in a batch reactor at 20°C

Barbeau studied the inactivation of spores of *B. subtilis* and of two environmental strains by chlorine and found *B. subtilis* to possess an intermediate resistance (Barbeau, 1996). Miltner *et al.* studied pilote-scale ozonation of *C. parvum* oocysts and an environmental population of aerobic spores in natural waters. He found that the environmental population of spores was more resistant than protozoan cysts, but only beyond 2 min (Miltner *et al.*, 1997).

Although the environmental strain was expected to be more resistant, several hypotheses can account for our results. Inactivation with ozone results from membrane damage and not from DNA damage (Finch *et al.*, 1994a; Komanapalli *et al.*, 1995), although protein and nucleic acid leakage may be observed as a result of membrane disruption (Komanapalli *et al.*, 1995; Popham *et al.*, 1995). As hypothesised by Wickramanayake, differences in membrane constituents can lead to variations in ozone permeability or pH sensitivity (Wickramanayake *et al.*, 1984). This last hypothesis is supported by observations we made that both strains had similar responses to ozone at pH 6.3 where differences in CT values were not significant. The environmental strain

was much less resistant than *B. subtilis* at pH 8.2 compared to *B. subtilis*. According to Langlais et Perrine, the components of the outer structure attacked by ozonation should be of mucopolysaccharidic nature, while resistant structures should be of a cellulosic nature (Langlais et Perrine, 1989). Finally, the vitalistic theory states that a population is formed by individuals with varying resistances (Cerf, 1977). It is feasible to believe that various strains may produce outer structures of various compositions. The environmental isolate we used for our study may not be representative of the overall resistance of an environmental assemblage of various species. Moreover, the environmental conditions causing sporulation may influence the nature of the spore's outer shell (Setlow, 1994) . Finally, the age of the strain may be relevant since the environmental strain was younger than the *B. subtilis* strain (3 and 9 months respectively). Wickramanayake mentioned no "age protective effect", but for a 17-day period only (Wickramanayake *et al.*, 1985). Unfortunately, our data cannot substantiate any of those hypotheses and additional research is needed to investigate these effects.

4.2.4.5. Influence of the inactivation model

The modified Hom model is the better choice for assessing CT values with an oxidant characterised by rapid decay (Barbeau, 1996; Haas et Joffe, 1994). The integration of oxidant decay in the inactivation model provides a better description of the kinetics of inactivation. In order to compare our results with the CTs published by the SWTR (USEPA) for *Giardia* cyst inactivation, the Chick-Watson model was applied to our data. The results presented in Figure 4.9 show that the Chick-Watson model systematically underestimates the CT values required for a given inactivation level compared with CT values estimated with the Hom model including the exponential decay of ozone (56% on average in the phosphate buffer). This effect is not as acute at pH 6.3 (27% on average), since ozone decay is slower than at pH 8.2. At pH 8.2, results provided by the Chick-Watson model were absurd, CT values decreased with increasing inactivation level. For example, in the phosphate buffer, CT values for *B. subtilis* were 1.78 mg.min/l for 2 log inactivation and 0.9 mg.min/l for

B. subtilis were 1.78 mg.min/l for 2 log inactivation and 0.9 mg.min/l for 4 log inactivation. This is the result of using the residual at a given contact time rather than the dose utilised (which is the mathematical integration of exponential decay of the applied dose). Our results highlight the inability of the model to describe inactivation by an oxidant with a rapid decay.

The effect of pH is not considered to be significant under the USEPA STWR guidelines for the inactivation of *G. lamblia*. Based on the results of Wickramanayake (Wickramanayake *et al.*, 1985) who worked at pH 6.9, the published value is 0.72 mg.min/l for 3 log, and values for 2 and 4 log are deduced by linear extrapolation: 0.48 and 0.96 mg.min/l respectively. We found 2.25 mg.min/l for 2 log and 2.99 and 3.56 mg.min/l for 3 and 4 log respectively, in the phosphate buffer.

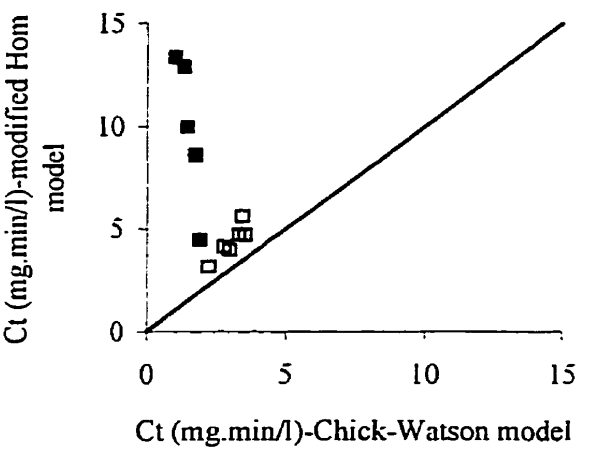

Figure 4.9: Comparison of predicted CT values for *B. subtilis* using Hom model with exponential decay and Chick-Watson model at pH 6.3 (□) and at pH 8.2 (■)

Even if the Chick-Watson model is not appropriate for describing inactivation by a decaying oxidant, the comparison between the CT of *G. lamblia* published by the USEPA and our results shows that the resistance of *B. subtilis* is a conservative prediction of the resistance of the protozoan cysts (only results at pH 6.3 are considered).

Even though the Hom model using exponential ozone decay was statistically significant, as evaluated by the least squares method, for predicting CT values, it systematically overestimated the inactivation levels observed during our experiments. Its best predictions were for 3 log inactivation. Even with the flexibility given by three model parameters, it did not adequately describe the inactivation of bacterial spores under the experimental conditions tested. Another weakness of this model is its high sensitivity to adequate kinetic decomposition data.

In conclusion, the most commonly used model (Chick-Watson) does not describe the inactivation of bacterial spores. The Hom model including exponential decay of ozone remains the best model to consider for its ability to describe both shoulder and tailing behaviours, but its lack of precision implies that a customised model should be developed for accurate description of resistant microorganism inactivation.

4.2.5. Conclusions

General conclusions may be drawn from this study:

- The resistance of *B. subtilis* provides a conservative estimate of the resistance of protozoan (oo)cysts in batch inactivation testing. Estimates computed using the Hom model with exponential decay gave significantly higher CT values than those reported in the literature for protozoan (oo)cysts.
- For both pH levels investigated, the kinetics of ozone decomposition were found to fit a first-order decay model, the rates of ozone decomposition being greater at higher pH.
- The inactivation of bacterial spores is mainly due to molecular oxidation. Although radicals do possess an oxidative effect, their contribution to inactivation appears limited.

- For both bacterial strains tested, the inactivation rates were significantly greater at pH 6.3 than at 8.2, because of the slower ozone decomposition at lower pH. This conclusion goes against the USEPA CT guidelines for *Giardia* inactivation and suggests that the impact of pH should be reconsidered.
- The environmental isolate was less resistant to ozone than the reference strain of *B. subtilis*. This implies that the resistance of aerobic spores could vary from one source to another, or even within a year for a given source, reflecting variations in the species composition.
- The modified Hom model remains the more appropriate model to describe the kinetics of inactivation by ozone. The Chick-Watson equation is not reliable since it does not describe either shoulder or tailing behaviours, which are commonly observed for the inactivation of spores.
- Bacterial spores could be considered as a promising indicator of encysted protozoan inactivation in full-scale treatment plants. The measurement technique is simple, cheap and does not require highly skilled technical personnel. Nevertheless, several issues remain to be addressed, such as: the variability of resistance of the natural assemblage of spores present in a given water source and the difference in resistance between populations of aerobic spore-formers from different water sources.

