

Titre:	Validation à échelle réelle de la performance des procédés de désinfection de l'eau potable par le développement de technologies biodosimétriques
Auteur:	Romain Broséus
Date:	2006
Type:	Mémoire ou thèse / Dissertation or Thesis
Référence:	Broséus, R. (2006). Validation à échelle réelle de la performance des procédés de désinfection de l'eau potable par le développement de technologies biodosimétriques [Mémoire de maîtrise, École Polytechnique de Montréal]. PolyPublie. https://publications.polymtl.ca/7703/

Document en libre accès dans PolyPublie

Open Access document in PolyPublie

URL de PolyPublie: <https://publications.polymtl.ca/7703/>
PolyPublie URL:

Directeurs de recherche: Benoit Barbeau, & Christian Bouchard
Advisors:

Programme: Non spécifié
Program:

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

VALIDATION À ÉCHELLE RÉELLE DE LA PERFORMANCE DES PROCÉDÉS
DE DÉSINFECTION DE L'EAU POTABLE PAR LE DÉVELOPPEMENT DE
TECHNOLOGIES BIODOSIMÉTRIQUES

ROMAIN BROSÉUS

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)

AVRIL 2006



Library and
Archives Canada

Published Heritage
Branch

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Bibliothèque et
Archives Canada

Direction du
Patrimoine de l'édition

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file *Votre référence*
ISBN: 978-0-494-17932-1

Our file *Notre référence*
ISBN: 978-0-494-17932-1

NOTICE:

The author has granted a non-exclusive license allowing Library and Archives Canada to reproduce, publish, archive, preserve, conserve, communicate to the public by telecommunication or on the Internet, loan, distribute and sell theses worldwide, for commercial or non-commercial purposes, in microform, paper, electronic and/or any other formats.

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

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this thesis.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the thesis.

AVIS:

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, publier, archiver, sauvegarder, conserver, transmettre au public par télécommunication ou par l'Internet, prêter, distribuer et vendre des thèses partout dans le monde, à des fins commerciales ou autres, sur support microforme, papier, électronique et/ou autres formats.

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

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de cette thèse.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.

**
Canada

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

Ce mémoire intitulé :

VALIDATION À ÉCHELLE RÉELLE DE LA PERFORMANCE DES PROCÉDÉS
DE DÉSINFECTION DE L'EAU POTABLE PAR LE DÉVELOPPEMENT DE
TECHNOLOGIES BIODOSIMÉTRIQUES

Présenté par : BROSÉUS Romain

en vue de l'obtention du diplôme de : Maîtrise ès sciences appliquées
a été dûment accepté par le jury d'examen constitué de :

Mme PRÉVOST Michèle, Ph.D., présidente

M. BARBEAU Benoit, Ph.D., membre et directeur de recherche

M. BOUCHARD Christian, Ph.D., membre et codirecteur de recherche

M. NIQUETTE Patrick, Ph.D., membre

REMERCIEMENTS

Mes remerciements s'adressent tout d'abord à M. Benoit Barbeau, mon directeur d'étude. Sa disponibilité, ses suggestions, ses remarques pertinentes, sa bonne humeur et sa motivation m'ont poussé à entreprendre et à réussir du mieux possible. Ce fut un plaisir de travailler sous sa direction. Je remercie aussi M. Christian Bouchard pour ses conseils éclairés, pour la révision des articles ainsi que celle du présent mémoire.

Je tiens également à remercier Mme Michèle Prévost et M. Raymond Desjardins qui, au sein de la Chaire en Eau Potable de l'École Polytechnique de Montréal, m'ont permis d'acquérir de l'expérience et des connaissances mises en application dans le cadre de ce programme de recherche. Je remercie aussi M. Patrick Niquette d'avoir accepté de réviser ce mémoire.

Les manipulations sur le terrain n'auraient pu se dérouler correctement sans la présence de M. Yves Fontaine et de Mlle Annie Carrière, que je remercie chaleureusement d'avoir passé plusieurs journées dans les cuves d'ozonation de l'usine DesBaillets, notamment. J'en profite pour remercier M. Stéphane Schiltz, M. Patrice Rollain, M. Alain Champagne ainsi que le personnel des laboratoires de chimie et de microbiologie de l'usine DesBaillets et l'ensemble des opérateurs qui n'ont pas hésité à répondre positivement à mes nombreuses requêtes.

Je remercie beaucoup l'équipe de la Chaire en Eau potable, notamment Jacinthe Mailly, Julie Philibert et Mélanie Rivard pour leur disponibilité, leurs renseignements précis et le temps qu'elles m'ont consacré. Mes remerciements s'adressent aussi, forcément, aux Boys du B616, sombre local désormais associé à *Pushap*. Je remercie finalement ma famille proche et l'ensemble des amis qui ont su me redonner le moral et le courage nécessaires pour réaliser ce projet. À tous, mes immenses remerciements et mes plus sincères vœux de réussite.

RÉSUMÉ

La désinfection a pour but de diminuer le risque de transmission de maladies d'origine hydrique. L'efficacité du traitement est mesurée d'après le concept de dose (CT) car il est actuellement difficile de mesurer l'inactivation des pathogènes, retrouvés en faible concentration à l'eau traitée. Or, le calcul réglementaire du CT est conservateur sachant qu'il est nécessaire de limiter la formation de sous-produits d'oxydation. Le modèle IDDF (*Integrated Disinfection Design Framework*), qui combine une caractérisation hydraulique des bassins de contact et un modèle de décroissance du désinfectant, permet une mesure plus précise de la dose délivrée. Cependant, tout modèle intègre un certain niveau d'incertitude. Ainsi, l'utilisation d'une technique permettant de valider les prédictions du modèle IDDF sous conditions réelles est requise.

L'objectif général de cette étude est de valider les valeurs de CT des contacteurs d'ozone de l'usine DesBaillets (Montréal, Québec) à l'aide d'une technique biodosimétrique. Cette approche est couramment utilisée pour calculer la dose délivrée par les réacteurs UV à échelle réelle et permet de mesurer directement la performance d'un procédé de désinfection. L'utilisation des spores de bactéries sporulantes aérobies (BSA) a été suggérée puisque cet indicateur est retrouvé couramment dans les eaux de surface, est résistant à la désinfection, est inactivé de manière linéaire selon la dose et est détectable de façon reproductible. Cependant, les concentrations de spores de BSA sont généralement faibles à l'eau traitée. Leur analyse par filtration membranaire puis culture cellulaire avec les volumes routiniers ne permet pas une estimation précise de leur inactivation.

Ainsi, la première partie de ce projet a consisté à mettre en œuvre une nouvelle méthode de mesure des spores de bactéries sporulantes aérobies dans les eaux naturelles. Cette technique, plus rapide que l'approche traditionnelle, combine la détection de l'activité enzymatique estérase et l'utilisation de la cytométrie de flux en phase solide. Dans ce

cas, la détection d'une cellule est considérée fiable. La méthode retenue requiert l'usage de la ciprofloxacine, antibiotique qui inhibe la division cellulaire. La détection des spores de *Bacillus subtilis* a été optimale pour une concentration de 0,50 µg/L d'antibiotique et au bout de 3 heures d'incubation. Pour cette concentration, l'intensité de fluorescence et l'allongement cellulaire ont augmenté proportionnellement à la durée d'incubation. Par contre, en eau naturelle, la méthode doit être optimisée afin de limiter la présence des particules auto-fluorescentes et prendre en compte la croissance plus lente des spores indigènes.

Dans un deuxième temps, une méthode de concentration de grands volumes d'eau par filtration membranaire frontale a été étudiée afin d'accroître la précision du compte de spores de bactéries sporulantes aérobies. Les résultats ont montré une corrélation entre cette technique et la méthode de détection traditionnelle des spores de BSA et ont validé son utilisation. Des tests ont montré que la qualité de l'eau pouvait avoir une influence sur le compte de spores. Ainsi, pour tout type d'eau, une étude préliminaire de l'impact du volume filtré sur la détection des spores de BSA serait à envisager avant la filtration membranaire frontale de larges volumes d'eau.

Finalement, la méthode de concentration préalablement citée a été utilisée lors des essais biodosimétriques pour la filtration de 10 litres d'eau ozonée. Considérant la technique biodosimétrique, la mesure de la dose a été obtenue précisément suite à l'analyse de l'atténuation des spores. Les spores de BSA indigènes ont suivi une cinétique d'inactivation de Chick-Watson et les validations à échelle réelle ont montré que le CT₁₀ sous-estimait la dose effective alors que le CT-IDDF la surestimaient. La méthode a globalement permis de déterminer l'influence de la qualité de l'eau sur la performance de la désinfection et de mesurer la dose réelle délivrée par le procédé d'ozonation de l'usine DesBaillets. De plus, les résultats ont remis en question le modèle IDDF développé pour cette usine.

La mise en œuvre de modèles de calcul de la dose est nécessaire afin de limiter l'usage d'oxydants et ainsi la formation potentielle de sous-produits de désinfection. Cependant, leurs prédictions sous diverses conditions d'opération doivent être fiables. Ceci peut s'avérer difficile d'autant plus que les concentrations d'ozone résiduel dans les cuves peuvent varier de manière importante, comme cela a été observé pour la cuve de dissolution #5 de l'usine DesBaillets. En ce sens, l'utilisation de la biodosimétrie à l'aide des spores de BSA serait une technique adaptée pour valider les calculs effectués par les modèles.

Malgré les résultats obtenus au cours de ce projet, il s'avère nécessaire de poursuivre les recherches afin d'optimiser l'approche biodosimétrique développée et obtenir des résultats plus rapidement. De plus, la technique biodosimétrique pourrait ne pas être applicable pour des conditions de faible température à cause de la résistance des spores de BSA.

ABSTRACT

The aim of disinfection is to decrease the risk of transmission of waterborne diseases. The disinfection treatment's efficiency is calculated by the dose concept (CT) since it is not possible to measure pathogen inactivation due to their low concentrations in treated water. However, CT calculation based on the regulations appears to be conservative whereas a limitation of disinfection by-products is required. The IDDF model (*Integrated Disinfection Design Framework*), which couples a contactor hydraulic model with a disinfectant decay model, allows for a more precise measure of the dose. Nevertheless, every model has a certain level of uncertainty. The use of a technique to validate IDDF model's predictions under full-scale conditions is hence required.

The general objective of this project is to validate the CT values of the ozone contactors of the DesBaillets water treatment plant (Montreal, QC) by means of a biodosimetric technique. That approach is currently used to calculate the dose delivered by full-scale UV reactors and allows for a direct measure of the disinfection system performance. The use of aerobic spores has been suggested since they are found in high concentrations in surface waters, resistant to disinfection, linearly inactivated and detected by reproducible techniques. Since spores concentrations are generally low in treated water, their analysis by membrane filtration then cellular culture with routine volumes does not give precise data about their inactivation by disinfection.

The first step of this project was to implement a new detection method of aerobic spore-forming bacteria (ASF) in natural waters. This technique, faster than the traditional one, couples esterase activity measurement and solid-phase cytometry. Simple cells' detection is then considered reliable. The optimized technique requires the use of ciprofloxacin, an antibiotic which inhibits cellular division. *Bacillus subtilis* spores' detection was optimal for a 0.50 µg/L antibiotics concentration and for 3 hours of incubation. Fluorescence intensity and cellular elongation increased with the duration of

incubation for this concentration. However, the method has to be improved when studying natural waters in order to limit autofluorescent particles detection and to take into account the slower germination rate of indigenous ASF.

The second step of the project was to study a concentration method of large water samples by dead-end membrane filtration to increase the accuracy of the aerobic spore formers counts. A correlation was determined between this approach and the traditional method, which validated its use. Tests performed also showed that the quality of the water might have an impact on ASF counts. Then, for each type of water, a preliminary study of the influence of the volume filtered on ASF enumeration would be necessary before using dead-end membrane filtration for large volumes of water.

Finally, the concentration technique previously cited was used to filter 10 liters of ozonated water when performing biodosimetric assays. The dose measurement was then obtained by calculation of the spores' inactivation. Indigenous ASF inactivation kinetics was well described by a simple Chick-Watson model. The results also indicated that the CT_{10} underestimates the true dose whereas the CT-IDDF overestimates it. The biodosimetry technique globally allowed to determine the influence of the quality of the water on the efficiency of the disinfection process and to measure the actual dose delivered by the DesBaillets ozonation system. The results made hence question the IDDF model developed for this water treatment plant.

Implementation of effective dose calculation models is required in order to limit the use of oxidant and the potential formation of disinfection by-products. However, the predictions of those models must be reliable under various operation conditions. This may be difficult to achieve given that ozone residuals in contactor's cells can highly vary, as was observed for the dissolution cell of the DesBaillets WTP. In that sense, the use of the biodosimetric approach with indigenous ASF would be an appropriate technique to validate the disinfectant doses calculated by models.

It must be said that additional research is needed to improve the biodosimetic approach developed and obtain faster results. Moreover, this technique might not be usable for water treatment plants treating cold waters because of the high resistance of ASF to disinfection.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	IV
RÉSUMÉ.....	V
ABSTRACT	VIII
TABLE DES MATIÈRES	XI
LISTE DES TABLEAUX.....	XIV
LISTE DES FIGURES	XV
LISTE DES ABRÉVIATIONS	XVI
LISTE DES ANNEXES	XVII
CHAPITRE 1 INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE 2 REVUE BIBLIOGRAPHIQUE.....	4
2.1 Concept du CT et modèles de calcul.....	4
2.1.1 Concept du CT	4
2.1.2 Approche réglementaire	6
2.1.2.1 Le CT disponible : la dose appliquée en station de filtration.....	7
2.1.2.2 Le CT requis : la dose fixée par la réglementation	8
2.1.3 Les lacunes du calcul réglementaire	8
2.1.4 Modèles de calcul de la dose effective.....	10
2.1.4.1 Le modèle IDDF	12
2.1.4.2 Les lacunes du modèle IDDF	14
2.1.4.3 Le modèle CFD	15
2.1.5 Autres approches.....	17
2.1.6 La nécessité d'une mesure directe de la performance.....	18
2.2 La biodosimétrie.....	19
2.2.1 Validation des réacteurs UV par biodosimétrie	19
2.2.2 Procédure de validation.....	20
2.2.3 Limites	22
2.3 Revue des indicateurs.....	24
2.3.1 Caractéristiques nécessaires de l'indicateur.....	24

2.3.2	Revue des marqueurs potentiels.....	25
2.3.2.1	Marqueurs biologiques.....	25
2.3.2.2	Marqueurs biochimiques.....	34
2.3.2.3	Marqueurs physico-chimiques	36
2.3.2.4	Synthèse et choix de l'indicateur	37
CHAPITRE 3	OBJECTIFS DE RECHERCHE	40
CHAPITRE 4	OPTIMISATION DE LA DÉTECTION DES SPORES DE BACTÉRIES SPORULANTES AÉROBIES	43
4.1	Introduction.....	43
4.2	Rapid Enumeration of Aerobic Spore-forming Bacteria in Drinking Water using Solid-phase Cytometry	45
4.2.1	Introduction.....	45
4.2.2	Material and Methods	48
4.2.2.1	Solid-phase Cytometry.....	48
4.2.2.2	Bacterial Strains	49
4.2.2.3	Water Samples	49
4.2.2.4	General Approach	49
4.2.2.5	ASF Enumeration with Chemscan RDI®	50
4.2.2.6	Standard Cultivation Techniques	52
4.2.2.7	Total Cell Counts	52
4.2.3	Results.....	52
4.2.3.1	Optimal Conditions for the Detection of <i>B. subtilis</i> Spores.....	52
4.2.3.2	Method Sensitivity: <i>B. subtilis</i> Spores Spiked in Drinking Water Samples.....	55
4.2.3.3	Method Sensitivity for Direct Enumeration of ASF in Drinking Waters.....	56
4.2.4	Discussion	56
4.2.5	Conclusion	60

CHAPITRE 5 VALIDATION DE LA PERFORMANCE DES PROCÉDÉS DE DÉSINFECTION PAR BIODOSIMÉTRIE.....	72
5.1 Introduction	72
5.2 Mise en œuvre de la technique de concentration	74
5.2.1 Concentration avec des Swinnex	74
5.2.2 Étude de l'impact du volume filtré	75
5.2.3 Concentration avec un filtreur.....	76
5.3 Validation of full-scale ozone contactor performance using biodosimetry	79
5.3.1 Introduction.....	80
5.3.2 Objectives.....	81
5.3.3 Material and Methods	82
5.3.3.1 Development of a Biodosimetric Reference Curve	82
5.3.3.2 Validation of the Full-Scale CT values.....	85
5.3.4 Results	88
5.3.4.1 Comparison of the Biodosimetric Curves	88
5.3.4.2 Validation of the CT Values	88
5.3.4.3 Variations of Ozone Residual in the Contactor's Cells	89
5.3.5 Discussion	90
5.3.5.1 Impacts of WQ on Biodosimetric Ccurves	90
5.3.5.2 Precision of the Biodosimetric Curves.....	92
5.3.5.3 Effective Dose Calculations.....	93
5.3.5.4 The Future of the Biodosimetric Approach	95
5.3.6 Conclusion	96
CHAPITRE 6 SYNTHÈSE	112
6.1 Analyse des spores de BSA par cytométrie de flux en phase solide.....	115
6.2 Amélioration de la méthode biodosimétrique	119
CHAPITRE 7 CONCLUSION.....	123
REFERENCES.....	125
ANNEXES.....	150

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 2.1 : Différences entre les modèles CFD et IDDF (Tiré de Greene <i>et al.</i> 2004).	16
Tableau 4.1 : Influence of water quality on the detection of <i>B. subtilis</i> spores spiked in drinking water and detected by solid phase cytometry	64
Tableau 4.2 : Detection of indigenous spores in drinking water by solid phase cytometry	65
Tableau 5.1 : Protocole expérimental	75
Table 5.2 : Water Quality Data	98
Table 5.3 : Summary of Full-Scale Experimental Procedure	99

LISTE DES FIGURES

Figure 2-1 : Protocole de validation des réacteurs UV	22
Figure 4-1 : a) Enzymatic activities of <i>B. subtilis</i> spores, evaluated by fluorescence intensity. b) Elongation of <i>B. subtilis</i> spores. Black lines represent values for the control sample - no antibiotics, with pasteurization, but without incubation. c) Counts of <i>B. subtilis</i> spores by the Chemscan RDI®. All error bars indicate the standard deviation from duplicate samples. d) Fluorescence ratio (MPI) by elongation (MNS) of samples (S) compared to the same ratio for the control sample (CS).....	64
Figure 5-1 : Boîtes de Pétri obtenues par filtration sous pression avec <i>Swinnex</i>	74
Figure 5-2 : Comparaison des comptes de spores de BSA par méthode de filtration sous vide (47 mm) et sous pression (filtre - 142 mm) – 14-07-05.....	77
Figure 5-3 : Schematic of the Pilot Apparatus used to Create Reference Curves.....	100
Figure 5-4 : Schematic of the Full-Scale Ozone Contactor at the DesBaillets Water Treatment Plant used to Validate the Effective Dose	100
Figure 5-5 : Biodosimetric Reference Curves obtained on the Pilot Ozone Contactor...	101
Figure 5-6 : Summary of the Four Biodosimetric Reference Curves obtained on the Pilot Ozone Contactor (assay 1: 08/09/05, assay 2: 20/09/05, assay 3: 03/10/05, assay 4: 17/10/05).....	102
Figure 5-7 : Comparisons of CT Calculations Methods with Measured Biodosimetric CT Values. (a) Biodosimetric CT vs CT ₁₀ , (b) Biodosimetric CT vs CT-IDDF, (c) CT-IDDF vs CT ₁₀ . Four assays were completed over a 6 weeks period (data outside the biodosimetric curve range are circled; data regarding the test c of the fourth assay are bordered).	103
Figure 5-8 : Ozone residual in cell A of the contactor. The mean concentration was calculated for the 5 samplings points (cf Fig. 2). G/L ratio range was 0.06 - 0.17.....	104
Figure 6-1 : Clivage du substrat fluorogène par les estérases.....	116

LISTE DES ABRÉVIATIONS

- AHA: Acides haloacétiques
- APHA: American Public Health Association
- AWWA: American Water Works Association
- AWWARF: American Water Works Association Research Foundation
- BSA : Bactéries Sporulantes Aérobies (ASF)
- CFD: Computational Fluid Dynamics (Mécanique des fluides numérique)
- CM: Écoulement complètement mélangé
- CSTR: Completely Stirred Tank Reactors (Réacteurs en série complètement mélangés)
- DBP: Disinfectants & Disinfection By-Products
- IDDF: Integrated Disinfection Design Framework
- IESWTR: Interim Enhanced Surface Water Treatment Rule
- MDDEP : Ministère du Développement Durable, de l'Environnement et des Parcs
- PF: Plug Flow (Écoulement piston)
- PFD: Plug Flow with Dispersion (Écoulement piston avec dispersion)
- RTD: Retention Time Distribution (Distribution des temps de séjour)
- SPD: Sous-produits de disinfection
- SSRC: Spores of Sulphito-Reductrice Bacteria
- SWTR: Surface Water Treatment Rule
- THM: Trihalométhanes
- USEPA: United States Environmental Protection Agency
- UV: Ultraviolet

LISTE DES ANNEXES

ANNEXE A: Informations concernant les traceurs étudiés.....	151
ANNEXE B : Valeurs de CT pour l'inactivation des spores de BSA lors de la désinfection au chlore, au dioxyde de chlore et à l'ozone	155
ANNEXE C : Essais de concentration des spores de BSA par filtration sur Swinnex..	157
ANNEXE D : Étude de l'impact du volume filtré sur le compte de spores de BSA.....	158
ANNEXE E : Résultats des essais biodosimétriques.....	159

CHAPITRE 1 INTRODUCTION

La réglementation exige que les stations de traitement utilisées à des fins de production d'eau potable fournissent des barrières efficaces en vue d'éliminer ou inactiver les microorganismes pathogènes. Parmi les procédés employés par les stations de filtration, la désinfection constitue une étape primordiale et a pour objectif de limiter la transmission de maladies d'origine hydrique. Elle correspond à l'inactivation des microorganismes ou à la réduction de leur viabilité suite à l'exposition à une concentration de désinfectant (C) durant un temps de contact donné (T). La dose de désinfectant (CT) est en effet le paramètre essentiel permettant d'évaluer l'efficacité de la désinfection car il évalue la résistance des microorganismes à un oxydant.

La conception des procédés d'oxydation est basée sur les résultats d'expériences ayant utilisé des parasites dopés en eau ultra-pure et selon des conditions opératoires définies. Cependant, l'hydrodynamique des bassins de contact, le transfert gaz-liquide de l'oxydant et sa décroissance dans les contacteurs, ainsi que les cinétiques d'inactivation, différentes en eau naturelle, peuvent difficilement être extrapolés d'études de laboratoire à une utilisation directe en station. D'autre part, la performance de la désinfection est typiquement mesurée par un calcul réglementaire, défini comme étant le produit de la concentration résiduelle en désinfectant par le temps de contact T_{10} (temps requis pour récupérer 10% de la masse d'un traceur injecté en entrée du bassin de contact). Ce calcul de CT à échelle réelle est volontairement conservateur afin de s'assurer du respect en tout temps des exigences de désinfection. Cela signifie que pour une même inactivation, la dose fournie est supérieure à celle réellement requise.

Or, l'utilisation d'oxydants peut conduire à la formation de sous-produits de désinfection indésirables, nocifs pour la santé humaine. Puisque le rôle du désinfectant est d'éliminer les microorganismes pathogènes tout en minimisant la formation de sous-produits

d'oxydation, il s'avère nécessaire de mesurer précisément la dose réelle délivrée par tout procédé de désinfection.

Le modèle IDDF (*Integrated Disinfection Design Framework*), qui combine la cinétique de consommation du désinfectant et la caractérisation hydraulique des bassins de contact, a été introduit en Amérique du Nord à la fin des années 1990. Les gains de performance prédicts par ce modèle (de 200 à 300%) sont importants mais ils nécessitent d'être validés par des mesures directes de doses à l'échelle réelle. La vérification par les (oo)cystes est impossible car leurs concentrations dans les eaux traitées sont faibles et les méthodes d'analyse employées pour leur détection sont peu fiables à l'heure actuelle.

Ce projet a ainsi pour objectif de développer une technique biodosimétrique afin de mesurer directement la performance du procédé d'ozonation de l'usine DesBaillets (Montréal, Qc). La biodosimétrie est couramment utilisée dans le domaine de la désinfection UV afin de valider la dose fournie par les réacteurs UV à échelle réelle. Pour cela, l'utilisation des spores de bactéries sporulantes aérobies est envisagée notamment du fait de leur résistance à l'ozonation et de leur méthode d'analyse simple et peu coûteuse. Cet organisme permettra la mesure de la capacité d'inactivation des contacteurs d'ozone et ses variations sous des conditions réelles d'expérience. La dose mesurée par cette méthode sera comparée aux modèles actuels de calcul de la performance tels que le CT_{10} ou le CT_{IDDF} afin de valider ou d'infirmer leurs prédictions.

Le mémoire se présente sous forme de 7 chapitres. Après une revue des connaissances dans le domaine de la désinfection au chapitre 2, les trois objectifs de recherche sont explicités au chapitre 3 afin de développer ultimement la technique biodosimétrique. En vue d'obtenir des résultats rapidement, le chapitre 4 propose une optimisation de la méthode de détection des spores de BSA par cytométrie de flux en phase solide.

Le chapitre 5 présente les données obtenues lors des essais biodosimétriques à l'usine DesBaillets à l'aide d'une méthode de concentration des indicateurs biologiques proposés. Finalement, le chapitre 6 discute les résultats principaux et critique les deux approches étudiées durant ce projet. Les conclusions principales sont rappelées au chapitre 7.

CHAPITRE 2 REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

2.1 CONCEPT DU CT ET MODÈLES DE CALCUL

2.1.1 Concept du CT

Le but premier du traitement de l'eau potable est la réduction du risque de maladies hydriques liées à la présence d'organismes pathogènes. L'efficacité d'élimination est évaluée par une approche « multi-barrières », dont la désinfection peut constituer l'étape finale. Plusieurs microorganismes peuvent contaminer les eaux d'alimentation. Ainsi des organismes cibles ont été identifiés afin de fixer les objectifs, soit les virus entériques, les kystes de *Giardia* et les oocystes de *Cryptosporidium*. Ces organismes sont très résistants aux traitements (Cohn *et al.* 1999), sont détectés couramment dans les eaux de surface et sont à l'origine d'épidémies confirmées. *Cryptosporidium* a ainsi entraîné en 1993 l'épidémie de Milwaukee (Wisconsin, États-Unis), contaminant plus de 400 000 personnes (Mac Kenzie *et al.* 1994). La distribution géographique de ce protozoaire et sa capacité à causer des infections à de très faibles doses favorisent les possibilités de transmission par voie hydrique (Carey *et al.* 2004).

Pour une eau de surface ou une eau souterraine sous influence d'une eau de surface, la réglementation québécoise impose une réduction minimale de 2 log de *Cryptosporidium*, 3 log de *Giardia* et 4 log de virus, en accord avec l'approche de l'USEPA basée sur une limitation du risque annuel microbiologique de cas infectieux à 10^{-4} (Finch *et al.* 2001). Le respect de ces objectifs de réduction, indexés au Québec sur la concentration en coliformes fécaux, assure l'enlèvement des microorganismes moins résistants. Cependant, les pathogènes visés apparaissent généralement à de faibles concentrations dans les eaux traitées (Nieminski, 1999; Hijnen *et al.* 2000b). Leur quantification est complexe, prend un temps considérable, produit des résultats variables (Nieminski *et al.* 2000) et les méthodes de détection disponibles sont laborieuses et coûteuses (Emelko, 2001 et 2003). Un faible taux de récupération des parasites est observé et la

détermination du caractère infectieux est difficile (Carey *et al.* 2004). Les mêmes considérations peuvent être énoncées lorsqu'il s'agit de la détection des virus (Leclerc *et al.* 2000). La mesure directe de la performance des procédés de traitements de l'eau potable est donc impossible avec les méthodes actuelles (Hijnen *et al.* 2004).

Plusieurs pays ont ainsi adopté le concept de microorganismes indicateurs pour mesurer l'efficacité des chaînes de traitement (European Union, 1998). En effet, il a été démontré à la fin du 19^{ème} siècle que la majorité des maladies d'origine hydrique était due à des organismes infectieux présents dans l'environnement aquatique par l'intermédiaire des souillures fécales animales ou humaines (Haslay et Leclerc, 1993). Des indicateurs bactériens d'origine fécale tels que les coliformes fécaux et *Escherichia coli*, introduits afin de mettre en évidence ces contaminations, constituent la base de l'analyse bactériologique de l'eau. Cependant, 80% des cas de maladies d'origine hydrique relevés statistiquement aux États-Unis au cours des cinquante dernières années sont associés à des virus ou à des protozoaires à cause de leur résistance plus élevée vis-à-vis des agents de désinfection (Haslay et Leclerc, 1993), montrant que les grandes épidémies du passé d'origine bactérienne avaient pratiquement disparu. Des épidémies de cryptosporidiose, de giardiase et d'autres maladies entériques pour des eaux rencontrant les standards de coliformes ont été rapportées dans certains pays développés (Craun *et al.* 1997) et 71% des épidémies d'origine hydrique en 1993 et 1994 aux Etats-Unis ont été attribués à *Cryptosporidium parvum* et *Giardia lamblia* (Gostin *et al.* 2000).

L'utilisation d'indicateurs pour la mesure de la performance de la désinfection n'est donc pertinente que lorsque l'inactivation du pathogène ciblé est au moins aussi forte que celle de l'indicateur choisi (Von Gunten, 2003a). L'utilité des bactéries coliformes indicatrices a ainsi été remise en question du fait de leur résistance plus faible que les pathogènes qu'elles étaient censées représenter. Pour surmonter cette difficulté, l'estimation de la performance est basée sur une approche « orientée procédé » afin de s'assurer de respecter les objectifs de traitement. Ainsi, dans le cas des procédés

physico-chimiques, des crédits d'enlèvement physique sont alloués selon la turbidité à l'eau filtrée et le type de procédé employé. Dans le cas de la désinfection, l'évaluation de la performance est basée sur l'utilisation du concept du CT.

L'approche CT consiste à estimer l'exposition d'un microorganisme dans un bassin de contact voué à la désinfection. Le CT représente la dose en désinfectant, soit le produit de la concentration résiduelle de désinfectant dans l'eau C, par le temps de contact T. En effet, il a été montré pour plusieurs microorganismes que la décroissance de la viabilité était proportionnelle au produit C^nT , selon la loi de Chick-Watson (Haas, 1999).

$$\log \frac{N}{N_0} = -kC^n t \quad (1)$$

N_0 représente le nombre de microorganismes à l'instant $t = 0$, N le nombre de microorganismes à l'instant t , k la constante de réaction de désinfection, C la concentration du désinfectant, t le temps de contact et n le coefficient de dilution, qui représente le nombre moyen de molécules de désinfectant nécessaires qui doivent être combinées avec l'organisme cible pour entraîner l'inactivation (Haas et Finch, 2001). Dans le cas de l'ozone, n est souvent égal à 1 (Hunt et Marinas, 1997; Driedger *et al.* 2001) et ainsi l'inactivation des microorganismes correspond à une réaction du premier ordre. Finalement, dans des conditions données (pH, température...), une valeur de CT implique une inactivation fixe.

2.1.2 Approche réglementaire

Le concept du CT est adopté par de nombreuses stations pour démontrer l'efficacité de désinfection obtenue dans les contacteurs (USEPA, 1991). La loi de Chick-Watson est utilisée pour modéliser l'inactivation des parasites et des virus et le log d'inactivation réglementaire est le rapport de la dose fournie ($CT_{disponible}$) par celle requise par la réglementation (CT_{requis}), définie selon le pH, la température de l'eau, les microorganismes cibles et le type de désinfectant. Le log d'inactivation d'une usine pour ce traitement est alors (MDDEP, 2002):

$$\text{Log d'inactivation} = \frac{CT_{\text{disponible}}}{CT_{\text{requis}}} \quad (2)$$

2.1.2.1 Le CT disponible : la dose appliquée en station de filtration

La dose délivrée par le traitement (dose disponible) doit être supérieure à celle requise par la réglementation. Elle est définie comme étant le produit de la concentration résiduelle de désinfectant en fin de traitement C_{res} , par le temps de contact T_{10} qui est le temps requis pour récupérer 10% de la masse de traceur injecté à l'entrée du bassin de contact. Le choix du T_{10} assure que 90% de l'eau a séjourné avec le désinfectant pendant un temps au moins égal à T_{10} . Par exemple, dans le cas de la chloration finale, la dose disponible est la suivante (MDDEP, 2002) :

$$CT_{\text{disponible}} = C_{\text{res}} \times \frac{T_{10}}{T} \times \frac{V_{\text{utile}}}{\text{Débit maximum horaire}} \quad (3)$$

Pour une ozonation avec injection par mélangeur statique, le débit considéré serait le débit maximum journalier. Enfin, dans le cas d'une injection d'ozone par l'utilisation de diffuseurs poreux, le calcul de la dose disponible prend en considération la présence de cuves de dissolution (transfert d'ozone) et de cuves de réaction (consommation d'ozone). La division initiale de la concentration résiduelle par un facteur de 2 évite de surestimer la performance du procédé et prend en compte la demande instantanée (MDDEP, 2002).

$$CT_{\text{disponible}} = \frac{C_{\text{res}}}{2} \times \frac{T_{10}}{T} \times \frac{\text{Volume cuve}}{\text{Débit cuve}} + \sum C_{\text{res}} \times \frac{T_{10}}{T} \times \frac{\text{Volume cuve}}{\text{Débit cuve}} \quad (4)$$

La méthode assure un contrôle préventif en mesurant la concentration résiduelle de désinfectant, ce qui permet de surveiller le procédé mais peut être aussi considéré comme une estimation prévisionnelle du risque (Haslay et Leclerc, 1993). Elle contourne l'impossibilité de mesurer directement l'efficacité des procédés de désinfection.

2.1.2.2 *Le CT requis : la dose fixée par la réglementation*

Le CT_{requis} pour une inactivation donnée est fixé par la réglementation. Connaissant les objectifs de traitement, la qualité microbiologique de l'eau brute et l'enlèvement réalisé par les procédés physico-chimiques, il est possible de déterminer la dose requise pour obtenir une certaine inactivation par le procédé de désinfection. Typiquement, l'estimation de la désinfection est basée sur des valeurs tabulées et publiées pour un désinfectant et un micro-organisme spécifiques.

2.1.3 **Les lacunes du calcul réglementaire**

Cette vérification théorique et indirecte de la performance des procédés d'inactivation chimique, par l'intermédiaire du concept du CT, possède des défauts et les limites de cette méthode ont été discutées (Teefy et Singer, 1990; Haas *et al.* 1995; Barbeau, 1996; Finch *et al.* 2001; Ducoste *et al.* 2001; Von Gunten, 2003b; Rakness *et al.* 2005). Tout d'abord, la prise en compte de la concentration résiduelle du désinfectant ignore sa cinétique de décroissance durant son trajet dans le réservoir de contact. La concentration utilisée pour le calcul de la dose est égale à la concentration minimale d'oxydant dans le bassin. Cette approche sous-estime la dose effective appliquée, la dose réelle étant l'intégration de la concentration de désinfectant pour une période donnée (Haas *et al.* 1995). De plus, bien que l'emploi du T_{10} soit préférable à celui du temps de séjour théorique en raison de la présence de courts-circuits, il inclut un facteur de sécurité conservateur (Teefy et Singer, 1990). Le T_{10} représenterait entre 15 et 60% du temps de résidence théorique (Barbeau, 1996). Ainsi, le produit $C_{\text{res}} \times T_{10}$ qui correspond à une approche conservatrice, appliquée pour des raisons de commodité, est équivalent à la dose minimale de désinfectant reçue par les microorganismes.

Par ailleurs, les tables de CT du manuel de l'USEPA (1989) sont basées sur des suppositions simplificatrices puisqu'elles sont construites à partir de résultats d'expériences de laboratoire en eaux ultra-pures et selon des conditions opératoires

définies. Par exemple, les valeurs de CT pour inactiver *Giardia* ont été mesurées à 5°C puis ajoutées d'un facteur de sécurité de 2, et les données pour les autres températures ont été déterminées selon la loi de Van't Hoff (Hibler *et al.* 1987; Leahy *et al.* 1987; Wickramanayake *et al.* 1984; Oppenheimer *et al.* 2000a). Ces valeurs de CT sont largement utilisées pour la conception des systèmes de désinfection pour le contrôle de *Giardia* (Finch *et al.* 2001). Or, les cinétiques de désinfection diffèrent dans une eau naturelle dont les caractéristiques locales peuvent avoir une influence sur l'efficacité de la désinfection (Haas *et al.* 1996). Oppenheimer *et al.* (2000b) ont montré que pour une augmentation de la température de 10°C, la constante de réaction de désinfection de *Cryptosporidium* par l'ozone croît d'environ 5 fois alors qu'un facteur 2 est supposé par l'USEPA pour l'inactivation de *Giardia* par l'ozone.

Une simple relation d'inactivation de Chick-Watson pour l'inactivation microbienne est également supposée avec un coefficient de dilution égal à 1. Or, ce modèle et des études de laboratoire ne peuvent décrire les cinétiques d'inactivation comprenant des phases d'« épaules » et de « traînées » (« tailing-off »). Les microorganismes sont des structures complexes. Diverses réactions chimiques et plusieurs mécanismes de transport sont présents lors de l'inactivation d'un organisme. Des modèles cinétiques plus précis incluant la décroissance du désinfectant peuvent être utilisés (Haas et Joffe, 1994; Gyürék et Finch, 1998). Ces modèles dépendent d'un type d'eau en particulier, du désinfectant et de l'organisme d'intérêt (Haas *et al.* 1996). Les données de CT tabulées ne sont finalement valables que pour des réacteurs « batch » car dans le cas de contacteurs réels, on observe une distribution des temps de séjour, soit un comportement hydrodynamique non idéal du système de désinfection qui n'est pas pris en compte par la dose réglementaire. Aussi, le transfert du désinfectant et sa décroissance ne peuvent être extrapolés d'études de laboratoire à une utilisation directe en station (Hijnen *et al.* 2002). Ces points engendrent des divergences entre l'efficacité de désinfection réelle et celle d'un système idéal.

Du fait de ces facteurs conservateurs, il est admis que la dose réelle appliquée par les procédés de désinfection est sous-estimée lorsque le CT réglementaire est utilisé pour la conception. Pour une même inactivation, le règlement impose une valeur de CT supérieure à celle réellement nécessaire. Or, un des inconvénients de l'utilisation d'oxydants est la formation de sous-produits de désinfection (SPD) indésirables et représentant un risque pour la santé. Bien que le risque microbiologique soit prépondérant par rapport au risque sanitaire lié à l'ingestion des sous-produits (Havelaar *et al.* 2000), ce problème a gagné de l'importance depuis la reconnaissance de la résistance des oocystes de *Cryptosporidium* vis-à-vis de la désinfection (von Gunten, 2003a; Rennecker *et al.* 1999). L'inactivation nécessite des doses de désinfectant plus importantes, induisant la formation accrue de SPD.

La conception et l'opération des contacteurs doivent atteindre des niveaux d'inactivation adéquats des pathogènes tout en contrôlant la présence des sous-produits à l'eau traitée (El Baz, 2002). La formation de bromates (BrO_3^-) est d'un intérêt particulier lorsque l'ozone est utilisé comme désinfectant et la réglementation aux États-Unis (USEPA, 1998) et au Québec impose un niveau de concentration maximale de 10 µg/L (RQEP, 2004). Sachant que l'utilisation du CT₁₀ peut se traduire par une application d'oxydant excessive et une augmentation des coûts, il est nécessaire de mesurer plus précisément la dose réelle délivrée par les stations de traitement. À ce jour, diverses approches ont été envisagées afin de déterminer la dose effective appliquée dans un bassin de contact.

2.1.4 Modèles de calcul de la dose effective

Les modèles tentent de déterminer la performance réelle du procédé de désinfection en proposant une approche dynamique. Celle-ci couple la cinétique de décroissance du désinfectant et l'hydraulique des réacteurs.

Une méthode de calcul du CT effectif a tout d'abord été proposée par Teefy et Singer (1990). Pour chaque intervalle de temps, l'aire sous la courbe de distribution des temps de séjour est combinée à la dose en désinfectant. Par sommation, le CT_{effectif} est calculé :

$$CT_{\text{effectif}} = \sum_i (C_0 \exp^{-kt_i} \times t_i) \times (RTD(t_i) \times \Delta t_i) \quad (5)$$

$C_0 \exp^{-kt_i}$ représente la concentration résiduelle de désinfectant au temps t_i (C_0 en est la concentration initiale, k la constante de décroissance). La dose en désinfectant est obtenue, au temps t_i , en multipliant la concentration résiduelle par t_i . Dans l'expression précédente, il est noté que la concentration retenue n'est pas l'intégrale de la courbe de décroissance. La « RTD » est la courbe de distribution des temps de séjour. Δt_i représente un intervalle de temps et le produit $RTD(t_i) \times \Delta t_i$ est l'aire située sous la courbe de distribution des temps de séjour entre t_i et $t_i + \Delta t_i$. Pour tous les cas étudiés par cette méthode de calcul, le CT effectif est significativement supérieur au CT₁₀ (jusqu'à 6 fois).

Pour décrire un système à échelle réelle et sa capacité d'oxydation, von Gunten *et al.* (1999) ont lié par simulation numérique les cinétiques de réaction obtenues en laboratoire avec les caractéristiques hydrauliques d'un réacteur particulier. Les mesures de profils de concentration d'ozone, calculées par le modèle, sont fortement corrélées à celles sur le terrain. Le modèle prend en compte la contribution des radicaux OH· en introduisant une sonde dont la constante de réaction avec l'ozone a été préalablement déterminée. D'autre part, en combinant la courbe de décroissance du désinfectant avec la cinétique d'inactivation des microorganismes, puis avec la courbe de distribution des temps de séjour, Haas *et al.* (1995) ont montré que les valeurs de CT obtenues pour une même inactivation de *Giardia* sont inférieures à celles requises par les tables de l'USEPA.

Une technique de contrôle de la distribution du désinfectant et de la caractérisation hydraulique du système de traitement, le modèle IDDF (*Integrated Disinfection Design Framework*), a été introduite récemment (Bellamy *et al.* 1998). Cependant, l'approche préliminaire adoptée est valide uniquement si l'hydraulique des bassins de contact peut être décrite par un modèle d'écoulement piston avec dispersion (PFD). Or, pour un ratio T_{10}/T inférieur à 0,5, ce qui est courant, la modélisation PFD peut ne pas être suffisamment précise (Ducoste *et al.* 2001). La méthode a été généralisée pour notamment l'adapter à d'autres approches hydrauliques telles que le modèle N-CSTR (*Completely Stirred Tank Reactor*) (Carlson *et al.* 2001).

2.1.4.1 Le modèle IDDF

La particularité de ce modèle est l'utilisation de la distribution des temps de séjour de manière globale pour calculer l'inactivation, au contraire du CT₁₀ qui ne choisit qu'un temps de séjour spécifique. Il prend en compte les caractéristiques de l'oxydant (chimie et cinétique de décroissance), du réacteur (hydraulique des cuves de contact) et le comportement des microorganismes (cinétique d'inactivation), soit les conditions chimiques, physiques et biologiques retrouvées lors de la désinfection.