4.2.6. Acknowledgments

The authors would like to thank Dr. Bernard Clément, professor at the École Polytechnique of Montréal for his collaboration on the statistical analyses.

Funding for this research was provided by the NSERC Chair on Drinking Water of École Polytechnique of Montréal (City of Montréal, City of Laval, John Meunier-CGE and Vallée Lefebvre & ass.)

4.2.7. References

APHA, AWWA, et WEF (1992). "Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater," 18th/Ed. American Public Health Association, Washington, DC.

Barbeau, B. (1996). Évaluation des bactéries sporulantes aérobies comme indicateur de l'efficacité du traitement d'une filière d'eau potable, Université de Montréal, Montréal.

Barbeau, B., Boulos, L., Desjardins, R., Coallier, J., et Duchesne, D. (1997). A modified method for the enumeration of aerobic spore-forming bacteria. *Can. J. of Microbiol.* **43**, 976-980.

Barbeau, B., Facile, N., Myre, I., Desjardins, R. and Prévost, M. (1998). Evaluating disinfection processes: aerobic spore-formers as a surrogate for *Giardia* and *Cryptosporidium*. WQTC, San Diego, CA.

Cerf, O. (1977). Tailing of survival curves of bacterial spores. *Journal of Applied Bacteriology.* **42**, 1-19.

Clancy, J. L., Hargy, T. M., Marshall, M. M. and Dyksen, J. E. (1998). UV light inactivation of *Cryptosporidium* oocysts. *J. Am. Water Works Assoc.* **90** (9).

Coallier, J., Prévost, M., Barbeau, B., Boulos, L., Desjardins, R. and Duchesne, D. (1996). Full-scale physical and chemical removals of a fast response and economic microbiological indicator. AWWA-WQTC Proceedings (CD-Rom), Boston, MA.

Craun, G. F., Hubbs, S. A., Frost, F., Calderon, R. L. and Via, S. H. (1998). Waterborne outbreaks of cryptosporidiosis. *J. Am. Water Works Assoc.* **90** (9)

Dahi, E. (1976). Physiochemical aspects of disinfection of water by means of ultrasound and ozone. *Wat. Res.* **10**, 677-684.

Doré, M. (1989). L'ozone. *In* "Chimie des oxydants et traitement des eaux", TEC & DOC Lavoisier, pp. 275-372, Paris.

Dyksen, J. E., Marshall, M. M., Gera, A. and Clancy, J. L. (1998). Cost of advanced UV for inactivating crypto. *J. Am. Water Works Assoc.* **90**, 9, 103-111.

Farooq, S., Chian, E. S. K., and Engelbrecht, R. S. (1977). Basic concepts in disinfection with ozone. *Journal of Water Pollution and Control Federation* **49**, 1818-1831.

Finch, G. R., Black, E. K., Gyüreck, L., and Belosevic, M. (1994). "Ozone disinfection of *Giardia* and *Cryptosporidium*,". AWWARF, Denver.

Finch, G. R., Smith, D. W. and Stiles, M. (1988). Dose-response of *Escherichia coli* in ozone demand-free phosphate buffer. *Wat. Res.* **22**, 1563-1570.

Fricker, C., and Clancy, J. (1998). Crypto's protocol prospects. *Water quality International*, 11-14.

Goepfert, M., Hartemann, P., and Blech, M. F. (1995). Free radicals and bacterial action of hydrgen peroxide on *Escherichia coli*. *In* "12th world congress of the international ozone association", pp. 497-501, Lille, France.

Gurol, M. D., and Singer, P. C. (1982). Kinetics of ozone decomposition : a dynamic approach. *Environ. Sci. Technol.* **16**, 377-383.

Haas, C. N., and Joffe, J. (1994). Disinfection under dynamic conditions : modification of Hom's model for decay. *Environ. Sci. Technol.* **28**, 1367-1369.

Haas, C. N., Joffe, J., Anmaugandla, U., and Hornberger, J. C. (1995). "Development and validation of rational design methods of disinfection,". AWWARF, Denver.

Hoigne, J., and Bader, H. (1976). The role of hydroxyl radical reactions in ozonation process in aqueous solutions. *Wat. Res.* **10**, 377-386.

Hunt, N. K., and Marinas, B. J. (1997). Kinetics of *Escherichia coli* inactivation with ozone. *Wat. Res.* **31**, 1355-1362.

Jakubowski, W., Boutros, S., Fayer, R., Ghiorse, W., LeChevallier, M., Rose, J., Schaub, S., Singh, A., and Stewart, M. (1996). Environmental methods for *Cryptosporidium*. *J. Am. Water Works Assoc.* **88**, 107121.

Komanapalli, I. R., Mudd, B. J., and Lau, b. H. S. (1995). Effect of ozone on the metabolic activities of *Escherichia coli* K-12. .ASM Poster, Session 108, Q145.

Labatiuk, C. W. (1992). Ozone and ozone-hydrogen peroxide inactivation of *Giardia*, University of Alberta, Edmonton.

Labatiuk, C. W., Belosevic, M., and Finch, G. R. (1992). Factors influencing the infectivity of *Giardia muris* cysts following ozone inactivation in laboratory and natural waters. *Wat. Res.* **26**, 733-743.

Langlais, B., and Perrine, D. (1989). Study of the mechanisms of cyst killing action of ozone on free amoebae. *Techniques sciences et méthodes* **84**, 215-219.

Lev, O., and Regli, S. (1992). Evaluation of ozone disinfection systems : characteristic concentration C. *Journal of environmental engineering* **118**, 477-494.

Lytle, D. A., Fox, K. R., Rice, E. W., Owens, J., and Johnson, C. H. (1996). The use of aerobic spore forming bacteria for evaluating drinking water treatment preformance. *In* "1996 AWWA annual conference", Toronto.

Miller, K. J. (1994). Protecting consumers from Cryptosporidiosis. *J. Am. Water Works Assoc.* **86**, 8.

Miltner, R. J., Shukairy, H. M., Rice, E. W., Owens, J. H., Shaefer III, F. W., and Dahling, D. (1997). Comparative ozone inactivation of *Cryptosporidium* and other microorganisms. *In* "International symposium on waterborne Cryptosporidium", Newport Beach.

Peeters, J. E., Ares Mazas, E., Masschelein, W. J., Villacorta Martinez de Maturana, I., and Debacker, E. (1989). Effect of disinfection of drinking water with ozone or chlorine dioxide on survival of *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**, 1519-1522.

Popham, D. l., Sengputa, S., and Setlow, P. (1995). Heat, hydrogen peroxide and UV resistance of *Bacillus subtilis* spores with increased core water content and with or without major DNA-binding proteins. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 3633-3638.

Setlow, P. (1994). Mechanisms which contribute to the long-term survival of spores of *Bacillus* species. *Journal of Applied Bacteriology Symposium Supplement*, 49S-60S.

Solo-Gabriele, H. and Neumeister, S. (1996). US outbreaks of cryptosporidiosis. *J. Am. Water Works Assoc.* **88**, 76-86.

Sous Comité fédéral-provincial sur l'eau potable. (1997). Les protozoaires dans l'eau potable. , Santé canada, Ottawa.

USEPA "Part II: Drinking Water; National Primary Drinking Water Regulations; Filtration, Disinfection; Turbidity, *Giardia lamblia*, Viruses, *Legionella*, and Heterotrophic Bacteria; Final Rule. 40 CFR Parts 141 and 142,".

Wickramanayake, G. B., Rubin, A. J., and Sproul, O. J. (1984). Inactivation of *Naegleria* and *Giardia* cysts in water by ozonation. *Journal of Water Pollution and Control Federation* **56**, 983-988.

Wickramanayake, G. B., Rubin, A. J., and Sproul, O. J. (1985). Effects of ozone and storage temperature on *Giardia* cysts. *J. Am. Water Works Assoc.* **77**, 74-77.

Chapitre 5
Conclusions et recommandations

5.1. Synthèse des résultats

La détection directe et la récupération des (oo)cystes de protozoaires relevant de techniques laborieuses et coûteuses, la détection indirecte de ces organismes pathogènes semble demeurer la meilleure alternative pour les producteurs d'eau. A ce titre, les bactéries sporulantes aérobies présentent des avantages qui en font un indicateur potentiel de choix :

- présence en grande concentration dans les eaux ;
- facilité de détection et de récupération ;
- développement possible comme analyse de routine en laboratoire de contrôle ;
- grande résistance aux divers traitements d'une filière de traitement d'eau potable.

L'inactivation chimique demeure une étape essentielle dans la filière de potabilisation de l'eau, puisqu'elle constitue la dernière barrière de protection du consommateur avant le réseau de distribution. En ce qui a trait à l'ozone, son pouvoir oxydant supérieur à celui des autres produits couramment utilisés lui confère de grands avantages, surtout dans le cas de l'inactivation d'organismes très résistants comme le sont les (oo)cystes de protozoaires.

Dans le cadre de l'évaluation des bactéries sporulantes aérobies comme indicateur de l'abattement des (oo)cystes de protozoaires potentiellement présents dans l'eau, l'étude menée constitue une première étape pour la caractérisation de leur résistance à l'ozonation.

Dans un premier temps, les essais menés en laboratoire, dans un réacteur en cuvée, ont permis de préciser la cinétique de décomposition de l'ozone moléculaire.

Celui-ci est caractérisé par un taux de décomposition du premier ordre. L'évolution du résiduel d'ozone est donc décrite par une décroissance exponentielle en fonction du temps. D'autres auteurs ont rapporté des cinétiques de décomposition d'ordre 2, $^3/_2$ ou 1 suivant le pH (d'après Gurol et Singer, 1982) . Ces résultats divergents sont sans aucun doute le fait de conditions expérimentales et de méthodes d'analyses différentes.

L'efficacité d'inactivation par l'ozone augmente avec la diminution du pH. Ce résultat est directement lié à la stabilité du résiduel d'ozone et à l'oxydation moléculaire : le pH influence le taux de décomposition, qui à son tour influence le résiduel d'ozone. Des conditions acides favorisent la stabilisation du résiduel d'ozone et donc de l'ozone moléculaire. Il en découle un plus fort taux d'inactivation que dans des conditions basiques.

La chimie de l'ozone en solution aqueuse reste un domaine évolutif dans la mesure où le cycle de décomposition de l'ozone moléculaire n'a pas encore été clairement établi. Cependant, les diverses théories s'accordent sur ce point : la décomposition, catalysée par les ions OH^-, produit des radicaux hydroxyles $OH^\bullet$, espèce oxydante hautement réactive mais très peu sélective. En ce qui concerne l'inactivation chimique des micro-organismes, les théories, là encore divergent : certains soutiennent que l'oxydation est principalement radicalaire, tandis que d'autres la négligent dans le processus global. Dans le cas de l'ozonation des spores, il a été démontré que l'inactivation provenait essentiellement de l'ozone moléculaire, l'effet de l'inactivation radicalaire restant mineur (observée dans des conditions basiques).

L'ozonation d'une souche environnementale a montré que la nature des micro-organismes est un point clé dans le processus d'inactivation. Des temps de latence observés uniquement pour *B. subtilis* et des taux d'inactivation plus importants pour la souche environnementale à des doses d'ozone équivalentes suggèrent plusieurs hypothèses pour expliquer ces différentes cinétiques :

- des réactivités différentes vis à vis de l'ozone, propres à des composants membranaires particuliers ;

- une modification de la charge surfacique des spores en fonction du pH, due à une susceptibilité plus ou moins grande des composants membranaires aux ions OH^- ;
- des populations constituées d'organismes ayant des résistances variées, conformément à ce que suggère la théorie vitaliste (Cerf, 1977).

Le meilleur modèle pour la description des cinétiques d'inactivation par l'ozone est sans conteste le modèle de Hom modifié par Haas : celui-ci intègre la cinétique de décomposition de l'oxydant. Cette caractéristique est essentielle dans le cas d'oxydants instables, car elle évite les situations aberrantes où l'on obtient des Ct décroissants pour des niveaux d'inactivation croissants. Cependant, force est de constater que des lacunes restent à combler : le modèle surestime systématiquement les niveaux d'inactivation observés et il est très sensible aux variations de ses paramètres, ce qui implique qu'une grande précision est nécessaire dans leur détermination.

Finalement, si l'on compare les Ct des souches testées aux valeurs rencontrées dans la littérature pour les cystes de *G. lamblia* et les oocystes de *C. parvum*, la souche de *B. subtilis* est entre 0,7 et 11 fois plus résistante que les (oo)cystes de protozoaires selon les conditions de pH et les taux d'inactivation considérés. Pour ce qui est de la souche environnementale, elle présente une résistance inférieure à celle de la souche commerciale, mais les mêmes tendances restent valables. Il semble donc raisonnable d'affirmer que les spores de bactéries aérobies constituent un bon indicateur de l'efficacité d'ozonation pour l'inactivation des (oo)cystes de protozoaires. Des conditions permettant d'obtenir 3 log d'inactivation des spores devraient permettre d'atteindre plus de 3 log d'inactivation de cystes de *G. lamblia* et d'oocystes de *C. parvum*.

5.2. Prochaines avenues

Si ces travaux ont permis de dégager plusieurs conclusions importantes quant à l'inactivation des spores par ozonation, certains points nécessitent un

approfondissement pour une meilleure description et une compréhension accrue des phénomènes mis en jeu dans des cinétiques d'inactivation.

A cet égard, le choix d'un modèle d'inactivation est crucial pour la modélisation et la prédiction des niveaux d'inactivation : il doit être flexible afin de décrire les diverses courbes d'inactivation obtenues (voir Annexe II), tout en étant robuste face à de faibles variations des conditions dans lesquelles il est utilisé. Par rapport à l'ensemble des modèles existants, le modèle de Hom modifié par Haas a donné les meilleurs résultats pour la description des courbes d'inactivation. Cependant, plusieurs inconvénients sont rattachés à son utilisation :

- il s'est avéré très sensible à de faibles variations de k^* (taux de décomposition de l'ozone) ;
- il a systématiquement surestimé les taux d'inactivation atteints.

Il importe donc de développer un modèle qui rende mieux compte des données expérimentales, dans le cas d'organismes très résistants. Dans l'optique de l'utilisation des Ct comme mesure de la résistance à l'inactivation, une condition paraît cependant incontournable : l'intégration du modèle de décomposition de l'oxydant. Celle-ci permet de considérer la dose réelle en contact avec les organismes cibles, sachant que ne considérer qu'une valeur unique de résiduel introduit nécessairement un biais, difficilement quantifiable, étant données les non-linéarités des phénomènes de décroissance d'oxydant et/ou d'inactivation. En outre, une étude de la sensibilité du modèle par rapport aux incertitudes sur la détermination des paramètres devrait être conduite pour s'assurer que le modèle respecte les données expérimentales : l'évaluation de la précision d'un modèle ne doit pas uniquement se faire selon des critères statistiques, mais doit aussi se baser sur son adéquation avec les données qu'il est censé décrire.