Trois approches représentant trois niveaux de complexité peuvent être utilisées (Carlson *et al.* 2001; Finch *et al.* 2001) :

- le niveau de base : ce module est similaire aux valeurs de CT publiées par la SWTR pour diverses données de demande en oxydant, de température et de pH. Les données nécessaires au calcul de l'inactivation sont généralement tirées de la littérature, ce qui évite des tests de terrain. Cependant, la détermination du T₁₀/T et la demande en désinfectant peuvent s'avérer utiles.
- le niveau standard : celui-ci inclut des tests spécifiques au site d'intérêt, soit des études de demande et de décroissance (une dose) ainsi qu'une caractérisation de l'hydraulique

des réacteurs. Des tests d'inactivation doivent confirmer la validité des paramètres k (taux d'inactivation), k_d (taux de décroissance du désinfectant), m et n (constantes d'inactivation) tirés de la littérature. En effet, le modèle de Hom modifié (Gyurek et Finch, 1998) est le modèle d'inactivation utilisé par l'IDDF.

$$\log \frac{N}{N_o} = -kmC_0^n \int_0^T \exp(-k_d t n) t^{m-1} dt \quad (6)$$

Avec t le temps de contact, N_o le nombre de microorganismes à l'instant $t = 0$, N le nombre de microorganismes à l'instant t , C_0 la concentration initiale de désinfectant et m , n , k et k_d qui sont des constantes empiriques.

- le niveau avancé : ce module est considéré pour une conception spécifique au type d'eau à traiter. La décroissance et la demande en oxydant sont prises en compte dans un modèle de réduction microbienne calibré pour l'eau à traiter, et l'organisme cible est utilisé pour développer le modèle cinétique d'inactivation. La distribution des temps de séjour est ensuite combinée aux caractéristiques chimiques du désinfectant, ce qui permet l'obtention d'un modèle cinétique qui prédit l'inactivation de l'organisme cible sous différentes conditions de débits et de qualité d'eau. Ce niveau de module nécessite l'utilisation de la CFD (*Computational Fluid Dynamics*), détaillée ultérieurement.

Afin de vérifier l'applicabilité et la précision de cet outil, quatre études de cas ont été réalisées pour lesquelles l'inactivation calculée à l'aide du modèle IDDF est supérieure à celle calculée par la méthode réglementaire (Carlson *et al.* 2001). Par exemple, l'utilisation de l'IDDF à la station Kuiper (Aurora, Colorado) lors de la désinfection au dioxyde de chlore indique que le modèle prédit une dose de 0,95 mg/L pour une inactivation de 3 log de virus alors qu'une dose de 1,4 mg/L serait requise en application de la IESWTR (USEPA, 2001c). Des résultats identiques montrent que la dose en désinfectant peut être réduite de 35% et tout de même rencontrer les exigences de l'USEPA pour l'inactivation de *Giardia*, suggérant une baisse des coûts de désinfection (Ducoste *et al.* 2001). Cette réduction de la dose s'accompagne d'une diminution de la

concentration en THM et AHA. La méthode IDDF a également été appliquée à l'usine Charles DesBaillets (Montréal, Québec) afin de comparer la dose réglementaire et la dose effective (El Baz, 2002). Les modèles décrivant les concentrations résiduelles d'ozone et le comportement hydraulique ont été combinés et les conditions d'opération moyennes d'hiver et d'été ont été utilisées pour déterminer les valeurs de CT. Le modèle permet d'obtenir un calcul plus précis de la dose effective de désinfectant et montre un gain de 150% de la performance par rapport au CT réglementaire.

2.1.4.2 *Les lacunes du modèle IDDF*

Bien que le modèle IDDF estime plus précisément la dose de désinfectant, permettant de limiter les coûts d'application et la formation de SPD, des critiques vis-à-vis de sa validité ont été formulées. Le modèle IDDF estime l'efficacité de la désinfection d'un réacteur non idéal d'après une convolution de cinétiques d'inactivation en « batch » et de la courbe de DTS obtenue à échelle réelle. Or, cette approche ignore les caractéristiques hydrodynamiques qui affectent l'efficacité du procédé de désinfection en considérant le réacteur comme une boîte noire (Greene *et al.* 2004). L'IDDF suppose que les particules de fluide dans le bassin de contact sont complètement séparées, ce qui peut sous-estimer ou surestimer l'inactivation microbienne selon l'ordre de la cinétique d'inactivation. La ségrégation réfère au concept selon lequel le mélange d'un fluide se fait au niveau microscopique ou macroscopique. Puisque dans un bassin de chloration, le fluide a un degré de séparation très inférieur à 1, une ségrégation du fluide est peu probable (Greene *et al.* 2004). Or, le degré de séparation peut affecter l'efficacité de la réaction de désinfection (Levenspiel, 1999). De plus, l'IDDF est basé sur une courbe de DTS, sachant que des réacteurs différents peuvent engendrer des courbes de distribution similaires (Greene *et al.* 2004; Levenspiel, 1999). Enfin, les effets de mélange sont aussi requis pour décrire le degré d'inactivation dans le réacteur. En raison des points précédents, une modélisation de 3^{ème} type s'impose désormais, la CFD (*Computational Fluid Dynamics*).

2.1.4.3 *Le modèle CFD*

La modélisation CFD permet la résolution des équations gouvernant le débit de fluide dans le temps et l'espace (continuité, moment, turbulence). Plusieurs étapes sont à mettre en œuvre lors du développement de ce type de modèle (Ducoste *et al.* 2001). Une description numérique de la géométrie du procédé est d'abord effectuée en représentant chaque espace du réacteur par des volumes de contrôle, les mailles devant être suffisamment précises afin de prédire des solutions indépendantes pour chaque volume. Un modèle de turbulence est sélectionné et les paramètres du fluide (vitesse, turbulence) sont déterminés et quantifiés puis utilisés comme conditions initiales pour résoudre les équations de diffusion. Le modèle est ensuite mis en œuvre jusqu'à ce que la limite de convergence de la vitesse soit atteinte. Un contrôle de qualité est finalement exécuté pour comparer le temps de séjour numérique et théorique, faire un bilan de masse et vérifier que les solutions ne changent pas de manière significative selon le volume de contrôle et le temps.

La CFD considère les phénomènes de transport de manière tridimensionnelle (3D) et ne fait pas l'hypothèse d'absence de micromixing (mélange au niveau microscopique) dans le réacteur. L'hydraulique des bassins est modélisée par les équations de Navier-Stokes et les concentrations de désinfectant et de microorganismes sont prédites par un champ 3D par résolution des équations de transport. Le tableau 2.1 résume les différences entre les modèles CFD et IDDF.

Dans le cas du chlore, les premiers modèles CFD se sont concentrés sur l'hydraulique des bassins et la courbe de DTS (Hannoun *et al.* 1998; Crozes *et al.* 1999). Greene *et al.* (2004) ont développé un modèle plus complet en considérant le transport de masse, la décroissance du chlore et l'inactivation microbienne. L'objectif de l'étude était d'évaluer l'inactivation en comparant les résultats de la CFD à l'approche IDDF et aux mesures expérimentales réalisées auparavant par Haas *et al.* (1995). De manière générale, les prédictions du modèle CFD sont plus proches des données expérimentales que les

prédictions du modèle IDDF. La modélisation de l'inactivation microbienne a aussi été estimée pour des systèmes UV (Chiu *et al.* 1999; Lyn *et al.* 1999) et pour des bassins d'ozonation (Do-Quang *et al.* 2001; Zhang *et al.* 2005). À Mannheim (Ontario), dont la désinfection primaire est réalisée par ozonation, les valeurs de CT_{CFD} sont 2,3 à 2,5 fois supérieures aux CT_{10} (Zhang *et al.* 2005).

Tableau 2.1 : Différences entre les modèles CFD et IDDF (Tiré de Greene *et al.* 2004)

Composante du modèle	Modèle IDDF	Modèle CFD
Hydraulique	Effets hydrauliques décrits partiellement par les courbes de traçage	Composants hydrauliques modélisés directement par la résolution des équations de Navier-Stokes
Transport de masse et mélange du fluide	Utilise des courbes de traçage pour caractériser la distribution des temps de séjour du désinfectant et des microorganismes dans le réacteur, supposé contenir un « macrofluide » (fluide séparé)	Transport du désinfectant et des microorganismes caractérisé par résolution des équations de transport advection/diffusion à travers un domaine 3D; structure du débit comprenant les effets de mélange; pas de supposition sur l'état de mélange du réacteur
Décroissance du désinfectant	Concentration prédite par intégration de la courbe de traçage et l'expression cinétique de la décroissance	Concentration prédite par un champ 3D par résolution des équations de transport advection/diffusion et un terme pour la décroissance
Inactivation microbienne	Concentration microbienne prédite par intégration de la courbe de traçage et l'expression cinétique de l'inactivation	Concentration microbienne prédite par un champ 3D par résolution des équations de transport advection/diffusion et un terme pour l'inactivation

2.1.5 Autres approches

Une alternative aux modèles CFD et IDDF est l'utilisation des réseaux de neurones pour décrire les données d'inactivation. En utilisant des valeurs antérieures sur l'inactivation de *Giardia* par le chlore, l'utilisation d'un réseau de neurones a permis une meilleure corrélation vis-à-vis des données de désinfection qu'une modélisation par l'approche conventionnelle (Haas, 2004). Cette approche semble permettre la description précise et quantitative de la désinfection mais elle nécessite de nombreuses recherches liées à son utilisation pour la description de systèmes réels. De plus, l'impact de l'hydraulique n'a pas été encore testé par ce modèle.

Par ailleurs, étant donné l'importance de la qualité de l'eau sur l'efficacité de la désinfection, Oppenheimer *et al.* (2000b) ont développé une approche de conception des systèmes d'ozonation pour l'inactivation des oocystes de *Cryptosporidium* en eau naturelle. Une table préliminaire de CT a ainsi été proposée pour des eaux de faible concentration en COT et de faible turbidité, respectivement 1,5 mg/L et 1,6 UTN en moyenne. Une généralisation de cette méthode a permis de générer des modèles cinétiques pouvant être utilisés de manière spécifique et intégrés à un modèle pour prédire l'efficacité de désinfection (Finch *et al.* 2001).

Enfin, Rakness *et al.* (2005) ont discuté de 4 méthodes estimant différemment la dose d'ozone selon le degré de caractérisation des contacteurs. Les auteurs insistent sur la nécessité de développer des techniques de calcul précises pour les stations devant traiter *Cryptosporidium*, les CT requis étant 15 à 25 fois plus importants que pour *Giardia*. En appliquant un calcul faisant intervenir la décroissance de l'ozone, un gain de 2,7 log d'inactivation de *Cryptosporidium* est possible, selon Rakness *et al.* (2005).

2.1.6 La nécessité d'une mesure directe de la performance

La présence de modèles de calcul raffinés permet d'obtenir des gains de performance supérieurs au CT réglementaire. Cependant, ces gains nécessitent d'être validés à échelle réelle par l'utilisation de mesures directes de la performance des unités de désinfection, solution à privilégier par rapport à une technique indirecte et théorique. Ainsi, la technique biodosimétrique telle qu'elle est actuellement utilisée pour la validation des réacteurs UV est une avenue intéressante. En usant de cette méthode, des sphères de polystyrène dopées en amont des procédés de désinfection ont été proposées pour décrire l'inactivation microbienne d'après l'atténuation de fluorescence (Chiou *et al.* 1997; Marinas *et al.* 1999; Baeza et Ducoste, 2004; Tang *et al.* 2005). La mesure directe de la performance est obtenue mais les coûts d'utilisation et l'injection dans les eaux de consommation, soumise à des autorisations, freinent l'application à grande échelle et visent un usage ponctuel. La considération de traceurs naturellement présents dans les eaux serait à privilégier. Hijnen *et al.* (2002) ont testé l'inactivation des spores de *Clostridium perfringens* comme indicateur conservateur de l'efficacité des contacteurs d'ozone mais aucune comparaison n'a été effectuée avec des modèles avancés de calcul de CT. Avant de présenter une liste de marqueurs naturellement présents dans les eaux et potentiellement utilisables pour une mesure directe de la performance, les paragraphes qui suivent porteront sur la description de la technique biodosimétrique, son application en désinfection UV et les limites de cette approche.

2.2 LA BIODOSIMÉTRIE

2.2.1 Validation des réacteurs UV par biodosimétrie

La réglementation exige que les réacteurs UV aient été validés pour obtenir les crédits d'inactivation des microorganismes cibles (USEPA, 2003). Le but de la validation est de s'assurer que le réacteur peut fournir le niveau d'inactivation requis pour une application donnée (USEPA, 2003).

En désinfection UV, le degré d'inactivation des microorganismes par le rayonnement ultraviolet dépend de la dose d'énergie calculée selon l'IT, par analogie avec le CT lors de la désinfection chimique.

$$D = I * T \quad (7)$$

Avec :

- D, la dose d'énergie UV, en mJ/cm^2
- I, l'intensité moyenne, en mW/cm^2
- T, la durée d'exposition, en s

La mesure d'intensité UV peut être effectuée par une méthode physique, actinométrique ou biologique mais pour la validation des réacteurs UV à échelle réelle, la biodosimétrie s'est révélée la plus fiable (Sommer *et al.* 1999) et est inscrite comme méthode standard en station de filtration (USEPA, 2003). Les études menées dans ce domaine étaient difficilement comparables en absence d'une méthode directe de mesure à échelle réelle puisque les capteurs UV mesurent l'intensité sur une surface plane et en un seul point, ainsi ils ne peuvent pas estimer l'intensité moyenne du rayonnement (Qualls *et al.* 1983). Il n'est pas possible pour un opérateur de calculer un IT pour un réacteur UV à partir de mesures d'intensité multipliées par un temps de contact théorique (MDDEP, 2002). Afin de valider les réacteurs UV, une méthode de mesure basée sur des bioessais a donc été introduite pour tester leur efficacité et cette méthode est utilisée de manière croissante par les stations de traitement d'eau potable (Sommer *et al.* 1999; Cabaj *et al.* 1996).

Par définition, la biodosimétrie est une procédure permettant de déterminer la dose d'un réacteur UV. Elle implique pour cela la mesure de l'inactivation d'un microorganisme de challenge (« biodosimètre ») après son exposition à la lumière UV, à échelle réelle, et en comparant les résultats à une courbe dose-réponse prédéterminée par faisceau collimaté, en laboratoire. Par faisceau collimaté, il est possible de déterminer la dose UV en multipliant l'intensité moyenne mesurée par radiométrie et le temps d'exposition (l'absorbance UV, la distribution de lumière, la réflexion et la réfraction sont introduites dans le calcul). Par contre, à échelle réelle, la dose appliquée est difficile à calculer. Elle dépend de l'absorbance de l'eau, du débit, de l'intensité UV fournie, des caractéristiques hydrauliques. On observe une distribution de la dose due à une distribution des temps de séjour et une distribution de l'intensité fournie (USEPA, 2003). La dose mesurée à échelle réelle est définie comme étant la dose équivalente de réduction (RED), différente de la moyenne arithmétique de la distribution de dose. La RED est posée égale à la dose d'UV obtenue en laboratoire, qui permet la même inactivation du microorganisme de challenge que celle mesuré lors du test biodosimétrique effectué à échelle réelle (Cabaj *et al.* 1996). Finalement, la biodosimétrie constitue un test standard permettant de comparer les différents systèmes UV et permet de prendre en compte la géométrie du réacteur et les différents types de lampes UV (Leuker, 1999). Elle contourne la difficulté de mesurer directement la dose et permet de vérifier que la dose calculée correspond à l'intensité mesurée (MDDEP, 2002).

2.2.2 Procédure de validation

La procédure de validation est explicitée à la figure 2.1. Les points suivants résument les étapes à effectuer lors de la réalisation d'un essai biodosimétrique.

1. Un essai dosimétrique consiste tout d'abord à produire en conditions contrôlées une courbe dose-réponse de référence permettant de relier l'atténuation du marqueur à la dose appliquée (test de faisceau collimaté). Les marqueurs utilisés couramment sont les coliphages MS2 et les spores de *Bacillus subtilis*. Les spores ont une sensibilité aux UV

constante à partir du moment où elles sont retirées de l'incubateur jusqu'au test actuel (Leuker, 1999) et sont plus résistantes aux UV que les oocystes de *Cryptosporidium*.

2. Dans un deuxième temps, il s'agit de mesurer l'atténuation du marqueur dosimétrique sur une installation réelle.

3. À l'aide de la courbe de référence, il est ensuite possible d'assigner une dose RED à l'installation réelle sur la base de l'atténuation observée du marqueur sélectionné.

Les effets de l'hydraulique, l'équipement UV, et les possibilités d'erreurs des capteurs entraînent une incertitude qui est prise en compte par l'ajout d'un facteur de sécurité. Deux approches permettent ensuite de déterminer le log d'inactivation selon la valeur de la RED mesurée. Par ailleurs, la courbe biodosimétrique n'est valable que jusqu'à un certain log d'enlèvement et pour avoir le plus de flexibilité possible, le guide de l'USEPA (2003) suggère de cibler des inactivations de 1 à 5 log et de répéter 4 séries de paramètres opérationnels qui diffèrent selon le débit, la transmittance de l'eau et l'intensité UV de la lampe. Après validation par biodosimétrie, la performance des réacteurs UV doit être contrôlée pour vérifier leur potentiel d'inactivation. Les capteurs UV sont utilisés pour le suivi de routine du procédé et mesurent la valeur de l'intensité de rayonnement.

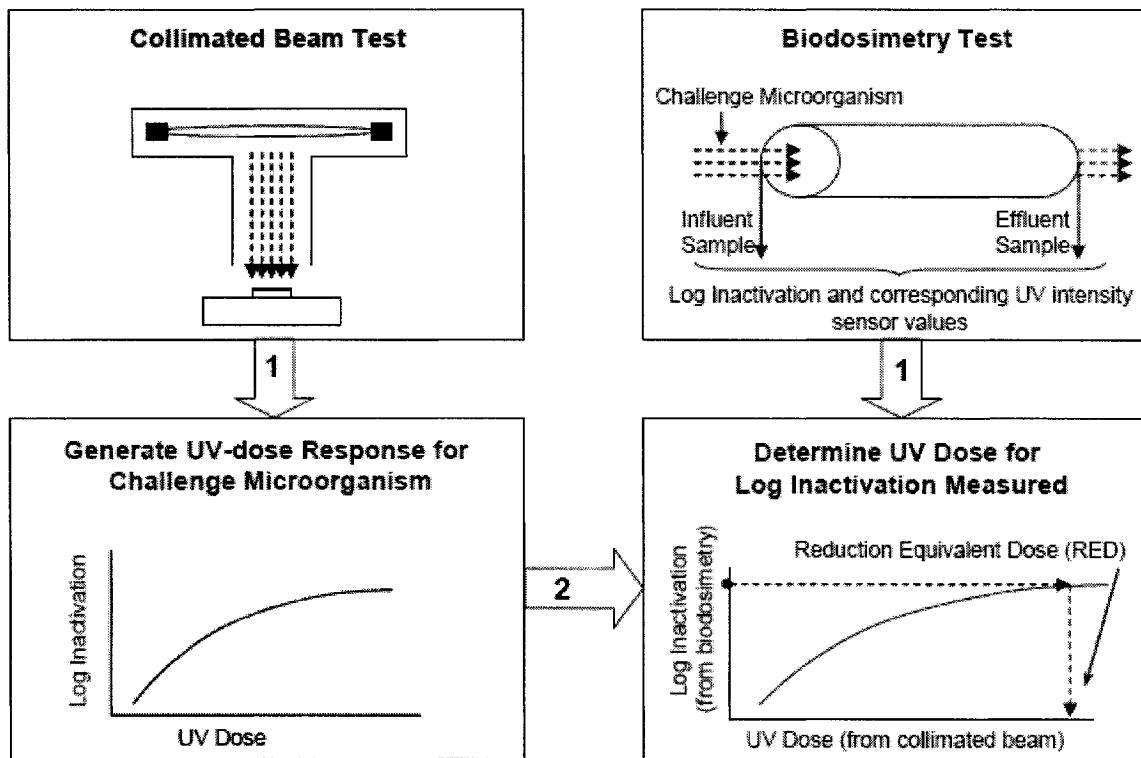


Figure 2-1 : Protocole de validation des réacteurs UV

(Tiré de USEPA, 2003)

2.2.3 Limites

Alors que la validation des réacteurs UV est largement effectuée par biodosimétrie, quelques points de discussion sont cependant à souligner. Tout d'abord, des divergences peuvent exister au sein d'une souche de laboratoire, utilisée lors du dopage des procédés. La sensibilité aux UV dépend des conditions de culture et des méthodes de sporulation, ainsi l'utilisation d'une souche unique est critiquée et les spores indigènes ont été proposées (Mamane-Gravetz et Linden, 2004). La sensibilité spectrale des biodosimètres revêt en outre de l'importance pour des lampes à moyenne pression et doit être mesurée (Cabaj *et al.* 2002). Le calcul des paramètres d'inactivation permet de décrire les courbes de survie avec épaule et permet de sélectionner un capteur UV adéquat. La présence de spectres différents pour les organismes dosimétriques entraîne des valeurs de RED différentes, ce qui nécessite une étude approfondie des différences de spectre entre les organismes dosimétriques et les pathogènes (Hijnen *et al.* 2006). Ce paramètre

spectral n'est pas requis pour des lampes à basse pression dont la radiation est quasi-monochromatique. Sommer *et al.* (1999) ont aussi présenté l'influence du mélange lors des tests en faisceau collimaté. Sachant que les courbes de référence sont généralement effectuées avec cette méthode, un champ de radiation homogène et un mélange adéquat sont essentiels et peuvent entraîner des résultats reproductibles. Finalement, puisque les biodosimètres couramment employés, tels que les spores et les coliphages, sont moins sensibles aux UV que la plupart des organismes pathogènes, d'autres organismes de cinétique similaire à *Cryptosporidium* et *Giardia* sont suggérés pour mieux apprécier leur comportement vis-à-vis du rayonnement UV (Hijnen *et al.* 2006).

2.3 REVUE DES INDICATEURS

2.3.1 Caractéristiques nécessaires de l'indicateur

La recherche s'est préalablement axée sur les indicateurs microbiologiques couramment utilisés dans le domaine de l'eau potable. En effet, la détection des pathogènes exige des techniques spécialisées, peu sensibles et coûteuses et l'utilisation d'organismes indicateurs est plus populaire pour détecter indirectement leur présence potentielle. On peut distinguer deux types d'indicateurs microbiologiques utilisés dans le contexte du contrôle réglementaire (MDDEP, 2002):

- les indicateurs sanitaires sont essentiellement des indicateurs de contamination fécale dont la présence représente un niveau de risque pour la santé. Ces indicateurs sont les bactéries *E. coli*, les coliformes fécaux, les entérocoques et les virus coliphages. Ils sont présents dans la flore intestinale des animaux à sang chaud, en concentration plus abondante que les microorganismes pathogènes entériques. Leur surveillance constitue une partie importante de la microbiologie sanitaire ;
- les indicateurs de qualité d'eau sont utilisés pour évaluer et contrôler la qualité bactérienne de l'eau dans le réseau. Ce sont les coliformes totaux, les colonies atypiques et les BHAA.

Bonde (1977) a proposé qu'un indicateur « idéal » doive être présent lorsque les pathogènes concernés le sont, en plus grande concentration, et être absent dans une eau décontaminée ; être présent dans la matière fécale ; répondre de manière similaire aux pathogènes d'intérêt en ce qui concerne les conditions environnementales et les procédés de traitement ; être plus résistant aux désinfectants et à l'environnement aqueux que les pathogènes ; croître rapidement sur des milieux relativement simples ; être aléatoirement distribué dans un échantillon à examiner, ou être distribué de manière uniforme par une simple homogénéisation ; croître de manière indépendante vis-à-vis d'autres organismes présents lors de l'inoculation sur un milieu artificiel ; être stable et non pathogène.

Dans le cadre de ce projet, le choix du marqueur dosimétrique a une importance capitale puisque le but est de mesurer l'effet de la désinfection avec la plus grande sensibilité mais les exigences vis-à-vis de l'indicateur sont différentes étant donné les objectifs, détaillés ultérieurement. Le candidat idéal est (i) facilement détectable par des tests de laboratoire et en un temps relativement court (ii) présent en concentration suffisante dans les eaux naturelles afin d'éviter le recours au dopage (iii) détectable de façon reproductible à faible coût et avec grande sensibilité (iv) résistant à la désinfection et inactivé/atténué linéairement et proportionnellement à la dose (CT).

2.3.2 Revue des marqueurs potentiels

Une revue de littérature a été réalisée afin de colliger une liste de marqueurs potentiels, biologiques et physico-chimiques, lesquels sont présentés à la section suivante. Un tableau de synthèse a été préparé et est présenté à l'annexe A.

2.3.2.1 Marqueurs biologiques

2.3.2.1.1 Bactéries Hétérotrophes Aérobies et Anaérobies Facultatives

Les BHAA sont membres d'un très large groupe de bactéries qui utilisent le carbone organique pour l'énergie et la croissance (AWWA, 1999). Les résultats obtenus par l'analyse des BHAA ne constituent pas une évaluation exacte de la densité des bactéries hétérotrophes mais indiquent plutôt la population hétérotrophe cultivable dans l'eau potable (Robertson, 1995). À cause de leur manque de spécificité, ces bactéries ne sont pas considérées comme des indicateurs de risque sanitaire (WHO, 2003), ne renseignent pas sur une éventuelle contamination fécale ou la présence de pathogènes, et ne seraient pas indicatrices de la densité du biofilm. Cependant, c'est un bon indicateur d'exploitation puisqu'une brusque et significative augmentation des BHAA peut suggérer un problème du traitement, comme une faible désinfection. D'ailleurs, Haslay et Leclerc (1993) et la réglementation anglaise suggèrent d'étudier les variations de concentration temporelles dans le réseau plutôt que la quantité de colonies. De manière générale, la présence de BHAA en quantité élevée peut être indicatrice de difficultés de

traitement ou d'un entretien inadéquat du réseau (MDDEP, 2002). Des essais d'inactivation de BHAA ont déjà été réalisés avec l'eau de l'usine Charles DesBaillets (Montréal). Cette méthode a été abandonnée à cause de la faible reproductibilité des mesures, lesquelles induisaient une trop grande erreur sur l'évaluation du CT (Pagé, 2005).

2.3.2.1.2 Coliformes totaux

Puisque le risque d'épidémies d'origine hydrique est corrélé à la présence de pollution fécale, les coliformes totaux et fécaux sont utilisés traditionnellement pour montrer la présence éventuelle de contamination (Tallon *et al.* 2005). La simplicité, la reproductibilité et le faible coût d'analyse des coliformes totaux dans les eaux de surface en font un indicateur universel pour juger de la qualité d'une eau. Peu de bactéries peuvent métaboliser le lactose, qui constitue la base de leur identification, pour produire de l'acide et du gaz en 48h à 35°C. Ce groupe hétérogène appartient à la famille des Entérobactéries et comprend plusieurs genres bactériens se retrouvant dans la flore intestinale animale. La plupart des espèces se retrouvent aussi naturellement dans le sol, la végétation et aussi dans l'eau (Camper *et al.* 1991), ainsi ils ne sont pas considérés comme indicateurs fiables de pollution fécale. Comme ils sont plus résistants à la désinfection que les bactéries pathogènes communes, les coliformes sont utilisés pour estimer l'efficacité du traitement de l'eau potable (USEPA, 1990) et l'intégrité du système de distribution. Leur présence peut être due à une recroissance bactérienne, une perte d'étanchéité du réseau ou une déficience dans le traitement (MDDEP, 2002). Cependant, leur cinétique d'inactivation est trop rapide pour pouvoir être étudiée précisément, une inactivation de 2 log étant constatée pour un CT de 2 mg.min/l lors de la désinfection au chlore (Boulos *et al.* 1999).

2.3.2.1.3 Coliformes fécaux et *E.coli*

Les bactéries coliformes fécales, sous-groupe des coliformes totaux, sont notamment distinguées en laboratoire d'après leur capacité de croissance à de hautes températures (44,5°C). Elles sont présentes en grand nombre dans les intestins et les excréments des animaux à sang chaud, sont utilisées comme indicateurs de qualité des eaux brutes et peuvent indiquer la présence potentielle d'organismes pathogènes à la source. Leur détection ne permet pas l'estimation de l'inactivation chimique car elles sont généralement facilement éliminées au cours du traitement et sont présentes en plus faible concentration que les coliformes totaux. De plus, leur analyse par filtration membranaire peut être négativement influencée par une concentration de BHAA supérieure à 500 UFC /ml (Geldreich *et al.* 1978). La situation est identique pour *E. coli*, seule espèce de coliformes totaux strictement d'origine fécale, qui représente plus de 90% des coliformes thermotolérants (Seyfried et Harris, 1990) et dont la présence à la sortie d'une station de traitement indique une faille grave au niveau des procédés.

2.3.2.1.4 Bactériophages

Les bactériophages sont des virus qui infectent les bactéries soit en lysant la cellule et en se reproduisant à ses dépens (phage virulent), soit en se répliquant avec celle-ci (prophage). Puisque les coliformes ont déjà une fonction indicatrice importante, les coliphages, phages de bactéries coliformes, sont utilisés comme indicateurs. Leur présence révèle celle des bactéries qui ont permis leur multiplication et leur survie est semblable à celle de certains virus entériques. Les coliphages male-spécifiques, qui pénètrent les bactéries par les *pili*, synonymes de croissance thermotolérante, sont utilisés pour l'évaluation de la qualité de l'eau (MDDEP, 2002). Un problème lié à leur utilisation est l'incohérence des résultats des techniques d'analyses dans les eaux environnementales, ainsi que des problèmes de détection et d'énumération (WHO, 2001). Les deux techniques de mesure employées, qui sont réalisées dans des cultures de bactéries hôtes, demandent aussi de l'expertise (USEPA, 2001a; USEPA, 2001b) et sont

de plus applicables à des eaux relativement propres, ce qui limite l'usage des bactériophages comme marqueurs naturels. Enfin, ils sont peu abondants et assez peu résistants aux traitements (Payment, 1991; Jofre *et al.* 1995). La majorité des bactériophages est éliminée durant la préchloration-flocculation-sédimentation (Jofre *et al.* 1995) et de grands volumes d'eau sont nécessaires pour obtenir des plaques représentatives du nombre de coliphages (Payment et Franco, 1993).

2.3.2.1.5 Algues

Les algues sont des plantes eucaryotes trouvées dans de nombreuses niches écologiques (eaux douces, marines, saumâtres...) et elles forment une grande partie du phytoplancton (Prescott *et al.* 2003). Elles sont abondantes dans la ressource (parfois jusque 10^5 /ml) et puisqu'elles contiennent certains pigments et notamment la chlorophylle pour réaliser la photosynthèse productrice d'oxygène, il serait possible, en mesurant la fluorescence de ce pigment, d'estimer la biomasse présente. Une étude a utilisé les algues comme indicateur de l'enlèvement des oocystes de *Cryptosporidium parvum* par filtration, certaines espèces trouvées dans les sources d'eau brute ayant des propriétés physiques, telles que le potentiel Zêta, similaires à celles des oocystes (Akiba *et al.* 2002). La mesure de l'efficacité de la flocculation par des algues naturellement fluorescentes a aussi été étudiée (Bergstedt et Rydberg, 2002). Il est cependant difficile de considérer les algues comme marqueur dosimétrique pour mesurer l'efficacité de la désinfection. Les techniques classiques vont plutôt s'intéresser à un dénombrement total.

2.3.2.1.6 Bactéries formatrices de spores

Les spores sont des structures très résistantes à la chaleur, aux UV, aux désinfectants chimiques et à la dessication et sont ainsi importantes en microbiologie industrielle et médicale (Prescott *et al.* 2003). Les endospores favorisent la survie durant les périodes de sécheresse ou de manque d'éléments nutritifs, c'est-à-dire en conditions défavorables. Les bactéries formatrices d'endospores habitent surtout les sols mais sont largement

distribuées dans l'environnement. Les genres les mieux étudiés sont *Bacillus* sp. et *Clostridium* sp. qui contiennent des bacilles Gram-positifs formant des endospores. Le genre *Clostridium* est anaérobiose obligé alors que le genre *Bacillus* est aérobiose, parfois facultatif.

Spores de bactéries sporulantes aérobies (spores de BSA)

Les BSA constituent un large groupe de bactéries à Gram-positif qui proviennent surtout du genre *Bacillus*. Elles se retrouvent couramment dans les eaux et ne présentent aucun danger pour la santé humaine (Rice *et al.* 1994). Cet indicateur, dont les méthodes analytiques sont simples et peu coûteuses (Barbeau *et al.* 1997), offre l'avantage d'être présent en grandes quantités ce qui permet d'en récupérer jusqu'à la fin de la chaîne de traitement (Nieminski, 1999 ; Nieminski *et al.* 2000). Étant donné leur petite taille (0.5 x 1.0 x 2.0 μm) et leur résistance, la mesure des spores peut être utilisée pour déterminer la performance d'une usine de filtration (Coallier *et al.* 1996; Rice *et al.* 1996; Dunn et Button, 2001; Huertas *et al.* 2003; Galofré *et al.* 2004). Leur enlèvement physique par décantation et filtration semble conservateur vis-à-vis de celui des parasites (Nieminski *et al.* 2000; Nieminski et Bellamy, 2000; Emelko, 2003; Dugan *et al.* 2001; Mazoua et Chauveheid, 2005) et l'ajout d'un adoucissement à la chaux, qui permet 3,5 à 4 log d'enlèvement de spores (Cornwell *et al.* 2003), confirmerait le caractère conservateur de cet indicateur microbiologique. Cependant, une augmentation significative de la concentration en spores de BSA a été constatée suite à la filtration sur CAG et serait due à une croissance (Galofré *et al.* 2004) ou à une accumulation puis une percée de spores (Mazoua et Chauveheid, 2005), rendant difficile l'évaluation de la performance de ce procédé.

Par ailleurs, les spores de *Bacillus subtilis* seraient des indicateurs conservateurs de l'inactivation de *Giardia* par le chlore et l'ozone (Barbeau *et al.* 1999; Facile *et al.* 2000). Elles le seraient également vis-à-vis de *Cryptosporidium* lors de l'ozonation (Miltner *et al.* 1997; Owens *et al.* 2000) mais des résultats différents sont obtenus par

Barbeau *et al.* (1998). Les conclusions tirées de ces recherches dépendent cependant des souches de spores présentes dans l'eau étudiée, d'autant plus qu'il est difficile de prédire la désinfection de *Cryptosporidium* (Craik *et al.* 2002). Une comparaison des énergies d'activation révèle que les spores de *B. subtilis* ne sont pas des indicateurs adéquats à faible température (Driedger *et al.* 2001; Larson et Marinas, 2003, von Gunten, 2003b). La variabilité de la résistance des spores au dioxyde de chlore (Anderson *et al.* 2001; Verhille *et al.* 2001) a aussi entraîné des conclusions diverses sur leur usage conservateur (Chauret *et al.* 2001; Radziminski *et al.* 2002). Leur utilisation comme indicateurs de l'inactivation des oocystes ne convient finalement que pour des cas particuliers puisque la résistance des souches est variable d'une source à l'autre et au sein d'une même population (Facile *et al.* 2000).

Néanmoins, leur résistance à la désinfection permet de les utiliser comme indicateur de la performance des bassins de contact, à condition que les concentrations retrouvées à l'eau traitée soient suffisantes. Bien que les spores n'indiquent pas la présence des protozoaires, leur dénombrement est recommandé pour évaluer la performance d'une filière de traitement pour l'enlèvement des parasites (Craik *et al.* 2002; MDDEP, 2002). En l'absence d'indicateurs parfaits, l'utilisation des spores aérobies présente plusieurs avantages et des enlèvements de 3 à 4 log peuvent être mesurés pour un traitement conventionnel considérant leur abondance en eaux brutes (Nieminski, 1999).

Des essais de désinfection au chlore, à l'ozone et au dioxyde de chlore ont montré que les BSA obéissent à une cinétique d'inactivation linéaire (Barbeau *et al.* 1999 ; Barbeau *et al.* 2002 ; Facile *et al.* 2000 ; Chauret *et al.* 2001 ; Driedger *et al.* 2001 ; Radziminski *et al.* 2002 ; Cho *et al.* 2002 ; Larson et Marinas, 2003). Celle-ci peut être décrite par le modèle de Chick-Watson avec latence (Rennecker *et al.* 1999), avec CT_{lag} appelé CT de latence :

$$\frac{N}{N_o} = 1 \text{ si } CT \leq CT_{lag} = \frac{1}{k} \ln \frac{N_1}{N_o}$$

$$\frac{N}{N_o} = \frac{N_1}{N_o} \exp(-kCT) = \exp(-k[CT - CT_{lag}]) \text{ si } CT > CT_{lag} = \frac{1}{k} \ln \frac{N_1}{N_o}$$

Ce CT de latence correspond au temps requis pour la diffusion du désinfectant (Haas *et al.* 1995) et les valeurs dépendent des conditions opératoires : des CT_{lag} maximaux de 41 mg.min/L à pH 5,6 et de 150 mg.min/L à pH 8,2 ont été observés (Cho *et al.* 2003b). Cette phase de latence qui dépend de la température est retrouvée chez les organismes difficiles à inactiver. Les tableaux fournis à l'annexe B présentent les valeurs de CT requises pour inactiver les spores aérobies, pour le chlore, le dioxyde de chlore et l'ozone.

Spores de bactéries sporulantes anaérobies

Puisque les cellules végétatives sont inadéquates pour modéliser la désinfection, les spores de *Clostridium* peuvent être des modèles intéressants (Venczel *et al.* 1997). Les spores anaérobies, appelées aussi spores de *Clostridium* sulfato-réductrices (SSRC), sont résistantes à la chaleur, à la chloration et à la dessiccation (Nieminski et Bellamy, 2000). L'organisme *Clostridium perfringens*, qui appartient au groupe des SSRC, a été introduit dans la directive de 1998 de l'Union Européenne sur la qualité de l'eau afin de contrôler les eaux influencées par une eau de surface. Cet organisme y est aussi inscrit comme indicateur des eaux traitées et constitue un paramètre de la réglementation française depuis plus de 20 ans. *Clostridium perfringens* est en effet associé à la matière fécale humaine (Cabelli, 1977). Un lien entre les virus et *C. perfringens* dans des sources d'eau contaminées fécalement a été montré (Payment et Franco, 1993) mais les corrélations avec la présence d'autres pathogènes est moins évidente (AWWA, 1999). Cet indicateur a surtout été utilisé en Angleterre alors qu'en France, le groupe plus large des SSRC est étudié. Leur contrôle est aussi inclus dans le *Dutch Drinking Water Decree* (Hijnen *et al.* 2000b). Les spores aérobies ne sont pas adaptées à l'évaluation de la performance de la désinfection pour les stations hollandaises car, très résistantes à l'ozone, leur inactivation

est faible pour les CT employés et nécessaires pour limiter la formation de bromates (Hijnen *et al.* 2004).

La capacité de survie des endospores de *C. perfringens* dans l'eau et leur résistance au traitement sont plus importantes que d'autres indicateurs (Bonde, 1977). Par contre, les concentrations dans les eaux brutes sont faibles par comparaison aux autres bactéries indicatrices et étant donné que le traitement conventionnel en élimine une bonne partie, cet indicateur n'est pas utile pour estimer la qualité de l'eau traitée avec les volumes routiniers. En effet, les volumes couramment utilisés pour la détection microbienne ne dépassent généralement pas un litre d'eau filtrée. Ceci est un obstacle important à l'utilisation de ces spores puisqu'elles se retrouvent en trop faible concentration pour être détectées après le traitement, impliquant la filtration de grands volumes pouvant aller jusqu'à 2000 litres (Payment et Franco, 1993). Les SSRC ont été envisagées pour mesurer l'enlèvement des (oo)cystes de parasites (Payment et Franco, 1993; Hijnen *et al.* 1997) du fait de leur résistance (Hijnen *et al.* 2000a) et puisque leur détection peut être obtenue par filtration de larges volumes (Hijnen *et al.* 2000b). Elles ont aussi été proposées comme indicateurs de la performance des bassins d'ozonation mais des recherches complémentaires sont nécessaires pour valider leur utilité en tant que mesure conservatrice de l'inactivation de *Cryptosporidium* (Hijnen *et al.* 2002). Leur résistance serait similaire à celle de ce protozoaire, une inactivation de 2 log étant obtenue pour des valeurs de CT de 3.5 mg.min/L environ. L'étude de l'influence du volume filtré sur la récupération de microorganismes peut aussi être débattue et par ailleurs, le caractère anaérobie de ces microorganismes complique les procédures de détection et limite leur utilisation en laboratoire comme analyse de routine.

2.3.2.1.7 Comptes totaux viables (TVC)

Cette méthode est basée sur la détection de l'activité enzymatique estérase de la flore bactérienne et permet le décompte de bactéries « viables » dans l'échantillon d'eau analysé (Partuisot *et al.* 2000). Cette activité enzymatique induit le clivage d'un substrat fluorogène qui devient alors fluorescent et l'accumulation de la fluorescence à l'intérieur des cellules permet leur détection à l'aide d'un cytomètre de flux en phase solide (*ChemScan*^{MD}). Cette technique a été testée sur les cuves de l'usine Charles DesBaillets de Montréal par Pagé (2005) mais elle a été abandonnée. En effet, une contamination des échantillons était souvent observée lors des essais *in-situ*. D'autre part, les résultats d'essais d'inactivation montraient que cet indicateur n'obéissait pas à la loi de Chick-Watson.

2.3.2.1.8 Bactéroides

Le genre *Bactéroïde* est un groupe de bactéries anaérobies qui croissent seulement dans l'intestin des humains, dans une moindre mesure chez les animaux, et dont la concentration est importante dans la matière fécale (Finegold *et al.* 1983). Les virus qui infectent la bactérie *Bacteroides fragilis* ont montré un avenir prometteur comme indicateur (Jofre *et al.* 1995). Cependant, les espèces de *Bacteroides* ne survivent pas bien dans les eaux fraîches aérobies et meurent à un rythme supérieur à *E. coli* (AWWA, 1999). Des méthodes analytiques simples et peu coûteuses sont disponibles mais une incubation anaérobie est nécessaire et peut entraîner des difficultés de mise en culture.

2.3.2.1.9 Entérocoques

Les bactéries du genre *Enterococcus* appartiennent au groupe de bactéries qu'on appelait auparavant les streptocoques fécaux. À l'instar des bactéries *E. coli*, les bactéries entérocoques se retrouvent en quantité considérable dans les matières fécales humaines et animales, mais moins abondamment que celles-ci. Toutefois, certaines variétés ne sont pas d'origine fécale et sont présentes naturellement dans les végétaux et le sol.

(Stevens *et al.* 2001). En outre, dans les eaux salées, les entérocoques sont de meilleurs organismes indicateurs de contamination fécale que les coliformes en raison de leur plus faible taux de mortalité (Prescott *et al.* 2003). La détection des entérocoques par filtration membranaire est simple et peu coûteuse. Le décompte est facile et les entérocoques, plus résistants à la chloration que les coliformes totaux et fécaux, survivent généralement plus longtemps dans l'environnement (Edberg *et al.* 2000; Godfree *et al.* 1997). Cependant, ils sont pratiquement éliminés durant les premières étapes de traitement et les résultats ne sont disponibles qu'après 48h.

2.3.2.2 Marqueurs biochimiques

2.3.2.2.1 L'ATP

Toute cellule vivante produit et consomme de l'ATP (Adénosine Tri-Phosphate), qui est un intermédiaire énergétique majeur de nombreuses réactions du métabolisme cellulaire. Ce coenzyme est spécifique des milieux vivants et toute trace d'ATP est le témoin d'une trace de vie (cellules vivantes ou ayant vécu, car l'ATP n'est pas détruit en totalité à la mort de la cellule). La détection de l'ATP par luminométrie a été utilisée pour des applications variées : contrôle de l'hygiène et mesure de l'efficacité des procédures de désinfection dans l'industrie agroalimentaire (Griffiths, 1993; Bautista *et al.* 1992; Poulis *et al.* 1993a; Hawronskyj et Holah, 1997; Bautista *et al.* 1992; Poulis *et al.* 1993b) et contrôle de la qualité microbiologique d'échantillons de boues activées (McEntee, 1989). Actuellement, aucune autre mesure de contrôle de l'hygiène ne fournit un tel degré de rapidité et de flexibilité (Hawronskyj et Holah, 1997).