Plusieurs auteurs ont souligné l'inadéquation entre les résultats obtenus en laboratoire et ceux observés en usine. Les caractéristiques physico-chimiques de l'eau sont en grande partie responsables de la difficulté de transposer les résultats de laboratoire aux conditions d'usine. Barbeau (1996) souligne à cet effet de moins bonnes

performances atteintes par rapport aux enlèvements théoriques attendus pour des conditions données. Il importe donc d'étudier le procédé d'ozonation en usine, afin de déterminer les facteurs à l'origine de telles déviations. Ces facteurs peuvent être de natures différentes :

- paramètres physico-chimiques : pH, température, matrice de l'eau (turbidité, alcalinité, matière organique, etc) ;
- paramètre microbiologique : souches de spores ;
- influence de la nature et de l'hydraulique des contacteurs ;
- conditions d'exploitation : taille des bulles d'ozone, mélange ou non dans les contacteurs, etc.

De façon plus générale, la compréhension des phénomènes régissant l'inactivation des micro-organismes par un oxydant donné nécessite d'avoir une vue d'ensemble des facteurs influençant les différents phénomènes mis en cause, ainsi qu'un outil adéquat permettant non seulement la description des mécanismes mis en jeu, mais encore leur interprétation en fonction des influences qu'ils subissent.

Enfin, le concept de Ct tel qu'il est utilisé actuellement par l'USEPA, à savoir, résiduel × temps de contact, n'est certainement pas l'approche la plus appropriée pour décrire la résistance d'un organisme à un traitement. Une notion plus étendue de « combinaisons possibles » de résiduels et de temps de contact serait peut-être plus juste, dans la mesure ou elle serait plus descriptive des conditions dans lesquelles on peut ou non atteindre un certain niveau d'inactivation. La Figure 5.1 illustre bien cette notion, en montrant comment peuvent se décliner les valeurs de résiduels et de temps de contact sur les gammes définies.

Ces enveloppes (régressions non linéaires établies à partir des Ct) sont équivalentes à des Ct évalués à 8,6, 12,9 et 15,6 mg.min/l pour 2, 3 et 4 log d'inactivation respectivement (moyennes calculées sur 6 valeurs). Mais là encore, cette pratique nécessiterait d'avoir à sa disposition des outils parfaitement adaptés pour la description des divers mécanismes mis en jeu.

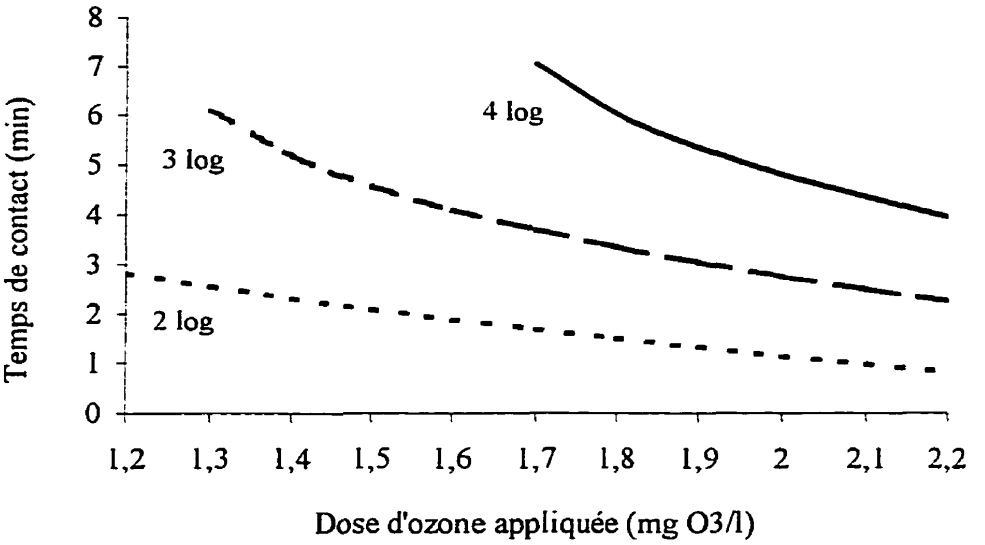

Figure 5.1: Courbes d'abattement de *B. subtilis*, pour un niveau d'inactivation donné, en fonction de la dose d'ozone appliquée et du temps de contact, dans un tampon phosphate à pH 8,2 (dans un réacteur en cuvée et à température ambiante)

5.3. Conclusion générale

L'objectif de cette étude était de caractériser l'inactivation de spores bactériennes aérobies en fonction de deux paramètres définis (pH et souche bactérienne) en calculant leur Ct d'inactivation. Les essais réalisés dans un réacteur en cuvée et à température constante ont permis de dégager les conclusions suivantes :

- une diminution du pH entraîne une augmentation du taux d'inactivation ;
- l'inactivation par ozonation est essentiellement due à l'oxydation moléculaire. L'oxydation radicalaire est présente à pH élevée, mais son rendement reste faible ;
- la souche environnementale testée s'est révélée moins résistante que *B. subtilis* à l'ozonation ; la nature du micro-organisme est donc un facteur clé dans le processus d'inactivation ;
- le modèle de Hom modifié par Haas (prise en compte de la décroissance exponentielle du résiduel) donne de meilleurs résultats que le modèle de

Chick-Watson pour la description des cinétiques d'inactivation et la prédiction des Ct ; cependant, le modèle n'est pas bien adapté à la description de cinétiques d'inactivation dans le cas d'organismes très résistants ;

- la comparaison des résultats obtenus pour les deux souches bactériennes avec les valeurs publiées pour les (oo)cystes de *G. lamblia* et *C. parvum* suggère que les spores bactériennes aérobies constituent de bons indicateurs de ces organismes pathogènes.

Dans le cadre de la recherche d'un indicateur des (oo)cystes de protozoaires, les résultats obtenus sont très encourageants et se placent dans la lignée de ce qui a été fait dans le cas de l'inactivation par le chlore ou de l'abattement par des procédés physiques ; cependant, ils ne constituent qu'une étape d'un travail de plus longue haleine dont l'urgence est de plus en plus grande, comme en témoigne l'avis de bouillir du mois de juillet sous lequel près de quatre millions de consommateurs de la ville de Sydney sont toujours placés, au moment de rédiger ce mémoire.

Références

APHA, AWWA et WEF. (1992). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, American Public Health Association, Washington, DC.

Bader, H. et Hoigne, J. (1981). Determination of ozone in water by the indigo method. Water Research, 15, 449-456.

Bancroft, K., Chrostowski, R., Wright, R. L. et Suffet, I. H. (1984). Ozonation and oxidation competition values. Water Research, 18(4), 473-478.

Barbeau, B. (1996). Évaluation des bactéries sporulantes aérobies comme indicateur de l'efficacité du traitement d'une filière d'eau potable, , Université de Montréal, Montréal.

Barbeau, B., Boulos, L., Desjardins, R., Coallier, J. et Duchesne, D. (1997). A modified method for the enumeration of aerobic spore-forming bacteria. Canadian Journal of Microbiology, 43, 976-980.

Barbeau, B., Boulos, L., Desjardins, R., Coallier, J. et Prévost, M. (1996). Utilisation des bactéries sporulantes aérobies comme indicateur de la performance d'une filière de traitement de l'eau potable. 8 ième Atelier sur l'eau potable -AQTE, Montréal, Canada, 365-374.

Barbeau, B., Facile, N., Myre, I., Desjardins, R. et Prévost, M. (1998). Evaluating disinfection processes: aerobic spore-formers as a surrogate for *Giardia* and *Cryptosporidium*. WQTC, San Diego, CA.

Bellamy, W. D., Finch, G. R. et Haas, C. N. (1998). Integrated disinfection design framework. , AWWARF, Denver.

Bergey. (1986). Bergey's manual of systematic bacteriology, Williams and Wilkins, Baltimore.

Bitton, G. (1994). Pathogens and parasites in domestic wastewater. Wastwater microbiology, New York, 77-100.

Black, E. K., Finch, G. R., Taghi-Kilani, R. et Belosevic, M. (1996). Comparison of assays for *Cryptosporidium parvum* oocysts viability after chemical disinfection. FEMS Microbiology Letters, 135, 187-189.

Broadwater, W. T., Hoehn, R. C. et King, P. H. (1973). Sensitivity of three selected bacterial species to ozone. Applied Microbiology, 26(3), 391-393.

Carlson, S. (1991). Fundamentals of water disinfection. Journal of water SRT-Aqua, 40(6), 346.

Cerf, O. (1977). Tailing of survival curves of bacterial spores. Journal of Applied Bacteriology, 42, 1-19.

Champiat, D. (1988). La biologie des eaux. Biologie des eaux, Masson, Paris

Chiou, C.-F., Torres-Lugo, M., Marinas, B. J. et Adams, J. Q. (1997). Non biological surrogate indicators for assessing ozone disinfection. Journal of American Water Works Association, 89(8), 54-66.

Clancy, J. L., Hargy, T. M., Marshall, M. M. et Dyksen, J. E. (1998). UV light inactivation of *Cryptosporidium* oocysts. Journal of American Water Works Association, 90(9).

Coallier, J., Prévost, M., Barbeau, B., Boulos, L., Desjardins, R. et Duchesne, D. (1996). Full-scale physical and chemical removals of a fast response and economic microbiological indicator. AWWA-WQTC Proceedings (CD-ROM), Boston, MA

Craun, G. F., Berger, P. S. et Calderon, R. L. (1997). Coliform bacteria and waterborne disease outbreaks. Journal of American Water Works Association, 89(3), 96-104.

Craun, G. F., Hubbs, S. A., Frost, F., Calderon, R. L. et Via, S. h. (1998). Waterborne outbreaks of cryptosporidiosis. Journal of American Water Works Association, 90(9).

Dahi, E. (1976). Physiochemical aspects of disinfection of water bu means of ultrasound and ozone. Water Research, 10, 677-684.

Desjardins, R. (1990). Le traitement des eaux, Éditions de l'École Polytechnique de Montréal, Montréal.

Doré, M. (1989). L'ozone. Chimie des oxydants et traitement des eaux, Lavoisier, Paris, 275-372.

DuPont, H. L., Chappell, C. L., Sterling, C. R., Okhuysen, P. C., Rose, J. B. et Jakubowsky, W. (1995). The infectivity of *Cryptosporidium* parvum in healthy volunteers. New England Journal of Medecine, 332(12), 855-859.

Dyksen, J. E., Marshall, M. M., Gera, A. et Clancy, J. L. (1998). Cost of advanced UV for inactivating crypto. Journal of American Water Works Association, 90(9), 103-111.

Farooq, S., Chian, E. S. K. et Engelbrecht, R. S. (1977). Basic concepts in disinfection with ozone. Journal of Water Pollution and Control Federation, 49, 1818-1831.

Finch, G. R., Black, E. K., Gyüreck, L. et Belosevic, M. (1994a). Ozone disinfection of *Giardia* and *Cryptosporidium*. , AWWARF, Denver.

Finch, G. R., Black, E. K. et Gyüreck, L. L. (1994b). Ozone and chlorine inactivation of *Cryptosporidium*. 1994 WQTC, San Francisco, 1303-1318.

Finch, G. R., Black, E. K., Gyürek, L. et Belosevic, M. (1993a). Ozone inactivation of *Cryptosporidium parvum* in demand-free phosphate buffer determined by in vitro excystation and animal infectivity. Applied and Environmental Microbiology, 59(12), 4203-4210.

Finch, G. R., Black, E. K., Labatiuk, C. W., Gyürek, L. et Belosevic, M. (1993b). Comparison of *Giardia lamblia* and *Giardia muris* cyst inactivation by ozone. Applied and Environmental Microbiology, 59(11), 3674-3680.

Finch, G. R., Smith, D. W. et Stiles, M. (1988). Dose-response of *Escherichia coli* in ozone demand-free phosphate buffer. Water Research, 22(12), 1563-1570.

Fricker, C. et Clancy, J. (1998). Crypto's protocol prospects. Water quality International, 11-14.

Goepfert, M., Hartemann, P. et Blech, M. F. (1995). Free radicals and bacterial action of hydrgen peroxide on *Escherichia coli*. 12th world congress of the international ozone association, Lille, France, 497-501.

Gurol, M. D. et Singer, P. C. (1982). Kinetics of ozone decomposition : a dynamic approach. Environmental Science and Technology, 16(7), 377-383.

Haas, C. N. et Joffe, J. (1994). Disinfection under dynamic conditions : modification of Hom's model for decay. Environmental Science and Technology, 28, 1367-1369.

Haas, C. N., Joffe, J., Anmaugandla, U. et Hornberger, J. C. (1995). Development and validation of rational design methods of disinfection. , AWWARF, Denver.

Hancock, C. M., Rose, J. B. et Caalahan, M. (1998). *Crypto* and *Giardia* in US groundwater. Journal of American Water Works Association, 90(3), 58-61.

Haslay, C. et Leclerc, H. (1989). Microbiologie des eaux d'alimentation, Lavoisier, TEC & DOC. 479 p.

Hoigne, J. et Bader, H. (1976). The role of hydroxyl radical reactions in ozonation process in aqueous solutions. Water Research, 10, 377-386.

Hunt, N. K. et Marinas, B. J. (1997). Kinetics of *Escherichia coli* inactivation with ozone. Water Research, 31(6), 1355-1362.

Jakubowski, W., Boutros, S., Fayer, R., Ghiorse, W., LeChevallier, M., Rose, J., Schaub, S., Singh, A. et Stewart, M. (1996). Environmental methods for *Cryptosporidium*. Journal of American Water Works Association, 88, 107121.

Kawamura, K., Kaneko, M., Hirata, T. et Tagushi, K. (1986). Microbial indicators for the efficiency of disinfection processes. Water Science and Technology, 18(10), 175-184.

Komanapalli, I. R., Mudd, B. J. et Lau, b. H. S. (1995). Effect of ozone on the metabolic activities of *Escherichia coli* K-12. ASM Poster, Session 108, Q145.

Labatiuk, C. W. (1992). Ozone and ozone-hydrogen peroxide inactivation of *Giardia*, , University of Alberta, Edmonton.

Labatiuk, C. W., Belosevic, M. et Finch, G. R. (1992). Factors influencing the infectivity of *Giardia muris* cysts following ozone inactivation in laboratory and natural waters. Water Research, 26(6), 733-743.

Labatiuk, C. W., Belosevic, M. et Finch, G. R. (1994). Inactivation of *Giardia muris* using ozone and ozone-hydrogen peroxide. Ozone Science & Engineering, 16, 67-78.

Langlais, B. et Perrine, D. (1989). Study of the mechanisms of cyst killing action of ozone on free amoebae. Techniques sciences et méthodes, 84(4), 215-219.

Langlais, B., Reckhow, D. A. et Brink, D. R. (1991). Ozone in water treatment. Application and engineering, Lewis Publishers, Chelsea, MI. p.

Lev, O. et Regli, S. (1992a). Evaluation of ozone disinfection systems : characteristic concentration C. Journal of Environmental Engineering, 118(4), 477-494.

Lev, O. et Regli, S. (1992b). Evaluation of ozone disinfection systems : charcacteristics time T. Journal of Environmental Engineering, 118(2), 268-285.

Lytle, D. A., Fox, K. R., Rice, E. W., Owens, J. et Johnson, C. H. (1996). The use of aerobic spore forming bacteria for evaluating drinking water treatment preformance. 1996 AWWA annual conference, Toronto.