Dans le domaine de l'eau potable, les premières applications de cette analyse ont été décrites pour déterminer l'activité microbienne (Holm-Hansen et Booth, 1966). La faible limite de détection, l'inclusion de tous les microorganismes actifs, la concentration d'ATP directement reliée à l'activité et l'analyse possible sur le terrain en font une technique attrayante (van der Kooij, 2003). Lee et Deininger (2001a) ont observé une

forte relation entre les concentrations d'ATP et celles de BHAA dans 120 échantillons provenant de diverses sources des États-Unis. Des corrélations entre les mesures d'ATP, d'AODC et de DVC ont aussi été présentées (Lee et Deininger, 2001b). La mesure d'ATP a également été étudiée pour contrôler l'activité des biofilms dans les réseaux de distribution ou pour estimer la biomasse totale (Boe-Hansen *et al.* 2003) et une relation linéaire entre le log (ATP) et le log (HPC/mL) a pu être déterminée (Delahaye *et al.* 2003). Cette technique permet la détection d'espèces spécifiques comme *E. coli* (Lee et Deininger, 2004), les bactéries coliformes par l'utilisation de milieux de culture sélectifs (Tanaka *et al.* 1997) et a été testée pour estimer le caractère infectieux des oocystes (Somiya *et al.* 2000).

La méthode de détection de l'ATP est basée sur la rupture des liaisons entre les différents groupes phosphates de la molécule, responsable d'une libération d'énergie. La réaction de bioluminescence, catalysée par une enzyme, la luciférase, utilise l'énergie chimique contenue dans la molécule d'ATP pour conduire l'oxydation-décarboxylation de la luciférine, avec production résultante de lumière, selon l'équation suivante :



La luminométrie concilie sensibilité, réactifs peu chers, protocole expérimental simple et bruit de fond réduit d'autant plus que la luciférase est spécifique à l'ATP. Lorsqu'il est le composant limitant de la réaction, l'intensité de la lumière émise est proportionnelle à la concentration d'ATP avec, pour chaque molécule d'ATP présente, l'émission d'un photon de lumière. Ainsi, la quantité de lumière produite est directement reliée aux niveaux de microorganismes présents dans l'échantillon. Les résultats sont obtenus rapidement ce qui permettrait de contrôler en temps réel un procédé.

2.3.2.2.2 « SYBR-II RNA gel stain »

Une alternative aux méthodes de culture pour le contrôle de la désinfection de l'eau est l'utilisation de marqueurs fluorescents mettant en évidence les dommages causés par les oxydants sur les acides nucléiques. Pour utiliser cette technique, il est nécessaire que l'intensité de la fluorescence du complexe acide nucléique/marqueur varie suffisamment lors de la chloration. L'étude de Phe *et al.* (2004) a montré que le SYBR-II marque fortement les acides nucléiques et plus faiblement les autres biomolécules contenues dans les cellules. Le marqueur est très sensible au traitement car il réagit dès que le désinfectant est injecté, une relation linéaire entre le log de l'intensité de fluorescence et la concentration en hypochlorites a été observée jusqu'à 250 µmol/l HOCl (13 mg/l) et l'intensité de la fluorescence, mesurée par spectrofluorométrie à 515 nm, est assez bien corrélée à la quantité d'ADN, ce qui confirme la perte d'intégrité lors de la chloration. Néanmoins, l'intensité de fluorescence dépend de plusieurs facteurs et notamment du ratio [fluorochrome] / [biomolécule], sachant que la détermination de la concentration d'ADN et d'ARN en eau naturelle n'est pas évidente.

2.3.2.3 Marqueurs physico-chimiques

Parmi les indicateurs physico-chimiques, seuls les sous-produits de désinfection au chlore et à l'ozone sont envisagés. En effet, l'augmentation de la dose de désinfectant conduit à l'augmentation de l'inactivation des microorganismes mais également à une hausse de la concentration des sous-produits d'oxydation. La chromatographie en phase gazeuse (couplée ou non avec une spectrométrie de masse) constitue la base de plusieurs des méthodes de l'USEPA pour leur analyse.

La mesure des bromates permettrait de calculer l'efficacité du procédé d'ozonation puisque la concentration augmente linéairement avec l'exposition à l'oxydant (von Gunten *et al.* 2001). Cependant, les laboratoires accrédités aux États-Unis sont peu nombreux et très peu sont capables d'obtenir le seuil de détection actuel de 2 µg/L. Les

échantillons qui présentent des niveaux élevés de chlorure doivent souvent être dilués, ce qui augmente à 10 µg/L le seuil de détection de cette méthode. Augmenter la sensibilité est indispensable et plusieurs techniques de concentration ont été investiguées (Sorrell et Hautman, 1992). De plus, des effets de mélange à l'échelle réelle peuvent modifier les relations déterminées en laboratoire entre la dose et la concentration de SPD. Puisque l'efficacité de la désinfection est mesurée sur une échelle logarithmique alors que la formation de SPD l'est sur une échelle linéaire, l'hydraulique des réacteurs doit être prise en considération lors de cette approche (von Gunten *et al.* 2001). De même que précédemment, il a été montré que la formation du chloroforme (CHCl₃) est linéairement reliée à la dose de chlore (von Gunten *et al.* 2001). Cependant, malgré les linéarités observées, des études en station doivent être envisagées car de nombreux paramètres de qualité d'eau interviennent lors de la formation des bromates (pH, T, carbone organique dissous, etc.).

2.3.2.4 *Synthèse et choix de l'indicateur*

Bien qu'il n'existe pas d'indicateur présentant toutes les caractéristiques souhaitées, les divers points exposés ont permis de dégager les marqueurs les plus avantageux. L'utilisation d'un indicateur physico-chimique pour ce projet n'est pas envisagée considérant les faibles concentrations d'ions bromures dans les eaux à étudier et la validation nécessaire à échelle réelle de la cinétique de production linéaire des SPD selon la dose appliquée. En ce qui concerne les indicateurs biologiques, les aspects les plus importants restent la présence en forte concentration dans les eaux et la résistance à la désinfection. Les BHAA et les spores sont les indicateurs retrouvés le plus fréquemment à tous les stades du traitement, mais la contamination possible lors de la mesure des BHAA rend difficile l'exploitation des résultats et la détermination de la valeur du CT. D'autre part, les comptes totaux viables (TVC) n'obéissent pas à une cinétique d'inactivation linéaire et les coliformes sont éliminés rapidement par la désinfection. La présence relativement faible des bactériophages, leur résistance variable à la désinfection mais surtout les techniques analytiques délicates et la faible

reproductibilité des résultats ne permettent pas de considérer leur utilisation. Quant aux algues, les techniques fournissent un dénombrement total et non viable, ce qui ne permet pas d'estimer la performance de la désinfection.

Les spores aérobies et anaérobies, du fait de leur résistance, ont été largement étudiées afin de vérifier leur potentiel d'indicateur de performance des traitements. Cependant, le caractère anaérobie complique les procédures de détection et limite l'utilisation comme analyse de routine. Bien que simple, la méthode de détection est plus coûteuse que celle des spores aérobies. De plus, par rapport aux SSRC, les spores de bactéries sporulantes aérobies ont l'avantage d'être présentes en plus grand nombre, dans l'eau brute comme dans l'eau traitée. Nieminski et Bellamy (2000) ont identifié que la capacité d'estimation de la performance d'une station de traitement est contrôlée par les concentrations en eaux brutes et par la limite de détection dans les eaux filtrées. Ainsi, les spores de bactéries aérobies, qui suivent une loi d'inactivation de Chick-Watson avec latence et dont l'analyse est obtenue avec reproductibilité, sont un indicateur naturel intéressant. Un autre avantage provient du caractère sécuritaire pour la santé humaine.

La détection de l'ATP, indicateur de stérilité/désinfection et détectable en continu (*New Horizons Diagnostic, www.nhdiag.com*) et celle du SYBR-II, sont des alternatives, mais aucune étude ne décrit précisément leurs cinétiques d'inactivation. Des actions supplémentaires doivent être effectuées afin de valider leur utilisation : mesure des concentrations d'ATP et de biopolymères (ADN et ARN) en eaux de station, étude de l'effet des désinfectants sur l'atténuation de l'émission de lumière et de la fluorescence, vérification des limites de détection et de la répétabilité des analyses. Dans le cas du SYBR-II, l'importance de la concentration du fluorochome par rapport à celle des biopolymères est pour l'instant un frein à sa considération.

La biodosimétrie, appliquée aux UV, permet la mesure de la dose effective appliquée. L'objectif est de transposer cette méthode aux procédés chimiques tels que l'ozonation en utilisant les spores de bactéries sporulantes aérobies.

CHAPITRE 3 OBJECTIFS DE RECHERCHE

L'objectif général du projet consiste à développer des outils méthodologiques basés sur la technique biodosimétrique afin de mesurer directement la performance d'un procédé de désinfection à échelle réelle. Il s'agit, en l'occurrence, de l'ozonation à l'usine de filtration DesBaillets (Montréal, Qc). Ces outils permettront d'évaluer la dose effective appliquée (CT) dans les bassins de contact et seront comparés aux modèles actuels de calcul de la performance tels que le CT_{10} ou le CT_{IDDF} afin de valider ou d'infirmer leurs prédictions.

Le développement de cet outil est effectué à l'aide des spores de bactéries sporulantes aérobies comme marqueurs dosimétriques. Les spores de BSA sont présentes en concentration suffisante dans les eaux naturelles (ce qui évite le recours au dopage), sont détectables de façon reproductible à faible coût et avec grande sensibilité, et sont inactivées de façon linéaire. Cependant, les concentrations de spores sont généralement faibles à l'eau traitée, suite à la désinfection. Leur analyse avec les volumes routiniers (1 L) et par la technique conventionnelle ne permet pas l'estimation précise de leur inactivation. Considérant la procédure de validation biodosimétrique, la mesure de la dose nécessite une mesure précise de l'atténuation. Il est donc nécessaire d'affiner le calcul de la concentration de spores à l'eau ozonée. Pour cela, il s'agit soit d'améliorer la méthode d'analyse des spores aérobies par filtration membranaire, soit d'augmenter le seuil de détection par une technique d'énumération alternative.

La réalisation de ce projet a été divisée en trois objectifs de recherche dont l'étude est nécessaire avant la mise en œuvre de la procédure biodosimétrique: (i) la détection des spores par cytométrie de flux en phase solide pour améliorer la sensibilité de la détection des marqueurs; (ii) la mise au point d'une méthode de concentration des spores par filtration membranaire puisqu'un compte bactérien est considéré statistiquement fiable lorsque 20 unités formatrices de colonies (UFC) environ sont énumérées par la méthode

de croissance sur milieu de culture et (iii) l'application de la méthode de détection des spores la plus performante pour valider par biodosimétrie la performance des contacteurs d'ozonation de l'usine DesBaillets.

Objectif 1 : Détection des spores de BSA par la cytométrie de flux en phase solide

La possible détection des spores par cytométrie de flux en phase solide à l'aide d'un marqueur d'activité enzymatique constitue la principale hypothèse de recherche. Cette méthode est plus rapide et plus sensible que par croissance sur milieu de culture et la détection d'une cellule est considérée fiable. Cette méthode serait utilisée pour le dénombrement direct des spores à condition que leur concentration dans les eaux traitées le permette et que le décompte ne soit pas influencé par le contenu particulaire et microbien. Cette analyse permettrait aussi de mesurer les taux de récupération d'une quelconque méthode de concentration. L'analyse des spores a été conduite (i) en eau ultra pure afin de déterminer les conditions optimales de récupération; (ii) en eau naturelle pour vérifier l'influence des particules sur la qualité de la détection.

Objectif 2 : Concentration des spores de BSA par filtration membranaire

La mise en œuvre d'une méthode de concentration des spores aérobies par filtration membranaire constitue le second axe de recherche. Une des approches abordées est la filtration frontale mais l'usage de grands volumes d'échantillons, pour remédier aux faibles concentrations, peut être négativement influencé par le gâteau de filtration. La détection des coliformes totaux peut ainsi être empêchée par la présence de turbidité microbienne et particulière (Geldreich *et al.* 1978; LeChevallier *et al.* 1981; Herson et Victoreen, 1980). L'étude de l'impact du volume filtré sur la détection des spores aérobies a donc été étudiée avant d'envisager toute concentration par filtration membranaire frontale.

Objectif 3 : Validation biodosimétrique des cuves d'ozonation à DesBaillets

Suite à l'étude de ces deux axes de recherche, il s'agit de conduire les étapes suivantes en utilisant la méthode de détection des spores aérobies la plus appropriée :

- Mettre en œuvre la courbe de référence biodosimétrique (courbe dose-réponse) à l'aide d'un pilote d'ozonation,
- Calculer la dose en désinfectant selon l'approche réglementaire, l'approche IDDF et l'approche biodosimétrique, suite à des essais d'ozonation à échelle réelle,
- Comparer les trois méthodes de calculs de la dose,
- Effectuer plusieurs essais afin d'évaluer l'influence de la qualité de l'eau.

Le prochain chapitre présente les expériences menées afin de mesurer les spores de BSA en eau naturelle par l'utilisation de la cytométrie de flux en phase solide. Il est suivi des résultats concernant la filtration membranaire frontale et la mise en œuvre de la biodosimétrie pour la mesure de la performance des contacteurs. Une synthèse permettra de lier les deux axes de recherche étudiés.

CHAPITRE 4 OPTIMISATION DE LA DÉTECTION DES SPORES DE BACTÉRIES SPORULANTES AÉROBIES

4.1 INTRODUCTION

Les techniques traditionnelles d'énumération microbienne détectent les cellules capables de croître sur des milieux de culture. Ces tests sont simples et reproductibles mais ils donnent des résultats après plusieurs heures d'incubation et sont sujets aux interférences d'autres microorganismes (Rompré *et al.* 2002). De plus, outre les bactéries aptes à se multiplier et à former des colonies (bactéries viables et cultivables), il existe des bactéries non cultivables mais qui n'en sont pas moins viables dans le sens où elles sont pourvues d'une certaine activité métabolique (Joux et Lebaron, 2000). Aussi, les altérations engendrées par les désinfectants ne sont pas nécessairement fatales mais le plus souvent réparables, dans certaines conditions. Les bactéries stressées ne sont plus cultivables dans les conditions d'un contrôle bactériologique mais des tests spécifiques permettent leur détection. Une faible proportion de la population bactérienne totale (0.1 à 15%) est énumérée par la technique de culture cellulaire, qui sous-estime grandement le nombre réel de microorganismes présents dans un échantillon.

La mise en œuvre de méthodes alternatives de détection a été considérée afin d'estimer la viabilité microbienne en temps réel et de considérer les cellules viables et non cultivables. Ainsi, la capacité d'hydrolyse d'une cellule peut être considérée comme une fonction physiologique essentielle au maintien de son activité métabolique. Cette activité peut être mesurée au travers de l'activité estérase et s'effectue au moyen de substrats fluorogènes (Joux et Lebaron, 2000). Ces derniers sont des composés lipophiles, pouvant pénétrer dans la cellule à travers la paroi cellulaire et la membrane externe, et sont non fluorescents. Une fois dans les cellules actives, le substrat est clivé (hydrolysé) par des enzymes estérases non spécifiques qui libèrent un produit fluorescent polaire (Baudart *et al.* 2002).

La rétention du fluorochrome est conditionnée par le degré d'intégrité de la membrane cytoplasmique. Parmi les colorants utilisés, le ChemChrome V6 (Chemunex) est le plus développé. Substrat à base de fluorescéine, il combine une coloration de contraste pour réduire la fluorescence non spécifique ainsi qu'un tampon (Chemsol B16) qui permet de réduire l'extrusion du marqueur. Ce substrat constitue la base de la détection de l'activité enzymatique estérase qui peut être couplée à l'utilisation du Chemscan RDI® (Chemunex, France). La technique est basée sur le marquage direct fluorescent des microorganismes viables et est couplée à un scanner au laser et à un système de dénombrement et de confirmation par microscopie. Le niveau de sensibilité permet la détection d'une cellule unique sur un filtre membranaire.

L'objectif de cet axe de recherche était de s'appuyer sur la méthode TVC (*Total Viable Count*) afin de détecter de manière sensible les spores de bactéries sporulantes aérobies. Cette technique nécessite une filtration des échantillons puis un marquage et s'appuie sur le principe que seules les cellules viables, ayant une membrane intacte, sont capables de retenir et d'accumuler le colorant fluorescent. La cellule est ensuite analysée en 3 minutes par la technologie de scanner au laser. L'instrument permet de différencier les microorganismes marqués et les particules autofluorescentes selon les caractéristiques optiques et électroniques du signal.

La prochaine section présente un article en anglais soumis au journal *Applied Environmental Microbiology*. L'objectif de cette étude était de mettre en œuvre une méthode de détection des spores de bactéries sporulantes aérobies par cytométrie de flux en phase solide. Les essais ont d'abord été effectués en souche pure afin de déterminer les conditions optimales de récupération, à l'aide d'un antibiotique. Deux types d'eau ont ensuite été étudiés afin de vérifier l'impact de la matrice de l'eau sur l'efficacité du marquage au ChemChrome V6.

4.2 RAPID ENUMERATION OF AEROBIC SPORE-FORMING BACTERIA IN DRINKING WATER USING SOLID-PHASE CYTOMETRY

Romain Broséus^a, Benoit Barbeau^{a,*}

^a *Ecole Polytechnique de Montréal, NSERC Industrial Chair on Drinking Water, Civil, Department of Civil, Geological and Mining Engineering, CP 6079, Succ. Centre-ville, Montréal (Qué.), Canada H3C 3A7*

* Corresponding author. Tel.: +1514 340 4711x2988.
E-mail address: benoit.barbeau@polymtl.ca

Abstract

Aerobic-spore formers are used increasingly to evaluate water treatment effectiveness. The current methodology is based on standard cultivation after a preliminary pasteurisation. This work evaluates the use of esterase activity and solid phase cytometry to detect *B. subtilis* spores or indigenous aerobic spores in water samples. Spores were detected after germination in the presence of antibiotics in order to inhibit cell division. It was determined that the optimal concentration of ciprofloxacin hydrochloride would be 0.50 µg/L to increase fluorescence intensity and cellular elongation with the duration of incubation. An optimal incubation period of 3 h allowed for the detection of *B. subtilis* at a sensitivity equivalent to the traditional cultivation technique. However, the detection of indigenous ASF was challenged by (i) the presence of fluorescent particles in natural waters and (ii) the slower germination rate of indigenous ASF.

4.2.1 Introduction

The traditional enumeration methods of micro-organisms in drinking water treatment are based on cultures by using specific media and conditions (temperature, pH, duration of incubation). This approach, requiring cell growth, is time-consuming and constitutes a retrospective control of the microbial quality of the treated water. Moreover, depending on environmental pressures, bacteria can occur in natural waters in a viable but nonculturable state (VBNC) (Rompré *et al.* 2002). Due to this mechanism of survival

(dormancy), standard plate counts lead to an underestimation of the viable bacteria in an oligotrophic environment, such as drinking water (Roszak et Colwell, 1987).

Therefore, new methods, usually based on fluorescent probes and which allow for estimation of the physiological state, have been introduced to detect microbial cells more specifically (Joux et Lebaron, 2000): membrane integrity, respiratory and enzymatic activity, nucleic acid staining, as well as molecular tests providing identity information (Polymerase Chain Reaction, Fluorescent In Situ Hybridization). Epifluorescence microscopy and flow cytometry are techniques used in conjunction with the methods previously mentioned. However, microscopy requires 10^5 cells in studied samples to obtain reliable results (Broadaway *et al.* 2003; Lisle *et al.* 2004) while the detection by flow cytometry is limited by the quantity of non targeted cells (Joux et Lebaron, 2000). Hence, those techniques allow a specific detection but are still inconvenient for samples containing low concentrations of cells and few of them show potential as a routine test (Lemarchand *et al.* 2001).

The Chemscan RDI[®] (Chemunex, France), a laser-scanning cytometer, was designed to detect cells in highly diluted water samples without having to conduct any culture step. Solid-phase cytometry has been shown to accurately enumerate rare events (Lemarchand *et al.* 2001) and to perform better than microscopic methods (Lisle *et al.* 2004). The Chemscan RDI[®] was first applied to determine the total viable count (TVC) in water (Reynolds et Fricker, 1999; Reynolds *et al.* 1997) and has also been used to detect specific micro-organisms such as *Cryptosporidium* oocysts (Reynolds *et al.* 1999; Rushton *et al.* 2000; Zanelli *et al.* 2000), *Escherichia coli* or other members of the family of *Enterobacteriaceae* (Baudart *et al.* 2002; Van Poucke et Nelis, 2000).

The work described in this paper was undertaken to evaluate the ability of the Chemscan RDI[®], with cellular esterase activity, to detect spores of aerobic spore-forming bacteria (ASF) in drinking water. Esterase activity is frequently used as a viability detection

method (Parthuisot *et al.* 2000) and is based on direct fluorescent labelling of viable micro-organisms. The method originally developed by Chemunex (France) relies on the detection of cell metabolic activity. The hydrolysis capacity and the esterase activity are both considered essential physiological functions. They can be analysed using fluorogenic substrates. The Chemchrome V6 (Chemunex, France) is a lipophilic compound which traverses the cell's membrane and is then hydrolysed by non-specific enzymes following its penetration inside the cell (Breeuwer *et al.* 1994; Lemarchand *et al.* 2001). The initially non-fluorescent substrate is cleaved to liberate free fluorochrome (carboxyfluorescein). Only cells having intact membranes will perform this cleavage and retain the label which accumulates inside the cells. This method of detection hence requires esterase activity and membrane integrity (Breeuwer *et al.* 1995).

Aerobic spores, mainly from *Bacillus* genus, are present in large numbers in natural waters and do not pose any health risk for humans (Rice *et al.* 1994). Since spores are resistant to heat treatment, chemical disinfectants, and desiccation, they are important in industrial and medical microbiology (Prescott *et al.* 2003). They have also been considered as an indicator of drinking water treatment performance (Kawamura *et al.* 1986). Their small size (0.5 x 1.0 x 2.0 μm) and their high resistance make them suitable for indicating drinking water treatment efficacy (Dunn et Button, 2001; Galofré *et al.* 2004; Huertas *et al.* 2003; Mazoua et Chauveheid, 2005). They are sufficiently resistant to be recovered from disinfected waters (Barbeau *et al.* 1999; Nieminski, 1999). ASF and particle removals are correlated throughout treatments (Rice *et al.* 1996) and although studies have shown that ASF do not indicate the presence of protozoan (oo)cysts, monitoring their removal is recommended to estimate the removal of parasites by treatment processes (Craik *et al.* 2002).

Rapid detection of ASF with the Chemscan RDI® is desirable due to the importance of ASF in the water industry. Currently, aerobic spores are easily detected using a modified membrane filtration technique (Rice *et al.* 1996; Barbeau *et al.* 1997) but the solid-phase

cytometry could (i) improve their detection by improving the accuracy of the measurement of their concentration, (ii) lower the delay for detection (24 hours) and (iii) avoid the limitations inherent to culture, such as the influence of turbidity and microbial growth, as already described for coliforms (Geldreich *et al.* 1978; Herson et Victoreen, 1980; LeChevallier *et al.* 1981).

The research objectives are to (i) develop a method for enumerating viable aerobic spores of *Bacillus subtilis* using the Chemscan RDI® and (ii) validate this method of detection in natural waters for indigenous aerobic-spore forming bacteria (ASF). Tests were carried out using two bacterial reference strains and two types of ozonated waters in order to estimate the influence of particles and other micro-organisms on aerobic spores' detection.

4.2.2 Material and Methods

4.2.2.1 Solid-phase Cytometry

The detection and enumeration of spores were performed using the Chemscan RDI® apparatus, described previously (Cools *et al.* 2005; Mignon-Godefroy *et al.* 1997). To summarize, water samples are filtered on a membrane which is then stained with the Chemchrome V6 fluorogenic substrate (carboxyfluorescein diacetate, Chemunex, France). Cells retained on the filter are enumerated within 3 minutes by the laser scanner and the computer distinguishes between labelled cells and autofluorescent particles. A subsequent manual validation is performed using an epifluorescent microscope linked to a computer-driven motorized stage, connected to the ScanRDI. This operation validates the device's resulting categorization and confirms whether or not the fluorescent spots detected are viable micro-organisms. If so, detected events were considered positive responses.

4.2.2.2 *Bacterial Strains*

Two strains were used for the experiments: a suspension of *Bacillus subtilis* spores (ATCC 6633, Difco) and *E. coli* (ATCC 25922, Difco). Spores were produced by following the methodology described by Barbeau *et al.* (2004). *E. coli* cells were obtained in the late stationary growth phase by inoculating a small aliquot of reference strain in 1 ml of TSB and culturing at 35°C for 18 hours. Two 900 mL reactors containing phosphate-buffered waters were spiked with stock solution and maintained at 4°C in a temperature-controlled shaker, set at 180 rpm, during experiments.

4.2.2.3 *Water Samples*

Demand-free buffered water was used for bacteria suspensions by adding MgCl₂ (final concentration 0.41 g/L) and KH₂PO₄ (final concentration 0.04 g/L) to adjust pH to 7.2. Drinking water samples were collected from two water treatment plants in the Montreal area (Qc, Can). In one case, treatment included sand filtration, followed by an ozonation (DW1), while the other included coagulation, filtration and then ozonation (DW2). Waters were sampled in 1-L sterile bottles containing sodium thiosulfate (Fisher Scientific - final concentration, 0.01%) to neutralize any ozone residual. All samples were stored at 4°C in dark conditions prior to analysis.

4.2.2.4 *General Approach*

The procedure combining esterase activity and the Chemscan RDI® was first applied to the detection of *B. subtilis* spores in ultra-pure waters, then in ozonated waters spiked with *B. subtilis* spores, and finally in drinking water samples containing indigenous aerobic-spores.

Experiments were performed using ciprofloxacin hydrochloride (C5075, *US Biological*) in the culture medium (see preliminary results). This quinolone is known to inhibit cell division of Gram-positive and Gram-negative bacteria. This addition was considered in

order to (i) generate cellular elongation and avoid cellular division (ii) maximize signal in terms of fluorescence and elongation (iii) limit extrusion of the fluorochrome by reducing the cell's activity (iv) take into account ASF having a low growth rate. Since each bacterial strain reacts differently to antibiotics, assays were performed to determine ideal conditions for ASF detection. The main objective was to obtain the best results for three discriminating parameters. The first is determined by Chemscan RDI® software and corresponds to the maximum peak intensity (MPI) of detected cells (peak intensity of the dominant peak, expressed in arbitrary fluorescence units). Cells having intact membranes will accumulate the fluorochrome, leading to an increase in fluorescence. The second parameter, also provided by Chemscan, is the mean number of samples (MNS), which is linked to cellular length (elongation). Finally, the visual clarity was considered by the operator in order to distinguish ASF from auto-fluorescent particles and non-specific cells, and validate results from the scan apparatus.

As proposed by Thorsen *et al.* (1992), the type and concentration of antibiotic, the type and concentration of nutrient, temperature, and the duration of incubation should be evaluated when using an antibiotic. In this case, the concentration of ciprofloxacin and the duration of incubation were considered. *E. coli* strain was used to confirm the device's ability to detect dead cells. Drinking water samples were then studied to verify Chemscan RDI®'s ability to detect spores of *B. subtilis* in spiked natural waters and spores of ASF in unspiked natural waters.

4.2.2.5 ASF Enumeration with Chemscan RDI®

The device's calibration was tested daily with fluorescent beads (Standard C3, Chemunex, Ivry-Sur-Seine, France). All reagents were filtered over Nalgene filters (0.22 µm pore size, Nalgene). Water samples were vacuum-filtered on 25 mm (ø), 0.4 µm pore-size black polyester membrane filters (Chemunex, France). Filters were subsequently placed on cellulose pads (ø 25 mm, Chemunex, France) saturated with 500 µL of TSB (BBL, 4311768). The pads and the filters were placed in Petri dishes (ø 47

mm, Millipore) and pasteurized at 75°C for 15 min to kill vegetative cells and activate spore germination. The filters were then placed on pads containing 600 µL of TSB and ciprofloxacin hydrochloride. Antibiotic concentrations tested were 0.05, 0.50, 5.0 and 10.0 µg/mL. The pads and filters were incubated at 35°C for 0, 1, 3 or 5 hours. After incubation, the filters were transferred onto cellulose pads saturated with 600 µL of a label solution (1% Chemchrome V6 in ChemSol B16, both from Chemunex). ChemSol B16 retains carboxyfluorescein only in cells having an intact cytoplasmic membrane (Cools *et al.* 2005). The filter-pad combinations were placed in Petri dishes, sealed with Parafilm and left at 30°C for 60 min in a water bath. The next step was to remove the filters from the pads and place them on top of 25 mm black cellulose membranes (Chemunex) saturated with 100 µL of Chemsol B16. These membranes were then placed in the ChemScan for detection.

Laser scanning results were confirmed using an Olympus BX60 epifluorescent microscope. The motorized stage driven by the cytometer computer allows visualisation of each fluorescent signal validated by the ChemScan RDI (Baudart *et al.* 2002). Signals were considered positive when detected by the scan and validated visually by microscopy. All assays were done in duplicate. Filtration volumes were selected in order to get approximately 10² viable spores of *B. subtilis* per filter.

In order to evaluate method sensitivity and gauge the impact of water quality matrix on the method performance, spores of *B. subtilis* were spiked in 1 and 10 mL of 0.45 µm-filtered (Millipore, HAWG047S1) drinking water samples in order to remove indigenous ASF. Following incubation, CSE/2 was applied as a counterstain. The use of CSE/2 has been shown to stain dead cells and help differentiate between auto-fluorescent particles and viable cells (Catala *et al.* 1999). Finally, indigenous ASF detection was also assessed in drinking water samples with volumes of 1, 10 mL or 50 mL. The counterstain CSE/2 was also used for these experiments.

4.2.2.6 Standard Cultivation Techniques

As a point of reference, spore viability was assessed by a traditional membrane filtration technique (Barbeau *et al.* 1997). Samples were filtered through a 47 mm (ø), 0.45 µm membrane (Millipore, HAWG047S1), placed on pads (Millipore, AP10047S1), saturated with 1.5 ml of TSB (BBL, 4311768), and pasteurized at 75°C for 15 min. Colonies were enumerated after incubation for 22-24 h at 35°C. All samples were analyzed at least in triplicate. Results are expressed in colony-forming units per mL (CFU/mL).

4.2.2.7 Total Cell Counts

Total cell counts were enumerated in duplicate by staining the sample for 2 min with a 0.22-µm filtered acridine orange stock solution (Mallinckrodt, Inc. Paris, France - final concentration 0.01%) filtered on Nalgene filters (0.22 µm pore size, Nalgene). Samples were filtered through ø 25 mm, 0.2 µm pore-size black polycarbonate membrane filters supported by 0.8 µm membrane filters. Cells were enumerated by calculating the average counts of 10 microscopic fields by epifluorescence microscopy (1000X).

4.2.3 Results

*4.2.3.1 Optimal Conditions for the Detection of *B. subtilis* Spores*

Preliminary assays without antibiotics were conducted at the beginning of the project. It was found that direct detection of spores (without pasteurisation nor incubation) by esterase activity was possible. However, the visual detection was not optimal and the fluorescence intensity quite low. Because of spore structure (coat, cortex, and core), an incubation period is necessary to allow the penetration of the viability marker and germination onset. Adding a pasteurisation step (15 min at 75°C) favoured germination as the cell's length was enlarged. It was also observed that pasteurizing the filter gave better results than pasteurizing the water sample in terms of elongation, visual detection,

and fluorescence intensity. Finally, spores' morphology greatly varied according to the duration of incubation following pasteurisation. The morphology varied from small points (1 h) to very long rods (5 h) and it was possible to observe cellular division. In this case, portions of the divided cells did not contain fluorochrome, inducing high standard deviation for fluorescence intensity.

These preliminary experiments supported the use of the DVC technique (Kogure *et al.* 1979). When performing a DVC assay, differentiation between elongated (viable) cells and non elongated cells is important. Use of Chemscan RDI® allows for simultaneous measurement of fluorescence and elongation in order to estimate the physiological activity of spores and their germination into vegetative cells, respectively. Moreover, the visual detection is facilitated by the increased fluorescence and the longer cells.

Figure 4.1a presents the enzymatic activity of *B. subtilis* spores, evaluated by the maximum peak of fluorescence intensity, for various incubation periods and antibiotic concentrations. Data were obtained at incubation times $t = 1, 3$ and 5 h for $0.05, 0.50, 5.0$ and 10.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of ciprofloxacin. Spores labelled immediately after pasteurisation (no incubation) in the absence of ciprofloxacin generated a MPI value of 974 ± 83 (Fig. 4.1a) and a MNS of 11.2 ± 0.6 (Fig. 4.1b). Microscopically, these events were very small, which rendered validation difficult. In the absence of antibiotics, fluorescence intensity increased with incubation time. In the presence of the antibiotic, the fluorescence intensity generally increased by 1 h to 3 h, and then decreased from 3 h to 5 h. However, the 0.50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ concentration was different. The fluorescence intensity increased with incubation time. Spores esterase activity showed the greatest increase for the control sample (no antibiotic) and for a concentration of 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, with MPI after 5 h, respectively, increasing to 9.2 and 7.7 times the MPI for spores labelled after pasteurisation without incubation.

Figure 4.1b presents the mean cell length, evaluated by the MNS value. As for esterase activity, the mean cellular length increased with incubation time in the control sample (from 11.2 ± 0.6 to 49.1 ± 0.9). However, a 40% decrease in cell counts were observed while increasing incubation from 1 to 5 hrs (Fig. 1c). This loss was probably due to the extrusion of the fluorochrome and was also observed for the lowest concentrations of antibiotic, but this was not the case when ciprofloxacin concentrations of $0.5 \mu\text{g/mL}$ or higher were used (Fig. 4.1c).

In general, increasing the concentrations of ciprofloxacin reduced the elongation of cells (Fig 4.1b). A concentration of $0.05 \mu\text{g/mL}$ was not sufficient to inhibit cellular division. Some bacterial cells were elongated, yet division was often observed and fluorescence was generally quite low. For high ciprofloxacin concentrations (5 or $10 \mu\text{g/mL}$), validation by microscope revealed that cells detected by the device were small points or very small rods, which would be quite difficult to differentiate from drinking water particulate matter. Whereas the MNS values appear less sensitive to antibiotic concentrations than fluorescence intensity, the morphology of spores showed great variation, a MNS value of 20 appearing as a threshold value to observe rods. Therefore, optimal results were obtained with a ciprofloxacin concentration of $0.5 \mu\text{g/mL}$. An incubation period of 3 hours was chosen, given that fluorescence intensity, elongation, and visual morphology were sufficiently different from the control sample. For these optimal conditions, almost all cells showed a significant increase in length and no cell division was observed.

This incubation condition was confirmed as optimal by calculating the following ratio:

$$\text{Ratio} = \frac{\text{MPI}_t \times \text{MNS}_t}{\text{MPI}_{t=0} \times \text{MNS}_{t=0}} \quad (8)$$

This incubation condition (i) maximized the ratio of Eq. 8 and (ii) provided valid concentrations (Fig 4.1c). Figure 1d illustrates the calculated ratio (compared to the control sample: pasteurisation without incubation, absence of antibiotic).

The optimal incubation conditions (3h - 0.5 µg/mL) were tested with a mixture of *B. subtilis* spores and *E. coli* vegetative cells. It was noted that *E. coli* vegetative cells exhibited a residual enzymatic activity following pasteurization. For this assay, values of MPI were 5274 ± 969 for *B. subtilis* spores and only 355 ± 15 and *E. coli*. MNS values were 24.1 ± 0.8 and 9.6 ± 0.6 , respectively. The differentiation was obvious between the two organisms. This showed that the pasteurization allowed a significative difference between viable aerobic spores and pasteurized vegetative cells.

Colony counts of *B. subtilis* spores in ultra-pure waters were 111.6 ± 13.2 CFU (n=11, volume filtered = 400 µL). For the optimal incubation conditions, Chemscan RDI® results (141 ± 12.7) gave significantly higher counts ($p < 0.05$) compared to the standard cultivation technique.

4.2.3.2 Method Sensitivity: B. subtilis Spores Spiked in Drinking Water Samples

Method sensitivity was assessed by adding a known concentration (290 CFU/mL) of *B. subtilis* spores to two drinking water samples, described above. The cell characteristics enumerated by the ScanRDI are presented in Table 4.1. Spores were easily detected on the membranes, despite the increase in particulate matter inducing non-specific labelling and background fluorescence, especially for the largest filtered volume tested (10 mL). MPI and MNS values were similar in the control sample and the drinking water samples. However, the counts detected for DW1 (1 and 10 ml) and DW2 (10 ml) appeared to be roughly half the amount of the control sample. It is suggested that the placement of a glass cone on the filtration apparatus when applying CSE/2 may have hidden some areas of the membrane filter. Presence of particulate matter may have also prevented the detection of some *B. subtilis* spores, as the particulate content was highest for DW1-10mL, DW1-1mL, DW2-10 mL and DW2-1mL, respectively.

4.2.3.3 Method Sensitivity for Direct Enumeration of ASF in Drinking Waters

The approach developed was applied for the direct enumeration of indigenous ASF in drinking water samples. Total cell counts (Acridine orange – AO) ranged from 2.5×10^4 /mL (DW2) to 5.1×10^5 /mL (DW1). Indigenous ASF concentrations obtained by solid-phase cytometry were compared to the number of colony forming units from the culture-based method. ASF concentrations were significantly higher using the ChemScan method (3.3. to 550-fold). However, whereas all spores of *B. subtilis* were elongated when spiked in ultra-pure and natural waters, indigenous ASF did not elongate as well. Some of the cells observed were clearly rods, but many of them were too small to be validated visually. Therefore, it is possible that these events were, in fact, auto-fluorescent particles validated during the procedure. Fluorescence intensity and elongation were lower than those measured for the pure strain of *B. subtilis*. For example, the mean MNS value varied from 10.9 to 12.4, while MNS values higher than 20 were found to be minimal for easy discrimination. Filtration of large volumes caused an increase in the number of particles present on the filter. This situation was observed when filtering 50 mL of the DW2 drinking water sample. In this case, only a portion of the membrane was analyzed and the actual concentration was obtained by extrapolation.

4.2.4 Discussion

Over the last decade, there has been increasing interest in implementing rapid and sensitive techniques for the detection of physiological active cells. Amongst them, the DVC assay was first used to detect viable but non culturable (VBNC) cells (Kogure *et al.* 1979). The water sample was incubated in the presence of nalidixic acid (20 µg/mL) and nutrients (250 µg/mL of yeast extract). However, (i) nalidixic acid is only effective on Gram-negative bacteria and (ii) bacterial cells may be resistant to antibiotics (Roszak *et al.* 1987). The method has been improved by using combinations of antibiotics (Guyard *et al.* 1999; Joux *et al.* 2000). This approach has increased (i) the fraction of the marine bacterial population sensitive to the antibiotic, (ii) the inhibition of cellular

division (Joux et Lebaron, 2000). It has also favoured rapid detection of elongated cells (Guyard *et al.* 1999). The addition of glycine, which interferes with the synthesis of peptidoglycan for cell wall formation, followed by cellular lysis, has also been assayed in a quantitative DVC method (Yokomaku *et al.* 2000) but must be adapted to each ecosystem.

In this study, the use of TSB favoured spore germination. Using esterase activity to quantify early events during the germination of *Bacillus anthracis* spores, Ferencio *et al.* (2004) showed that the combination of germinants (amino acids, purine ribosides) induced higher fluorescence than germinants alone. TSB is a complex substrate, which probably includes several compounds favourable to spore germination.

The choice of ciprofloxacin hydrochloride and the range of concentrations used for detecting ASF in drinking water were based on previous studies. Gram-positive marine isolates have been shown to be sensitive to this antibiotic (Joux et LeBaron, 1997). The concentration of ciprofloxacin which gave the optimal percentage of enlarged cells of *Bacillus subtilis* vegetative cells was found to be 10 µg/mL (Servis *et al.* 1995). However, only one incubation period was used (24 h) ; results showed high standard deviations and no lower antibiotic concentrations were studied. In another study, the minimal inhibitory concentration (MIC) determined for *B. subtilis* (ATCC 6633) by the broth dilution method was 0.03 µg/mL, while no bactericidal effect was detected until a concentration of 3 µg/mL (Berlanga *et al.* 2004) was reached. Concentrations of 0.05 µg/ml and 10 µg/mL were therefore considered as boundaries to evaluate the elongation of *B. subtilis* in this study.

An optimal concentration of antibiotics will inhibit the DNA-gyrase (required for DNA replication and transcription) without interfering with other metabolic activities. Bacteria sensitive to the antibiotic elongate during incubation since other cellular components (RNA, proteins), are not affected (Coallier *et al.* 1994). However, higher concentrations

of ciprofloxacin may interfere with several metabolic activities, as was observed when concentrations of 5 and 10 µg/mL were used. It was also necessary to study different incubation periods, since cellular elongation depends on the growth rate of the strain. A long incubation period may cause a decrease in antibiotic activity and a subsequent cellular division, whereas cells having a low growth rate will not elongate using a short incubation. For instance, a concentration of 1 µg/mL of ciprofloxacin for 7 hours of incubation produced a maximal elongation of *Listeria monocytogenes* (Besnard *et al.* 2000). Enlarged cells were found using 0.5 µg/mL for 6 h of incubation, 5 µg/mL for 24 h and 10 µg/mL for 24 h, respectively, for *L. plantarum*, *M. varians* and *E. faecalis* (Barcina *et al.* 1995) and 10 µg/mL for both *S. aureus* and *E. faecalis* after 6 hours (Regnault *et al.* 2000). In this study, the best compromise was to use a 3 hour-incubation period with a 0.5 µg/mL concentration of ciprofloxacin in the culture medium.

Under these optimal conditions of incubation, the increase in fluorescence (determined by the MPI, *i.e.* the esterase activity) of *B. subtilis* spores was approximatively proportional to the incubation period. Those results are also observed when fluorogenic substrates are used to detect airborne actinomycetes spores (Gazenko *et al.* 1998). Moreover, the presence of ciprofloxacin did not interfere with detection of esterase activity, which is also in agreement with results obtained by D'Haese *et al.* (2000). Five antibacterial compounds inhibiting bacterial protein synthesis, like ciprofloxacin, were evaluated to examine if their presence could affect the viability labelling of *E. coli* cells. In the presence of nutrients, antibiotics inhibited multiplication, but not viability.

During this study, large standard deviations of fluorescence activity were calculated for *B. subtilis* in the absence of antibiotics. It is possible that the physiological activity of *B. subtilis* led to an extrusion of carboxyfluorescein (cF), as this mechanism has been already observed for *Saccharomyces cerevisiae* (Breeuwer *et al.* 1994) and *Lactococcus lactis* (Molenaar *et al.* 1992) while using a cF derivative. This mechanism will cause a progressive loss of fluorescent signal and a decrease in viable cell counts. It is

established that an efflux-mediated resistance to fluoroquinolones exists in Gram-positive bacteria (Poole, 2000) and especially in *Bacillus subtilis* (Neyfakh *et al.* 1991).

The combination of solid-phase cytometry, esterase activity measurement and DVC assay may provide an interesting method to study the physiological state of viable cells, keeping in mind that determining elongation by epifluorescent microscopy is a tedious process and can be questioned. The optimal conditions for detection may be easily deducted by studying parameters automatically calculated by the solid-phase cytometer. However, it is possible that detecting a stained cell with esterase activity does not mean that the cell is viable, but rather that it does not have a severely damaged membrane and contains esterase activity (Breeuwer *et al.* 1994). This description is confirmed in this study by the detection of *E. coli* cells after pasteurization (without CSE/2). Moreover, the intensity of fluorescence depends on the uptake of the fluorochrome (passive transport), the efficiency of labelling, the temperature, the esterase activity, and the intracellular pH (Breeuwer *et al.* 1995).