Miller, K. J. (1994). Protecting consumers from Cryptosporidiosis. Journal of American Water Works Association, 86(8).

Miltner, R. J., Shukairy, H. M., Rice, E. W., Owens, J. H., Shaefer III, F. W. et Dahling, d. (1997). Comparative ozone inactivation of *Cryptosporidium* and other microorganisms. International symposium on waterborne Cryptosporidium, Newport Beach.

Morris, J. C. (1975). Aspects of the quantitative assessment of germicidal efficiency. Disinfection : water and wastewater, Ann Arbor Science Publishers, MI.

Owens, J. H., Berg, G., Summers, R. S., Rice, E. W., Reasoner, D. J. et Clark, R. M. (1994a). Survival of a fraction of heterotrophic bacteria indigenous to the Ohio river after a prolonged exposure to free chlorine. 1994 Annual conference on water research, New-York, 357-366.

Owens, J. H., Miltner, R. J. et Schaefer III, F. W. (1994b). Pilot-scale ozone inactivation of *Cryptosporidium* and *Giardia*. 1994 WQTC, San Francisco, 1319-1327.

Payment, P. (1993). Is *Clostridium perfringens* the ideal indicator for human enteric viruses during conventional drinking water treatment. WQTC, Miami, 873-878.

Peeters, J. E., Ares Mazas, E., Masschelein, W. J., Villacorta Martinez de Maturana, I. et Debacker, E. (1989a). Effect of disinfection of drinking water with ozone or chlorine dioxide on survival of *Cryptosporidium parvum* oocysts. Applied and Environmental Microbiology, 55(6), 1519-1522.

Peeters, J. E., Mazas, E. A., Masschelein, W., Villacorta Martinez de Maturana, I. et Debacker, E. (1989b). Effect of disinfection of drinking water with ozone or chlorine dioxide on survival of *Cryptosporidium parvum* oocysts. Applied and Environmental Microbiology, 55(6), 1519-1522.

Pontius, F. W. (1998). Communicating ICR data on *Cryptosporidium*. Journal of American Water Works Association, 90, 20-26.

Popham, D. l., Sengputa, S. et Setlow, P. (1995). Heat, hydrogen peroxide and UV resistance of *Bacillus subtilis* spores with increased core water content and with or without major DNA-binding proteins. Applied and Environmental Microbiology, 61(10), 3633-3638.

Rendtorff, R. C. (1978). The experimental transmission of *Giardia lamblia* among volunteer subjects. Waterborne transmission of giardiasis, W. Jakubowski et Hoff, J. C., eds., EPA-600/9-79-001, USEPA, Cincinnati, 64-81.

Rickloff, J. R. (1987). An evaluation of the sporicidal activity of ozone. Applied and Environmental Microbiology, 53(4), 683-686.

Setlow, P. (1994). Mechanisms which contribute to the long-term survival of spores of *Bacillus* species. Journal of Applied Bacteriology Symposium Supplement, 49S-60S.

Shechter, H. (1973). Spectrophometric method for determination of ozone in aqueous solutions. Water Research, 7, 729-739.

Sheffield, H. G. (1979). The ultrastructural aspects of *Giardia*. Waterborne transmission of giardiasis, W. Jakubowski et Hoff, J. C., eds., EPA-600/9-79-001, USEPA, Cincinnati.

Solo-Gabriele, H. et Neumeister, S. (1996). US outbreaks of cryptosporidiosis. Journal of American Water Works Association, 88, 76-86.

Sous Comité fédéral-provincial sur l'eau potable. (1997). Les protozoaires dans l'eau potable. , Santé canada, Ottawa.

Staehelin, J. et Hoigné, J. (1985). Decomposition of Ozone in Water in the Presence of Organic Solutes Acting as Promoters and Inhibitors of Radical Chain Reactions. Environmental Science Technology, 19, 1206-1213.

Tomiyasu, H., Fukutomi, H. et Gordon, G. (1985). Kinetics and mechnism of ozone decomposition in basic aqueous solution. Inorganic Chemistry, 24, 2962-2966.

USEPA. Part II: Drinking Water; National Primary Drinking Water Regulations; Filtration, Disinfection; Turbidity, *Giardia lamblia*, Viruses, *Legionella*, and Heterotrophic Bacteria; Final Rule. 40 CFR Parts 141 and 142. .

USEPA. (1994). Enhanced Surface Water Treatment Rule, Preambule (Draft). .

Venczel, L. V., Arrowoog, M., Hurd, M. et Sobsey, M. (1997). Inactivation of *Cryptosporidium parvum* oocysts and *Clostridium perfringens* spores by a mixed-oxidant disinfectant and by free-chlorine. Applied and Environmental Microbiology, 63(4), 1598-1601.

White, G. C. (1992). Ozone. Handbook of chlorination and alternative disinfectants. Third edition, Van Nostrand Reinhold, New york, 1049-1116.

Wickramanayake, G. B., Rubin, A. J. et Sproul, O. J. (1984). Inactivation of *Naegleria* and *Giardia* cysts in water by ozonation. Journal of Water Pollution and Control Federation, 56(8), 983-988.

Wickramanayake, G. B., Rubin, A. J. et Sproul, O. J. (1985). Effects of ozone and storage temperature on *Giardia* cysts. Journal of American Water Works Association, 77, 74-77.

Annexe I

Différentes méthodes de préparation des suspensions bactériennes

Le tableau ci-après présente un bref aperçu de différents protocoles utilisés pour obtenir des suspensions de plusieurs micro-organismes : *E. coli*, cystes de *Giardia* et oocystes de *Cryptosporidium* ou encore des spores de bactéries sporulantes aérobies.

Auteur	Micro-organismes	Milieu de culture	Procédure de nettoyage	Mise en suspension
(Barbeau et al., 1997)	BSA (a)	R2A, 10 jours environ	→ répété 3 fois : - lavage avec tampon phosphate - centrifugation, 10000 g, 10 min	tampon phosphate, à 4°C
(Broadwater et al., 1973)	- *E.coli* - *B.cereus* - *B.megaterium*	milieu de sporulation, incubation 12 h à 30°C, agitation vigoureuse	- suspension de spores et cellules dans eau déionisée stérile - chauffage 10 min à 80 °C ⇒ spores - 3 lavages - centrifugation	500 ml d'eau déionisée stérile
(Finch et al., 1988)	*E. coli*	inoculé d'agar nutritif dans TSB; incubation (18 h, 35°C), puis autre incubation dans TSB	2,0 ml de suspension centrifugation 7500 g , 10 min 1 lavage	tampon phosphate 0,05 M
(Finch et al., 1993a)	oocystes de *Cryptosporidium* (b)		lavage centrifugation 910 g, 15 min	eau Milli-Q®
(Finch et al., 1993b)	kystes de *G. lamblia* (c)		→ répété au moins 3 fois : - lavage avec eau Milli-Q® - centrifugation 500 g, 10 min	
(Hunt et Marinas, 1997)	*E. coli*	nutrient agar 18h, 35°C, puis Difco nutrient broth		200 ml de solution tampon

Auteur	Micro-organismes	Milieu de culture	Procédure de nettoyage	Mise en suspension
(Kawamura et al., 1986)	BSA	standard method agar	eau stérile distillée 2 fois	tampon phosphate pH=7,2
(Labatiuk, 1992)	kystes de *G. muris* (c)		→ répété 3 à 5 fois : - lavage dans eau Milli-Q® - centrifugation 6000 g, 10 min	eau Milli-Q® à 4°C entre 18 et 48 h (*)
(Owens et al., 1994b)	kystes de *G. muris* (c)		- série de tamis (20, 40, 100, 250) - flottation dans 1,0 M sucrose - 2 lavages au Tween 20, 0,01 % (v/v)	eau distillée, à 4°C, 5 jours maximum
	oocystes de *C. parvum* (c)		- gradients de sucrose à 1,0 et 0,85 M, à 1200 g, 10 min - gradient au Percoll isopycnic	tampon phosphate + pénicilline et streptomycine à 4°C
(Owens et al., 1994a)	bactéries hétérotrophes (a)	Brain Heart Infusion Agar	- vortex dans 5 ml de tampon - phosphate (0,05 M), pH 7	1 l de tampon phosphate 0,05 M (***)
(Rickloff, 1987)	- *B. subtilis* - *C. sporogenes*	incubation 72h puis filtration à travers du coton stérile	→ répété 3 fois : - centrifugation, 18800 g, 20 min - culot suspendu dans le même volume d'eau stérile	suspension à 80°C, 20 min puis stockée au frais

Auteur	Micro-organismes	Milieu de culture	Procédure de nettoyage	Mise en suspension
(Venczel et al., 1997)	*C. perfringens* *C. parvum* (c)	Duncan-Strong sporulation medium, 42°C	- filtration - centrifugation dans solutions de sucrose et Percoll isopycnic - lavage dans eau saline (0,1% de sérum d'albumine bovine)	(**) 1 ml de tampon phosphate
(Wickraman ayake et al., 1984)	kystes de *G. lamblia* (d)		isolation par flottation dans une solution de sucrose 1M	eau distillée, 5°C, 7 jours
(Wickraman ayake et al., 1985)	kystes de *G. muris* (c)		-filtration et centrifugation - lavage du culot avec polysorbate 20 - gradient de sucrose et lavages avec eau distillée - filtration 2 fois (25 µm)	à 5°C

Légende :

(a) : souche environnementale ;

(b) : souche commerciale ;

(c) : fèces animales ;

(d) : fèces humaines ;

(*) : contrôle qualité : mesure de l'absorbance à 260 nm d'une suspension de 4 log/ml de kystes ; seules les suspensions ayant une absorbance inférieure à 0,03/cm sont utilisées (260 nm est la longueur d'onde avec laquelle le résiduel d'ozone est analysé) ;

(**) : les suspensions utilisées contiennent au moins 95% de spores et sont exemptes d'agrégats visibles ;

(***) : les suspensions sont filtrées sur des membranes en polycarbonate de porosité 8,5 ou 3 µm pour éliminer les agrégats.

Annexe II

Courbes d'inactivation de *B. subtilis* et de la souche environnementale testée

Cette annexe présente les courbes d'inactivation obtenues pour tous les essais réalisés. Les courbes donnent le log d'enlèvement de la souche testée en fonction du temps de contact.