In natural waters, several authors (Catala *et al.* 1999; Parthuisot *et al.* 2000; Reynolds et Fricker, 1999) observed higher counts of Total Viable Counts using ChemScan results in conjunction with esterase activity, as opposed to the standard plate count. In the current project, ASF concentrations were also much higher than the results obtained using the culture technique. It is unclear whether this situation is due to an improvement in sensitivity or to an overestimation caused by the presence of auto-fluorescent particles. Even for volumes of drinking water samples (coagulated-filtered-ozonated) as low as 10 mL, particles limit optimal visualisation due to the presence of a background of fluorescence, for example. Improving incubation conditions might be considered to differentiate these two phenomena. Generally, the incubation period with antibiotics must be longer for environmental strains than for strains grown in the laboratory (Coallier *et al.* 1994). When this project was initiated, it was hypothesized that this would not be the case for indigenous ASF due to their state of dormancy. However, it

appears that it is also the case for environmental ASF, since their mean cell lengths (MNS) and fluorescence (MPI) were significantly lower than the reference strain of *B. subtilis* spores. An evaluation of different concentrations of TSB and incubation conditions may be considered as another potential improvement.

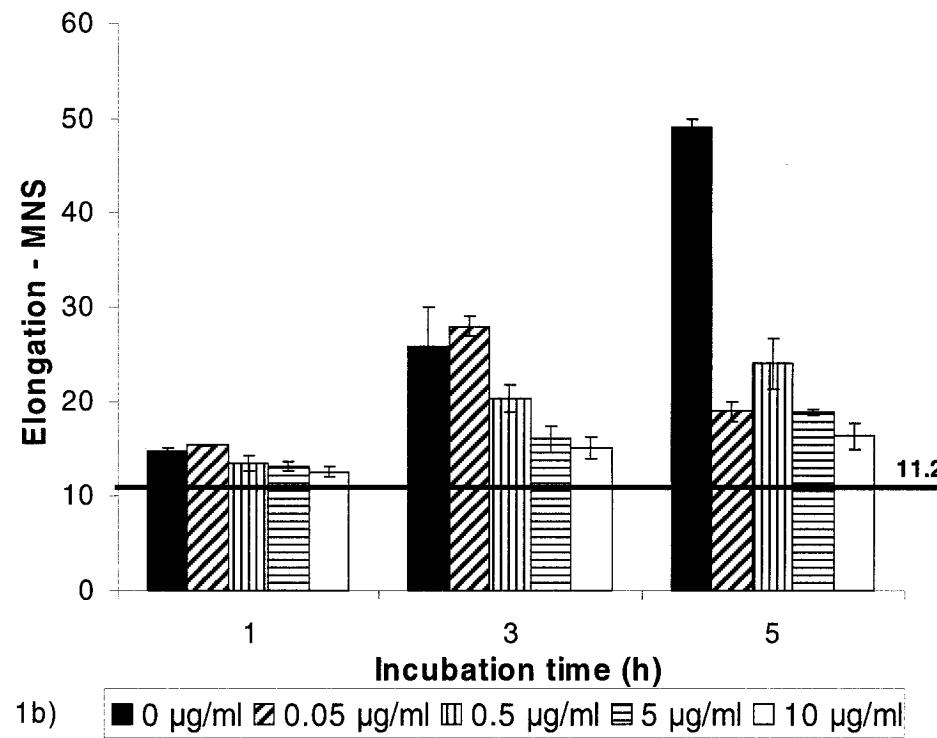
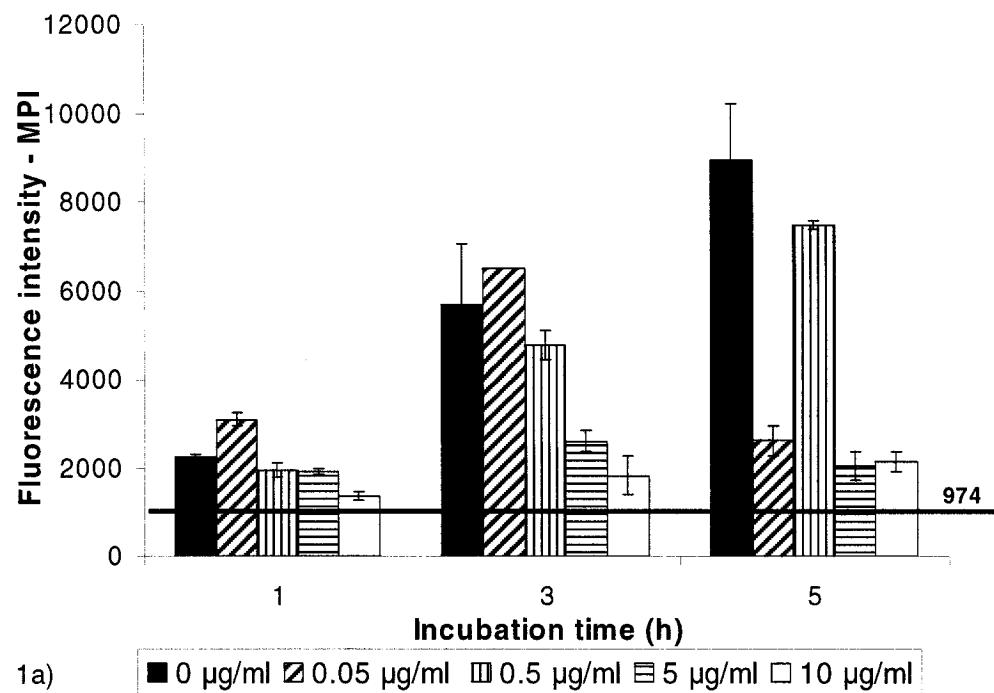
The method sensitivity is limited by the filtration capacity of the membrane (Aurell *et al.* 2004) - about 100 mL - and dilution is needed if the sample contains a large quantity of particles. These constraints limit the detection of ASF in natural waters. Results obtained show that ASF detection using solid-phase cytometry is difficult in natural waters. The concentrations measured varied with the volume, a higher filtered volume yielding lower counts. The negative impact of particle accumulation on recovery has been reported for standard culture techniques (Cartier *et al.* 2006).

The sensitivity of solid-phase cytometry has been successfully applied to the pharmaceutical industry, where control of microbiological water quality requires the detection of a few cell counts in high-quality waters (Brailsford, 2000). However, ASF are a useful indicator of drinking water treatment performance and therefore, improving their detection using solid phase cytometry is a promising alternative.

4.2.5 Conclusion

This study evaluated the use of pasteurization, esterase activity, and solid phase cytometry to detect *B. subtilis* or indigenous aerobic spores. Spores germinate following pasteurization and their esterase activity can be detected using a combination of viability labelling and solid-phase cytometry. Pasteurisation kills vegetative cells but does not eliminate esterase activity since dead *E. coli* cells (confirmed by standard culture) exhibited a small residual esterase activity. Pasteurization also improved spore detection. An optimal concentration of ciprofloxacin hydrochloride (0.50 µg/L) and incubation period (3 h) are proposed. For this concentration, fluorescence intensity and elongation increased with the incubation period in the range of 1h to 5h. Visual microscopic

validation of active spores of *B. subtilis* was obvious but the presence of fluorescent particles in natural waters interferes with the validation of active ASF. The use of solid-phase cytometry is a rapid technique to enumerate viable cells, but further investigation should be performed to improve method sensitivity for the detection of indigenous ASF in drinking water.



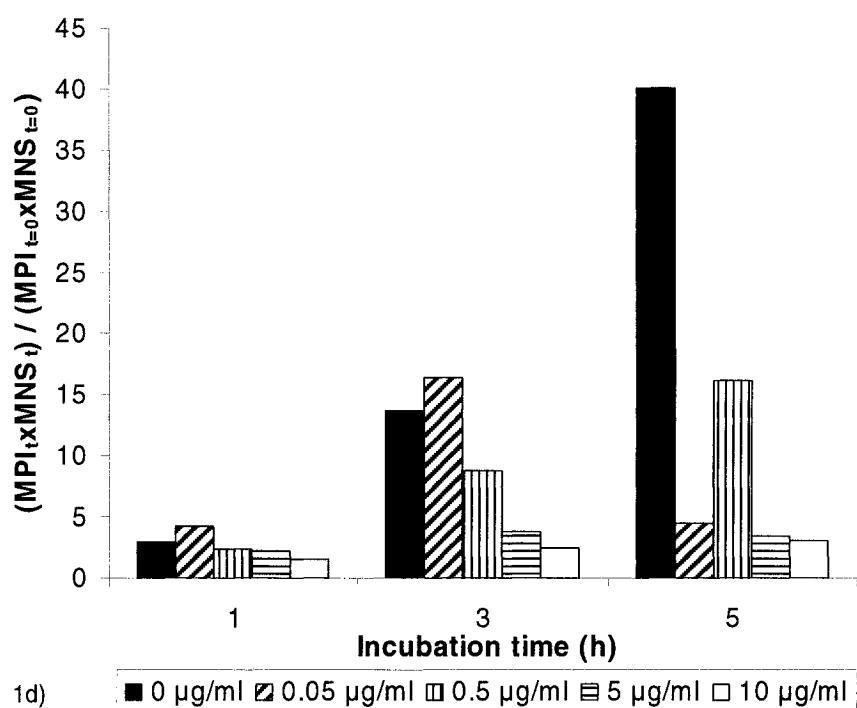
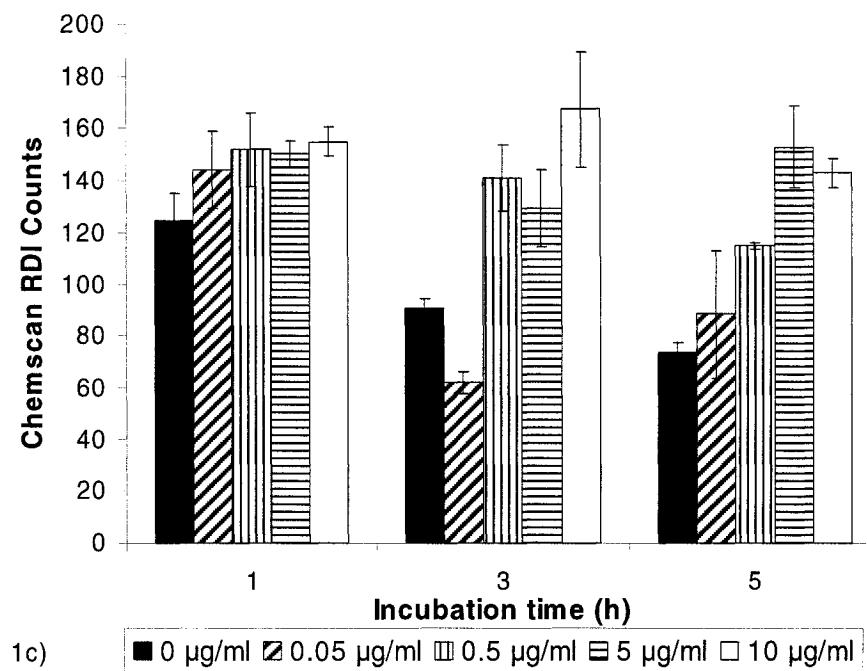


Figure 4-1 : a) Enzymatic activities of *B. subtilis* spores, evaluated by fluorescence intensity. b) Elongation of *B. subtilis* spores. Black lines represent values for the control sample - no antibiotics, with pasteurization, but without incubation. c) Counts of *B. subtilis* spores by the Chemscan RDI®. All error bars indicate the standard deviation from duplicate samples. d) Fluorescence ratio (MPI) by elongation (MNS) of samples (S) compared to the same ratio for the control sample (CS)

Tableau 4.1 : Influence of water quality on the detection of *B. subtilis* spores spiked in drinking water and detected by solid phase cytometry

Type of water	Sampling date (day/mo/yr)	Volume Filtered (mL)	Cells detected by the solid-phase cytometric method - mean (SD)		
			Counts	MPI	MNS
DW1	16/02/06	1	67.5 (33.2)	4438 (511)	20.0 (3.4)
DW1	16/02/06	10	61 (22.6)	4766 (187)	22.8 (0.2)
DW2	21/02/06	1	131 (17)	5049 (271)	23.8 (3.5)
DW2	21/02/06	10	68 (1.4)	4151 (845)	19.8 (0.7)
CS	16-21/02/06	0.4	126 (31.1)	4786 (754)	24.1 (0)

Assays were done in duplicate

Standard deviations were calculated from duplicate membrane counts

Note:

DW1: surface water 1, DW2: surface water 2

CS: Control Sample, SD: standard deviation

Tableau 4.2 : Detection of indigenous spores in drinking water by solid phase cytometry

Type of water	Sampling date (day/mo/yr)	Volume filtered (mL)	Cells detected by the solid-phase cytometric method - mean (SD)			Colony counts CFU/100 mL	MF AODC Total cells (x10 ⁶)
			Length (MNS)	Fluorescence (MPI)	Concentration (Counts/100mL)		
DW1	16/02/06	1	12.4 (2.6)	982.2 (341)	3700 (4600)		
DW1	16/02/06	10	12.1 (2.1)	1107 (163)	620 (78)	173 (4)	50.9 (9)
DW2	21/02/06	1	10.9 (1.7)	602 (188)	4400 (4200)		
DW2	21/02/06	50	11.1 (1.5)	586 (23)	584 (30)	8 (4)	2.5 (0.9)

Assays were done in duplicate

Standard deviations were calculated from duplicate membrane counts

Note:

DW1: drinking water 1

MF: membrane filtration

DW2: drinking water 2

AODC: Acridine Orange Direct Count

SD: standard deviation

References

- Aurell, H., P. Catala, P. Farge, F. Wallet, M. Le Brun, J. H. Helbig, S. Jarraud, and P. Lebaron. 2004. Rapid Detection and Enumeration of *Legionella pneumophila* in Hot Water Systems by Solid-Phase Cytometry. *Appl. Env. Microbiol.* 70:1651-1657.
- Barbeau, B., L. Boulos, R. Desjardins, J. Coallier, M. Prévost, and D. Duchesne. 1997. A modified method for the enumeration of aerobic spore-forming bacteria. *Can. J. Microbiol.* 43:976-980.
- Barbeau, B., L. Boulos, R. Desjardins, J. Coallier, and M. Prévost. 1999. Examining the use of aerobic spore-forming bacteria to assess the efficiency of chlorination. *Wat. Res.* 33:2941-2948.
- Barbeau, B., D. Huffman, C. Mysore, R. Desjardins, and M. Prévost. 2004. Examination of discrete and confounding effects of water quality parameters during the inactivation of MS2 phages and *Bacillus subtilis* spores with free chlorine. *J. Env. Eng. Sci.* 3:255-268.
- Barcina, I., I. Arana, P. Santorum, J. Iribarri, and L. Egea. 1995. Direct viable count of Gram-positive and Gram-negative bacteria using ciprofloxacin as inhibitor of cellular division. *J. Microbiol. Methods* 22:139-150.
- Baudart, J., J. Coallier, P. Laurent, and M. Prévost. 2002. Rapid and sensitive enumeration of viable diluted cells of members of the family Enterobacteriaceae in freshwater and drinking water. *Appl. Env. Microbiol.* 68:5057-5063.
- Berlanga, M., M. T. Montero, J. Hernandez-Borrell, and M. Vinas. 2004. Influence of the cell wall on ciprofloxacin susceptibility in selected wild-type Gram-negative and Gram-positive bacteria. *International Journal of Antimicrobial Agents* 23:627-630.
- Besnard, V., M. Federighi, and J. M. Cappelier. 2000. Development of a direct viable count procedure for the investigation of VBNC state in *Listeria monocytogenes*.

- Letters in Appl. Microbiol.* 31:77-81.
- Brailsford, M. 2000. One microbial analyser - four critical drinking water tests. *Water21* 44-46.
- Breeuwer, P., J.-L. Drocourt, F. M. Rombouts, and T. Abee. 1994. Energy-dependent, Carrier-Mediated Extrusion of Carboxyfluorescein from *Saccharomyces cerevisiae* Allows Rapid Assessment of Cell Viability by Flow Cytometry. *Appl. Env. Microbiol.* 60:1467-1472.
- Breeuwer, P., J.-L. Drocourt, N. Bunschoten, M. H. Zwietering, F. M. Rombouts, and T. Abee. 1995. Characterization of Uptake and Hydrolysis of Fluorescein Diacetate and Carboxyfluorescein Diacetate by Intracellular Esterases in *Saccharomyces cerevisiae*, Which Result in Accumulation of Fluorescent Product. *Appl. Env. Microbiol.* 61:1614-1619.
- Broadaway, S. C., S. A. Barton, and B. H. Pyle. 2003. Rapid staining and enumeration of small numbers of total bacteria in water by solid-phase laser cytometry. *Appl. Env. Microbiol.* 69:4272-4273.
- Cartier, C., M. Prévost, M.-C. Besner, and B. Barbeau. 2006. Optimising the detection of aerobic spore-formers in environmental samples. Submitted.
- Catala, P., N. Parthuisot, L. Bernard, J. Baudart, K. Lemarchand, and P. Lebaron. 1999. Effectiveness of CSE to counterstain particles and dead bacterial cells with permeabilised membranes: application to viability assessment in waters. *FEMS Microbiol. Letters* 178 :219-226.
- Coallier, J. M., M. Prévost, A. Rompré, and D. Duchesne. 1994. The optimization and application of two direct viable count methods for bacteria in distributed drinking water. *Can. J. Microbiol.* 40:830-836.
- Cools, I., E. D'Haese, M. Uyttendaele, E. Storms, H. J. Nelis, and J. Debevere. 2005. Solid phase cytometry as a tool to detect viable but non culturable cells of *Campylobacter jejuni*. *J. Microbiol. Methods* 63:107-114.

- Craik, S. A., D. W. Smith, M. Belosevic, and M. Chandrakanth. 2002. Use of bacillus subtilis spores as model micro-organisms for ozonation of Cryptosporidium parvum in drinking water treatment. *J. Env. Eng. & Sci.* 1:173-186.
- D'Haese, E. and H. J. Nelis. 2000. Effect of antibiotics on viability staining of *Escherichia coli* in solid phase cytometry. *J. Appl. Microbiol.* 89:778-784.
- Dunn, R. and Button, K. Using biological indicators to evaluate treatment process efficiency. 2001. Nashville, Tennessee, USA, American Water Works Association - Water Quality Technology Conference.
- Ferencko, L., M. A. Cote, and B. Rotman. 2004. Esterase activity as a novel parameter of spore germination in *Bacillus anthracis*. *Biochem. and Biophys. Res. Comm.* 319:854-858.
- Galofré, B., S. Israel, J. Dellunde, and F. Ribas. 2004. Aerobic bacterial spores as process indicators for protozoa cysts in water treatment plants. *Wat. Sci. & Technol.* 50:165-172.
- Gazenko, S. V., T. A. Reponen, S. A. Grinshpun, and K. Willeke. 1998. Analysis of Airborne Actinomycete Spores with Fluorogenic Substrates. *Appl. Env. Microbiol.* 64:4410-4415.
- Geldreich, E. E., M. J. Allen, and R. H. Taylor. 1978. Interferences to coliform detection in potable water supplies, p. 13-20. In Evaluation of the microbiology standards for drinking water. C.W. Hendricks (ed.) United States Environmental Protection Agency, Washington, DC, USA.
- Guyard, S., P. Mary, C. Defives, and J. P. Hornez. 1999. Enumeration and characterization of bacteria in mineral water by improved direct viable count method. *J. Appl. Microbiol.* 86:841-850.
- Herson, D. S. and H. T. Victoreen. 1980. United States Environmental Protection Agency. Municipal Environmental Research Laboratory. Office of Research and Development, Cincinnati, Ohio.

- Huertas, A., B. Barbeau, C. Desjardins, A. Galarza, M. A. Figueroa, and G. A. Toranzos. 2003. Evaluation of *Bacillus subtilis* and coliphage MS2 as indicators of advanced water treatment efficiency. *Wat. Sci. & Technol.* 47:255-259.
- Joux, F. and P. LeBaron. 1997. Ecological Implications of an Improved Direct Viable Count Method for Aquatic Bacteria. *Appl. Env. Microbiol.* 63:3643-3647.
- Joux, F. and P. Lebaron. 2000. Use of fluorescent probes to assess physiological functions of bacteria at single-cell level. *Microbes and Infection* 2:1523-1535.
- Kawamura, K., M. Kaneko, T. Hirata, and K. Taguchi. 1986. Microbial indicators for the efficiency of disinfection processes. *Wat. Sci. & Technol.* 18:175-184.
- Kogure, K., U. Simidu, and N. Taga. 1979. A tentative direct microscopic method for counting living marine bacteria. *Can. J. Microbiol.* 25:415-420.
- LeChevallier, M. W., T. M. Evans, and R. J. Seidler. 1981. Effect of turbidity on chlorination efficiency and bacterial persistence in drinking water. *Appl. Env. Microbiol.* 42:159-167.
- Lemarchand, K., N. Parthuisot, P. Catala, and P. Lebaron. 2001. Comparative assessment of epifluorescence microscopy, flow cytometry and solid-phase cytometry used in the enumeration of specific bacteria in water. *Aquatic Microbial Ecology* 25:301-309.
- Lisle, J. T., M. A. Hamilton, A. R. Willse, and G. A. McFeters. 2004. Comparison of fluorescence microscopy and solid-phase cytometry methods for counting bacteria in water. *Appl. Env. Microbiol.* 70:5343-5348.
- Mazoua, S. and E. Chauveheid. 2005. Aerobic spore-forming bacteria for assessing quality of drinking water produced from surface water. *Wat. Res.* 39:5186-5198.
- Mignon-Godefroy, K., J. G. Guillet, and C. Butor. 1997. Solid-phase cytometry for detection of rare events. *Cytometry* 27:336-344.
- Molenaar, D., H. Bolhuis, T. Abee, B. Poolman, and W. N. Konings. 1992. The Efflux

- of a Fluorescent Probe Is Catalyzed by an ATP-Driven Extrusion System in *Lactococcus lactis*. *J. Bact.* 174:3118-3124.
- Neyfakh, A. A., V. E. Bidnenko, and L. B. Chen. 1991. Efflux-mediated multidrug resistance in *Bacillus subtilis*: Similarities and dissimilarities with the mammalian system. *Biochemistry* 88:4781-4785.
- Nieminski, E. C. 1999. Using microbial indicators in optimization of treatment plant performance. Proceedings of the 1999 Rapid Microbiological Monitoring Methods, Feb 23-Feb 24 1999: *Water Supply* 17:95-107.
- Parthuisot, N., P. Catala, K. Lemarchand, J. Baudart, and P. Lebaron. 2000. Evaluation of ChemChrom V6 for bacterial viability assessment in waters. *J. Appl. Microbiol.* 89:370-380.
- Poole, K. 2000. Efflux-Mediated Resistance to Fluoroquinolones in Gram-Positive Bacteria and the Mycobacteria. *Antimicrob. Agents and Chemother.* 44:2595-2599.
- Prescott, L. M., J. P. Harley, and D. Klein. 2003. Microbiologie. De Boeck - Wesmael SA.
- Regnault, B., S. Martin-Delautre, and P. A.D.Grimont. 2000. Problems associated with the direct viable count procedure applied to gram-positive bacteria. *Intern. J. Food Microbiol.* 55:281-284.
- Reynolds, D. T., E. J. Fricker, D. Purdy, and C. R. Fricker. 1997. Development of a rapid method for the enumeration of bacteria in potable water. *Wat. Sci. & Technol.* 35:433-436.
- Reynolds, D. T. and C. R. Fricker. 1999. Application of laser scanning for the rapid and automated detection of bacteria in water samples. *J. Appl. Microbiol.* 86:785-795.
- Reynolds, D. T., R. B. Slade, N. J. Sykes, A. Jonas, and C. R. Fricker. 1999. Detection of Cryptosporidium oocysts in water: techniques for generating precise recovery data. *J. Appl. Microbiol.* 87:804-813.

- Rice, E. W., Fox, K. R., Miltner, R. J., Lytle, D. A., and Johnson, C. H. 1994. A microbial surrogate for evaluating treatment efficiency. Water Quality Technology Conference - American Water Works Association.
- Rice, E. W., K. R. Fox, R. J. Miltner, D. A. Lytle, and C. H. Johnson. 1996. Evaluating plant performance with endospores. *J. Am. Wat. Wks Assoc.* 88:122-130.
- Rompré, A., P. Servais, J. Baudart, M.-A. de Roubin, and P. Laurent. 2002. Detection and enumeration of coliforms in drinking water: current methods and emerging approaches. *J. Microbiol. Methods* 49 :31-54.
- Roszak, D. B. and R. R. Colwell. 1987. Survival strategies of bacteria in the natural environment. *Microbiol. Reviews* 51:365-379.
- Rushton, P., B. M. Place, and N. F. Lightfoot. 2000. An evaluation of a laser scanning device for the detection of *Cryptosporidium parvum* in treated water samples. *Letters in Appl. Microbiol.* 30:303-307.
- Servis, N. A., S. Nichols, and J. C. Adams. 1995. Development of a direct viable count procedure for some Gram-positive bacteria. *Letters in Appl. Microbiol.* 20:237-239.
- Thorsen, B. T., O. Enger, S. Norland, and K. A. Hoff. 1992. Long-Term Starvation Survival of *Yersinia ruckeri* at Different Salinities Studied by Microscopical and Flow Cytometric Methods. *Appl. Env. Microbiol.* 58:1624-1628.
- Van Poucke, S. and H. Nelis. 2000. A 210-min solid phase cytometry test for the enumeration of *Escherichia coli* in drinking water. *J. Appl. Microbiol.* 89:390-396.
- Yokomaku, D., D. Yamaguchi, and M. Nasu. 2000. Improved direct viable count procedure for quantitative estimation of bacterial viability in freshwater environments. *Appl. Env. Microbiol.* 66:5544-5548.
- Zanelli, F., B. Compagnon, J. C. Joret, and M. R. de Roubin. 2000. Enumeration of *Cryptosporidium* oocysts from surface water concentrates by laser-scanning cytometry. *Wat. Sci. & Technol.* 41:197-202.

CHAPITRE 5 VALIDATION DE LA PERFORMANCE DES PROCÉDÉS DE DÉSINFECTION PAR BIODOSIMÉTRIE

5.1 INTRODUCTION

Les essais effectués par cytométrie de flux en phase solide ont montré la nécessité de poursuivre les investigations afin d'optimiser la détection des spores aérobies en eaux naturelles par le biais de cette méthode. Ainsi, la mise en œuvre d'une technique de concentration des microorganismes par filtration membranaire frontale a été envisagée. L'analyse routinière des bactéries dans le domaine de l'eau potable est généralement réalisée pour de faibles volumes d'eau, de l'ordre de quelques centaines de millilitres. Or, la technique de concentration proposée requiert l'utilisation de grands volumes d'échantillons, tel que précisé au chapitre 3, et l'usage de cette pratique nécessite une étude préalable de l'influence du volume filtré sur le décompte de spores. En effet, un volume filtré plus important suggère une interférence accrue du gâteau de filtration vis-à-vis du dénombrement des microorganismes.

La turbidité, dont l'analyse permet de mesurer la diffusion de la lumière entraînée par la présence de particules, peut être de trois ordres différents : (i) inorganique (limon, argile, précipitants naturels), (ii) organique (décomposition de la matière végétale, substances humiques), (iii) sous forme d'organismes biologiques (Santé Canada, 2004). De manière générale, les microorganismes ont tendance à s'adsorber sur les particules de turbidité plutôt que de rester en suspension libre dans l'eau (Langlais *et al.* 1991) et les particules organiques offrent une protection vis-à-vis de la désinfection (LeChevallier *et al.* 1981). En particulier, la turbidité peut interférer lors de l'énumération bactérienne ou virale en concentrant au même endroit un nombre important de microorganismes qui seront par exemple perçus comme une seule unité formatrice de colonie lors du dénombrement sur le milieu de culture.

Les causes de l’interférence de la turbidité sur le dénombrement microbien sont nombreuses : (i) les microorganismes peuvent se retrouver inclus dans des particules ou adsorbés à leur surface et ne pas croître sur le milieu de culture, sous-évaluant le nombre réel (Santé Canada, 2003), (ii) la croissance peut être inhibée par des organismes compétiteurs, (iii) les particules de turbidité peuvent se loger dans les pores de membrane et empêcher la détection des organismes en diminuant la surface disponible pour leur croissance (LeChevallier *et al.* 1981). Un lien entre la baisse de la turbidité du filtrat et la baisse du nombre d’algues et de bactéries (Logsdon, 1982) ainsi que la réduction des spores aérobies qui correspondait de près à celle de la turbidité en réaction au dosage de coagulant (Rice *et al.* 1996) montrent la relation liant microorganismes et particules de turbidité.

Une augmentation de la turbidité a entraîné une hausse du pourcentage d’échantillons ne montrant pas de croissance de coliformes totaux (LeChevallier *et al.* 1981) et d’autre part la nature de la matière en suspension et l’épaisseur des dépôts superficiels peuvent empêcher l’utilisation de la filtration membranaire. Concernant les interférences microbiennes, une concentration de BHAA de 500 UFC/ml a diminué la détection des coliformes (Geldreich *et al.* 1978) mais Herson et Victoreen (1980) ont montré que les bactéries non coliformes n’ont pas empêché leur croissance mais en ont sérieusement limité la détection. Dans ce cas, les auteurs concluent que l’inhibition, si elle se manifestait, proviendrait de la présence d’autres microorganismes et non des matières en suspension (MES) présentes dans l’échantillon. Ceci est d’un intérêt particulier puisque la détection des spores aérobies nécessite une pasteurisation qui élimine la possibilité de croissance des cellules végétatives.

5.2 MISE EN ŒUVRE DE LA TECHNIQUE DE CONCENTRATION

5.2.1 Concentration avec des Swinnex

Un pilote de filtration composé de cinq *Swinnex* en parallèle (bases de filtration ajustées pour la réalisation d'essais sous pression) a été développé pour étudier l'influence du volume filtré. Ce pilote permettait notamment (i) l'élimination de la manutention de grands volumes d'eau à des fins d'analyse au laboratoire, (ii) l'obtention aisée de replicats pour le volume d'eau étudié, (iii) la maximisation du volume de filtration. En effet, une diminution du débit de filtration a une influence sur la perte de charge et donc sur le volume maximal filtrable. Un faible débit permet la filtration d'un volume plus important, ainsi les essais étaient conduits à 200 ml/min, et les spores aérobies ont été mesurées par la technique de filtration membranaire (Barbeau *et al.* 1997). À terme, ce pilote aurait permis de déterminer le volume d'eau maximal filtrable pour lequel aucune influence sur le décompte de spores n'aurait été constatée, pour le type d'eau considéré.

Cependant, cette approche a été abandonnée suite à l'observation des membranes qui présentaient une distribution du volume filtré, rendant difficile l'usage des *Swinnex* en vue d'une étude microbiologique. La figure 5.1 présente l'allure des boîtes de Pétri.

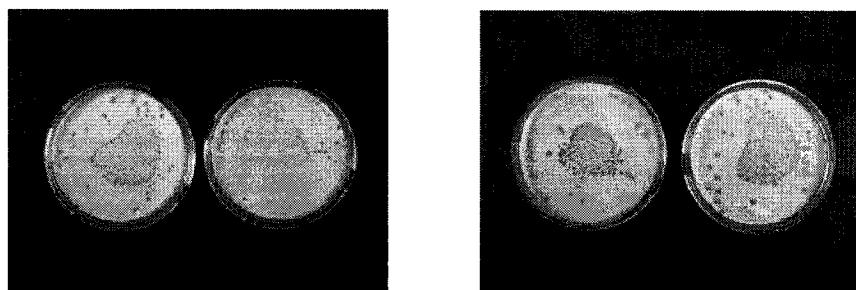


Figure 5-1 : Boîtes de Pétri obtenues par filtration sous pression avec *Swinnex*

Au cours des deux essais de filtration réalisés avec le pilote, la distribution du volume sur les membranes filtrantes a entraîné des comptes de spores sous pression inférieurs de manière significative à ceux obtenus par filtration sous vide, pour des volumes d'eau filtrée identiques (annexe C - voir les conditions d'essai).

5.2.2 Étude de l'impact du volume filtré

Les résultats précédents ont conduit à étudier l'influence du volume filtré sur le décompte des spores par filtration sous vide, au laboratoire. Le tableau 5.1 présente le protocole expérimental mené, l'objectif étant d'obtenir au moins vingt UFC (Unités Formatrices de Colonies) par volume étudié afin que les dénombrements soient statistiquement fiables. En effet, en supposant que les microorganismes sont distribués selon une loi de Poisson dans un échantillon d'eau, le pourcentage d'erreur sur la mesure est de 44% lorsque vingt événements sont détectés. Neuf échantillonnages ont été réalisés, deux types d'eau étudiés (eau filtrée et eau ozonée de l'usine DesBaillets) et finalement treize essais ont été réalisés. Les volumes filtrés sont précisés pour chaque date d'échantillonnage et chaque type d'eau ainsi que le nombre de réplicats pour chaque volume (entre parenthèses).

Tableau 5.1 : Protocole expérimental

Date	Type d'eau	Volume filtré (ml)
03/06/05	Eau filtrée	100 (3) - 200 (3) - 400 (3) - 1000 (3) - 2000 (3)
	Eau ozonée	100 (19) - 200 (10) - 400 (5) - 800 (3) - 1000 (3)
13/06/05	Eau filtrée	100 (5) - 200 (3) - 500 (3) - 1000 (3) - 2000 (3)
	Eau ozonée	100 (10) - 200 (3) - 500 (3) - 1000 (3) - 2000 (3)
23/06/05	Eau ozonée	100 (5) - 200 (5) - 500 (5) - 1000 (5) - 2000 (5) - 4000 (2)
04/07/05	Eau filtrée	100 (10) - 200 (10) - 500 (5) - 1000 (5) - 2000 (4)
	Eau ozonée	100 (20) - 200 (20) - 500 (10) - 1000 (5) - 2000 (3) - 4000 (3)
12/07/05	Eau ozonée	100 (10) - 200 (10) - 500 (5) - 1000 (5) - 2000 (3) - 4000 (3)
14/07/05	Eau ozonée	100 (10) - 200 (10) - 500 (5) - 1000 (3) - 2000 (3) - 4000 (3)
15/08/05	Eau ozonée	100 (5) - 200 (5) - 500 (5) - 1000 (3) - 2000 (3)
29/08/05	Eau filtrée	100 (10) - 200 (5) - 500 (5) - 1000 (3) - 2000 (2)
	Eau ozonée	100 (10) - 200 (10) - 500 (5) - 1000 (5) - 2000 (3) - 4000 (3)
01/09/05	Eau ozonée	100 (10) - 1000 (3) - 2000 (3) - 4000 (3)

L'étude statistique (ANOVA) des données a montré que l'influence du volume filtré sur la concentration normalisée du compte de spores était liée à la date d'échantillonnage (annexe D). La diminution de la quantité de spores pour des volumes importants variait selon la qualité d'eau, lors de la journée d'étude. Une caractérisation précise des particules (concentration, distribution de taille) permettrait de décrire adéquatement le type d'eau. Si la filtration de volumes importants d'échantillons est envisagée à des fins de concentration, une étude préliminaire de l'influence de la qualité de l'eau sur le décompte des spores aérobies serait requise.

5.2.3 Concentration avec un filtreur

En vue d'augmenter le volume filtrable, des essais ont été réalisés avec un filtreur (Millipore) de diamètre 150 mm. Un système de filtration a été développé et comprenait une pompe (Masterflex), le tubing adapté (LS17, Masterflex), un filtreur et un cylindre en aval pour mesurer le volume filtré. Le débit de filtration était de 2 Lpm. La méthode de détection des spores aérobies développée a été basée sur la méthode de Barbeau *et al.* (1997) et comprenait des filtres de 142 mm de diamètre ainsi que des boîtes de Pétri contenant 25 ml de TSA (Triptyc Soy Agar). Des études sur ce type de système ont permis la filtration de plus de 500 litres d'eau naturelle pour un filtre membranaire de 142 mm et un débit de 100 Lph (1,67 Lpm) (Hijnen *et al.* 2000b).

Deux tests préliminaires ont été menés sur l'eau ozonée de l'usine DesBaillets afin de comparer la technique traditionnelle de détection des spores aérobies et la méthode de concentration par filtreur. Les résultats du 14-07-05 sont présentés à la figure 5.2 et permettent de conclure sur la correspondance entre les 2 méthodes d'analyse (Test de Student, $p > 0.05$). De plus, l'essai a permis d'observer la corrélation par rapport aux surfaces mises en jeu et à l'influence éventuelle du volume filtré. Ainsi, alors que des comptes de $2,7 \pm 1,9$ UFC et $20,3 \pm 2,5$ UFC sont obtenus par la filtration conventionnelle pour 100 ml et 1 L respectivement, $22 \pm 9,9$ UFC (1 L) et 215 UFC sont dénombrées pour 1 L et 10 L respectivement, avec le filtreur.

Ces premiers résultats ont été confirmés par un deuxième essai (01-09-05) pour lequel la concentration de spores de BSA a été de $9,3 \pm 3,2$ UFC pour 1 L d'eau ozonée (47 mm) et $99,5 \pm 27,6$ UFC pour 10 L (142 mm). Du reste, la réalisation d'un essai avec le filtreur (6,8 \$) est plus économique que l'usage de 10 filtres de 47 mm (8,3 \$).

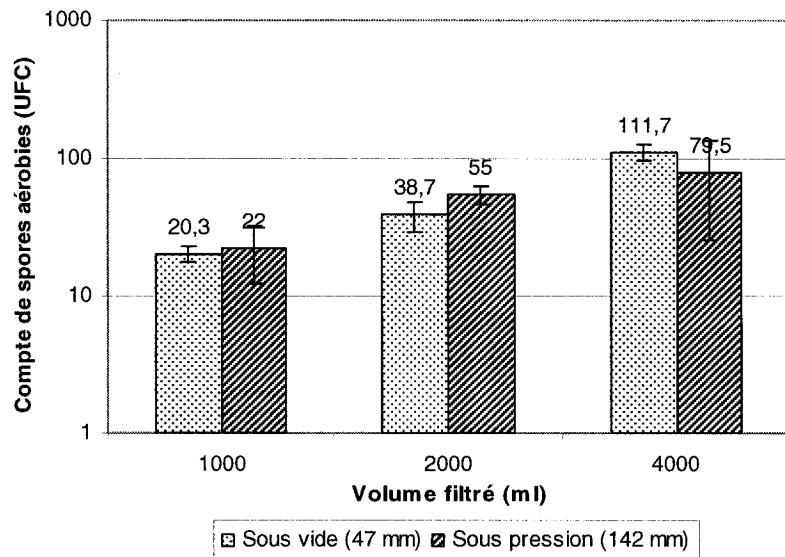


Figure 5-2 : Comparaison des comptes de spores de BSA par méthode de filtration sous vide (47 mm) et sous pression (filtreur - 142 mm) – 14-07-05

Finalement, suite aux résultats antérieurs, l'approche initiale souhaitée était d'étudier l'influence de la qualité d'eau sur le dénombrement des spores de BSA le jour précédent l'essai biodosimétrique afin de connaître les volumes maximaux filtrables. De manière pratique, des tests permanents effectués sur les ozoneurs de l'usine DesBaillets n'ont pas permis de considérer cette technique. Des volumes d'un litre à l'eau filtrée sur 47 mm et de 10 litres à l'eau ozonée sur 142 mm (filtreur) ont été utilisés. Ceci a permis d'éliminer le facteur potentiel d'influence de la qualité de l'eau d'après le ratio volume/surface des deux types de filtres.

La prochaine section présente un article en anglais soumis au *Journal of Environmental Engineering*. L'objectif de cette étude est de valider la performance des procédés de désinfection de l'eau potable en usant de la technique biodosimétrique. Les essais sont effectués sur le procédé d'ozonation de l'usine Charles DesBaillets (Montréal) et une estimation précise de l'efficacité de la désinfection a pu être effectuée.

5.3 VALIDATION OF FULL-SCALE OZONE CONTACTOR PERFORMANCE USING BIODOSIMETRY

Romain Broséus^a, Benoit Barbeau^{a,*} and Christian Bouchard^b

^a *Ecole Polytechnique de Montréal, NSERC Industrial Chair on Drinking Water, Civil, Geological and Mining Engineering Department, CP 6079, Succ. Centre-ville, Montréal (Qué.), Canada H3C 3A7*

^b *Civil Engineering Department, Laval University, Sainte-Foy (Quebec), Canada G1K 7P4
Tel. +1 (418) 656-2868; Fax +1 (418) 656-2928; email: cbouchard@gci.ulaval.ca*

* Corresponding author. Tel.: +1 (514) 340 4711x2988.

E-mail address: benoit.barbeau@polymtl.ca (B. Barbeau).

Abstract

A biodosimetric technique was used to validate the CT values (CT_{10} , CT-IDDF) of the ozone contactors of the DesBaillets water treatment plant (Montreal, Qc), using indigenous aerobic spore formers (ASF) as indicators of disinfection efficiency. ASF measurement in ozonated water was performed using a large water sample concentration method. Four assays, completed over a 6 weeks period, involved the implementation of reference biodosimetric curves using an ozone pilot apparatus and followed by full-scale validations. ASF inactivation kinetics were well described by a simple Chick-Watson model. The most accurate data also indicated that the CT_{10} underestimates the true dose whereas the CT-IDDF overestimates it. Biodosimetry is useful in determining the influence of water quality on microbial inactivation, in measuring the effective dose transferred, and in validating model predictions. Additional research should be conducted to take full advantage of the approach described in this paper and to obtain results more quickly.

5.3.1 Introduction

The performance of full-scale disinfection systems is usually evaluated using the CT_{10} concept developed by the USEPA (1989). This evaluation's conservative nature has been well documented (Teefy et Singer, 1990; Barbeau, 1996; Finch *et al.* 2001; Ducoste *et al.* 2001; von Gunten 2003b; Rakness *et al.* 2005). Several researchers have proposed improved methodologies to better estimate the effective CT under full-scale conditions (Teefy et Singer, 1990; Lawler et Singer, 1993; Haas *et al.* 1995; von Gunten *et al.* 1999). One of these techniques involves the use of the Integrated Disinfection Design Framework (IDDF), which pairs up the residence time distribution (RTD) with the disinfectant decay kinetics, assuming a segregated flow (Bellamy *et al.* 1998; Carlson *et al.* 2001; Ducoste *et al.* 2001, Rakness, 2001). This would mean that "each discrete element of fluid is assumed to take a different route and each may require a different length of time to pass through the vessel" (Teefy et Singer, 1990). Another alternative involves using computational fluid dynamics (CFD) to describe the flow and concentration profiles within the contactors (Lyn *et al.* 1999; Do-Quang *et al.* 2001; Greene *et al.* 2004; Zhang *et al.* 2005).

Clearly, the use of these advanced techniques is desirable for the water industry, as they provide (i) a powerful tool for design engineers to account for site-specific conditions and (ii) an effective operational tool for water utilities to evaluate the true effective microbiological dose of their disinfection processes under variable treatment conditions. A better control of the disinfectant dosage allows a reduction of the disinfection by-product (DBP) formation. CT calculations are necessary, since it would be impractical to attempt to measure the actual pathogen inactivation, due to their low concentrations. However, CFD and IDDF models, like any other model, involve a certain level of uncertainty. It would be beneficial, therefore, to develop a technique that could validate the prediction of these mathematical models under full-scale conditions.

Biodosimetry, a procedure used to determine the reduction equivalent dose (RED) of a UV reactor (USEPA, 2003), has been used extensively in order to certify the UV dose delivered by full-scale UV reactors. The advantage of this procedure is that it accounts directly for variable hydraulic conditions and disinfectant exposure without the need for advanced modeling techniques. The ideal biodosimetric tracer should be (i) naturally present in the waters, (ii) fairly resistant to disinfection and exhibit a linear decay with respect to the effective dose (CT) and (iii) non pathogenic and detectable using affordable and reproducible techniques.

Chiou *et al.* (1997) have proposed using reduction of fluorescent polystyrene microspheres induced by ozone. However, the cost of microspheres and the sanitary risk related to their injection into filtered water would limit their routine application. Hijnen *et al.* (2002) have evaluated the inactivation of *Clostridium perfringens* spores as an indicator of ozone contactor efficiency. However, no comparisons were made using advanced CT models, such as IDDF or CFD. Indigenous aerobic spore formers (ASF) have the advantage of being fairly abundant in surface waters (Nieminski *et al.* 2000). They are also highly resistant to ozone (Facile *et al.* 2000; Craik *et al.* 2002) and typically exhibit a linear inactivation, with respect to CT, up to a certain level, for which tailing is observed. It is therefore suggested that ASF may be a potential way to validate the effective CT (“true dose”) delivered by full-scale ozone contactors.

5.3.2 Objectives

The general objective of this project was to validate the CT values of ozone contactors at the DesBaillets water treatment plant (Montreal, Qc) by using a biodosimetric technique involving indigenous aerobic spores. More specifically, the objectives were to:

1. Develop a reproducible methodology using high-volume filtration in order to generate reference biodosimetric curves on a pilot ozone contactor using indigenous aerobic spores as a performance indicator;

2. Use the reference biodosimetric curves to validate the calculated CT values using various CT calculation methodologies (CT_{10} , CT_{IDDF}).

5.3.3 Material and Methods

5.3.3.1 *Development of a Biodosimetric Reference Curve*

5.3.3.1.1 Description of the Pilot Apparatus used to Develop Reference Curves

Reference curves were created with a continuous-flow pilot system, which consisted of two sections (Figure 5.3). The first one, the ozone injection, allowed the operator to transfer the desired ozone dosage by adjusting filtered water and ozone gas flows. The supplied filtered water (0 to 18 Lpm) was circulated through the entire system with a centrifugal pump (Model TE-5.5K-MD, March) and run through a static mixer with ozone gas (~ 1% w/w) supplied by the water treatment plant ozone generators (0-1.9 NLpm). Following the degassing column (retention time = 0.6 min), a portion of the ozonated water (0-10 Lpm) was delivered to the second section of the pilot, the contactor, which was made of eleven 2 in. (50.8 mm - inner diameter) PVC pipes having a unitary length of about 8 feet (2.44 m). Twelve sampling ports were distributed throughout the contactor and a tracer test was performed using potassium chloride as the tracer chemical. T_{50} was used as the contact time for each of the sampling ports. The contactor was operated at a constant flow rate (4 Lpm) which yielded a theoretical residence time of 14.1 min ($T_{50} = 11.4$ min).

5.3.3.1.2 Ozone Analysis

Ozone residual analyses were performed according to the standard colorimetric method (APHA, 1998). Samples were analyzed at 600 nm with a HP8453 spectrophotometer in a 2-cm quartz cell. Ozone gas transfer efficiency was performed following the standard iodometric method (APHA, 1998).

5.3.3.1.3 CT Calculations on the Ozone Pilot Contactor

CT calculations were performed using the integrated CT concept (Barbeau *et al.* 2005), for which the effective microbiological dose at time t is equal to the area under the decay curve at that time. CT values were calculated using the ozone concentration profiles and the T_{50} derived from the tracer studies. Since a static mixer was used for ozone injection, it was hypothesized that ozone transfer was almost instantaneous and that ozone decay could then be well described by a simple first-order decay (R^2 range over experiments: 0.91 - 0.99). Equation (1) was used to calculate the integrated CT.

$$CT_{integrated} = \int C(T_{50}) \cdot dt = \frac{C_o}{k} [1 - \exp(-k \cdot T_{50})] \quad (9)$$

Use of the CT-IDDF on the pilot did not improve the accuracy of the CT calculations. On the pilot, the maximum deviation between the integrated CT (as described by Eq. 9) and the CT-IDDF was 4.4%. It was therefore decided to use the integrated CT, which is simpler to obtain than the IDDF-CT value.

5.3.3.1.4 Analysis of Indigenous Aerobic Spore-Formers (ASF)

Indigenous aerobic spore-formers were used as a biodosimetric tracer. For small volumes (< 1L), spore measurements were made following the method developed by Barbeau *et al.* (1997), which is based on the pasteurization of the Petri dish rather than the water sample. Water samples were filtered through 0.45 μm filters (HAWG047S1, Millipore, USA), placed on pads (AP10047S1, Millipore), saturated with 1.5 ml of Trypticase Soy Broth (TSB), pasteurized at 75°C for 15 minutes, and then incubated at 35°C for 22-24h. Due to the relatively low concentrations expected in ozonated waters, however, a different technique was developed using the approach proposed by Hijnen *et al.* (2000b). In order to improve the method detection limit, large volumes of water (10 L) were filtered through large diameter (142 mm) 0.45 μm filters (HAWP 14250, Millipore) using a pressure filter holder (YY30 14236, Millipore) and a peristaltic pump (Model 7521-40, Masterflex). Filters were then placed in Petri dishes containing 25 ml

of Trypticase Soy Agar (TSA), then pasteurized at 75°C for 15 minutes, and incubated at 35°C for 22-24h. The filter holder was autoclaved at 121°C during 15 minutes before all experiments and disinfected between each type of water to be filtered. Filtering 1 L of influent water (No) and 10 L of ozonated water (N) eliminated the potential effect of the filtration cake on the ASF count, keeping in mind that the filtration surface of the 142 mm filter is about ten times greater than that of the 47 mm filter. Preliminary assays indicated that ASF recovery in large volumes of water was statistically equivalent to ASF enumeration in a large number of 100 mL samples.

5.3.3.1.5 Experimental Procedure

Four reference curves were completed over a 2-month period. Before tracking each reference curve, a concentrated solution (~ 100 mg Cl₂/L) of sodium hypochlorite (NaOCl) was pumped into the pilot apparatus for 15 min (about one theoretical residence time). Pumping was stopped for 15 min to disinfect the contactor and avoid Petri dishes bacterial contamination. The centrifugal pump was started once again, ozone gas was applied, and preliminary tests were performed to check the ozone gas production and validate the ozone transfer efficacy. So that each reference curve may continue, three successive ozonation assays were performed by applying increasing ozone doses by raising the ozone gas flow (which generally varied from 0.8 NLpm to 1.9 NLpm for the four reference curves). Ozone dosages generally varied from 1.2 to 2.5 mg/L and the pilot apparatus was operated for two hydraulic contact times between each ozone dose applied. For each dose, ozone residual was measured at five sampling ports (P1, P2, P4, P6, P12). At the same time, ASF concentrations were determined. Filtered water was sampled in three one-litre sterile bottles containing sodium thiosulfate (final concentration, 0.01%) and analyzed in triplicate (N_o). Ozonated water was sampled at four sampling ports (P2, P6, P9, P12) of the contactor (N) using ten-litre carboys previously disinfected with sodium hypochlorite (100 mg Cl₂/L - 12 hours). Therefore, on any given day, a biodosimetric curve had a maximum of 12 data points (3 dosages x

4 contact times). The log inactivation was calculated as the log differences between filtered and ozonated water ASF average concentrations.

5.3.3.2 Validation of the Full-Scale CT values

5.3.3.2.1 Description of the Full-Scale Ozone Contactor

The DesBaillets water treatment plant (WTP) has a capacity of 1.136 MLD and treats the St. Lawrence River's water, which is of good quality (see TOC and turbidity data - Table 5.2). The treatment is composed of a direct sand filtration without pre-coagulation (5 m/h), post-ozonation followed by a final chlorination. The WTP uses six parallel ozone trains each divided into two cells in a row and having a depth of 6.5 meters. Experiments were performed with contactor #5, for which a longitudinal cross-section is shown in Figure 5.4. Ozone gas (1-2% in air) is fed at the bottom of the first cell (cell A) through circular porous bubble diffusers. The first cell is operated in the counter-current mode, while the second cell (cell B) is co-current. Five sampling ports are distributed throughout cell A, while one is available at the outlet of cell B. The contactor's hydrodynamics were previously evaluated using fluoride as the tracer chemical (El Baz, 2002). For the flow rate during validation conditions (*i.e.* 2.16 m³/s per contactor), the T₁₀/T value was estimated as 0.71. Hydraulic contact time (HRT) was about 5.0 minutes for the same conditions (1.9 and 3.1 minutes for cells A and B, respectively).

5.3.3.2.2 Experimental Design

Table 5.2 shows the DesBaillets water quality data for the two consecutive days required to create a reference curve and a full-scale validation. No significant differences in water quality were observed during these short-term periods. Full-scale validations were performed the next day following the progress of the biodosimetric reference curves on the pilot unit. Each of the four full-scale validations was performed by applying four increasing ozone doses and maintaining a constant flow rate (2.16 m³/s or 5.0 minutes HRT). Table 5.3 summarizes the experimental procedure. The ozone contactor ran for

three HRT and then samples were taken from the six sampling ports for ozone residual analysis. For ASF measurements, influent and then ozonated waters were sampled in one-litre sterile bottles (analysis done in triplicate) and ten litres carboys (analysis done in duplicate) containing sodium thiosulfate (final concentration, 0.01%). Microbial samples from ozonated water were taken from the sampling port P6 of cell B of the contactor.

5.3.3.2.3 Calculations of the CT Values for the DesBaillets O₃ Contactors

Full-scale validations, following the progress of reference curves, allow calculation of the CT value according to different approaches: CT₁₀ concept, CT-IDDF, and biodosimetric CT.

CT₁₀ Concept

The following expression is used in the Province of Quebec (Canada) to calculate the CT₁₀ for porous diffuser ozone contactors with counter-current dissolution (MDDEP 2002) :

$$CT_{10} = \frac{C_{res}}{2} \times \frac{T_{10}}{T} \times T_1 + \sum_i C_{res_i} \times \frac{T_{10}}{T} \times T_i \quad (2)$$

Where C_{res} is the ozone residual in the first cell, T₁₀/T the hydraulic efficacy, T₁ the hydraulic retention time (HRT) of the first cell, and C_{resi} and T_i are ozone residual and HRT of subsequent cells, respectively. For the DesBaillets water treatment plant, the CT₁₀ was calculated as described by equation (3):

$$CT_{10} = (\bar{C}_{cellA} \times T_1 + C_{res-cellB} \times T_2) \times \frac{T_{10}}{T} \quad (3)$$

Where \bar{C}_{cellA} is the mean ozone residual in the first cell and T₁ its HRT, C_{res-cellB} and T₂ are ozone residual and HRT of cell B, respectively, and T₁₀/T is the overall hydraulic efficacy of the contactor. \bar{C}_{cellA} was the mean ozone residual using data from the five sampling ports and C_{res-cellB} the ozone residual at the outlet of the contactor (P6).

CT-IDDF

An IDDF model was previously developed for the ozone contactor #5 of the DesBaillets water treatment plant (El Baz, 2002). According to definitions from Carlson *et al.* (2001), a standard level was chosen for evaluating hydrodynamics and an advanced one for ozone decay. Implementation of the IDDF methodology requires the use of a residence time distribution (RTD) for each cell. In this case, tracer studies were obtained for cell A and the whole contactor and the RTD of cell B alone was determined by the Fourier deconvolution method. Each contactor cell was described as a PFD (Plug-Flow Reactor with Dispersion; Levenspiel, 1999). At the same time, ozone decay was studied for six applied doses, six water flows, and four temperatures. The ozone decay model was based on ozone residual at the outlet of cell B (C_f). Ozone residual was found at the inlet (C_0) since there was exponential decay and the ozone decay constant was calculated by an empirical relation (Bellamy, 1995). C_0 was identical to the ozone residual at the outlet of cell A following one HRT. In this cell, ozone residual linearly increased until reaching C_0 . Using the IDDF model, the calculation of CT-IDDF was possible by choosing the ozone residual at the outlet of the contactor and the water flow (which gave the HRT of each cell using cells geometry). CT values for each cell were calculated, then added together to obtain the total CT of the contactor.

Biodosimetric CT

By measuring the ASF inactivation during full-scale validations, it is possible to link it to the CT measured on the pilot contactor. This process is similar to what is currently being done to validate UV reactors, using reference curves developed for MS2 phages (USEPA, 2003).

5.3.4 Results

5.3.4.1 Comparison of the Biodosimetric Curves

The four biodosimetric reference curves are shown separately in Figure 5.5. Inactivation curves (Inactivation versus Ozone Exposure) were adequately described by a Chick-Watson kinetic (R^2 : 0.78 - 0.91) with log inactivation and integrated CT, which ranged from 0.1 up to 1.8 and from 1.0 up to 10.6 mg.min/L, respectively. Creating the first biodosimetric curve consisted of implementing the procedure, which explains the lower number of data, and hence larger 95th centile prediction intervals (dotted lines), whereas the second and third assays gave relations of greater significance (see the p values). It should also be noted that water temperature decreased as time passed during the experiments, which were initiated in early September (22.5°C) and continued until mid-October (15.5°C) (Table 5.2). All four reference curves are combined in Figure 5.6 in order to provide an overview of the variation from one assay to another. Whereas the aspect of the first three assays are not statistically different at $p=0.05$, the fourth one exhibits a significantly different kinetic. The water temperature during the latter assay was the lowest of the four assays. Also, rainfalls occurred the days before this assay, inducing higher turbidity, TOC, and true colour. This situation is the most likely cause of the lower disinfection kinetic observed in the fourth assay.

5.3.4.2 Validation of the CT Values

Ozone residual analysis and ASF measurements performed during full-scale validations allowed calculations to be performed, then comparisons of CT_{10} , CT-IDDF, and biodosimetric CT (Figure 5.7). However, on some occasions, full-scale ASF log inactivation were beyond the valid range for the biodosimetric curves. These extrapolated data are circled in Fig. 5.7 (one data for assay 1 and 2). Moreover, low biodosimetric CT values are also questionable due to a limited number of data points in the very low CT values. For instance, a 0.47 log inactivation was measured for the second ozone dose applied during the second full-scale assay, predicting a CT of 1.56

mg.min/L. Meanwhile, only 2 biodosimetric reference curve data were obtained from 0 up to 0.52 log inactivation. This was also observed for the first ozone dosage of the third full-scale assay.

CT values predicted by the three CT calculation methods gradually increased when the ozone dosage increased. However, this was not the case for the CT value of the biodosimetric prediction in the fourth assay, especially test c (bordered data in Fig. 5.7a and 5.7b). Moreover, out of the four assays and the extrapolated values, the fourth one is the only one for which biodosimetric CT values were higher than CT-IDDF. Section 5 attempts to explain these results. If circled data in Fig. 5.7 and low biodosimetric CT values are ignored, CT_{10} underestimates the effective dose, which was to be expected. On the other hand, IDDF seems to overestimate the true dose (if we exclude the fourth assay). Except for assay #4 and previous data, biodosimetric CT values were 1.2 to 1.9 times the CT_{10} and the biodosimetric CT/CT-IDDF ratio varied from 0.6 to 1 (for the less accurate assay #1). Finally, results indicated that effective dose underestimation by CT_{10} was more pronounced with increased ozone dose. The true effective dose, as measured by the biodosimetric CT, appears to be somewhere between the CT_{10} and the CT-IDDF. To better evaluate the precise relationship between biodosimetric CT and CT-IDDF for the application of high ozone dosages, additional assays should be conducted.

5.3.4.3 Variations of Ozone Residual in the Contactor's Cells

A total of 15 ozone dosages were applied during the full-scale assays. Figure 5.8 shows the ozone residual measurements in the dissolution cell (cell A) during these assays. The G/L ratio was varied from 0.06 to 0.17 by applying different ozone gas flows while keeping water flow constant ($2.16 \text{ m}^3/\text{s}$). Figure 5.8 shows that the O_3 residual in cell A did not always increase according to ozone dosages (especially in assays 2 and 3). Nevertheless, it was also observed that, under such circumstances, this difference was compensated by a greater ozone residual at the cell B outlet (data not shown), leading up to greater CT_{10} and CT-IDDF values overall. Ozone residual versus ozone dosage and

G/L ratio resulted in weak linear correlations (R^2 range: 0.30 to 0.55 and 0.32 to 0.53, respectively). Mean ozone residual also depends on water quality. The fourth assay's ozone residual was always lower than in other full-scale experiments (cell A), which is probably due to the increased turbidity, true colour, and TOC (Table 5.2). In general, it was difficult to establish any pattern for ozone residual in the first cell, as previously observed on these contactors (El Baz, 2002). The standard deviations of the mean ozone residual in the first cell were quite high and ozone residual greatly varied from one depth to another, as shown by the min/max range on Fig.5.8. In a previous study, such variability in the dissolution cell was also observed by Bellamy (1995). Differences as great as four-fold were measured in O_3 concentrations from one sampling port to another, and for the same sampling port, the variations of the operational conditions induced a three-fold variation in O_3 concentration (Carlson *et al.* 2001).

5.3.5 Discussion

5.3.5.1 Impacts of WQ on Biodosimetric Curves

Microbial inactivation depends on many factors, which are directly linked to the water matrix. Ideally, a biodosimetric reference curve should be generated on the same day that the full-scale assay is performed. Due to the amount of time spent on the pilot and full-scale assays, two days were always necessary to measure the effective dose. However, only minor variations of the major water quality parameters were observed. The four biodosimetric reference curves are not identical, with assay #4 being significantly different from the first three.

Type and biological state of micro-organisms, temperature, pH, oxidant demand, turbidity, and natural organic matter (NOM) may impact microbial inactivation (Facile *et al.* 2000; Cho *et al.* 2002). In this case, a decrease in temperature and/or an increase in turbidity may have lead to the lower observed inactivation rate during assay #4. It has been shown in previous studies that a rise in temperature favours disinfection

(Wickramanayake *et al.* 1984; Rennecker *et al.* 1999; Oppenheimer *et al.* 2000a; Hijnen *et al.* 2002). This observation was also demonstrated more recently while inactivating spores of *B. subtilis* (Larson et Marinas 2003; Dow *et al.* 2006). However, in natural waters, the temperature's influence may depend on competitive reactions (Mazoua et Chauveheid 2005), on the type of water (Finch *et al.* 2001), and on the presence of cross-effects, as already described by Barbeau *et al.* (2004) for chlorine. Organic matter may reduce oxidant action and provide some protection to micro-organisms (Langlais *et al.* 1991). In Milli-Q water, the impact of NOM and turbidity (kaolin) has generally not been significant, but dissolved and colloidal material from natural waters have been shown to negatively impact disinfection (Dow *et al.* 2006). Association of indigenous spores with particles may also interfere with ozone action. Considering the significant reduction in inactivation observed during assay #4, we suggest that this effect was mainly due to the degradations of the water matrix, more than the lowering of the water temperature by 7°C.

Implementation of biodosimetric reference curves could eventually be used to evaluate the seasonal impact of water matrix on disinfection efficiency. Conducting pilot-scale inactivation experiments would enable us to gather information that would be useful in studying the complex site-specific impacts of water quality on disinfection efficacy. For example, inactivation kinetics of indigenous spores by chlorine has been shown to vary from one source to another (Barbeau *et al.* 2005), emphasizing the need to conduct *in-situ* inactivation assays to measure the performance of contactors. It is generally accepted that results obtained in ultra-pure buffered waters may differ from results obtained in natural waters (Haas *et al.* 1996; Finch *et al.* 2001; Radziminski *et al.* 2002; Barbeau *et al.* 2005) and the use of advanced modelling would be required in order to transpose the findings to full-scale contactors. Hydraulics of the contactor, the impact of water quality, and variations in microbial sensitivity must all be considered together.

5.3.5.2 Precision of the Biodosimetric Curves

The precision of the reference curve is an important factor to consider. The accuracy of the calculated log inactivation is directly related to the number of colonies counted on the membrane. Naturally occurring spores are made up of various species that all have different sensitivities to oxidation, their resistance varying according to genus, population, and water source (Facile *et al.* 2000). According to Nieminski et Bellamy (2000), the use of the *Bacillus* genus, which accounted for 90% of total ASF in treated water, generated lower and less reproducible counts. Detection of total indigenous ASF reduces the variability caused by the sporulation medium (Barbeau *et al.* 1999).

Absence of coagulation at DesBaillets WTP favours the occurrence of relatively high ASF concentrations in filtered water (~ 10 CFU/100mL). In ozonated waters, the lowest ASF concentrations are measured in the Summer, when ozonation is at its maximal efficiency (~ 1 CFU/100mL). To obtain precise measurements, large volume samples are needed. During this project, volumes of 1 L and 10 L were used for filtered and post-ozonated waters, respectively. Filtration of large volumes provides a better estimate of the true concentration of micro-organisms in treated water and makes it possible to measure a representative removal rate, whereas 100 mL samples may underestimate the ASF concentrations (Gale *et al.* 2002). However, frontal filtration may reduce recovery due to the accumulation of suspended matter on the membrane, as previously described for coliforms (Geldreich *et al.* 1978; Herson et Victoreen 1980; LeChevallier *et al.* 1981). The recovery efficiency depends on the microbial species and the water quality. For a filtered volume of 50 L on a 142 mm filter, Hijnen *et al.* (2000b) did not observe any adverse impacts on the recovery of *Clostridia* spores spiked in tap water. During this project, preliminary assays in natural waters showed that the influence of the volume filtered on ASF counts depended on the type of water filtered. In order to avoid any confounding effects, an identical volume/surface ratio was used for ASF measurements in filtered and post-ozonated waters.

In order to overcome the drawbacks of frontal filtration, other ASF concentration techniques could be studied (like cross-flow membrane filtration), using, for example, the electrokinetic properties of ASF, as described by Ahimou *et al.* (2001) for *B. subtilis*. Moreover, ASF detection by membrane filtration requires $24\text{h} \pm 2\text{h}$, whereas the WTP would benefit from a real-time measurement of the effective CT. Considering the interesting characteristics of ASF as a biodosimetric tracer, the development of quicker ASF enumeration methods would be very useful. Moreover, the recovery of ASF for very high volumes ($> 50\text{L}$) should be validated, especially for WTP's dealing with very low ASF concentrations ($< 1 \text{ CFU/L}$).

5.3.5.3 Effective Dose Calculations

Bioassays were conducted using the heterogeneous spore population naturally occurring in surface waters. Surprisingly, inactivation kinetics are well described by simple Chick-Watson models. Generally, the inactivation of laboratory-grown *B. subtilis* spores exhibits a lag phase and, in some cases, a tailing (Driedger *et al.* 2001; Larson et Marinas 2003; Dow *et al.* 2006). Recently, Mamane-Gravetz et Linden (2004) proposed the use of indigenous ASF to evaluate full-scale UV reactor performance. The UV inactivation was also well described by a simple Chick-Watson kinetic.

Reference curves provide minimum and maximum log inactivation, which, in turn, provide boundaries for predicting the biodosimetric CT by interpolation. For each CT value validation, it is essential to apply a large range of contact time and ozone dosages in order to produce a reference curve that encompasses all potential full-scale CT conditions.

Predicted biodosimetric CT accuracy is improved when the log inactivation of spores is greater. However, the dose-response curve cannot be adjusted, which is contrary to the biodosimetric approach developed by Chiou *et al.* (1997), which uses fluorescent microspheres. This is well illustrated by assay #4, in which the maximum log

inactivation was only 0.35 log. The full-scale inactivation rates were also limited, ranging from 0.08 up to 0.18 log. Meanwhile, ASF inactivation varied from 0.19 up to 1.21 log for assay 1 when applying similar CT values. For this given WTP, biodosimetric validations of CT values would probably be impossible to determine during the Winter, due to minimal ASF inactivation. However, for other treatment conditions (higher applied CT and/or warm water temperature), this factor may not matter.

With the exception of assay #4 and uncertain data, each valid biodosimetric CT value was found to be higher than CT_{10} , but lower than the CT-IDDF. For the low ozone doses, the biodosimetric CT is very close to the CT_{10} , which is calculated here using the mean ozone residual in cell A and the ozone residual at cell B's exit. However, for higher ozone doses, the gap increases, and in the case of assay 3, CT biodosimetric / CT_{10} ratio increases from 1.2 to 1.6. According to Rakness *et al.* (2005), this observation suggests that WTP's aiming for high CT values, such as ones needed for *Cryptosporidium*, should consider alternative CT calculation methodologies and validate their method using biodosimetric assays. Otherwise, an excessive production of bromate can be expected, which is the main disinfection by-product (DBP) formed when natural waters containing bromide are ozonated.

To date, different approaches have been studied to calculate the true disinfectant dose. The IDDF model proposes a dynamic method using a convolution of the disinfectant decay kinetics and reactor hydraulics. Use of this model has allowed a more precise calculation of the CT value, which was higher than the microbiological dose determined by the CT_{10} concept (Bellamy *et al.* 2000; Carlson *et al.* 2001; Ducoste *et al.* 2001). One of the challenges of developing an IDDF model is the high variability of ozone residual in the dissolution cell. For the DesBaillets WTP, the HRT of the dissolution cell accounts for about 40% of the total contactor HRT. It was not easy to predict any particular ozone profile for the studied WTP based on the operational conditions (G/L

ratio, flow, and dosage). The results presented (in Figure 5) also indicate that the IDDF CT value is at least twice the CT_{10} . Moreover, the IDDF CT value is often higher than the biodosimetric CT value. The convolution during the IDDF methodology assumes that fluid elements in the contactor are completely segregated (Greene *et al.* 2004). This convolution does not take into account the micro-mixing effects, whereas the degree of segregation can indeed impact disinfection efficiency. Furthermore, different reactor geometries may show a similar residence time distribution (Levenspiel, 1999). Therefore, the residence time alone does not precisely characterize the degree of separation. Under- or overestimation of the true dose is possible when using the IDDF model, depending on the order of the microbial inactivation kinetics (Greene *et al.* 2004). Recently, Craik (2005) showed that segregated flow calculations may overestimate the inactivation of *Cryptosporidium* by ozone. The CFD model developed by Greene *et al.* (2004) was shown to be closer to experimental data than IDDF.

5.3.5.4 The Future of the Biodosimetric Approach

The integrity of disinfection processes must be ensured at all times. The delivered effective dose must be known in order to verify adequate inactivation so as to reduce any microbiological risk, but also to limit the production of DBP. *Clostridium perfringens* spores have been proposed as a conservative surrogate for *Cryptosporidium parvum* (Hijnen *et al.* 2002), but further research is necessary. Biodosimetry may be an interesting tool to validate models. Using microsphere fluorescence, Tang *et al.* (2005) assessed parasite inactivation and bromate formation in a full-scale ozone contactor. Model predictions matched experimental data well enough, but underestimation of *Cryptosporidium* was observed for one of the tests performed. During this project, biodosimetry using indigenous spores proved to be an interesting approach to (i) determine the influence of water quality on microbial inactivation, (ii) measure the effective dose of an industrial full-scale ozone contactor, and (iii) validate the accuracy of models, which is essential if we are to rely on the CT values predicted (Haas, 2005).

In our case, the relevance of the IDDF model developed for the DesBaillets WTP is questionable.

Following optimization of the ASF measurements, real-time monitoring would be of great benefit, using biodosimetry to directly confirm how well inactivation processes worked and to better control transient events. If future data confirm that the effective dose is higher than the CT_{10} , investments needed for some WTP's could be reconsidered. Oxidants could also be used less, thus lowering disinfection costs and DBP formation. In North America, regular disinfection monitoring is performed according to the CT_{10} concept. Even though advanced CT calculation methodologies have been emerging over the last decade, their successful integration into the regulatory process calls for the availability of a biodosimetric technique, similar to what is used in the area of UV disinfection.

5.3.6 Conclusion

Indigenous ASF possess many of the necessary characteristics and advantages of a biodosimeter (resistance to treatments, linear inactivation kinetics, high concentration in raw waters, ease of detection, and low measurement cost). In ozonated waters, ASF measurement was performed using a large volume (10 L) sample concentration method, which precisely determined inactivation and, in turn, effective dose (biodosimetric CT). The biodosimetric method is a useful tool, but at this time, its implementation requires much reworking and many precautions must be taken in order to produce reliable results. In addition, this approach may be inapplicable under low water temperature conditions, due to the high resistance of ASF. One of the four assays deviated from the other three, upon which the main conclusions are based. Hence, data obtained during this study indicate that the CT_{10} concept currently used to calculate the performance of these contactors underestimates the true dose, whereas the CT-IDDF overestimates it. The water treatment industry would greatly benefit from the development of alternative CT calculation methodologies. Model development is necessary to predict the precise

effective microbiological dose in full-scale applications and to optimize oxidant use. However, models must be reliable enough to predict the effective microbiological dose adequately under varying water quality conditions and must also provide an adequate safety factor. These considerations would make validation of models using biodosimetry essential, and biodosimetry using indigenous ASF could be a method of choice. Research must be carried on to optimize the approach described in this study and ideally, to obtain quicker results. The availability of biodosimetric tools would appear to be the next logical step in monitoring disinfection processes.

Table 5.2 : Water Quality Data

Assay	Type	Date	T (°C)	pH	TOC (mg/L)	Alkalinity (mg/L)	True Color	Turbidity (NTU)
1	DRC	08/09/05	22.5	8.30	2.10	83	3	0.12
1	FSV	09/09/05	22.5	8.30	2.15	83	3	0.13
2	DRC	20/09/05	21	8.18	2.40	85	2	0.13
2	FSV	21/09/05	21	8.22	2.68	85	5	0.15
3	DRC	03/10/05	18	8.25	2.41	86	3	0.14
3	FSV	04/10/05	18	8.20	2.50	86	4	0.14
4	DRC	17/10/05	15.5	8.13	2.93	85	10	0.35
4	FSV	18/10/05	15.5	8.04	3.05	85	10	0.45

Note:

DRC: Development of the Reference Curve

FSV: Full-Scale Validation

pH, TOC and alkalinity are raw water parameters whereas true color and turbidity are given for filtered water and temperature for treated water.

Table 5.3 : Summary of Full-Scale Experimental Procedure

Assay	Test	Ozone gas flow (Nm ³ /s)	Ozone gas (% by wt)	Ozone dose (mg/L)
1	a	0.15	1.38	1.16
	b	0.19	1.40	1.49
	c	0.25	1.42	1.98
	d	0.36	1.34	2.70
2	a	0.15	1.44	1.21
	b	0.21	1.44	1.69
	c	0.25	1.50	2.10
3	a	0.15	1.16	0.98
	b	0.20	1.30	1.46
	c	0.25	1.30	1.83
	d	0.30	1.22	2.05
4	a	0.19	1.19	1.27
	b	0.24	1.13	1.55
	c	0.29	1.17	1.90
	d	0.34	1.17	2.23

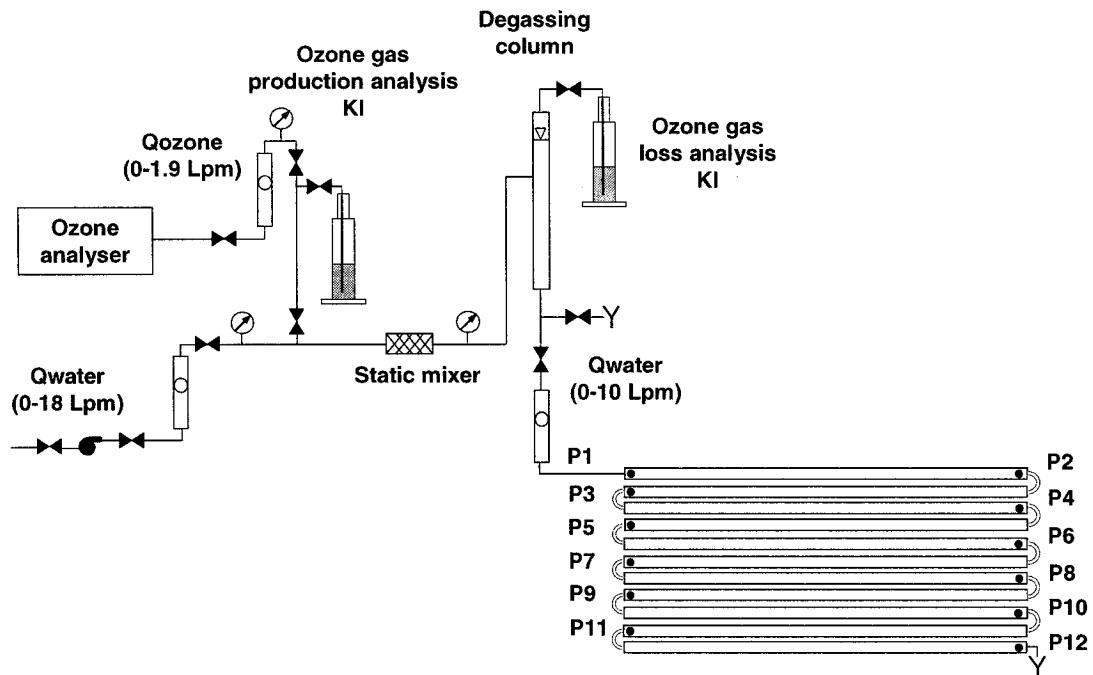


Figure 5-3 : Schematic of the Pilot Apparatus used to Create Reference Curves

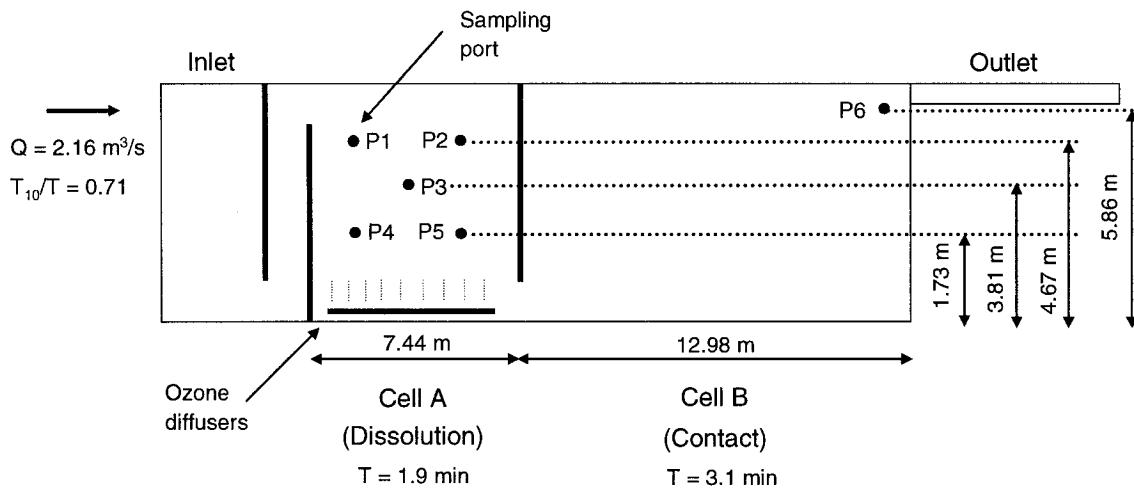


Figure 5-4 : Schematic of the Full-Scale Ozone Contactor at the DesBaillets Water Treatment Plant used to Validate the Effective Dose

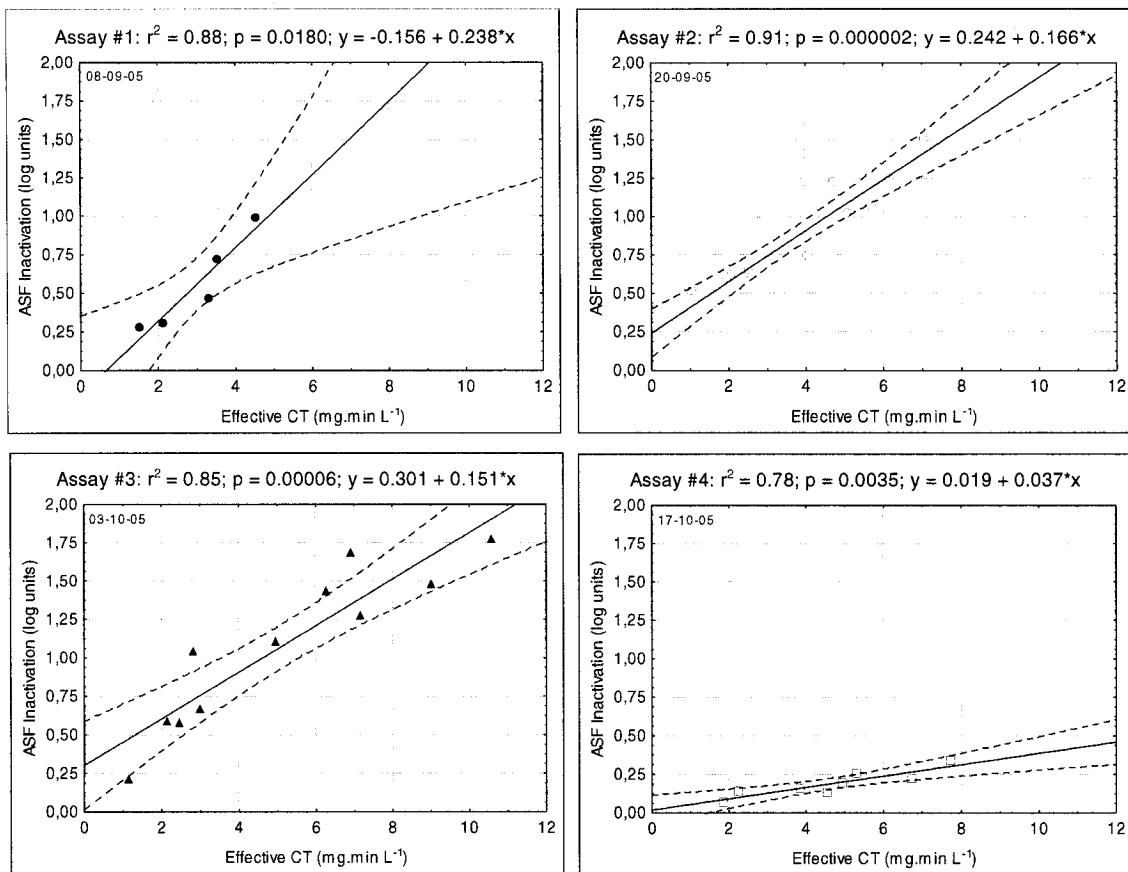


Figure 5-5 : Biodosimetric Reference Curves obtained on the Pilot Ozone Contactor

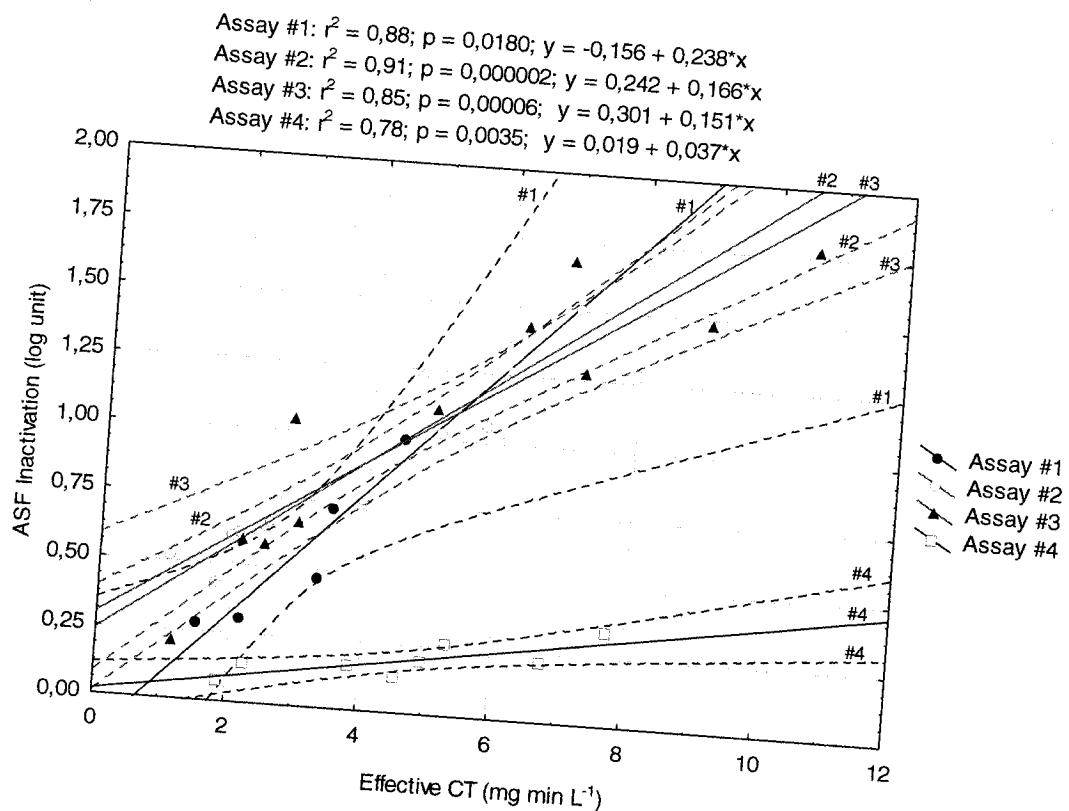


Figure 5-6 : Summary of the Four Biodosimetric Reference Curves obtained on the Pilot Ozone Contactor (assay 1: 08/09/05, assay 2: 20/09/05, assay 3: 03/10/05, assay 4: 17/10/05)

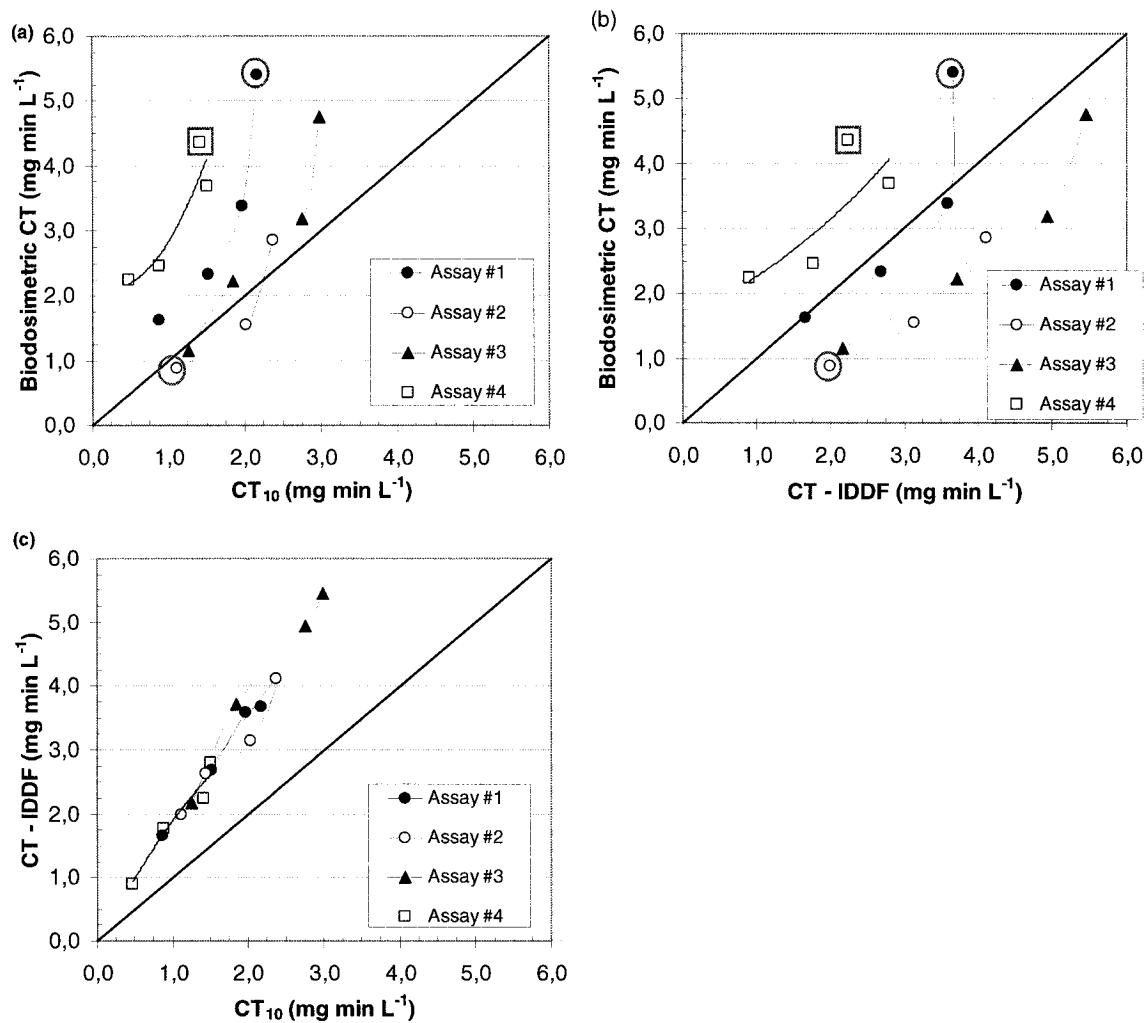


Figure 5-7 : Comparisons of CT Calculations Methods with Measured Biodosimetric CT Values. (a) Biodosimetric CT vs CT₁₀, (b) Biodosimetric CT vs CT-IDDF, (c) CT-IDDF vs CT₁₀. Four assays were completed over a 6 weeks period (data outside the biodosimetric curve range are circled; data regarding the test c of the fourth assay are bordered).