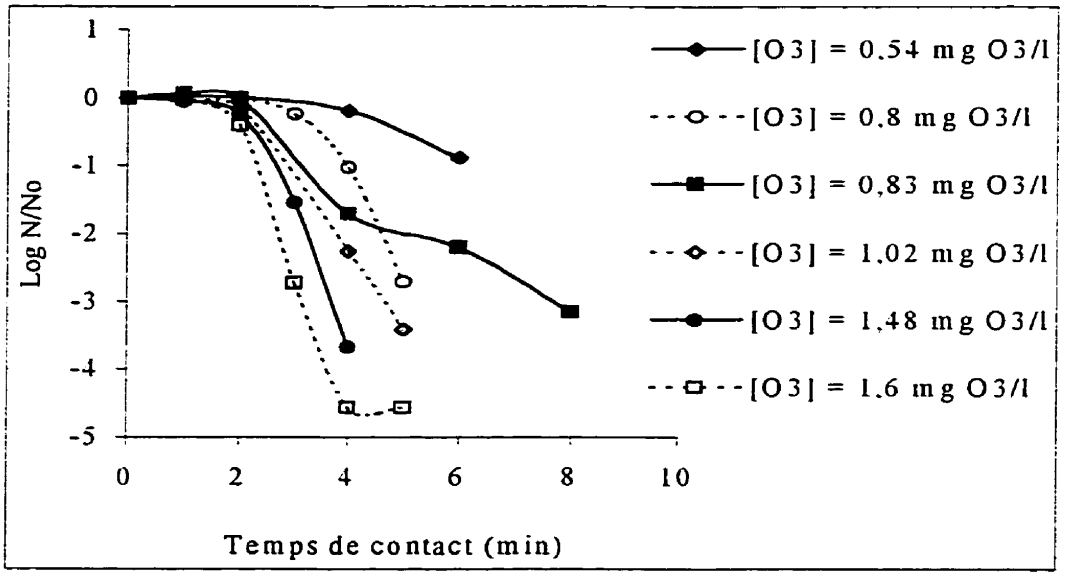

Figure II. 1: Souche de *B. subtilis*, tampon phosphate, pH = 6.3

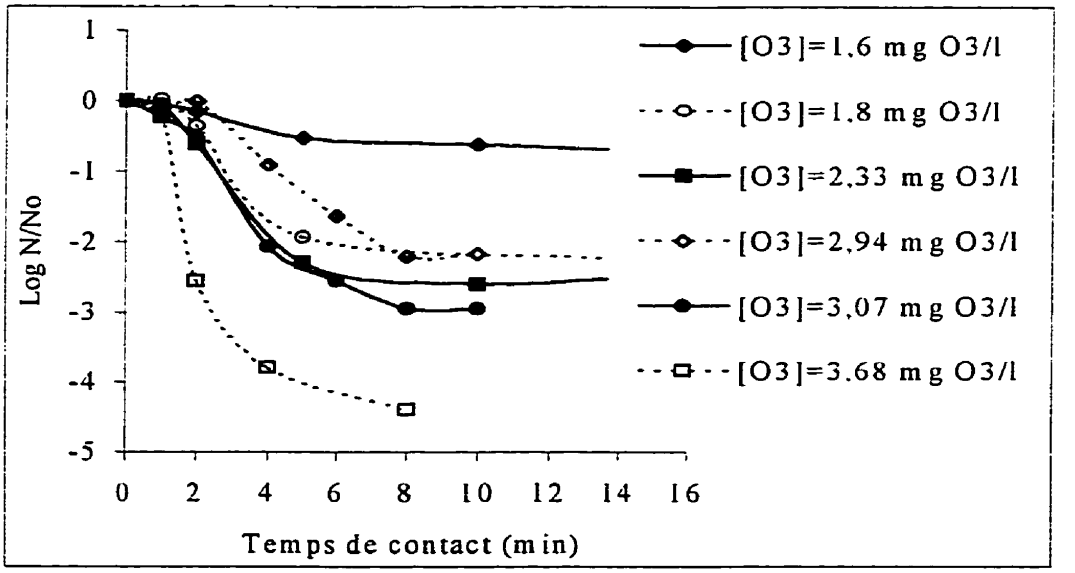

Figure II. 2: Souche de *B. subtilis*, tampon phosphate, pH = 8.2

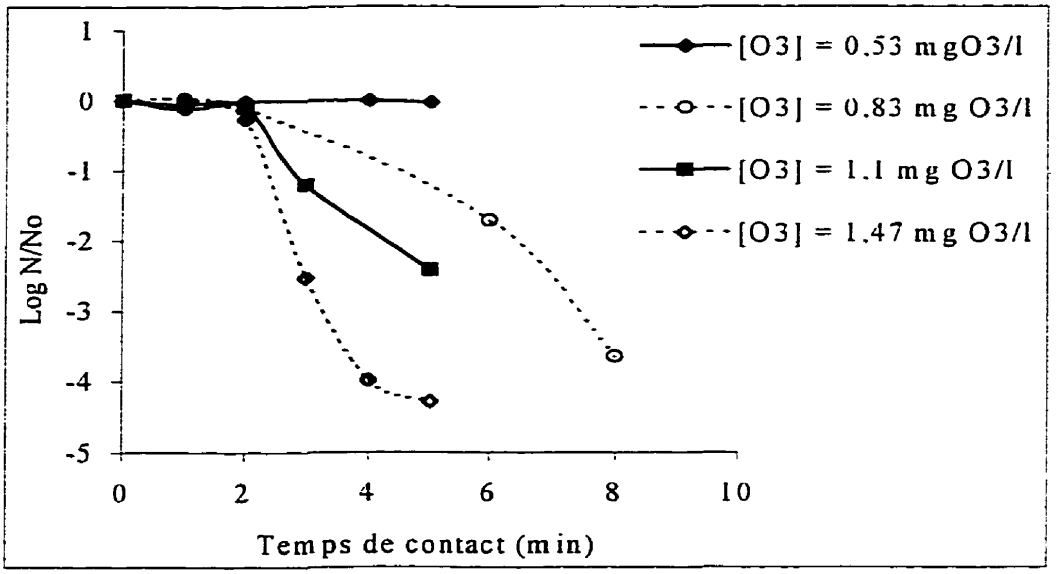

Figure II. 3: Souche de *B. subtilis*, tampon borate, pH = 6.3

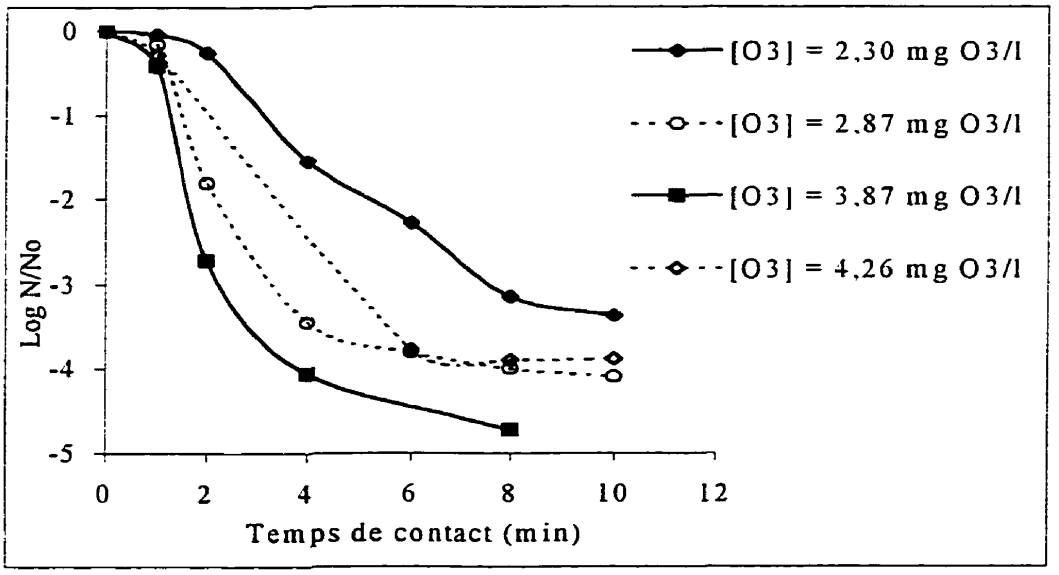

Figure II. 4: Souche de *B. subtilis*, tampon borate, pH = 8.2

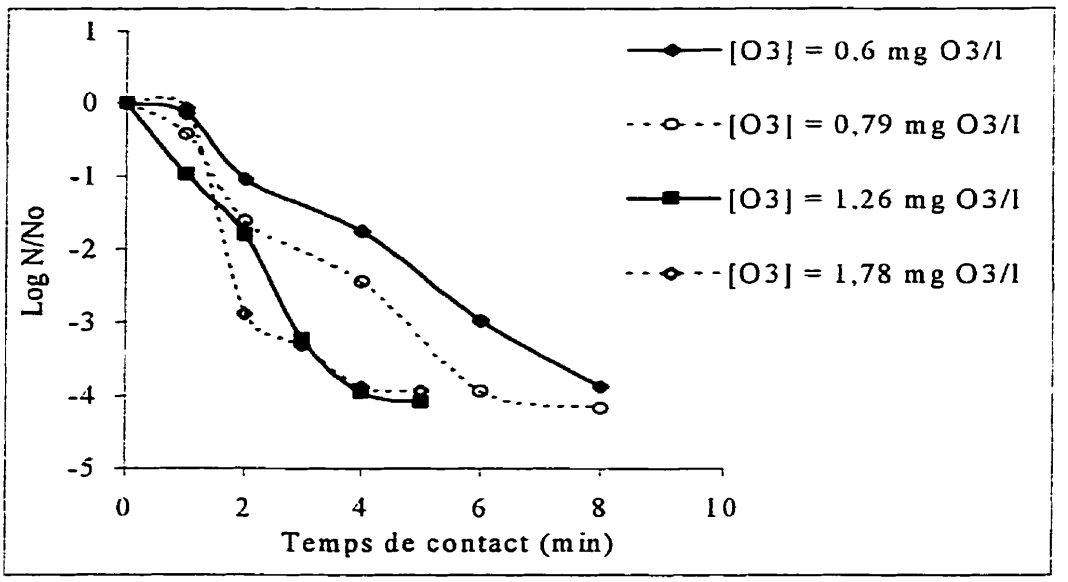

Figure II. 5: Souche environnementale, tampon phosphate, pH = 6.3

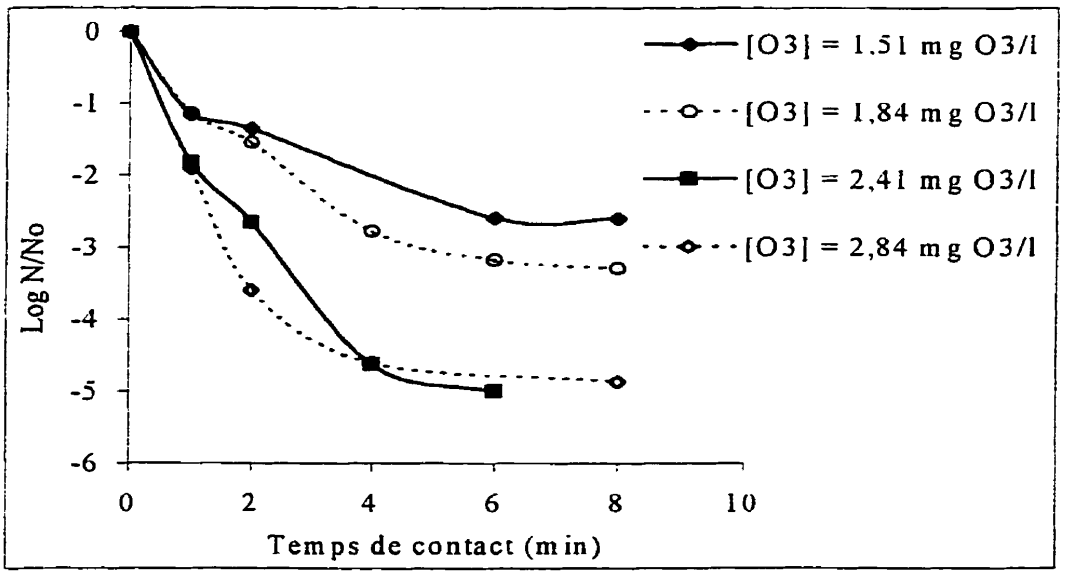

Figure II. 6: Souche environnementale, tampon phosphate, pH = 8.2