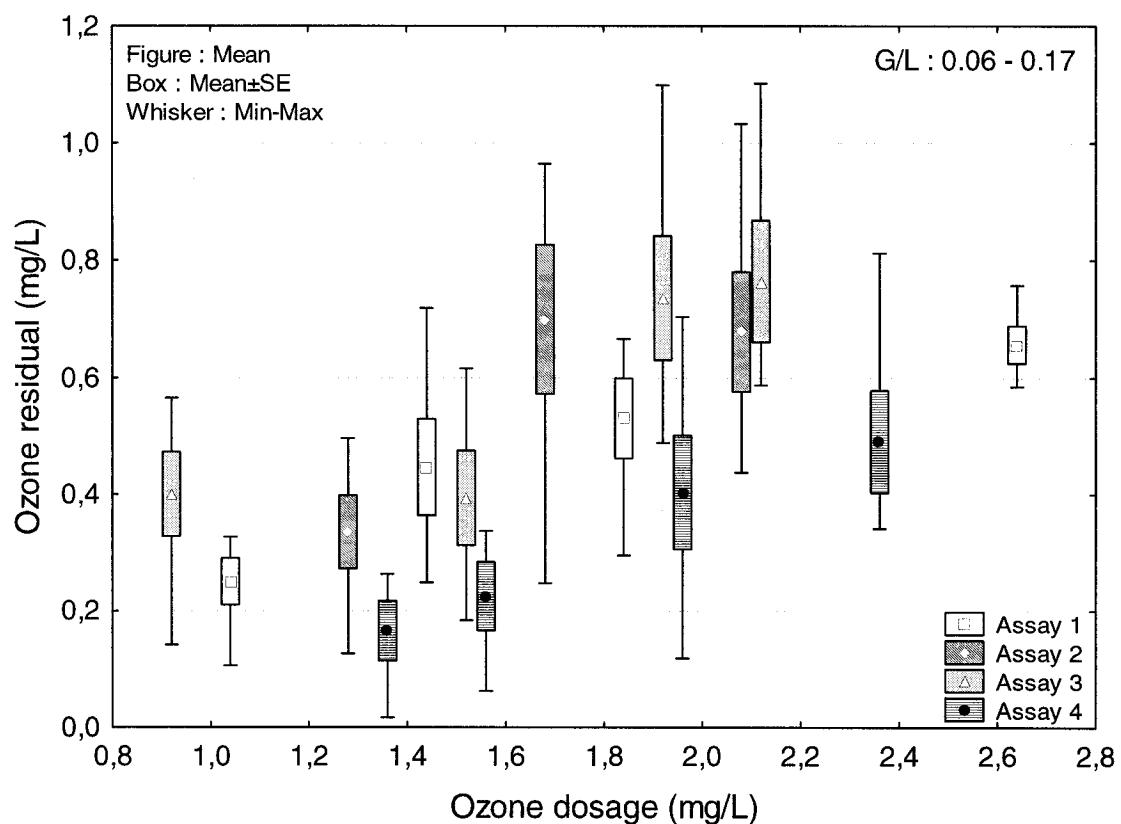


Figure 5-8 : Ozone residual in cell A of the contactor. The mean concentration was calculated for the 5 samplings points (cf Fig. 2). G/L ratio range was 0.06 - 0.17.

References

- Ahimou, F., Paquot, M., Jacques, P., Thonart, P., and Rouxhet, P. G. (2001). "Influence of electrical properties on the evaluation of the surface hydrophobicity of *Bacillus subtilis*." *J. Microbiol. Methods*, 45, 119-126.
- APHA (1998). "Standard methods for the examination of water and wastewater", 20th edition, American Water Works Association and the Water Environment Federation, Washington, DC, USA
- Barbeau, B. (1996). "Évaluation des spores de *Bacillus* comme indicateur de l'efficacité du traitement d'une filière d'eau potable." MS Thesis, École Polytechnique de Montréal, Qc.
- Barbeau, B., Boulos, L., Desjardins, R., Coallier, J., Prévost, M., and Duchesne, D. (1997). "A modified method for the enumeration of aerobic spore-forming bacteria." *Can. J. Microbiol.*, 43, 976-980.
- Barbeau, B., Boulos, L., Desjardins, R., Coallier, J., and Prévost, M. (1999). "Examining the use of aerobic spore-forming bacteria to assess the efficiency of chlorination." *Wat. Res.* 33(13), 2941-2948.
- Barbeau, B., Huffman, D., Mysore, C., Desjardins, R., and Prévost, M. (2004). "Examination of discrete and confounding effects of water quality parameters during the inactivation of MS2 phages and *Bacillus subtilis* spores with free chlorine." *J. Environ. Eng. Sci.*, 3(4), 255-268.
- Barbeau, B., Desjardins, R., Mysore, C., and Prévost, M. (2005). "Impacts of water quality on chlorine and chlorine dioxide efficacy in natural waters." *Wat. Res.*, 39(10), 2024-2033.
- Bellamy, W. D. (1995). "Full-scale ozone contactor study." Rep. No. # 90668, American Water Works Association Research Foundation, Denver, Colorado, USA .
- Bellamy, W.D., Finch, G.R., Haas, C.N., (1998) "Integrated disinfection design

framework", American Water Works Association Research Foundation, Denver Colorado, USA

Bellamy, W., Carlson, K., Pier, D., Ducoste, J., and Carlson, M. (2000). "Determining disinfection needs." *J. Am. Water Works Assoc.*, 92(5), 44-52.

Carlson, K., Pier, D., Bellamy, W., Carlson, M., Ducoste, J., Amy, G., and Rakness, K. (2001). "Implementation of the integrated disinfection design framework." Rep. No. #90848, American Water Works Association Research Foundation, Denver, Colorado, USA .

Chiou, C.-F., Torres-Lugo, M., Marinas, B. J., and Adams, J. Q. (1997). "Nonbiological surrogate indicators for assessing ozone disinfection." *J. Am. Water Works Assoc.*, 89(8), 54-66.

Cho, M., Chung, H., and Yoon, J. (2002). "Effect of pH and importance of ozone initiated radical reactions in inactivating *Bacillus subtilis* spore." *Ozone: Sci. & Eng.*, 24(2), 145-150.

Craik, S. A., Smith, D. W., Belosevic, M., and Chandrakanth, M. (2002). "Use of *bacillus subtilis* spores as model micro-organisms for ozonation of *Cryptosporidium parvum* in drinking water treatment." *J. Env. Eng. & Sci.*, 1, 173-186.

Craik, S. A. (2005). "Effect of micro-mixing conditions on predictions of *Cryptosporidium* inactivation in an ozone contactor ." *Ozone: Sci. & Eng.*, 27, 487-494.

Do-Quang, Z., Cockx, A., Laine, J. M., and Roustan, M. (2001). "Applying CFD modelling in order to enhance water treatment reactors efficiency: Example of the ozonation process." *Wat. Sci. & Technol.: Wat. Supply*, 1(4), 125-130.

Dow, S. M., Barbeau, B., von Gunten, U., Chandrakanth, M., Amy, G., and Hernandez, M. (2006). "The impact of selected water quality parameters on the inactivation of *Bacillus subtilis* spores by monochloramine and ozone." *Wat. Res.*, 40, 373 –

382.

- Driedger, A., Staub, E., Pinkernell, U., Marinas, B., Köster, W., and von Gunten, U. (2001). "Inactivation of *Bacillus subtilis* spores and formation of bromate during ozonation." *Wat. Res.*, 35, 2950-2960.
- Ducoste, J., Carlson, K., and Bellamy, W. (2001). "The Integrated Disinfection Design Framework Approach to Reactor Hydraulics Characterization." *J. Wat. Supply : Res. & Tech.*, 50(4).
- El Baz, G. (2002). "Développement d'un modèle de calcul de la performance des unités de désinfection (application aux usines Chomedey et DesBaillets)." MS Thesis, École Polytechnique de Montréal, Qc.
- Facile, N., Barbeau, B., Prévost, M., and Koudjouou, B. (2000). "Evaluating bacterial aerobic spores as a surrogate for *Giardia* and *Cryptosporidium* inactivation by ozone." *Wat. Res.*, 34(12), 3238-3246.
- Finch, G. R., Haas, C. N., Oppenheimer, J. A., Gordon, G., and Trussell, R. R. (2001). "Design criteria for inactivation of *Cryptosporidium* by ozone in drinking water." *Ozone: Sci. & Eng.*, 23(4), 259-284.
- Gale, P., Pitchers, R., and Gray, P. (2002). "The effect of drinking water treatment on the spatial heterogeneity of micro-organisms: Implications for assessment of treatment efficiency and health risk." *Wat. Res.*, 36(6), 1640-1648.
- Geldreich, E. E., Allen, M. J., and Taylor, R. H. (1978). "Interferences to coliform detection in potable water supplies." Evaluation of the microbiology standards for drinking water, C.W. Hendricks (ed.) United States Environmental Protection Agency, Washington, DC, 13-20.
- Greene, D. J., Farouk, B., and Haas, C. N. (2004). "CFD design approach for chlorine disinfection processes." *J. Am. Water Works Assoc.*, 96(8), 138-150.
- Haas, C. N., Joffe, J., Hornberger, J. C., Anmangandla, U., Heath, M., and Jacangelo, J. (1995). "Development and validation of rational design methods of disinfection."

- Rep. No. #90666, American Water Works Association Research Foundation.
- Haas, C. N., Joffe, J., Anmangandla, U., Jacangelo, J. G., and Heath, M. (1996). "Water quality and disinfection kinetics." *J. Am. Water Works Assoc.*, 88(3), 95-103.
- Haas, C. N. (2005). "Disinfection : towards a fourth generation in water chemical disinfection process." WQTC Conference, American Water Works Association.
- Herson, D. S. and Victoreen, H. T. (1980). Hindrance of coliform recovery by turbidity and non-coliforms, United States Environmental Protection Agency, Office of Research and Development, Cincinnati, Ohio.
- Hijnen, W. A. M., Van Veenendaal, D. A., Van Der Speld, W. M. H., Visser, A., Hoogenboezem, W., and Van Der Kooij, D. (2000b). "Enumeration of faecal indicator bacteria in large water volumes using on site membrane filtration to assess water treatment efficiency." *Wat. Res.*, 34(5), 1659-1665.
- Hijnen, W. A., Van de Veer, A. J., Van Beveren, J., and Medema, G. J. (2002). "Spores of sulphite-reducing *clostridia* (SSRC) as surrogate for verification of the inactivation capacity of full-scale ozonation for *Cryptosporidium*." *Wat. Sci. & Technol.: Wat. Supply*, 2(1), 163-170.
- Langlais, B., Reckhow, D. A., and Brink, D. R. (1991). "Ozone in water treatment: application and engineering." Rep. No. #87374, American Water Works Association Research Foundation, Michigan, USA.
- Larson, M. A. and Marinas, B. J. (2003). "Inactivation of *Bacillus subtilis* spores with ozone and monochloramine." *Wat. Res.*, 37(4), 833-844.
- Lawler, D. F. and Singer, P. C. (1993). "Analysing disinfection kinetics and reactor designs : a conceptual approach versus the SWTR." *J. Am. Water Works Assoc.*, 85(11), 67-76.
- LeChevallier, M. W., Evans, T. M., and Seidler, R. J. (1981). "Effect of turbidity on chlorination efficiency and bacterial persistence in drinking water." *Appl. Environ. Microbiol.*, 42(1), 159-167.

- Levenspiel, O. (1999) Chemical reaction engineering, 3rd Edition, John Wiley Inc.
- Lyn, D. A., Chiu, K., and Blatchley, E. R. (1999). "Numerical modeling of flow and disinfection in UV disinfection channels." *J. Environ. Eng. - ASCE*, 125(1), 17-26.
- Mamane-Gravetz, H. and Linden, K. G. (2004). "UV disinfection of indigenous aerobic spores: implications for UV reactor validation in unfiltered waters." *Wat. Res.*, 38(12), 2898-2906.
- Mazoua, S. and Chauveheid, E. (2005). "Aerobic spore-forming bacteria for assessing quality of drinking water produced from surface water." *Wat. Res.*, 39(20), 5186-5198.
- Ministère du Développement Durable, de l'Environnement et des Parcs (MDDEP) (2002) Guide de conception des installations de production d'eau potable
- Nieminski, E. C. and Bellamy, W. D. (2000). "Application of surrogate measures to improve treatment plant performance." Rep. No. # 90811, American Water Works Assosication Research Foundation and American Water Works Association, Denver, Co, USA.
- Nieminski, E. C., Bellamy, W. D., and Moss, L. R. (2000). "Using surrogates to improve plant performance." *J. Am. Water Works Assoc.*, 92(3), 67-78.
- Oppenheimer, J., Najm, I., Trussell, R. R., Aieta, E. M., and Jacangelo, J. (2000a). "Constructing a CT table for *Cryptosporidium* inactivation with ozone in low TOC and low turbidity waters." *Wat. Supply*, 18(1), 427-430.
- Radziminski, C., Ballantyne, L., Hodson, J., Creason, R., Andrews, R. C., and Chauret, C. (2002). "Disinfection of *Bacillus subtilis* spores with chlorine dioxide: a bench-scale and pilot-scale study." *Wat. Res.*, 36(6), 1629-1639.
- Rakness, K. (2001). "Implementation of integrated disinfection design framework." Rep. No. # 90848, American Water Works Association Research Foundation, Denver, Co, USA .

- Rakness, K. L., Najm, I., Elovitz, M., Rexing, D., and Via, S. (2005). "Cryptosporidium log-inactivation with ozone using effluent CT₁₀, geometric mean CT₁₀, extended integration CT₁₀ and extended CSTR calculations." *Ozone: Sci. & Eng.*, 27, 335-350.
- Rennecker, J. L., Marinas, B. J., Owens, J. H., and Rice, E. W. (1999). "Inactivation of *Cryptosporidium parvum* oocysts with ozone." *Wat. Res.*, 33(9), 2481-2488.
- Tang, G., Adu-Sarkodie, K., Kim, D., Teefy, S., Shukairy, H. M., and Marinas, B. (2005). "Modeling *Cryptosporidium parvum* Oocyst inactivation and bromate formation in a full-scale ozone contactor." *Environ. Sci. Technol.*, 39, 9343-9350.
- Teefy, S. M. and Singer, P. C. (1990). "Performance and analysis of tracer tests to determine compliance of a disinfection scheme with the SWTR." *J. Am. Water Works Assoc.*, 82(12), 88-98.
- USEPA (1989). "Guidance manual for the compliance with the filtration and disinfection requirements." Washington, DC, USA.
- USEPA (2003). Rep. No. #EPA815-D-03-007 (draft), Office of Science and Technology-Office of Water, Washington, DC, USA.
- von Gunten, U., Elovitz, M., and Kaiser, H.-P. (1999). "Calibration of full-scale ozonation systems with conservative and reactive tracers." *J. Wat. Supply : Res. & Tech.*, 48, 250-256.
- von Gunten, U. (2003). "Ozonation of drinking water: Part 2. Disinfection and by-product formation in presence of bromide, iodide or chlorine." *Wat. Res.*, 37, 1443-1467.
- Wickramanayake, G. B., Rubin, A. J., and Sproul, O. J. (1984). "Inactivation of *Giardia lamblia* cysts with ozone." *Appl. Environ. Microbiol.*, 48(3), 671-672.
- Zhang, J., Anderson, W. B., Smith, E. F., Barbeau, B., Desjardins, R., and Huck, P. M. (2005). "Development, validation and implementation of a multiphase CFD

model for optimization of full-scale ozone disinfection processes." WQTC Conference - American Water Works Association, Québec, Canada.

CHAPITRE 6 SYNTHÈSE

Les raisons principales de l'utilisation de l'ozone sont la désinfection primaire et l'enlèvement des goûts et odeurs, de la couleur et des micropolluants (von Gunten, 2003a). Son usage croissant s'explique par sa capacité à inactiver les parasites plus facilement que le chlore et le bioxyde de chlore (Rennecker *et al.* 1999; Driedger et Marinas, 2000; Driedger *et al.* 2001). Cependant, parallèlement aux effets bénéfiques de l'oxydation, des sous-produits de désinfection peuvent être formés lors de la réaction de l'ozone avec la matrice de l'eau. Son application, qui augmente la fraction biodégradable du carbone organique dissous (CODB), est habituellement suivie d'une filtration biologique sur CAG (charbon actif granulaire) qui entraîne une minéralisation microbiologique des composés organiques partiellement oxydés (von Gunten, 2003a). Le seul sous-produit réglementé est l'ion bromate qui est formé de manière complexe lors de la réaction de l'ozone avec une eau contenant des ions bromures et qui n'est pas dégradé par la filtration biologique.

L'objectif de la désinfection est le contrôle de l'inactivation microbienne tout en limitant la formation de SPD ce qui nécessite une mesure précise de la dose appliquée dans un bassin de contact. L'utilisation du CT_{10} à échelle réelle se traduit par un surdosage et une augmentation des coûts. D'autre part, l'hydraulique des bassins, la chimie et la décroissance du désinfectant ainsi que les cinétiques d'inactivation doivent être intégrées afin de mesurer par un modèle la dose de désinfectant appliquée. Les outils tels que l'IDDF sont intéressants et flexibles mais ils doivent être validés. Dans le cadre de cette étude, la surestimation du CT_{IDDF} par rapport à la dose biodosimétrique mesurée nécessite de reconsidérer le modèle développé pour l'usine DesBaillets. L'approche CFD qui ne suppose pas *a priori* de l'état de mélange dans le réacteur et qui décrit l'ensemble des phénomènes de manière tridimensionnelle semble actuellement la voie de modélisation privilégiée. La comparaison de la méthode biodosimétrique avec une modélisation CFD permettrait de vérifier la précision de cette dernière.

Par ailleurs, les quelques études effectuées en eau naturelle suggèrent une interrelation entre les paramètres de qualité d'eau (Barbeau *et al.* 2005) et une influence différente de la température selon la matrice étudiée (Finch *et al.* 2001). Bien qu'une augmentation de la température ait l'effet le plus important sur l'accroissement du taux d'inactivation et la diminution du CT_{lag} et du CT_{2log} , cette caractéristique ne pourrait expliquer à elle seule l'inactivation microbienne retrouvée en eau naturelle (Dow *et al.* 2006). La seule prise en compte de la température lors du calcul des CT requis par la réglementation ne peut donc être acceptée comme scientifiquement valable. Divers paramètres tels que la turbidité, la matière organique naturelle (MON) et le pH ont également un impact sur la performance de l'ozonation. Par exemple, l'amélioration de la désinfection a pu être constatée en eau naturelle lors de la désinfection au b oxyde de chlore (Barbeau *et al.* 2005) et à l'ozone (Cho *et al.* 2003a; Hijnen *et al.* 2004) et l'explication la plus probable serait la formation de radicaux lors de la réaction de l'oxydant avec la MON. Cette réaction dépend donc du type de MON rencontré et de plus, les effets retrouvés lors de variations de pH pourraient être dus à des modifications chimiques au niveau des constituants cellulaires. L'influence significative du pH, bien que faible (Dow *et al.* 2006), pourrait être spécifique à un organisme (Langlais *et al.* 1991). Or, les eaux de surface sont composées de multitudes d'espèces.

Ces éléments confirment la difficulté de considérer l'extrapolation à partir d'essais de laboratoire, autant à cause des conditions testées qui ne peuvent représenter la spécificité de chaque eau naturelle qu'en raison des souches de microorganismes utilisées. La biodosimétrie à l'aide des spores de bactéries sporulantes aérobies, utilisées de manière croissante pour mesurer l'efficacité du traitement de l'eau potable, est une option pour mesurer la dose réelle. Certaines bactéries ont en effet le pouvoir, lorsque le milieu s'épuise en éléments nutritifs, de se transformer en unités ovales ou sphériques en dormance (Haslay et Leclerc, 1993). On les appelle endospores puisque leur formation est intracellulaire et elles appartiennent à deux genres bactériens principaux (*Bacillus*, *Clostridium*) et quelques autres genres plus rares (*Desulfotomaculum*, *Sporosarcina*,

Sporolactobacillus, *Oscillospira*, et *Thermoactinomyces*). Le cycle sporal caractérise les transformations alternantes entre les phases végétatives de croissance, le processus de sporulation et la germination (Haslay et Leclerc, 1993). Les spores, dans des conditions physico-chimiques favorables peuvent retourner sous la forme végétative.

Le genre *Bacillus* représente un groupe diversifié de bactéries en forme de bâtonnets, dont les espèces sont Gram-positives et vivent typiquement dans le sol telles des saprophytes. Les spores du genre *Bacillus*, retrouvées couramment dans les eaux de surface, ont une forte résistance qui serait due à la présence de la tunique sporale sachant que la spore est constituée de plusieurs couches (Barbeau, 2004; Setlow, 2003) : (i) le cytoplasme sporal est appelé *core* et contient un noyau comparable à celui de la cellule végétative (ii) la paroi sporale contient le peptidoglycane qui deviendra la paroi de la cellule végétative après germination de la spore (iii) le cortex, couche formée d'un autre type de peptidoglycane, constitue un mécanisme de défense puisque la perméabilité y est minimale (iv) la tunique est une couche imperméable composée d'un assemblage complexe d'au moins 24 polypeptides. La présence de ces diverses enveloppes serait une explication à la faible pénétration du marqueur fluorogène observée lors de la détection directe des spores, en absence de pasteurisation.

Les *Bacilli* élaborent une quantité importante d'enzymes, dont les amylases qui hydrolysent l'amidon et qui ont une application industrielle large tandis qu'une autre classe est constituée par les protéases qui incluent les estérases, les métallo-protéases et les protéases alcalines. Elles sont généralement produites à la fin de la croissance végétative et au début de la sporulation mais les spores de *Bacillus anthracis* ont montré une activité estérase après leur activation, soit une exposition à une combinaison d'acides aminés (Ferencko *et al.* 2004). Cette activité enzymatique s'est révélée être un bon indicateur de la germination des spores. C'est pourquoi la détection des spores aérobies par cytométrie de flux en phase solide a été envisagée durant ce projet afin d'améliorer la détection de ce traceur biologique.

6.1 ANALYSE DES SPORES DE BSA PAR CYTOMÉTRIE DE FLUX EN PHASE SOLIDE

Les conditions d'incubation optimales à l'aide de la technique DVC ont été déterminées, soit 0,50 µg/L pour une durée d'incubation de 3 heures. Cependant, la détection en eau naturelle est peu évidente. Le nombre de spores détectées, très supérieur à la mesure par croissance sur milieu de culture, peut être du à une meilleure sensibilité ou à la présence de faux-positifs. Les concentrations mesurées lors de la détection directe en eau naturelle montrent l'importance de la présence des particules. Malgré un volume filtré d'eau naturelle (usine de Pont-Viau) plus important (de 1 à 50 mL), la concentration en spores aérobies est relativement plus faible (de 4400 à 584 comptes/100 mL). D'autre part, la mesure de l'activité enzymatique souffre intrinsèquement de divers inconvénients. En effet, plusieurs paramètres ont une influence sur la rétention du fluorochromé à l'intérieur de la cellule et sur sa détection optimale (Breeuwer *et al.* 1995). Certains des paramètres d'intérêt, encadrés, sont précisés à la figure 6.1.

Ainsi, le transport du Chemchrome V6 (cFDA) dépend de la diffusion passive. Une concentration plus importante de fluorochromé permettrait un meilleur taux d'utilisation mais cela n'est pas possible étant donné la faible solubilité du dérivé de fluorescéine utilisé pour la détection. De plus, la température, le pH, la pression osmotique, la salinité et la présence de facteurs d'inhibition affectent l'activité enzymatique. Le pH intracellulaire est important car la fluorescence de la fluorescéine en dépend et puisqu'il affecte l'activité enzymatique. L'efflux du fluorochromé est également un mécanisme non négligeable bien que le taux d'efflux soit inférieur au taux d'utilisation et au taux d'hydrolyse du composé estérifié (Breeuwer *et al.* 1995). Puisqu'il s'agit d'une réaction entre une enzyme et son substrat, la réaction peut cesser lorsque certaines concentrations des produits sont atteintes et en général, l'accumulation des produits de la réaction inhibe l'activité de l'enzyme. Le taux de la réaction enzymatique augmente avec la croissance du ratio de l'enzyme par rapport au substrat, jusqu'au point de saturation (Prescott *et al.* 2003).

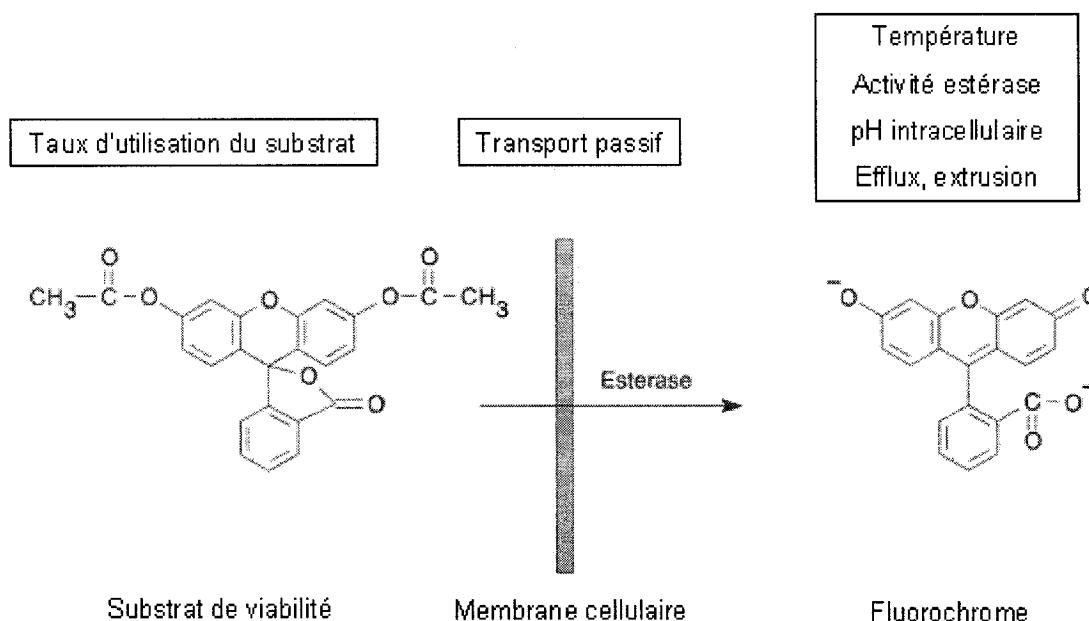


Figure 6-1 : Clivage du substrat fluorogène par les estérases

(Adapté du document de Molecular Probes)

La cytométrie de flux en phase solide est la seule technique capable d'énumérer une cellule unique sur une membrane, de manière fiable. La méthode préalablement étudiée pour détecter les spores aérobies en eau naturelle, soit la distinction selon la variation de durée d'incubation, a entraîné la présence de bâtonnets de *Bacillus* particulièrement longs. Cette longueur augmentait avec la durée d'incubation. Il était alors difficile de déterminer le nombre de cellules originellement filtrées. L'utilisation d'un antibiotique a permis de remédier à cette situation. Les quinolones, agents bactériostatiques, agissent par inhibition de l'activité de la DNA-gyrase, une topoisomérase (II) qui hydrolyse l'ATP. Les quinolones peuvent aussi inhiber l'activité de la topoisomérase (IV) qui dispose de similitudes structurelles avec la DNA-gyrase. La topoisomérase (II) serait la cible de l'activité des fluoroquinolones pour les bactéries Gram-négatives alors que la topoisomérase (IV) le serait pour les bactéries Gram-positives (Blondeau, 1999). Ces deux topoisomérases sont requises pour la réPLICATION de l'ADN bactérien, la transcription, la réparation et la recombinaison.

Malgré l'ajout de la ciprofloxacine, l'analyse des résultats en eau naturelle montre la nécessité d'une amélioration de la méthode considérant les avantages de la cytométrie de flux en phase solide et l'intérêt de la détection rapide des spores aérobies. Au contraire de la microscopie en épifluorescence, la limite de détection de l'appareil permet de réduire le volume d'échantillons à filtrer et de diminuer le nombre de cellules auto-fluorescentes non ciblées. Ceci réduit le risque de blocage de la membrane à cause du gâteau. L'ajout d'un contre-colorant comme le CSE/2 diminue les comptes viables, laissant penser qu'il permet d'augmenter la précision des cellules réellement actives (Catala *et al.* 1999). Cependant, les écarts constatés par rapport à un compte au Chemchrome V6 seulement dépendent du type d'eau à l'étude.

D'après la technique biodosimétrique, des log d'inactivation doivent être déterminés. Or, l'extrapolation des comptes lorsque la membrane est chargée de particules naturelles peut provoquer une mauvaise estimation du nombre d'événements positifs (viables). La combinaison de la technique DVC et d'une sonde FISH serait une approche intéressante pour dénombrer les spores de *Bacillus* plutôt que la population générale de spores de BSA. La sensibilité de la détection s'en trouverait améliorée à condition de trouver une sonde détectable par le cytomètre et suffisamment fluorescente. Cette combinaison a déjà été employée lors de l'étude des *Enterobacteriaceae* (Baudart *et al.* 2002; Lepeuple *et al.* 2003). De plus, différentes concentrations de TSB (le substrat nécessaire à la germination) seraient à étudier. Des cellules soumises à un antibiotique auraient une exigence nutritive plus importante bien qu'il ait été déjà montré que la détection des spores de BSA par croissance sur milieu de culture n'était pas influencée par le milieu et la température d'incubation (Barbeau *et al.* 1997). Enfin, puisque chaque espèce et chaque souche réagissent de manière différente aux antibiotiques et qu'une forte variabilité dans leur résistance est supposée, l'utilisation d'un mélange d'antibiotiques est proposée pour favoriser l'élongation cellulaire. Cela permettrait de fournir des comptes viables plus précis en eau naturelle puisque des cellules résistantes à un antibiotique pourraient être plus sensibles à un autre antibiotique.

Enfin, la cytométrie de flux en phase solide a l'avantage, à travers la mesure de fluorescence, d'elongation et d'après l'observation microscopique, de mettre en évidence l'ensemble du processus de germination de la spore. Ainsi, une activation à la chaleur et la présence d'éléments nutritifs lors de la pasteurisation du filtre plutôt que de l'échantillon d'eau peuvent être les causes d'une observation rapide de spores en germination. La séquence d'événements qui permet le passage de la spore en dormance à la cellule végétative est divisée en trois étapes au moins soit :

- l'activation, qui peut être accomplie au traitement à la chaleur dans un milieu nutritionnel approprié et par exposition à un faible pH (Demain et Solomon, 1985). En conditions naturelles, l'activation en milieu aqueux semble occasionnelle et lente. La pasteurisation permet l'activation des spores qui peut être aussi apportée par certains produits chimiques (*germinants*) comme la L-alanine, l'adénosine, le glucose et certains agents réducteurs (Frobisher, 1968).
- la germination, pour laquelle un changement irréversible est constaté. L'activité métabolique est initiée et des nutriments sont requis (P, N, S, C) ainsi que de l'énergie. La présence d'eau, de L-alanine et d'électrolytes sont essentielles. Deux phases se suivent au cours desquelles la spore perd complètement son aspect réfractaire et la cellule enflle.
- l'excroissance, qui survient uniquement si les conditions de nutrition cellulaire et de croissance sont favorables. Cette phase consiste en un gonflement de la spore, suivi de son élongation et d'un développement cellulaire. Cette succession d'événements induit la formation d'une cellule végétative active, ce qui explique la hausse de l'activité enzymatique des spores de BSA au cours du temps.

6.2 AMÉLIORATION DE LA MÉTHODE BIODOSIMÉTRIQUE

La détection d'une activité enzymatique de cellules végétatives de *E. coli*, suite à une pasteurisation (75°C - 15 min), montre que celle-ci n'entraîne pas forcément une lyse et un largage du matériel intracellulaire. Bien que ces cellules ne puissent pas croître sur un milieu de culture, la détection d'activité estérase signifie que leur membrane n'est pas fortement endommagée. Elle montre que la filtration de grands volumes d'échantillons d'eau peut entraîner une forte concentration cellulaire sur la membrane, empêchant potentiellement la détection de spores aérobies présentes dans le gâteau de filtration.

De manière pratique, l'analyse des spores dans de grands volumes d'échantillons devrait être précédée d'une étude de l'influence du volume filtré sur leur décompte, pour le type d'eau à l'étude. Ceci permettrait de valider le volume maximal filtrable, notamment pour des eaux peu concentrées en spores aérobies et nécessitant des volumes importants pour l'obtention de comptes (UFC) significatifs. Cependant, la diminution du nombre de spores constatée lorsque le volume d'eau augmente ne dépendrait pas du volume filtré mais du type d'eau, par exemple du type de particules. Il serait donc intéressant de procéder à une caractérisation précise des particules (utilisation d'un compteur *Brightwell*) ou de la quantité de la biomasse présente (à l'aide de sondes telles que celles utilisées lors d'études de biofilms). Ceci permettrait de prendre en compte la turbidité microbienne et particulaire et de vérifier si la taille de particules est un facteur déterminant dans la diminution de la récupération de spores de BSA.

Cette étude a montré que les spores aérobies constituaient un indicateur biodosimétrique de choix. La considération d'une population hétérogène de spores aurait pu limiter la modélisation linéaire de l'inactivation telle que retrouvée lors des études de désinfection de *B. subtilis*, en conditions de laboratoire. Cependant, les spores ont suivi une cinétique d'inactivation de Chick-Watson (avec $n = 1$) dans l'eau naturelle étudiée. Ainsi, leur mesure a permis de confirmer l'application de l'approche biodosimétrique pour valider la performance des contacteurs d'ozonation.

Par contre, la mise en œuvre d'une technique de concentration ne dépendant pas du type de particules ou du volume filtré serait à développer, au contraire d'une technique de concentration par filtration frontale. Plusieurs paramètres seraient à considérer lors de la conception du système: potentiel colmatant des particules en suspension, température de l'eau (qui affecte la perméabilité des membranes), matière organique naturelle (MON), alcalinité, conductivité, dureté et présence de sels dont la limite de solubilité pourrait être dépassée selon le type de membranes utilisé. Plusieurs facteurs peuvent aussi influencer le taux de récupération (tels que la souche et l'état physiologique) et l'adhésion aux membranes (qui dépend du système membranaire, des caractéristiques des eaux et des propriétés electrocinétiques des microorganismes). Il semble aussi que le taux de récupération soit influencé par plusieurs paramètres (flux de perméat, type de microorganismes, matériau membranaire et eau d'alimentation) et enfin la récupération par élution reste une procédure complexe. La méthode développée au Chemscan RDI® pour mesurer l'activité enzymatique, efficace pour détecter les spores de *Bacillus subtilis*, permettrait de mesurer les taux de récupération de la méthode de concentration développée.

Par ailleurs, le décompte des spores de BSA prend un certain temps (incubation de 24h) alors que l'intérêt des stations est d'obtenir une mesure en temps réel. Sachant que la présence de particules en eau naturelle limite pour l'instant la détection des spores par cytométrie de flux en phase solide, il est nécessaire de se tourner vers d'autres indicateurs. L'utilisation de l'ATP et du SYBR-II (un marqueur de l'acide nucléique) serait à valider d'autant plus que leur usage contournerait le problème de la faible concentration de spores de BSA généralement retrouvée à l'eau désinfectée. La détection de l'ATP par luminométrie et celle des biopolymères (ADN et ARN liés au SYBR-II) par fluorimétrie sont rapides mais, tel que précisé au chapitre 2, des recherches sont requises pour vérifier leurs concentrations en eau naturelle et démontrer une inactivation linéaire lors de la désinfection.

Concernant l'application pratique de la technique biodosimétrique, la réalisation de la courbe de référence à l'aide du pilote d'ozonation et la validation sur les cuves de DesBaillets à échelle réelle devraient être réalisées la même journée. Bien que la qualité d'eau n'ait pas fortement varié au cours des deux jours successifs de manipulation, lors des quatre essais biodosimétriques, cela éliminerait un facteur de variabilité. Par ailleurs, puisque la précision de la mesure dépend de la pente de la courbe de référence, il est clair que la méthode convient surtout, dans le cas de l'usine DesBaillets, lorsque l'inactivation augmente rapidement selon la dose appliquée, c'est-à-dire en été lorsque la performance de l'ozonation est maximale. Pour des stations de traitement dont les conditions d'application du désinfectant sont différentes (températures plus chaudes ou doses appliquées plus élevées), la validation biodosimétrique devrait être réalisable.

Les essais réalisés ont permis d'une certaine manière de mesurer l'impact de la qualité de l'eau sur l'efficacité de la désinfection. Cet axe nécessite de plus amples recherches afin de regrouper le maximum d'informations à ce sujet. Une étude de l'influence saisonnière de la qualité de l'eau sur la performance des procédés de désinfection serait possible. Les résultats obtenus à l'usine DesBaillets devraient aussi être validés pour d'autres usines employant des procédés de désinfection divers (ozonation, chlore ou bioxyde de chlore). D'après l'étude de El-Baz (2002), plus le T_{10}/T est faible, plus le gain potentiel d'une meilleure évaluation des CT est élevé. Une étude de validation biodosimétrique des CT pour des usines ayant des efficacités hydrauliques inférieures à celle de DesBaillets, comme à l'usine Chomedey (Laval), serait utile puisque le T_{10}/T (qui varie de 0,43 à 0,52) y est inférieur à celui de l'usine DesBaillets (T_{10}/T de 0,64 à 0,78). Ce travail constituerait cependant un défi en raison des faibles concentrations de spores de BSA mesurées à l'entrée du procédé d'ozonation (~ 1 UFC/100 mL).

Tel que prévu, les doses obtenues avec la méthode réglementaire sont plus faibles que celles obtenues avec la méthode biodosimétrique et la technique de l'IDDF. Pour des installations ayant de faibles objectifs de désinfection, il est possible de calculer la dose

à l'aide du CT_{10} car (i) la méthode est certes conservatrice mais reste pratique (ii) les résultats obtenus montrent que l'écart par rapport à la dose réelle est faible lorsque la dose appliquée diminue (iii) le risque microbiologique l'emporte sur le risque lié à la formation de SPD (sous-produits de désinfection). Au contraire, pour des stations employant de fortes doses, la sous-estimation est plus importante et un calcul approprié du CT est nécessaire pour limiter la formation de SPD. La mise en œuvre des modèles de prédition de la désinfection doit cependant être validée, autant l'IDDF que la CFD, par biodosimétrie par exemple. L'intérêt de l'approche biodosimétrique est la prise en compte de l'ensemble des phénomènes ayant une influence sur l'efficacité de la désinfection, autant liés à l'oxydant qu'à la matrice de l'eau et aux microorganismes. Jusqu'à présent, des méthodes efficaces ont été introduites pour réduire la formation des bromates par oxydation par HOCl des eaux contenant des ions bromures, au lieu d'un simple ajustement de pH avant l'ajout d'azote ammoniacal (Buffle *et al.* 2004). Cette approche devrait cependant être appliquée selon le type d'eau, considérant la formation potentielle de THM.

L'intégrité des procédés de désinfection des eaux potables doit être assurée en tout temps. La mise en œuvre d'outils biodosimétriques permet de calculer la dose réelle et de valider les modèles de calcul développés. L'utilisation de la technique dosimétrique permet de vérifier à la fois la réduction du risque microbiologique et le respect de la concentration de SPD dans les eaux traitées. De plus, la démonstration que le concept du CT_{10} sous-estime la dose réelle permet de retarder les investissements requis pour accroître la capacité de traitement et de limiter les pratiques de désinfection, limitant ainsi la formation des SPD. Enfin, une remise en question des critères de conception des procédés de désinfection peut être envisagée suite à cette étude, sous réserve de résultats complémentaires. Les travaux effectués montrent également la nécessité de valider les modèles mis en œuvre pour décrire les contacteurs. Dans le cas de l'usine DesBaillets, le modèle IDDF est remis en question et d'autres modèles devraient être introduits afin d'affiner le calcul de la dose réelle appliquée.

CHAPITRE 7 CONCLUSION

Cette étude a permis la comparaison de différents calculs de doses d'ozone dans les contacteurs de l'usine DesBaillets (Montréal, Qc). La dose réelle appliquée a été obtenue suite au développement d'une technique biodosimétrique impliquant les spores de bactéries sporulantes aérobies. Celles-ci ont été utilisées comme indicateurs de désinfection du fait de leur résistance aux traitements, de leur cinétique d'inactivation linéaire, de la facilité de détection et du faible coût de la mesure. Leur concentration a été précisément obtenue par filtration de grands volumes d'échantillons à l'eau ozonée.

Pour l'ensemble des essais effectués, les spores de BSA ont suivi une cinétique d'inactivation de Chick-Watson en eau naturelle, ce qui a permis la détermination précise de la dose suite à la mesure de leur inactivation. De plus, le calcul réglementaire sous-estimait la dose réelle appliquée dans les bassins de contact et le modèle IDDF préalablement développé pour cette usine la surestimait. En choisissant la concentration résiduelle, le CT_{10} permet de considérer la demande en oxydant exercée par le type d'eau en question mais plusieurs variables peuvent affecter le désinfectant et des mécanismes de protection des microorganismes peuvent réduire sa disponibilité. D'autre part, les modèles doivent être suffisamment précis pour prédire de manière adéquate la dose effective reçue par les microorganismes sous diverses conditions d'opération.

Le développement de ces modèles est d'un intérêt certain afin de prendre en compte les caractéristiques spécifiques à un site et de prédire précisément et rapidement la dose microbiologique effective. L'objectif est de limiter l'application de désinfectant et ainsi la formation potentielle de sous-produits de désinfection. Cependant, les modèles doivent être validés par une mesure directe afin de confirmer leurs calculs. Les résultats de cette étude ont montré la possibilité d'utiliser la technique biodosimétrique pour le calcul direct de la performance des procédés de désinfection de l'eau potable.

La méthode développée au cours de cette étude a permis l'analyse de l'influence de la qualité de l'eau sur l'efficacité de l'inactivation microbienne, le calcul de la dose réelle appliquée ainsi que l'appréciation de la prédition du modèle IDDF mis en œuvre pour l'usine DesBaillets. L'outil biodosimétrique autorise finalement le contrôle des procédés de désinfection. La méthode utilise les spores de BSA, indicateur biologique de choix et retrouvé en concentration suffisante lors des essais effectués. La détection a été effectuée par croissance sur milieu de culture, ce qui nécessite une période d'incubation de $22\text{h} \pm 2\text{h}$. Or, une mesure rapide de la performance serait souhaitable.

L'énumération des spores de BSA par l'association de la cytométrie de flux en phase solide et l'analyse de l'activité estérase a été entreprise. L'objectif était de diminuer la durée de détection ainsi que la sensibilité de la mesure pour répondre à cet objectif de diminution du délai d'obtention des résultats. Ainsi, la pasteurisation a permis une germination des spores et a facilité leur détection. La méthode DVC a été employée et une concentration d'antibiotique et une durée d'incubation optimales ont été déterminées lors de l'étude des spores de *B. subtilis* (0,5 µg/L de ciprofloxacine et 3 h d'incubation). Cependant, en eau naturelle, une présence importante de particules a été notée pour des volumes filtrés aussi faibles que 10 ml et 50 ml. Ceci rend difficile la validation de la viabilité cellulaire.

La cytométrie en phase solide permet une mesure rapide de la concentration des cellules viables. Par contre, des recherches additionnelles doivent être menées pour user de cette méthode pour des eaux naturelles, à cause notamment de questions liées à la sensibilité de la mesure. La technique biodosimétrique pourrait également être mise en œuvre en usant de l'ATP et du SYBR-II, indicateurs biochimiques, suite à la réalisation d'études préliminaires concernant ces traceurs. Finalement, la comparaison de la technique biodosimétrique avec la modélisation CFD à l'usine DesBaillets serait intéressante afin de vérifier la précision du modèle numérique.

REFERENCES

- AHIMOU, F., PAQUOT, M., JACQUES, P., THONART, P., ROUXHET, P.G. 2001. Influence of electrical properties on the evaluation of the surface hydrophobicity of *Bacillus subtilis*. *Journal of Microbiological Methods*. 45 : 119-126.
- AKIBA, M., KUNIKANE, S., KIM, H.-S., KITAZAWA, H. 2002. Algae as surrogate indices for the removal of Cryptosporidium oocysts by direct filtration. *Water Science and Technology: Water Supply*. 2 : 3. 73-80.
- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). 1998. Standard methods for the examination of water and wastewater. Washington, DC, USA : American Water Works Association and the Water Environment Federation.
- AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION (AWWA) 1999. Water quality and treatment, a handbook of public water supplies. McGraw-Hill Book Company. P. 960 .
- ANDERSON, E., LARSON, M.A., CORONA-VASQUEZ, B., MARINAS, B.J. 2001. "A comparative study of the inactivation kinetics of Cryptosporidium parvum oocysts and bacillus subtilis spores with chemical disinfectants". Nashville, Tennessee, USA : American Water Works Association - Water Quality Technology Conference.
- AURELL, H., CATALA, P., FARGE, P., WALLET, F., LE BRUN, M., HELBIG, J.H. *et al.* 2004. Rapid Detection and Enumeration of *Legionella pneumophila* in Hot Water Systems by Solid-Phase Cytometry. *Applied and Environmental Microbiology*. 70:3. 1651-1657.
- BAEZA, C., DUCOSTE, J. 2004. A non-biological surrogate for sequential disinfection processes. *Water Research*. 38 : 14-15. 3400-3410.
- BARBEAU, B. 1996. Évaluation des spores de *Bacillus* comme indicateur de l'efficacité

- du traitement d'une filière d'eau potable. Mémoire de maîtrise ès sciences appliquées, 110 pages, École Polytechnique de Montréal.
- BARBEAU, B., BOULOS, L., DESJARDINS, R., COALLIER, J., PRÉVOST, M., DUCHESNE, D. 1997. A modified method for the enumeration of aerobic spore-forming bacteria. *Canadian Journal of Microbiology*. 43 : 976-980.
- BARBEAU, B., MYRE, I., FACILE, N., DESJARDINS, R., PRÉVOST, M. 1998. "Evaluating disinfection processes: aerobic spore-formers as a surrogate for Giardia et Cryptosporidium". San Diego, California, USA : American Water Works Association - Water Quality Technology Conference.
- BARBEAU, B., BOULOS, L., DESJARDINS, R., COALLIER, J., PRÉVOST, M. 1999. Examining the use of aerobic spore-forming bacteria to assess the efficiency of chlorination. *Water Research*. 33 : 13. 2941-2948.
- BARBEAU, B., HUFFMAN, D., RIVARD, M., CHANDRA, M. 2002. "Impacts of water quality on the inactivation of viral and bacterial surrogates". Seattle, Washington, USA : American Water Works Association - Water Quality Technology Conference.
- BARBEAU, B. 2004. *Impacts de la qualité de l'eau sur l'efficacité de la désinfection des eaux potables*. Thèse de doctorat, École Polytechnique - Génies Civil, Géologique et des Mines.
- BARBEAU, B., HUFFMAN, D., MYSORE, C., DESJARDINS, R., PRÉVOST, M. 2004. Examination of discrete and confounding effects of water quality parameters during the inactivation of MS2 phages and *Bacillus subtilis* spores with free chlorine. *Journal of Environmental Engineering and Science*. 3 : 4. 255-268.
- BARBEAU, B., DESJARDINS, R., MYSORE, C., PRÉVOST, M. 2005. Impacts of water quality on chlorine and chlorine dioxide efficacy in natural waters. *Water Research*. 39 : 10. 2024-2033.

- BARCINA, I., ARANA, I., SANTORUM, P., IRIBERRI, J., EGEA, L. 1995. Direct viable count of Gram-positive and Gram-negative bacteria using ciprofloxacin as inhibitor of cellular division. *Journal of Microbiological Methods*. 22:139-150.
- BAUDART, J., COALLIER, J., LAURENT, P., PRÉVOST, M. 2002. Rapid and sensitive enumeration of viable diluted cells of members of the family Enterobacteriaceae in freshwater and drinking water. *Applied and Environmental Microbiology*. 68 : 10. 5057-5063.
- BAUTISTA, D.A., MCINTYRE, L., LALEYE, L., GRIFFITHS, M.W. 1992. The application of ATP bioluminescence for the assessment of milk quality and factory hygiene. *Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology*. 1 : 179-193.
- BELLAMY, W.D. 1995. Denver, Colorado, USA : American Water Works Association Research Foundation and American Water Works Association. 179 p. # 90668.
- BELLAMY, W.D., FINCH, G.R., HAAS, C.N. 1998. Integrated disinfection design framework. Denver Colorado, USA : American Water Works Association Research Foundation and American Water Works Association. 68.
- BELLAMY, W., CARLSON, K., PIER, D., DUCOSTE, J., CARLSON, M. 2000. Determining disinfection needs. *Journal of American Water Works Association*. 92 : 5. 44-52.
- BERGSTEDT, O., RYDBERG, H. 2002. Naturally occurring autofluorescent particles as surrogate indicator of sub-optimal pathogen removal in drinking water. London : Hahn, H., Hoffmann, H. and Ødegaard, H. (Eds.), Chemical water and wastewater treatment VII, IWA publishing. P. 1-8.
- BERLANGA, M., MONTERO, M.T., HERNANDEZ-BORRELL, J., VINAS, M. 2004. Influence of the cell wall on ciprofloxacin susceptibility in selected wild-type Gram-negative and Gram-positive bacteria. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 23:627-630.

- BESNARD, V., FEDERIGHI, M., CAPPELIER, J.M. 2000. Development of a direct viable count procedure for the investigation of VBNC state in *Listeria monocytogenes*. *Letters in Applied Microbiology*. 31:77-81.
- BLONDEAU, J.M. 1999. Expanded Activity and Utility of the New Fluoroquinolones: A Review. 21:1. 3-40.
- BOE-HANSEN, R., MARTINY, A.C., ARVIN, E., ALBRECHTSEN, H.-J. 2003. Monitoring biofilm formation and activity in drinking water distribution networks under oligotrophic conditions. *Water Science and Technology*. 47 : 5. 91-97.
- BONDE, G. 1977. Bacterial indication of water pollution. *Advances in Aquatic Microbiology*. 364 pages, Academic Press, London
- BOULOS, L., PRÉVOST, M., BARBEAU, B., COALLIER, J., DESJARDINS, R. 1999. LIVE/DEAD[®] BacLightTM: application of a new rapid staining method for direct enumeration of viable and total bacteria in drinking water. *Journal of Microbiological Methods*. 37 : 1. 77-86.
- BRAILSFORD, M. 2000. One microbial analyser - four critical drinking water tests. *Water* 21. 44-46.
- BREEUWER, P., DROCOURT, J.-L., ROMBOUTS, F.M., ABEE, T. 1994. Energy-dependent, Carrier-Mediated Extrusion of Carboxyfluorescein from *Saccharomyces cerevisiae* Allows Rapid Assessment of Cell Viability by Flow Cytometry. *Applied and Environmental Microbiology*. 60:5. 1467-1472.
- BREEUWER, P., DROCOURT, J.-L., BUNSCHOTEN, N., ZWIETERING, M.H., ROMBOUTS, F.M., ABEE, T. 1995. Characterization of Uptake and Hydrolysis of Fluorescein Diacetate and Carboxyfluorescein Diacetate by Intracellular Esterases in *Saccharomyces cerevisiae*, Which Result in Accumulation of Fluorescent Product. *Applied and Environmental Microbiology*. 61:4. 1614-1619.

- BROADAWAY, S.C., BARTON, S.A., PYLE, B.H. 2003. Rapid staining and enumeration of small numbers of total bacteria in water by solid-phase laser cytometry. *Applied and Environmental Microbiology*. 69 : 7. 4272-4273.
- BUFFLE, M.-O., GALLI, S., VON GUNTEN, U. 2004. Enhanced bromate control during ozonation: the chlorine-ammonia process. *Environmental Science and Technology*. 38 : 19. 5187-5195.
- CABAJ, A., SOMMER, R., SCHOENEN, D. 1996. Biodosimetry: model calculations for UV water disinfection devices with regard to dose distributions. *Water Research*. 30 : 4. 1003-1009.
- CABAJ, A., SOMMER, R., PRIBIL, W., HAIDER, T. 2002. The spectral UV sensitivity of microorganisms used in biodosimetry. *Water Science and Technology: Water Supply*. 2 : 3. 175-181.
- CABELLI V. J. 1977. *Clostridium perfringens* as a water quality indicator. p. 65-79. In A. W. Hoadley and B. J. Dutka (ed.), *Bacterial indicators/health hazards associated with water*, STP 635. *American Society for Testing and Materials*. Washington, D.C.
- CAMPER, A.K., MCFETERS, G.A., CHARACKLIS, W.G., JONES, W.L. 1991. Growth kinetics of coliform bacteria under conditions relevant to drinking water distribution system . *Applied and Environmental Microbiology*. 57 : 8. 2233-2339.
- CAREY, C.M., LEE, H., TREVORS, J.T. 2004. Biology, persistence and detection of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis* oocyst. *Water Research*. 38:818-862.
- CARLSON, K., PIER, D., BELLAMY, W., CARLSON, M., DUCOSTE, J., AMY, G. 2001. Denver, Colorado, USA : American Water Works Assosication Research Foundation and American Water Works Association. 152 p. #90848.
- CARTIER, C., PRÉVOST, M., BESNER, M.-C., BARBEAU, B. 2006. Optimising the

- detection of aerobic spore-formers in environmental samples. *Submitted.*
- CATALA, P., PARTHUISOT, N., BERNARD, L., BAUDART, J., LEMARCHAND, K., LEBARON, P. 1999. Effectiveness of CSE to counterstain particles and dead bacterial cells with permeabilised membranes: application to viability assessment in waters. *FEMS Microbiology Letters.* 178 : 219-226.
- CHAURET, C.P., RADZIMINSKI, C.Z., LEPUIL, M., CREASON, R., ANDREWS, R.C. 2001. Chlorine dioxide inactivation of cryptosporidium parvum oocysts and bacterial spore indicators. *Applied and Environmental Microbiology.* 67 : 7. 2993-3001.
- CHIOU, C.-F., TORRES-LUGO, M., MARINAS, B.J., ADAMS, J.Q. 1997. Nonbiological surrogate indicators for assessing ozone disinfection. *Journal of American Water Works Association.* 89 : 8. 54-66.
- CHIU, K., LYN, D.A., SAVOYE, P., BLATCHLEY, E.R. 1999. Integrated UV disinfection model based on particle tracking. *Journal of Environmental Engineering - ASCE.* 125 : 1. 7-16.
- CHO, M., CHUNG, H., YOON, J. 2002. Effect of pH and importance of ozone initiated radical reactions in inactivating *Bacillus subtilis* spore. *Ozone: Science and Engineering.* 24 : 2. 145-150.
- CHO, M., CHUNG, H., YOON, J. 2003a. Disinfection of water containing natural organic matter by using ozone-initiated radical reactions. *Applied Environmental Microbiology.* 69 : 4. 2284-2291.
- CHO, M., CHUNG, H., YOON, J. 2003b. Quantitative evaluation of the synergistic sequential inactivation of *Bacillus subtilis* spores with ozone followed by chlorine. *Environmental Science & Technology.* 37 : 10. 2134-2138.
- COALLIER, J.M., PRÉVOST, M., ROMPRÉ, A., DUCHESNE, D. 1994. The optimization and application of two direct viable count methods for bacteria in distributed drinking water. *Canadian Journal of Microbiology.* 40 : 10. 830-836.

- COALLIER, J., PRÉVOST, M., BARBEAU, B., BOULOS, L., DUCHESNE, D., DESJARDINS, R. 1996. "Full-scale physical and chemical removals of a fast response and economic microbiological indicator". *WQTC-AWWA Conference*.
- COHN, P.D., COX, M., BERGER, P.S. 1999. Health and aesthetic aspects of water quality. *Water Quality and treatment. A handbook of Community Water Supplies*. 86 p.
- COOLS, I., D'HAESE, E., UYTTENDAELE, M., STORMS, E., NELIS, H.J., DEBEVERE, J. 2005. Solid phase cytometry as a tool to detect viable but non culturable cells of *Campylobacter jejuni*. *Journal of Microbiological Methods*. 63:107-114.
- CORNWELL, D.A., MACPHEE, M.J., BROWN, R.A., VIA, S.H. 2003. Demonstrating cryptosporidium removal using spore monitoring at lime-softening plants. *Journal of American Water Works Association*. 95 : 5. 124-133.
- CRAIK, S.A., SMITH, D.W., BELOSEVIC, M., CHANDRAKANTH, M. 2002. Use of bacillus subtilis spores as model micro-organisms for ozonation of *Cryptosporidium parvum* in drinking water treatment. *Environmental Engineering Science*. 1 : 173-186.
- CRAIK, S.A. 2005. Effect of micro-mixing conditions on predictions of *Cryptosporidium* inactivation in an ozone contactor. *Ozone: Science and Engineering*. 27 : 487-494.
- CRAUN, G.F., BERGER, P.S., CALDERON, R. 1997. Coliform bacteria and waterborne disease outbreaks. *Journal of American Water Works Association*. 89 : 3. 96-104.
- CROZES, G.F., HAGSTROM, J.P., CLARK, M., DUCOSTE, J., BUEUS, C. 1999. *Improving clearwell design for CT compliance*. Denver, CO: American Water Works Association Research Foundation .
- D'HAESE, E., NELIS, H.J. 2000. Effect of antibiotics on viability staining of

- Escherichia coli* in solid phase cytometry. *Journal of Applied Microbiology*. 89:778-784.
- DELAHAYE, E., WELTE, B., LEVI, Y., LEBLON, G., MONTIEL, A. 2003. An ATP-based method for monitoring the microbiological drinking water quality in a distribution network. *Water Research*. 37 : 15. 3689-3696.
- DEMAIN, A.L., SOLOMON, N.A. 1985. Biology of industrial microorganisms. Stoneham, MA, USA : Benjamin-Cummings Publishing Company. 573 pages.
- DO-QUANG, Z., COCKX, A., LAINE, J.M., ROUSTAN, M. 2001. Applying CFD modelling in order to enhance water treatment reactors efficiency: Example of the ozonation process. *Water Science and Technology: Water Supply*. 1 : 4. 125-130.
- DOW, S.M., BARBEAU, B., VON GUNTEN, U., CHANDRAKANTH, M., AMY, G., HERNANDEZ, M. 2006. The impact of selected water quality parameters on the inactivation of *Bacillus subtilis* spores by monochloramine and ozone. *Water Research*. 40 : 373 – 382.
- DRIEDGER, A., MARINAS, B.J. 2000. Sequential inactivation of *Cryptosporidium parvum* oocysts with ozone and free chlorine. *Water Research*. 34 : 14. 3591-3597.
- DRIEDGER, A., STAUB, E., PINKERNELL, U., MARINAS, B., KÖSTER, W., VON GUNTEN, U. 2001. Inactivation of *Bacillus subtilis* spores and formation of bromate during ozonation. *Water Research*. 35 : 2950-2960.
- DUCOSTE, J., CARLSON, K., BELLAMY, W. 2001. The Integrated Disinfection Design Framework Approach to Reactor Hydraulics Characterization. *Journal of Water Supply: Research and Technology - AQUA*. 50 : 4.
- DUGAN, N.R., FOX, K.R., OWENS, J.H., MILTNER, R.J. 2001. Controlling *Cryptosporidium* oocysts using conventional treatment. *Journal of American Water Works Association*. 93 : 12. 64-76.

- DUNN, R., BUTTON, K. 2001. "Using biological indicators to evaluate treatment process efficiency". Nashville, Tennessee, USA : American Water Works Association - Water Quality Technology Conference.
- EDBERG, S.C., RICE, E.W., KARLIN, R.J., ALLEN, M.J. 2000. *Escherichia Coli* : The best biological drinking water indicator for public health protection. *Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement*. 88 : 106S-116S.
- EL BAZ, G. 2002. Développement d'un modèle de calcul de la performance des unités de désinfection (application aux usines Chomedey et esBaillets). Mémoire ès sciences appliquées, 194 pages, École Polytechnique de Montréal.
- EMELKO, M.B. 2001. *Removal of Cryptosporidium parvum by granular media filtration*. PhD thesis, 356 p. p. University of Waterloo, Ontario, Canada.
- EMELKO, M.B. 2003. Removal of viable and inactivated Cryptosporidium by dual- and tri-media filtration. *Water Research*. 37 : 12 . 2998-3008.
- EUROPEAN UNION. 1998. Common position (EC) No 13/98 adopted by the Council on 19 December 1997 with a view to the adoption of the Council Directive on the quality of water intended for human consumption. Official Journal of the European Communities. 26.3.98. C91/1-C91/27
- FACILE, N. 1998. Mesure des CT d'inactivation des bactéries sporulantes aérobies par ozonation, Mémoire ès sciences appliquées, 94 pages, École Polytechnique de Montréal.
- FACILE, N., BARBEAU, B., PRÉVOST, M., KOUDJONOU, B. 2000. Evaluating bacterial aerobic spores as a surrogate for *Giardia* and *Cryptosporidium* inactivation by ozone. *Water Research*. 34 : 12. 3238-3246.
- FERENCKO, L., COTE, M.A., ROTMAN, B. 2004. Esterase activity as a novel parameter of spore germination in *Bacillus anthracis*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 319:854-858.

- FINCH, G.R., BLACK, E.K., GYUREK, L. BELOSEVIC, M. 1994. Ozone disinfection of Giardia and Cryptosporidium. American Water Works Association Research Foundation. American Water Works Association. Denver, CO
- FINCH, G.R., CHOE, K. 1999. Using *Bacillus* spores as a surrogate for ozone inactivation of *Cryptosporidium*. *Proceedings of the 14th Ozone World Congress, International Ozone Association*, Dearborn, MI, USA. pp. 35-42
- FINCH GR, LI H. Inactivation of *Cryptosporidium* at 11°C using ozone or chlorine dioxide. *Ozone Science & Engineering* 1999;21:477-86.
- FINCH, G.R., HAAS, C.N., OPPENHEIMER, J.A., GORDON, G., TRUSSELL, R.R. 2001. Design criteria for inactivation of Cryptosporidium by ozone in drinking water. *Ozone: Science and Engineering*. 23 : 4. 259-284.
- FINEGOLD, S.M., SUTTER, V.L., MATHISON, G.E. 1983. Normal indigenous intestinal flora - HUMAN INTESTINAL MICROFLORA IN HEALTH AND DISEASE. New York: 1:3-31.
- FROBISHER, M. 1968. Fundamentals of Microbiology. An introduction to the microorganisms with special reference to the prokaryotes (8th Edition). Philadelphia, USA : W. B. Saunders Company. 629 p.
- GALE, P., PITCHERS, R., GRAY, P. 2002. The effect of drinking water treatment on the spatial heterogeneity of micro-organisms: Implications for assessment of treatment efficiency and health risk. *Water Research*. 36 : 6. 1640-1648.
- GALOFRÉ, B., ISRAEL, S., DELLUNDE, J., RIBAS, F. 2004. Aerobic bacterial spores as process indicators for protozoa cysts in water treatment plants. *Water Science and Technology*. 50 : 1. 165-172.
- GAZENKO, S.V., REPONEN, T.A., GRINSHPUN, S.A., WILLEKE, K. 1998. Analysis of Airborne Actinomycete Spores with Fluorogenic Substrates. *Applied and Environmental Microbiology*. 64:11. 4410-4415.
- GELDREICH, E.E., ALLEN, M.J., TAYLOR, R.H. 1978. Interferences to coliform

- detection in potable water supplies. *Evaluation of the microbiology standards for drinking water*. Washington, DC, USA : C.W. Hendricks (ed.) United States Environmental Protection Agency. P. 13-20.
- GODFREE, A.F., KAY, D., WYER, M.D. 1997. Fecal streptococci as indicators of faecal contamination in water. *Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement*. 110S-119S.
- GOSTIN, L.O., LAZZARINI, Z., NESLUND, V.S., OSTERHOLM, M.T. 2000. Water quality laws and waterborne diseases: *Cryptosporidium* and other emerging pathogens. *American Journal of Public Health*. 90 : 6. 847-853.
- GREENE, D.J., FAROUK, B., HAAS, C.N. 2004. CFD design approach for chlorine disinfection processes. *Journal of the American Water Works Association*. 96 : 8. 138-150.
- GRIFFITHS, M.W. 1993. Applications of bioluminescence in the dairy industry. *Journal of Dairy Science*. 76 : 3118-3125.
- GUYARD, S., MARY, P., DEFIVES, C., HORNEZ, J.P. 1999. Enumeration and characterization of bacteria in mineral water by improved direct viable count method. *Journal of Applied Microbiology*. 86:841-850.
- GYÜRÉK, L.L., FINCH, G.R. 1998. Modeling water treatment chemical disinfection kinetics. *Journal of Environmental Engineering*. 124 : 9. 783-793.
- HAAS, C.N., JOFFE, J. 1994. Disinfection under dynamic conditions: modification of hom's model for decay. *Environmental Science and Technology*. 28 : 7. 1367-1369.
- HAAS, C.N., JOFFE, J., HORNBERGER, J.C., ANMANGANDLA, U., HEATH, M., JACANGELO, J. 1995. Development and validation of rational design methods of disinfection, American Water Works Association Research Foundation. 158 p. 90666.
- HAAS, C.N., JOFFE, J., ANMANGANDLA, U., JACANGELO, J.G., HEATH, M.

1996. Water quality and disinfection kinetics. *Journal of American Water Works Association*. 88 : 3. 95-103.
- HAAS, C.N. 1999. Water quality and treatment, a handbook of public water supplies. *Disinfection*. McGraw-Hill Book Company. P. 960.
- HAAS, C.N., FINCH, G.R. 2001. *Methodologies for the determination of disinfection effectiveness*. 122 pages, Denver, CO: AWWA Research Foundation.
- HAAS, C.N. 2004. Neural networks provide superior description of Giardia lamblia inactivation by free chlorine. *Water Research*. 38 : 14-15. 3449-3457.
- HAAS, C.N. 2005. "Disinfection : towards a fourth generation in water chemical disinfection process". AWWA - *WQTC Conference*
- HANNOUN, I.A., BOULOS, P.F., LIST, E.J. 1998 . Using hydraulic modeling to optimize contact time. *Journal of American Water Works Association*. 90 : 8. 77-87.
- HASLAY, C., LECLERC, H. 1993. Microbiologie des eaux d'alimentation. Paris, France : Lavoisier Techniques et Documentation. 495 p.
- HAVELAAR, A.H., DE HOLLANDER, A.E.M., TEUNIS, P.F.M., EVERAERT, E.G., VAN KRANEN, H.J., VERSTEEGH, J.F.M. 2000. Balancing the risks and benefits of drinking water disinfection: disability adjusted life-years on the scale. *Environmental Health Perspectives*. 108 : 4. 315-321.
- HAWRONSKYJ, J.-M., HOLAH, J. 1997. ATP: a universal hygiene monitor. *Trends in Food Science and Technology*. 8 : 3. 79-84.
- HERSON, D.S., VICTOREEN, H.T. 1980. *Hindrance of coliform recovery by turbidity and non-coliforms*. Cincinnati, Ohio: United States Environmental Protection Agency. Municipal Environmental Research Laboratory. Office of Research and Development. 38-63 p.
- HIBLER, C.P., HANCOCK, C.M., PERGER, L.M., WEGRZYN, J.G., SWABBY, K.D.

1987. American Water Works Association Research Foundation 40 p. #90526.
- HIJNEN, W.A.M., VAN DER SPELD, W.M.H., HOUTEPEN, F.A.P., VAN DER KOOIJ, D. 1997. "Spores of sulphite-reducing clostridia: a surrogate parameter for assessing the effects of water treatment processes on protozoan (oo)cysts ". *International Symposium on Waterborne Cryptosporidium in Newport Beach, CA.*
- HIJNEN, W.A.M., WILLEMSSEN-ZWAAGSTRA, J., HIEMSTRA, P., MEDEMA, G.J., VAN DER KOOIJ, D. 2000a. Removal of sulphite-reducing clostridia spores by full-scale water treatment processes as a surrogate for protozoan (oo)cysts removal. *Water Science and Technology*. 41 : 7. 165-171.
- HIJNEN, W.A.M., VAN VEENENDAAL, D.A., VAN DER SPELD, W.M.H., VISSER, A., HOOGENBOEZEM, W., VAN DER KOOIJ, D. 2000b. Enumeration of faecal indicator bacteria in large water volumes using on site membrane filtration to assess water treatment efficiency. *Water Research*. 34 : 5. 1659-1665.
- HIJNEN, W.A., VAN DE VEER, A.J., VAN BEVEREN, J.. MEDEMA, G.J. 2002. Spores of sulphite-reducing *clostridia* (SSRC) as surrogate for verification of the inactivation capacity of full-scale ozonation for *Cryptosporidium*. *Water Science and Technology: Water Supply*. 2 : 1. 163-170.
- HIJNEN, W.A.M., BAARS, E., BOSKLOPPER, T.G.J., VAN DER VEER, A.J., MEIJERS, R.T., MEDEMA, G.J. 2004. Influence of DOC on the inactivation efficiency of ozonation assessed with *Clostridium perfringens* and a lab-scale continuous flow system. *Ozone: Science and Engineering*. 26 : 465-473.
- HIJNEN, W.A.M., BEERENDONK, E.F., MEDEMA, G.J. 2006. Inactivation credit of UV radiation for viruses, bacteria and protozoan (oo)cysts in water: A review. *Water Research*. 40:3-22.
- HOLM-HANSEN, O., BOOTH, C.R. 1966. The measurement of adenosine triphosphate

- in the ocean and its ecological significance. *Limnology and Oceanography*. 11 : 510-519.
- HUERTAS, A., BARBEAU, B., DESJARDINS, C., GALARZA, A., FIGUEROA, M.A., TORANZOS, G.A. 2003. Evaluation of *Bacillus subtilis* and coliphage MS2 as indicators of advanced water treatment efficiency. *Water Science and Technology*. 47 : 3. 255-259.
- HUNT, N.K., MARINAS, B.J. 1997. Kinetics of *Escherichia Coli* inactivation with ozone. *Water Research*. 31 : 1355-1362.
- JOFRE, J., OLLE, E., RIBAS, F., VIDAL, A., LUCENA, F. 1995. Potential usefulness of bacteriophages that infect *Bacteroides fragilis* as model organisms for monitoring virus removal in drinking water treatment plants. *Appl. Environ. Microbiol.* 61 : 9. 3227-3231.
- JOUX, F., LEBARON, P. 1997. Ecological Implications of an Improved Direct Viable Count Method for Aquatic Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 63:9. 3643-3647.
- JOUX, F., LEBARON, P. 2000. Use of fluorescent probes to assess physiological functions of bacteria at single-cell level. *Microbes and Infection*. 2 : 1523-1535.
- KAWAMURA, K., KANEKO, M., HIRATA, T., TAGUCHI, K. 1986. Microbial indicators for the efficiency of disinfection processes. *Water Science and Technology*. 18 : 10. 175-184.
- KOGURE, K., SIMIDU, U., TAGA, N. 1979. A tentative direct microscopic method for counting living marine bacteria. *Canadian Journal of Microbiology*. 25 : 3. 415-420.
- KORICH, D.G., MEAD, J.R., MADORE, M.S., SINCLAIR, N.A., STERLING, C.R. Effects of ozone, ClO₂, chlorine and monochloramine on *Cryptosporidium parvum* oocyst viability. *Applied Environmental Microbiology* 1990;56:1423-8.

- LANGLAIS, B., RECKHOW, D.A., BRINK, D.R. 1991. Michigan, USA: American Water Works Association Research Foundation. 551 p. 87374.
- LARSON, M.A., MARINAS, B.J. 2003. Inactivation of *Bacillus subtilis* spores with ozone and monochloramine. *Water Research*. 37 : 4. 833-844.
- LAWLER, D.F., SINGER, P.C. 1993. Analysing disinfection kinetics and reactor designs : a conceptual approach versus the SWTR. *Journal of AWWA*. 85 : 11. 67-76.
- LEAHY, J.G., RUBIN, A.G., SPROUL, O.J. 1987. Inactivation of *Giardia muris* cysts by free chlorine. *Applied and Environmental Microbiology*. 53 : 7. 1448-1453.
- LECHEVALLIER, M.W., EVANS, T.M., SEIDLER, R.J. 1981. Effect of turbidity on chlorination efficiency and bacterial persistence in drinking water. *Applied and Environmental Microbiology*. 42 : 1. 159-167.
- LECLERC, H., EDBERG, S., PIERZO, V., DELATTRE, J.M. 2000. Bacteriophages as indicators of enteric viruses and public health risk in groundwaters. *Journal of Applied Microbiology*. 88: 5-21
- LEE, J.Y., DEININGER, R.A. 2001a. Rapid determination of bacteria in water using an ATP assay. *Field analytical chemistry and technology*. 5 : 4. 185-189.
- LEE, J.Y., DEININGER, R.A. 2001b. Rapid quantification of viable bacteria in water using an ATP assay. 27-28.
- LEE, J., DEININGER, A. 2004 . Detection of *E.coli* in beach water within 1 hour using immunomagnetic separation and ATP bioluminescence. *Luminescence*. 19:31-36.
- LEMARCHAND, K., PARTHUISOT, N., CATALA, P., LEBARON, P. 2001. Comparative assessment of epifluorescence microscopy, flow cytometry and solid-phase cytometry used in the enumeration of specific bacteria in water. *Aquatic Microbial Ecology*. 25 : 301-309.

- LEPEUPLE, A.-S., DELABRE, K., GILOUPPE, S., INTERTAGLIA, L., DE ROUBIN, M.-R. 2003. Laser scanning detection of FISH-labelled *Escherichia coli* from water samples. *Water Science and Technology*. 47 : 3. 123-129.
- LEUKER, G. 1999. Description and Application of Biodosimetry : a Testing Procedure for UV Systems. *Journal of Water Supply: Research & Technology - AQUA*. 48 : 4. 154-160.
- LEVENSPIEL, O. 1999. Chemical reaction engineering. John Wiley Inc. 668 p.
- LISLE, J.T., HAMILTON, M.A., WILLSE, A.R., MCFETERS, G.A. 2004. Comparison of fluorescence microscopy and solid-phase cytometry methods for counting bacteria in water . *Applied and Environmental Microbiology*. 70 : 9. 5343-5348.
- LOGSDON, G.S.e.L.E.C. 1982. The role of filtration in preventing waterborne disease. *Journal of American Water Works Association*. 74 :649.
- LIYANAGE, L.R.J., FINCH, G.R., BELOSEVIC, M. Sequential disinfection of *Cryptosporidium parvum* by ozone and chlorine dioxide. *Ozone Science & Engineering*, 1997;19:409–23.
- LYN, D.A., CHIU, K., BLATCHLEY, E.R. 1999. Numerical modeling of flow and disinfection in UV disinfection channels. *Journal of Environmental Engineering - ASCE*. 125 : 1. 17-26.
- MAC KENZIE, W.R., HOXIE, N.J., PROCTOR, M.E., GRADUS, M.S., BLAIR, K.A., PETERSON, D.E. 1994. A massive outbreak in Milwaukee of Cryptosporidium infection tansmitted through the public water supply. *The New England Journal of Medicine*. 331 : 3. 161-167.
- MAMANE-GRAVETZ, H., LINDEN, K.G. 2004. UV disinfection of indigenous aerobic spores: implications for UV reactor validation in unfiltered waters. *Water Research*. 38 : 12. 2898-2906.
- MARINAS, B., RENNECKER, J.L., TEEFY, S., RICE, E.W. 1999. Assessing Ozone Disinfection With Nonbiological Surrogates. *Journal of American Water Works*

- Association.* 91 : 9. 79-89.
- MAZOUA, S., CHAUVEHEID, E. 2005. Aerobic spore-forming bacteria for assessing quality of drinking water produced from surface water. *Water Research.* 39 : 20. 5186-5198.
- McENTEE. 1989. Monitoring of ATP in fermentation seed cultures and in bacterial fermentations, in bioluminescence and chemiluminescence : fundamentals and applied aspects. *John Wiley and Sons.* 87-92.
- MIGNON-GODEFROY, K., GUILLET, J.G., BUTOR, C. 1997. Solid-phase cytometry for detection of rare events. *Cytometry.* 27:336-344.
- MILTNER, R.J., SHUKAIRY, H.M., RICE, E.W., OWENS, J.H., SCHAEFER, F.W., DAHLING, D.R. 1997. "Comparative ozone inactivation of *Cryptosporidium* and other microorganisms". *International symposium on waterborne Cryptosporidium.* Denver, CO : American Water Works Association.
- MDDEP, 2002. Guide de conception des installations de production d'eau potable. www.menv.gouv.qc.ca/eau/potable/guide/index.htm
- MOLECULAR PROBES, INC. Carboxyfluorescein Diacetate, Succinimidyl Ester (CFDA, SE) - Cell Proliferation Tracking by Flow Cytometry. TCO 168. Eugene, Oregon USA
- MOLENAAR, D., BOLHUIS, H., ABEE, T., POOLMAN, B., KONINGS, W.N. 1992. The Efflux of a Fluorescent Probe Is Catalyzed by an ATP-Driven Extrusion System in *Lactococcus lactis*. 174:10. 3118-3124.
- NEYFAKH, A.A., BIDNENKO, V.E., CHEN, L.B. 1991. Efflux-mediated multidrug resistance in *Bacillus subtilis*: Similarities and dissimilarities with the mammalian system. *Biochemistry.* 88:4781-4785.
- NIEMINSKI, E.C. 1999. Using microbial indicators in optimization of treatment plant performance. *Proceedings of the 1999 Rapid Microbiological Monitoring Methods, Feb 23-Feb 24 1999: Water Supply.* 17 : 2. 95-107.

- NIEMINSKI, E.C., BELLAMY, W.D. 2000. Denver Colorado, USA: American Water Works Assosication Research Foundation and American Water Works Association. 281 p. # 90811.
- NIEMINSKI, E.C., BELLAMY, W.D., MOSS, L.R. 2000. Using surrogates to improve plant performance. *Journal of American Water Works Association*. 92 : 3. 67-78.
- OPPENHEIMER, J., NAJM, I., TRUSSELL, R.R., AIETA, E.M., JACANGELO, J. 2000a. Constructing a CT table for Cryptosporidium inactivation with ozone in low TOC and low turbidity waters. *Water Supply*. 18 : 1. 427-430.
- OPPENHEIMER, J.A., AIETA, E.M., TRUSSELL, R.R., JACANGELO, J.G., NAJUM, I.N. 2000b. Denver, Colorado, USA: American Water Works Asssociation Research Foundation and American Water Works Association. 197 p. 90797-7.
- OWENS, J.H., MILTNER, R.J., RICE, E.W., JOHNSON, C.H., DAHLING, D.R., SCHAEFER, F.W. 2000. Pilot-scale inactivation of *Cryptosporidium* and other microorganisms in natural water. *Ozone - Science and Engineering*. 22 : 5. 501-518.
- PAGÉ, M.-C. 2005. *Validation par biodosimétrie du calcul de la dose effective*. Mémoire de Maîtrise ès sciences appliquées, 226 pages, École Polytechnique de Montréal.
- PARTHUISOT, N., CATALA, P., LEMARCHAND, K., BAUDART, J., LEBARON, P. 2000. Evaluation of ChemChrom V6 for bacterial viability assessment in waters. *Journal of Applied Microbiology*. 89 : 370-380.
- PAYMENT, P. 1991. Fate of human enteric viruses, coliphages, and *Clostridium perfringens* during drinking-water treatment. *Canadian journal of microbiology*. 37 : 2. 154-157.
- PAYMENT, P., FRANCO, E. 1993. Clostridium perfringens and somatic coliphages as indicators of the efficiency of drinking water treatment for viruses and protozoan cysts. *Applied and Environmental Microbiology*. 59 : 8. 2418-2424.

- PEETERS, J.E., ARES MAZAS, E., MASSCHELEIN, W.J., VILLACORTA MARTINEZ DE MATORANA, I., DEBACKER, E. Effect of disinfection of drinking water with ozone or chlorine dioxide on survival of *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Applied Environmental Microbiology* 1989;55:1519-22.
- PHE, M.H., DOSSOT, M., BLOCK, J.C. 2004. Chlorination effect on the fluorescence of nucleic acid staining dyes. *Water Research*. 38 : 17. 3729-3737.
- POOLE, K. 2000. Efflux-Mediated Resistance to Fluoroquinolones in Gram-Positive Bacteria and the Mycobacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 44:10. 2595-2599.
- POULIS, J.A., DE PIJPER, M., MOSSEL, D.A., DEKKERS, P.P. 1993a. Assessment of cleaning and disinfection in the food industry with the rapid ATP-bioluminescence technique combined with the tissue fluid contamination test and a conventional microbiological method. *International Journal of Food Microbiology*. 20 : 2. 109-116.
- PRESCOTT, L.M., HARLEY, J.P., KLEIN, D. 2003. *Microbiologie*. De Boeck - Wesmael SA. 1164 p. p.
- QUALLS, R.G., FLYNN, M.P., JOHNSON, J.D. 1983. The role of suspended particles in ultraviolet disinfection. *Journal of the Water Pollution Control Federation*. 55 : 10. 1280-1285.
- RADZIMINSKI, C., BALLANTYNE, L., HODSON, J., CREASON, R., ANDREWS, R.C., CHAURET, C. 2002. Disinfection of *Bacillus subtilis* spores with chlorine dioxide: a bench-scale and pilot-scale study. *Water Research*. 36 : 6. 1629-1639.
- RAKNESS, K. 2001. Denver Colorado, USA: American Water Works Association Research Foundation and American Water Works Association. 152 p. # 90848.
- RAKNESS, K.L., NAJM, I., ELOVITZ, M., REXING, D., VIA, S. 2005. *Cryptosporidium* log-inactivation with ozone using effluent CT₁₀, geometric mean CT₁₀, extended integration CT₁₀ and extended CSTR calculations. *Ozone:*

- Science and Engineering.* 27 : 335-350.
- REGNAULT, B., MARTIN-DELAUTRE, S., A.D.GRIMONT, P. 2000. Problems associated with the direct viable count procedure applied to gram-positive bacteria. *International Journal of food microbiology.* 55:281-284.
- RENNECKER, J.L., MARINAS, B.J., OWENS, J.H., RICE, E.W. 1999. Inactivation of *Cryptosporidium parvum* oocysts with ozone. *Water Research.* 33 : 9. 2481-2488.
- REYNOLDS, D.T., FRICKER, E.J., PURDY, D., FRICKER, C.R. 1997. Development of a rapid method for the enumeration of bacteria in potable water. *Water Science and Technology.* 35 : 11-12. 433-436.
- REYNOLDS, D.T., FRICKER, C.R. 1999. Application of laser scanning for the rapid and automated detection of bacteria in water samples. *Applied Microbiology.* 86 : 5. 785-795.
- REYNOLDS, D.T., SLADE, R.B., SYKES, N.J., JONAS, A., FRICKER, C.R. 1999. Detection of *Cryptosporidium* oocysts in water: techniques for generating precise recovery data. *Journal of Applied Microbiology.* 87 : 6. 804-813.
- RICE, E.W., FOX, K.R., MILTNER, R.J., LYTLE, D.A., JOHNSON, C.H. 1994. "A microbial surrogate for evaluating treatment efficiency". *Water Quality Technology Conference - American Water Works Association.*
- RICE, E.W., FOX, K.R., MILTNER, R.J., LYTLE, D.A., JOHNSON, C.H. 1996. Evaluating plant performance with endospores. *Journal of American Water Works Association.* 88 : 9. 122-130.
- ROBERTSON, W. 1995. Utilités et limites des indicateurs microbiologiques de la qualité de l'eau potable. *Air intérieur et eau potable.* Presses de l'Université Laval : 179-193.
- ROMPRÉ, A., SERVAIS, P., BAUDART, J., DE ROUBIN, M.-A., LAURENT, P. 2002. Detection and enumeration of coliforms in drinking water: current methods

- and emerging approaches. *Journal of Microbiological Methods*. 49 : 1. 31-54.
- ROSZAK, D.B., COLWELL, R.R. 1987. Survival strategies of bacteria in the natural environment. *Microbiological Reviews*. 51:365-379.
- RQEP (RÈGLEMENT SUR LA QUALITÉ DE L'EAU POTABLE) Environnement Québec, Édition 2004, 34 pages.
- RUSHTON, P., PLACE, B.M., LIGHTFOOT, N.F. 2000. An evaluation of a laser scanning device for the detection of *Cryptosporidium parvum* in treated water samples. *Letters in Applied Microbiology*. 30 : 4. 303-307.
- SANTÉ CANADA. 2004. Recommandations pour la qualité de l'eau potable au Canada : Documentation à l'appui — La turbidité. Bureau de la qualité de l'eau et de la santé, Direction générale de la santé environnementale et de la sécurité des consommateurs, Santé Canada, Ottawa (Ontario).
- SERVIS, N.A., NICHOLS, S., ADAMS, J.C. 1995. Development of a direct viable count procedure for some Gram-positive bacteria. *Letters in Applied Microbiology*. 20:237-239.
- SETLOW, P. 2003. Spore germination. *Current Opinion in Microbiology*. 6:550-556.
- SEYFRIED, P., HARRIS, E. 1990. *Bacteriological characterization of feces and source differentiation*, Ontario Ministry of the Environment, Water Resources Branch, Toronto, 149 p.
- SOMIYA, I.F.S., KISHIMOTO, N., KIM, R.-H. 2000. Development of ATP assay as a surrogate indicator of viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Water Science and Technology*. 41 : 7. 181-188.
- SOMMER, R., CABAJ, A., SANDU, T., LHOTSKY, M. 1999. Measurement of UV radiation using suspensions of microorganisms. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 53 : 1-3. 1-6.
- SORRELL, R.K., HAUTMAN, D.P. 1992. "A simple concentration technique for the

- analysis of bromate at low levels in drinking water". *American Water Works Association Water Quality Technology Conference (AWWA - WQTC)*.
- STEVENS, M., ASHBOLT, N., CUNLIFFE, D. 2001. Microbial indicators of water quality. – An NHMRC Discussion Paper. National Health and Medical Research Council. www.nhmc.gov.
- TALLON, P., MAGAJNA, B., LOFRANCO, C., TIN LEUNG, K. 2005. Microbial indicators of faecal contamination in water : a current perspective. *Water, Air and Soil Pollution* . 166:139-166.
- TANAKA, H., SHINJI, T., SAWADA, K., MONJI, Y., SETO, S., YAJIMA, M. 1997. Development and application of a bioluminescence ATP assay method for rapid detection of coliform bacteria. *Water Research*. 31 : 8. 1913-1918.
- TANG, G., ADU-SARKODIE, K., KIM, D., TEEFY, S., SHUKAIRY, H.M., MARINAS, B. 2005. Modeling *Cryptosporidium parvum* Oocyst inactivation and bromate formation in a full-scale ozone contactor. *Environmental Science Technology*. 39 : 9343-9350.
- TEEFY, S.M., SINGER, P.C. 1990. Performance and analysis of tracer tests to determine compliance of a disinfection scheme with the SWTR. *Journal of American Water Works Association*. 82 : 12. 88-98.
- THORSEN, B.T., ENGER, O., NORLAND, S., HOFF, K.A. 1992. Long-Term Starvation Survival of *Yersinia ruckeri* at Different Salinities Studied by Microscopical and Flow Cytometric Methods. *Applied and Environmental Microbiology*. 58:5. 1624-1628.
- UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (USEPA). 1989. Guidance manual for the compliance with the filtration and disinfection requirements, Report No. EPA-570/4-89-018. Office of Drinking Water, Washington, DC, USA www.epa.gov/safewater/mdbp/implement.html
- UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (USEPA). 1990.

- Total coliform rule and surface water treatment rules. Washington, DC
- UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (USEPA). 1991. Guidance manual for compliance with the filtration and disinfection requirements for public water systems using surface water sources. EPA-815-R-99014, 568 pages, AWWA, Washington, D.C.
- UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (USEPA). 1998. Stage 1 Disinfectants and Disinfection By-Products. Final rule. (D/DBPR). *Federal Register*, 63 :241 :69390. December, 16.
- UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (USEPA). 2001a. *Method 1601 : Male-specific (F+) and somatic coliphage in water by two-step enrichment procedure*. Washington DC. Report ID 4046, EPA 821-R-01-030, 32 pages.
- UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (USEPA). 2001b. *Method 1602 : Male-specific (F+) and somatic coliphage in water by single agar layer (SAL) Procedure*. Report ID 4046, EPA 821-R-01-029, 30 pages. Washington DC
- UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (USEPA). 2001c. Interim enhanced surface water rule: a quick reference guide. Report ID 4604, EPA-816-F-01-011, 2 pages Washington, DC
- UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (USEPA). 2003. *Ultraviolet disinfection guidance manual*. Washington, DC: EPA815-D-03-007, 478 pages
- VAN DER KOOIJ, D. 2003. Managing regrowth in drinkingwater distribution systems. in Heterotrophic Plate Counts and Drinking-Water Safety. Dans "The significance of HPCs for Water Quality and Human Health". IWA Publishing, pp 199-232, World Health Organization, London, UK
- VAN POUCKE, S., NELIS, H. 2000. A 210-min solid phase cytometry test for the

- enumeration of *Escherichia coli* in drinking water . *Journal of Applied Microbiology*. 89 : 3. 390-396.
- VENCZEL, L.V., ARROWOOD, M., HURD, M., SOBSEY, M.D. 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.
- VERHILLE, S., CHAURET, C., ANDREWS, R. 2001. "Evaluation of indigenous bacterial spores as indicators of Cryptosporidium inactivation". Nashville, Tennessee, USA : American Water Works Association - Water Quality Technology Conference.
- VON GUNten, U., ELOVITZ, M., KAISER, H.-P. 1999. Calibration of full-scale ozonation systems with conservative and reactive tracers. *Journal of Water Supply: Research and Technology - Aqua*. 48 : 250-256.
- VON GUNten, U., DRIEDGER, A., GALLARD, H., SALHI, E. 2001. By-products formation during drinking water disinfection : a tool to assess disinfection efficiency ? *Wat. Res.* 35 : 8. 2095-2099.
- VON GUNten, U. 2003a. Ozonation of Drinking Water: Part 1. Oxydation Kinetics and Product Formation. *Water Research*. 37 : 1443-1467.
- VON GUNten, U. 2003b. Ozonation of drinking water: Part 2. Disinfection and by-product formation in presence of bromide, iodide or chlorine. *Water Research*. 37 : 1443-1467.
- WICKRAMANAYAKE, G.B., RUBIN, A.J., SPROUL, O.J. 1984. Inactivation of *Giardia lamblia* cysts with ozone. *Applied Environmental Microbiology*. 48 : 3. 671-672.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). 2001. *Water Quality: Guidelines, Standards and Health*. London, UK: IWA Publishing. 424 pages, ISBN 1 900222 28 0.

- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). 2003. *Heterotrophic plate counts and drinking water safety*. IWA Publishing. 256 pages
- YOKOMAKU, D., YAMAGUCHI, D., NASU, M. 2000. Improved direct viable count procedure for quantitative estimation of bacterial viability in freshwater environments. *Applied and Environmental Microbiology*. 66:5544-5548.
- ZANELLI, F., COMPAGNON, B., JORET, J.C., DE ROUBIN, M.R. 2000. Enumeration of Cryptosporidium oocysts from surface water concentrates by laser-scanning cytometry. *Water Science and Technology*. 41 : 7. 197-202.
- ZHANG, J., ANDERSON, W.B., SMITH, E.F., BARBEAU, B., DESJARDINS, R., HUCK, P.M. 2005. "Development, validation and implementation of a multiphase CFD model for optimization of full-scale ozone disinfection processes". AWWA - Water Quality Technology Conference, Québec City, Canada.

ANNEXES

ANNEXE A: Informations concernant les traceurs étudiés

Suite au travail bibliographique, un tableau synthèse a été préparé afin de comparer les différents marqueurs potentiels. Ce tableau incorpore les éléments suivants :

Concentration à l'eau brute : les diverses concentrations en eaux brutes ont été estimées à partir de l'étude de Nieminski (1999).

Facilité de la méthode de détection : en ce qui concerne les indicateurs biologiques, les analyses pour les coliformes fécaux et totaux, les BHA, les algues et les spores de bactéries aérobies sont en général simples, rapides et peu coûteuses. Ces indicateurs sont présents en forte concentration dans les eaux brutes. La mesure des coliphages est peu coûteuse, rapide mais plutôt complexe, de même que celle des spores de bactéries anaérobies. Ces deux derniers indicateurs demandent davantage d'expertise.

Sensibilité : la sensibilité de la détection est difficile à qualifier, et par ailleurs la plupart des caractéristiques étudiées ici doivent être comprises relativement les unes par rapport aux autres. Les méthodes de culture seront considérées précises puisque leur utilisation est courante pour dénombrer les microorganismes. Cependant, elles ne permettent pas de compter les bactéries viables mais non cultivables.

Temps de détection : il est considéré court lorsqu'il est de l'ordre de l'heure. Ainsi, seules les mesures d'ATP, par bioluminescence, et des SPD peuvent être considérées « courtes ».

Mesure en continu : la mesure de la turbidité et du pH sont par exemple des mesures en continu disponibles. A partir du moment où une mise en culture est effectuée, ce qui implique que les opérateurs de station doivent patienter (en général 24h) avant de prendre toute mesure correctrice, on ne peut parler de mesure en continu.

Technique reproductible: on distingue répétabilité et reproductibilité. La répétabilité fait référence à l'équipement ou aux instruments, alors que la reproductibilité fait référence à l'opérateur de l'équipement et au phénomène en général. La reproductibilité peut être associée à la différence de mesure entre deux laboratoires qui disposeraient des mêmes appareils de détection.

Coût de la mesure de détection: On distingue plusieurs types de mesure des microorganismes dont les plus courantes sont la filtration membranaire suivie de décompte sur Pétri et la fermentation en tubes multiples (FTM). Ces deux analyses sont relativement peu chères. Un filtre Millipore[®], utilisé pour les filtrations, revient à 25 cents tandis que les FTM exigent des quantités plus importantes de milieu nutritif. Quant à la mesure des indicateurs physiques liés au projet, elle exige l'utilisation de chromatographes, dont le prix moyen varie de 8 000 à 15 000 \$.

L'utilisation de la mesure d'ATP demande l'achat préalable d'un luminomètre, dont le coût (qui peut atteindre 20 000 \$) varie selon la limite de détection de l'appareil, la présence d'injecteurs et l'aspect pratique (mesures sur le terrain par exemple). Mis à part cet investissement initial, une mesure d'ATP revient à environ 5\$ par essai (ce qui comprend une cuvette, les réactifs de luciférine-luciférase et un filtre membranaire).

Résistance à la désinfection: ce paramètre est très important car un des objectifs est de mesurer avec la plus grande sensibilité l'effet de la désinfection sur l'indicateur.

Cinétique d'inactivation linéaire: Cette information a été tirée de la littérature basée sur des publications étudiant l'inactivation des différents marqueurs biologiques. Il est à noter que cette information est souvent non disponible.

Les éléments de la revue bibliographique détaillés précédemment se retrouvent au tableau ci-joint. Les acronymes utilisés ont les définitions suivantes.

- **ATP** : Adénosine Tri-Phosphate
- **BHA** : Bactéries Hétérotrophes Aérobies Anaérobies Facultatives
- **BSA** : Bactéries Sporulantes Aérobies
- **CG** : Chromatographie Gazeuse
- **CI** : Chromatographie Ionique
- **COT** : Carbone Organique Total
- **FM** : Filtration Membranaire
- **FTM** : Fermentation en Tubes Multiples
- **PA** : Test de Présence-Absence
- **SPD** : Sous-produits de désinfection
- **SSRC** : Spores de *Clostridium* Sulfato-réductrices (Bactéries Sporulantes Anaérobies)

Tableau A.1 : Caractéristiques des indicateurs

Caractéristiques souhaitables	Concentration suffisante (eaux brutes)	Technique de détection aisée	Sensibilité de la détection	Temps de détection	Mesure En continu	Technique reproductible	Faible coût de la mesure	Résistance à la désinfection
Traceurs potentiels								
<i>Biologiques</i>								
BHA	- 1000 à 10 ⁶ /L - < 10 UFC/ml en eaux finies	Oui	Oui	BP : 48h ou 7j	Non	Oui	Oui	Faible
	1800 /L	PA : oui mais qualitative FM : oui FTM : oui	PA : oui FM : oui FTM : non	PA : < 1 min par échantillon FM : 24h FTM : 24h	PA : non FTM : non	PA : Oui FTM : Oui	PA : oui FM : oui FTM: oui	Faible
Coliformes totaux	1500 /L	FM : oui	FM : oui	2 étapes - 1 ^{ere} : 24h - 2 ^{eme} : 48h	FM : non	FM : Oui	FM : oui	Faible
Coliformes fécaux, <i>E.coli</i>								
Bactériophages	600 /L	Expertise requise	Non	1 nuit	Non	Non	Oui	> coliformes = virus ?
Algues	/	Oui	Oui	Oui	Non	Oui	Oui	?
Spores de BSA	100 à 1 000 000 /L	Oui	Oui	24h	Non	Oui	Oui	Forte
SSRC	1 à 10000 /L	Non – Technique anaérobie	Oui	20h	Non	Oui	Oui	Forte
ATP	Dépend de la biomasse microbienne	Oui	Oui	Oui – 5 minutes	Oui	Oui	Luminomètre	?
<i>Physico-Chimiques</i>								
SPD (bromates, THM)	/	Cl, CG	Oui	Oui	Non	Non	Chromato.	-

ANNEXE B : Valeurs de CT pour l'inactivation des spores de BSA lors de la désinfection au chlore, au dioxyde de chlore et à l'ozone

Tableau B.1 : Comparaison de la résistance au chlore des spores de BSA et de *Giardia lamblia* pour une inactivation de 2 log

Microorganisme	Conditions	CT pour 2 log (mg*min/l)	Source
<i>B.subtilis</i>	pH 5,6	100	Cho <i>et al.</i> 2003b
	pH 8,2	360	
<i>Bacillus (sewage)</i>	24°C – pH 7	198 ^a	Kawamura <i>et al.</i> 1986
Spore indigène	23°C – pH 9	114	Rice <i>et al.</i> 1996
<i>B.subtilis</i>	pH 7	148	Barbeau <i>et al.</i> 1999
ATW - <i>Bacillus</i>	pH 7	40	
ROS - <i>Bacillus</i>	pH 7	230	
<i>Giardia lamblia</i>	Chlore	39 ^b	Surface Water Treatment Rule (USEPA)

Note : Tableau adapté de Barbeau *et al.* 1999

^aValeur estimée (Barbeau *et al.* 1997)

^bIncluant un facteur de sécurité de 1,5, mais dépend aussi du pH et de la concentration de chlore résiduel libre

Tableau B.2 : Comparaison de la résistance au dioxyde de chlore des spores de BSA et des parasites

Microorganisme	Conditions	CT (mg*min/l)	Log d'inactivation	Source
<i>C.parvum</i>	Température pièce	12,9	1,24	Peeters <i>et al.</i> 1989
	0,01 M PB, pH 7, 25°C	78	1	Korich <i>et al.</i> 1990
	Demande en oxydant nulle 0,05 M PB, pH 8, 22°C	60	0,99	Liyanage <i>et al.</i> 1997
	0,05 M, pH 6 et 8, 22°C	120	1,8 et 2,1	Finch et Li (1999)
<i>G.lamblia</i>	PB	15	3	Surface Water Treatment Rule (USEPA)
Spores de <i>B.subtilis</i>	Eau déionisée, pH 8, 21°C	25	2	Radziminski <i>et al.</i> 2002
	Eau déionisée, pH 6, 21°C	100	2	
	Rivière Ottawa, pH 6, 21°C	40	2	
	Rivière Ottawa, pH 8, 21°C	40	2	

Note : Tableau adapté de Radziminski *et al.* 2002

Tableau B.3 : Comparaison de la résistance à l'ozone des spores de BSA et des parasites pour une inactivation de 2 log

Microorganisme	Conditions	CT pour 2 log (mg*min/l)	Source
Spores de <i>B.subtilis</i>	10°C, pH 8, PB, B, eau de lac filtrée	10,4	Driedger <i>et al.</i> 2001
	pH 6	8,4	
	pH 5,6	3	Cho <i>et al.</i> 2003b
	pH 8,2	2,6	
	20-22°C - pH 8,2, PB, B	6,32	Facile <i>et al.</i> 2000
Spores environnementales	Conditions précédentes	3,58	
Spores de <i>B.subtilis</i>	20-22°C - pH 6,3, PB, B	3,18	
Spores environnementales	Conditions précédentes	1,72	
<i>Bacillus Cereus</i>	22°C, pH = 6, PB, B	6	Finch et Choe, 1999
Spores indigènes	24°C, pH = 8 FW, PI, 0,5 NTU	19	Miltner <i>et al.</i> 1997
<i>Giardia</i>	20-22°C - pH 6,9, RW, B, D	0,16-0,68	Haas <i>et al.</i> 1995
	22°C - pH 6,9, PB, B, I	0,80	Finch <i>et al.</i> 1994
<i>Cryptosporidium</i>	20°C - pH 7, PB, SB, D	5,39	Rennecker <i>et al.</i> 1999
	0,5°C – mêmes conditions	57,9	
	22°C - pH 6,9, PB, B, I	3,50	Finch <i>et al.</i> 1994
<i>Giardia</i>	< 1°C à 25°C	0,32 à 1,94	MDDEP, 2002*
<i>Cryptosporidium</i>	< 1°C à 25°C	5,2 à 51,2	

Note : Tableau adapté de Facile *et al.* 2000

* Données tirées de l'USEPA

Légende

PB : tampon phosphate

FW : eau filtrée

RW : eau de rivière

DW : eau déminéralisée

B : méthode batch

SB : méthode semi-batch

PI : pilote

D: estimation par Dékystemt

I : estimation par Infectiosité

ANNEXE C : Essais de concentration des spores de BSA par filtration sur Swinnex

Ces essais ont été effectués sur l'eau ozonée (EO) de l'usine DesBaillets (Montréal) les 23 juin et 12 juillet 2005.

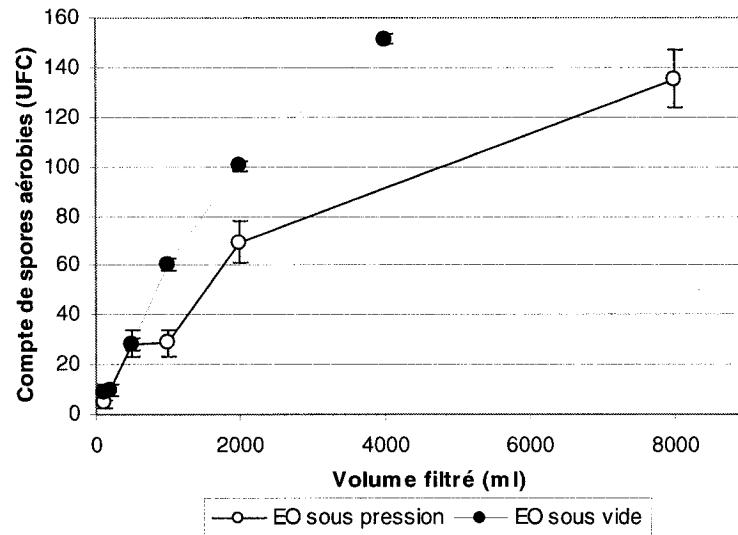


Figure C.1 : Essai de filtration du 23 juin 2005

Turbidité = 0.1 UTN, AODC = 2.74×10^9

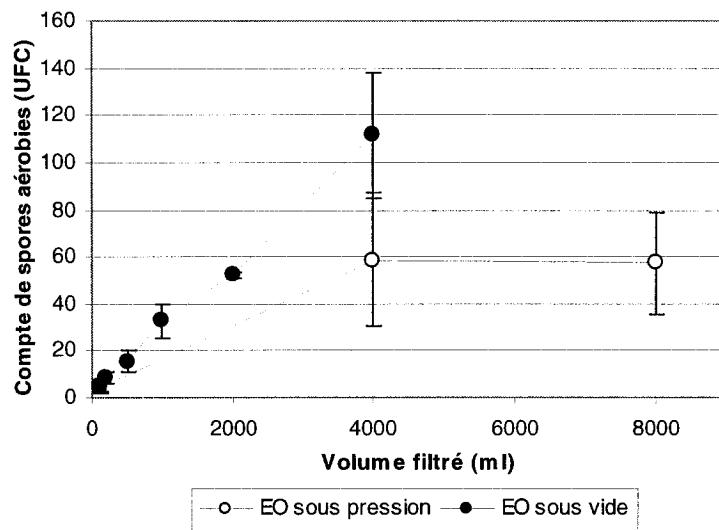


Figure C.2 : Essai de filtration du 12 juillet 2005

Turbidité = 0.06 UTN, AODC = 3.94×10^7

ANNEXE D : Étude de l'impact du volume filtré sur le compte de spores de BSA

Les données suivantes prennent en compte l'ensemble des essais. La valeur de p montre que la date d'échantillonnage (qualité de l'eau) a l'impact le plus important sur le dénombrement des spores de BSA. La figure D.1 précise la distribution normale des résidus.

Tableau D.1 : Effet de la date, du type d'eau et du volume filtré sur le compte de spores de BSA

Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	52,7349	1	52,73492	126,6128	0,000000
Date	7,5731	8	0,94664	2,2728	0,022044
Type eau	0,5536	1	0,55362	1,3292	0,249690
Volume filtré	1,8839	7	0,26912	0,6461	0,717596
Error	154,1070	370	0,41651		

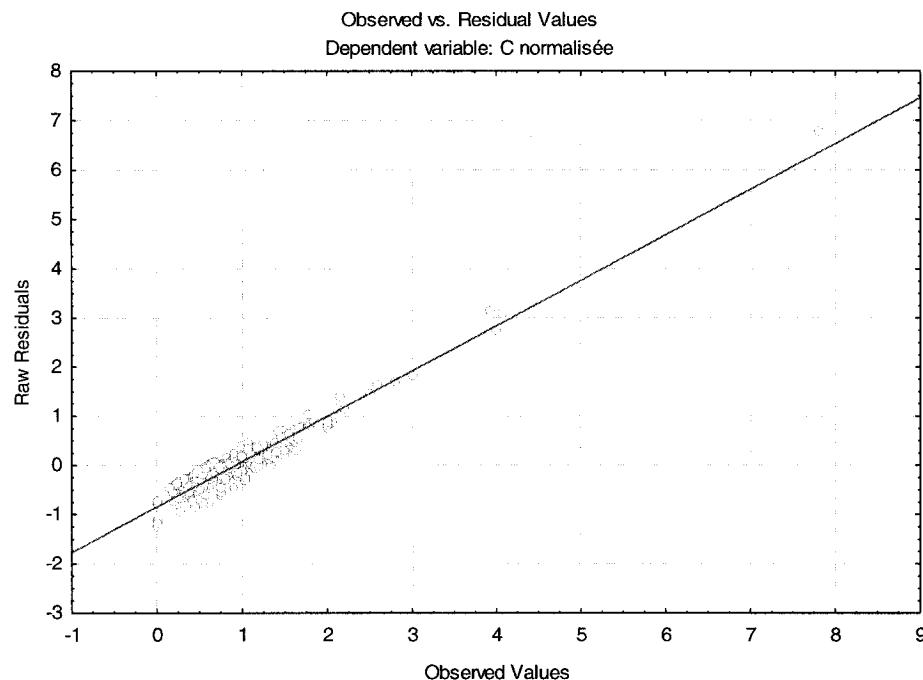


Figure D.1 : Distribution des résidus

ANNEXE E : Résultats des essais biodosimétriques

Essai biodosimétrique 1

Tableau E.1 : Mesure d'ozone sur le pilote pour l'essai 1 (dosages 1, 2 et 3)

Point	O ₃ (mg/l)	T ₅₀ (min)	C _t effectif (mg.min/l)
1	0,472	0,976	0,559
2	0,379	1,933	0,977
4	0,233	3,847	1,541
6	0,136	5,762	1,872
9		8,583	2,126
12	0,026	11,405	2,242

Point	O ₃ (mg/l)	T ₅₀ (min)	C _t effectif (mg.min/l)
1	0,852	0,976	0,817
2	0,624	1,933	1,494
4	0,445	3,847	2,551
6	0,312	5,762	3,308
9		8,583	4,050
12	0,130	11,405	4,504

Point	O ₃ (mg/l)	T ₅₀ (min)	C _t effectif (mg.min/l)
1	0,706	0,976	0,637
2	0,510	1,933	1,184
4	0,344	3,847	2,081
6	0,326	5,762	2,769
9		8,583	3,500
12	0,148	11,405	3,994

Tableau E.2 : Mesure des spores sur le pilote pour l'essai 1 (dosages 1, 2 et 3)

Eau	Volume filtré (L)	Type de filtre	Nombre	Concentration (/L)	Log d'I	CT eff associés
EF	1	47 mm	33	32		
EF	1	47 mm	40			
EF	1	47 mm	23			
Point 2	10	142 mm	363	36,3	-0,05	
Point 6	10	142 mm	TNTC			
Point 9	10	142 mm	159	15,9	0,30	2,13
Point 12	10	142 mm	1096			

Eau	Volume filtré (L)	Type de filtre	Nombre	Concentration (/L)	Log d'I	CT eff associés
EF	1	47 mm	41	44		
EF	1	47 mm	56			
EF	1	47 mm	35			
Point 2	10	142 mm	229	22,9	0,28	1,49
Point 6	10	142 mm	149	14,9	0,47	3,31
Point 9	10	142 mm	1024			
Point 12	10	142 mm	45	4,5	0,99	4,50

Eau	Volume filtré (L)	Type de filtre	Nombre	Concentration (/L)	Log d'I	CT eff associés
EF	1	47 mm	66	63		
EF	1	47 mm	67			
EF	1	47 mm	56			
Point 2	10	142 mm	154	15,4	0,61	1,18
Point 6	10	142 mm	81	8,1	0,89	2,77
Point 9	10	142 mm	119	11,9	0,72	3,50
Point 12	10	142 mm	365	36,5	0,24	3,99

Tableau E.3: Plan expérimental à échelle réelle pour l'essai 1 (dosages 1, 2, 3 et 4)

	Qeau (m ³ /s)	Qair (m ³ /s)	O ₃ /air (%)	DA (ppm)	Échantillonnage
Essai 1	2,16	0,19	1,400	1,49	3*1L EF 2*10L sortie cuve 5 O ₃ résiduel cuves 1 et 2
Essai 2	2,16	0,15	1,378	1,16	3*1L EF 2*10L sortie cuve 5 O ₃ résiduel cuves 1 et 2
Essai 3	2,16	0,25	1,417	1,98	3*1L EF 2*10L sortie cuve 5 O ₃ résiduel cuves 1 et 2
Essai 4	2,16	0,36	1,337	2,70	3*1L EF 2*10L sortie cuve 5 O ₃ résiduel cuves 1 et 2

Tableau E.4: Mesure d'ozone à échelle réelle pour l'essai 1 (dosages 1, 2, 3 et 4)

Point		O ₃ ppm
P1	Bassin 1	0,719
P2		0,351
P3		0,372
P4		0,547
P5		0,248
E2	Milieu cuve	0,743
S2	Sortie cuve	0,421

Point		O ₃ ppm
P1	Bassin 1	0,327
P2		0,227
P3		0,277
P4		0,315
P5		0,106
E2	Milieu cuve	0,398
S2	Sortie cuve	0,246

Point		O ₃ ppm
P1	Bassin 1	0,657
P2		0,475
P3		0,667
P4		0,561
P5		0,295
E2	Milieu cuve	1,063
S2	Sortie cuve	0,577

Point		O ₃ ppm
P1	Bassin 1	0,683
P2		0,594
P3		0,665
P4		0,758
P5		0,585
E2	Milieu cuve	1,009
S2	Sortie cuve	0,592

Tableau E.5: Mesure des spores à échelle réelle pour l'essai 1 (dosages 1, 2, 3 et 4)

Eau	Volume filtré (L)	Type de filtre	Nombre	Spores / L	Log d'inactivation
EF	1	47 mm	51	44,7	
EF	1	47 mm	44		
EF	1	47 mm	39		
Sortie cuve 5	10	142 mm	206	18,7	0,379
Sortie cuve 5	10	142 mm	167		

Eau	Volume filtré (L)	Type de filtre	Nombre	Spores / L	Log d'inactivation
EF	1	47 mm	35	41,0	
EF	1	47 mm	34		
EF	1	47 mm	54		
Sortie cuve 5	10	142 mm	289	26,7	0,186
Sortie cuve 5	10	142 mm	245		

Eau	Volume filtré (L)	Type de filtre	Nombre	Spores / L	Log d'inactivation
EF	1	47 mm	40	50,3	
EF	1	47 mm	47		
EF	1	47 mm	64		
Sortie cuve 5	10	142 mm	108	11,0	0,662
Sortie cuve 5	10	142 mm	111		

Eau	Volume filtré (L)	Type de filtre	Nombre	Spores / L	Log d'inactivation
EF	1	47 mm	109	102,3	
EF	1	47 mm	112		
EF	1	47 mm	86		
Sortie cuve 5	10	142 mm	75	6,4	1,207
Sortie cuve 5	10	142 mm	52		

Tableau E.6: Calcul des CT à échelle réelle et comparaison pour l'essai 1

Type de CT	Essai	CT calculé
Réglementaire	1	1,52
	2	0,87
	3	1,97
	4	2,17
IDDF	1	2,69
	2	1,66
	3	3,59
	4	3,67
Biodosimétrie	1	2,34
	2	1,62
	3	3,38
	4	5,40

Essai biodosimétrique 2

Tableau E.7 : Mesure d'ozone sur le pilote pour l'essai 2 (dosages 1, 2 et 3)

Point	O ₃ (mg/l)	T ₅₀ (min)	C _t effectif (mg.min/l)
1	0,607	0,976	0,587
2	0,402	1,933	1,038
4	0,266	3,847	1,669
6	0,124	5,762	2,058
9		8,583	2,377
12	0,042	11,405	2,533

Point	O ₃ (mg/l)	T ₅₀ (min)	C _t effectif (mg.min/l)
1	1,017	0,976	0,940
2	0,784	1,933	1,740
4	0,527	3,847	3,040
6	0,404	5,762	4,023
9		8,583	5,051
12	0,210	11,405	5,731

Point	O ₃ (mg/l)	T ₅₀ (min)	C _t effectif (mg.min/l)
1	1,188	0,976	1,046
2	0,844	1,933	1,959
4	0,652	3,847	3,496
6	0,528	5,762	4,717
9		8,583	6,072
12	0,306	11,405	7,036

Tableau E.8 : Mesure des spores sur le pilote pour l'essai 2 (dosages 1, 2 et 3)

Eau	Volume filtré (L)	Type de filtre	Nombre	Concentration (/L)	Log d'l	CT eff associés
EF	1	47 mm	238	237		
EF	1	47 mm	236			
EF	1	47 mm	237			
Point 2	10	142 mm	720	72	0,517	1,04
Point 6	10	142 mm	572	57,2	0,617	2,06
Point 9	10	142 mm	576	57,6	0,614	2,38
Point 12	10	142 mm	520	52	0,659	2,53

Eau	Volume filtré (L)	Type de filtre	Nombre	Concentration (/L)	Log d'l	CT eff associés
EF	1	47 mm	237	218		
EF	1	47 mm	202			
EF	1	47 mm	215			
Point 2	10	142 mm	804	80,4	0,433	1,74
Point 6	10	142 mm	396	39,6	0,741	4,02
Point 9	10	142 mm	207	20,7	1,022	5,05
Point 12	10	142 mm	189	18,9	1,062	5,73

Eau	Volume filtré (L)	Type de filtre	Nombre	Concentration (/L)	Log d'I	CT eff associés
EF	1	47 mm	260	236		
EF	1	47 mm	221			
EF	1	47 mm	227			
Point 2	10	142 mm	590	59	0,602	1,96
Point 6	10	142 mm	139	13,9	1,230	4,72
Point 9	10	142 mm	128	12,8	1,266	6,07
Point 12	10	142 mm	73	7,3	1,510	7,04

Tableau E.9: Plan expérimental à échelle réelle pour l'essai 2 (dosages 1, 2, 3 et 4)

	Qeau (m³/s)	Qair (m³/s)	O ₃ /air (%)	DA (ppm)	Échantillonnage
Essai 1	2,16	0,15	1,439	1,21	3*1L EF 2*10L sortie cuve 5 O ₃ résiduel cuves 1 et 2
Essai 2	2,16	0,21	1,437	1,69	3*1L EF 2*10L sortie cuve 5 O ₃ résiduel cuves 1 et 2
Essai 3	2,16	0,25	1,498	2,10	3*1L EF 2*10L sortie cuve 5 O ₃ résiduel cuves 1 et 2
Essai 4	2,16	0,17	1,522	1,45	3*1L EF 2*10L sortie cuve 5 O ₃ résiduel cuves 1 et 2

Tableau E.10: Mesure d'ozone à échelle réelle pour l'essai 2 (dosages 1, 2, 3 et 4)

Point		O ₃ ppm
P1	Bassin 1	0,356
P2		0,283
P3		0,416
P4		0,497
P5		0,126
S2	Sortie cuve	0,301

Point		O ₃ ppm
P1	Bassin 1	0,646
P2		0,733
P3		0,908
P4		0,965
P5		0,248
S2	Sortie cuve	0,500

Point		O ₃ ppm
P1	Bassin 1	0,542
P2		0,438
P3		0,736
P4		1,034
P5		0,643
S2	Sortie cuve	0,670

Point		O ₃ ppm
P1	Bassin 1	0,462
P2		0,322
P3		0,566
P4		0,560
P5		0,111
S2	Sortie cuve	0,414

Tableau E.11: Mesure des spores à échelle réelle pour l'essai 2 (dosages 1, 2, 3 et 4)

Eau	Volume filtré (L)	Type de filtre	Nombre	Spores / L	Log d'inactivation
EF	1	47 mm	226	204,7	
EF	1	47 mm	228		
EF	1	47 mm	160		
Sortie cuve 5	10	142 mm	904	93,6	0,340
Sortie cuve 5	10	142 mm	968		

Eau	Volume filtré (L)	Type de filtre	Nombre	Spores / L	Log d'inactivation
EF	1	47 mm	210	217,7	
EF	1	47 mm	217		
EF	1	47 mm	226		
Sortie cuve 5	10	142 mm	872	74,8	0,464
Sortie cuve 5	10	142 mm	624		

Eau	Volume filtré (L)	Type de filtre	Nombre	Spores / L	Log d'inactivation
EF	1	47 mm	254	248,3	
EF	1	47 mm	268		
EF	1	47 mm	223		
Sortie cuve 5	10	142 mm	660	49,2	0,703
Sortie cuve 5	10	142 mm	324		

Eau	Volume filtré (L)	Type de filtre	Nombre	Spores / L	Log d'inactivation
EF	1	47 mm	352	341,0	
EF	1	47 mm	330		
EF	1	47 mm			
Sortie cuve 5	10	142 mm	920	63,4	0,731
Sortie cuve 5	10	142 mm	348		

Tableau E.12: Calcul des CT à échelle réelle et comparaison pour l'essai 2

Type de CT	Essai	CT calculé
Réglementaire	Essai 1	1,11
	Essai 2	2,02
	Essai 3	2,37
	Essai 4	1,17
IDDF	Essai 1	1,99
	Essai 2	3,14
	Essai 3	4,12
	Essai 4	2,64
Biodesimétrique	Essai 1	0,88
	Essai 2	1,56
	Essai 3	2,86
	Essai 4	3,01

Essai biodosimétrique 3

Tableau E.13 : Mesure d'ozone sur le pilote pour l'essai 3 (dosages 1, 2 et 3)

Point	O ₃ (mg/l)	T ₅₀ (min)	C _t effectif (mg.min/l)
1	0,711	0,976	0,631
2	0,467	1,933	1,145
4	0,306	3,847	1,928
6	0,204	5,762	2,471
9		8,583	2,980
12	0,087	11,405	3,277

Point	O ₃ (mg/l)	T ₅₀ (min)	C _t effectif (mg.min/l)
1	1,213	0,976	1,146
2	0,978	1,933	2,128
4	0,666	3,847	3,737
6	0,510	5,762	4,966
9		8,583	6,270
12	0,271	11,405	7,148

Point	O ₃ (mg/l)	T ₅₀ (min)	C _t effectif (mg.min/l)
1	1,555	0,976	1,486
2	1,275	1,933	2,802
4	0,972	3,847	5,062
6	0,893	5,762	6,907
9		8,583	9,024
12	0,483	11,405	10,593

Tableau E.14 : Mesure des spores sur le pilote pour l'essai 3 (dosages 1, 2 et 3)

Eau	Volume filtré (L)	Type de filtre	Nombre	Concentration (/L)	Log d'I	CT eff associés
EF	1	47 mm	102	93		
EF	1	47 mm	83			
EF	1	47 mm	94			
Point 2	10	142 mm	567	56,7	0,215	1,15
Point 6	10	142 mm	245	24,5	0,579	2,47
Point 9	10	142 mm	199	19,9	0,670	2,98
Point 12	10	142 mm	7	0,7	2,123	3,28

Eau	Volume filtré (L)	Type de filtre	Nombre	Concentration (/L)	Log d'I	CT eff associés
EF	1	47 mm	128	125		
EF	1	47 mm	132			
EF	1	47 mm	115			
Point 2	10	142 mm	321	32,1	0,590	2,13
Point 6	10	142 mm	97	9,7	1,110	4,97
Point 9	10	142 mm	46	4,6	1,434	6,27
Point 12	10	142 mm	66	6,6	1,277	7,15

Eau	Volume filtré (L)	Type de filtre	Nombre	Concentration (/L)	Log d'I	CT eff associés
EF	1	47 mm	139	174		
EF	1	47 mm	166			
EF	1	47 mm	216			
Point 2	10	142 mm	158	15,8	1,041	2,80
Point 6	10	142 mm	36	3,6	1,683	6,91
Point 9	10	142 mm	57	5,7	1,484	9,02
Point 12	10	142 mm	29	2,9	1,777	10,59

Tableau E.15: Plan expérimental à échelle réelle pour l'essai 3 (dosages 1, 2, 3 et 4)

	Qeau (m ³ /s)	Qair (m ³ /s)	O ₃ /air (%)	DA (ppm)	Échantillonnage
Essai 1	2,16	0,15	1,166	0,98	3*1L EF 2*10L sortie cuve 5 O ₃ résiduel cuves 1 et 2
Essai 2	2,16	0,2	1,302	1,46	3*1L EF 2*10L sortie cuve 5 O ₃ résiduel cuves 1 et 2
Essai 3	2,16	0,25	1,306	1,83	3*1L EF 2*10L sortie cuve 5 O ₃ résiduel cuves 1 et 2
Essai 4	2,16	0,3	1,222	2,05	3*1L EF 2*10L sortie cuve 5 O ₃ résiduel cuves 1 et 2

Tableau E.16: Mesure d'ozone à échelle réelle pour l'essai 3 (dosages 1, 2, 3 et 4)

Point		O ₃ ppm
P1	Bassin 1	0,488
P2		0,363
P3		0,447
P4		0,566
P5		0,141
S2	Sortie cuve	0,333

Point		O ₃ ppm
P1	Bassin 1	0,616
P2		0,395
P3		0,527
P4		0,249
P5		0,183
S2	Sortie cuve	0,600

Point		O ₃ ppm
P1	Bassin 1	1,099
P2		0,685
P3		0,817
P4		0,590
P5		0,490
S2	Sortie cuve	0,812

Point		O ₃ ppm
P1	Bassin 1	0,631
P2		0,588
P3		1,102
P4		0,591
P5		0,911
S2	Sortie cuve	0,902

Tableau E.17: Mesure des spores à échelle réelle pour l'essai 3 (dosages 1, 2, 3 et 4)

Eau	Volume filtré (L)	Type de filtre	Nombre	Spores / L	Log d'inactivation
EF	1	47 mm	104	84,0	
EF	1	47 mm	74		
EF	1	47 mm	74		
Sortie cuve 5	10	142 mm	446	36,0	0,368
Sortie cuve 5	10	142 mm	274		

Eau	Volume filtré (L)	Type de filtre	Nombre	Spores / L	Log d'inactivation
EF	1	47 mm	83	86,3	
EF	1	47 mm	99		
EF	1	47 mm	77		
Sortie cuve 5	10	142 mm	238	23,9	0,558
Sortie cuve 5	10	142 mm	240		

Eau	Volume filtré (L)	Type de filtre	Nombre	Spores / L	Log d'inactivation
EF	1	47 mm	79	94,7	
EF	1	47 mm	103		
EF	1	47 mm	102		
Sortie cuve 5	10	142 mm	200	17,7	0,729
Sortie cuve 5	10	142 mm	153		

Eau	Volume filtré (L)	Type de filtre	Nombre	Spores / L	Log d'inactivation
EF	1	47 mm	120	129,7	
EF	1	47 mm	121		
EF	1	47 mm	148		
Sortie cuve 5	10	142 mm	86	12,7	1,011
Sortie cuve 5	10	142 mm	167		

Tableau E.18: Calcul des CT à échelle réelle et comparaison pour l'essai 3

Type de CT	Essai	CT calculé
Réglementaire	Essai 1	1,26
	Essai 2	1,84
	Essai 3	2,75
	Essai 4	2,99
IDDF	Essai 1	2,17
	Essai 2	3,72
	Essai 3	4,94
	Essai 4	5,46
Biodosimétrique	Essai 1	1,16
	Essai 2	2,22
	Essai 3	3,18
	Essai 4	4,75

Essai biodosimétrique 4

Tableau E.19 : Mesure d'ozone sur le pilote pour l'essai 4 (dosages 1, 2 et 3)

Point	O ₃ (mg/l)	T ₅₀ (min)	C _t effectif (mg.min/l)
1	0,293	0,976	0,259
2	0,216	1,933	0,453
4	0,090	3,847	0,717
6	0,035	5,762	0,872
9		8,583	0,992
12	0,017	11,405	1,046

Point	O ₃ (mg/l)	T ₅₀ (min)	C _t effectif (mg.min/l)
1	0,963	0,976	1,023
2	0,754	1,933	1,838
4	0,494	3,847	3,043
6	0,349	5,762	3,843
9		8,583	4,559
12	0,100	11,405	4,949

Point	O ₃ (mg/l)	T ₅₀ (min)	C _t effectif (mg.min/l)
1	1,323	0,976	1,207
2	0,982	1,933	2,248
4	0,742	3,847	3,968
6	0,551	5,762	5,299
9		8,583	6,733
12	0,306	11,405	7,716

Tableau E.20 : Mesure des spores sur le pilote pour l'essai 4 (dosages 1, 2 et 3)

Eau	Volume filtré (L)	Type de filtre	Nombre	Concentration (/L)	Log d'l	CT eff associés
EF	1	47 mm	632	537,3		
EF	1	47 mm	500			
EF	1	47 mm	480			
Point 2	5	142 mm	4921	984,3	-0,263	0,45
Point 6	5	142 mm	4255	850,9	-0,200	0,87
Point 9	5	142 mm	5779	1155,7	-0,333	0,99
Point 12	5	142 mm	6350	1270,0	-0,374	1,05

Eau	Volume filtré (L)	Type de filtre	Nombre	Concentration (/L)	Log d'l	CT eff associés
EF	1	47 mm	692	674,7		
EF	1	47 mm	676			
EF	1	47 mm	656			
Point 2	10	142 mm	5715	571,5	0,072	1,84
Point 6	10	142 mm	4667	466,7	0,160	3,84
Point 9	10	142 mm	4985	498,5	0,131	4,56
Point 12	10	142 mm	4318	431,8	0,194	4,95

Eau	Volume filtré (L)	Type de filtre	Nombre	Concentration (/L)	Log d'I	CT eff associés
EF	1	47 mm	624	694,0		
EF	1	47 mm	764			
EF	1	47 mm	Décollé			
Point 2	10	142 mm	5017	501,7	0,141	2,25
Point 6	10	142 mm	3810	381,0	0,260	5,30
Point 9	10	142 mm	4183	418,3	0,220	6,73
Point 12	10	142 mm	3167	316,7	0,341	7,72

Tableau E.21: Plan expérimental à échelle réelle pour l'essai 4 (dosages 1, 2, 3 et 4)

	Qeau (m ³ /s)	Qair (m ³ /s)	O ₃ /air (%)	DA (ppm)	Échantillonnage
Essai 1	2,16	0,245	1,129	1,55	3*1L EF 2*10L sortie cuve 5 O ₃ résiduel cuves 1 et 2
Essai 2	2,16	0,29	1,167	1,90	3*1L EF 2*10L sortie cuve 5 O ₃ résiduel cuves 1 et 2
Essai 3	2,16	0,34	1,168	2,23	3*1L EF 2*10L sortie cuve 5 O ₃ résiduel cuves 1 et 2
Essai 4	2,16	0,19	1,193	1,27	3*1L EF 2*10L sortie cuve 5 O ₃ résiduel cuves 1 et 2

Tableau E.22: Mesure d'ozone à échelle réelle pour l'essai 4 (dosages 1, 2, 3 et 4)

Point		O ₃ ppm
P1	Bassin 1	0,296
P2		0,104
P3		0,326
P4		0,337
P5		0,062
S2	Sortie cuve	0,266

Point		O ₃ ppm
P1	Bassin 1	0,485
P2		0,118
P3		0,422
P4		0,704
P5		0,290
S2	Sortie cuve	0,441

Point		O ₃ ppm
P1	Bassin 1	0,545
P2		0,342
P3		0,371
P4		0,812
P5		0,386
S2	Sortie cuve	0,347

Point		O ₃ ppm
P1	Bassin 1	0,263
P2		0,071
P3		0,221
P4		0,258
P5		0,017
S2	Sortie cuve	0,116

Tableau E.23: Mesure des spores à échelle réelle pour l'essai 4 (dosages 1, 2, 3 et 4)

Eau	Volume filtré (ml)	Type de filtre	Nombre	Spores / L	Log d'inactivation
EF	100	47 mm	207	2076,7	
EF	100	47 mm	226		
EF	100	47 mm	190		
Sortie cuve 5	1000	142 mm	1704	1700,0	0,087
Sortie cuve 5	1000	142 mm	1696		

Eau	Volume filtré (ml)	Type de filtre	Nombre	Spores / L	Log d'inactivation
EF	100	47 mm	208	2240,0	
EF	100	47 mm	200		
EF	100	47 mm	264		
Sortie cuve 5	1000	142 mm	1664	1606,0	0,145
Sortie cuve 5	1000	142 mm	1548		

Eau	Volume filtré (ml)	Type de filtre	Nombre	Spores / L	Log d'inactivation
EF	100	47 mm	176	1933,3	
EF	100	47 mm	199		
EF	100	47 mm	205		
Sortie cuve 5	1000	142 mm	1288	1288,0	0,176
Sortie cuve 5	1000	142 mm			

Eau	Volume filtré (ml)	Type de filtre	Nombre	Spores / L	Log d'inactivation
EF	100	47 mm	270	2303,3	
EF	100	47 mm	197		
EF	100	47 mm	224		
Sortie cuve 5	1000	142 mm	1856	1928,0	0,077
Sortie cuve 5	1000	142 mm	2000		

Tableau E.24: Calcul des CT à échelle réelle et comparaison pour l'essai 4

Type de CT	Essai	CT calculé
Réglementaire	Essai 1	0,88
	Essai 2	1,50
	Essai 3	1,41
	Essai 4	0,47
IDDF	Essai 1	1,78
	Essai 2	2,80
	Essai 3	2,25
	Essai 4	0,90
Biodosimétrique	Essai 1	2,45
	Essai 2	3,69
	Essai 3	4,35
	Essai 4	2,24