

**Titre:** Mesure des CT d'inactivation des bactéries sporulantes aérobies par oxydation avec le bioxyde de chlore  
Title: **Title:** Mesure des CT d'inactivation des bactéries sporulantes aérobies par oxydation avec le bioxyde de chlore

**Auteur:** Isabelle Myre  
Author:

**Date:** 1999

**Type:** Mémoire ou thèse / Dissertation or Thesis

**Référence:** Myre, I. (1999). Mesure des CT d'inactivation des bactéries sporulantes aérobies par oxydation avec le bioxyde de chlore [Mémoire de maîtrise, École Polytechnique de Montréal]. PolyPublie. <https://publications.polymtl.ca/8524/>  
Citation:

## Document en libre accès dans PolyPublie

Open Access document in PolyPublie

**URL de PolyPublie:** <https://publications.polymtl.ca/8524/>  
PolyPublie URL:

**Directeurs de recherche:** Raymond Desjardins  
Advisors:

**Programme:** Non spécifié  
Program:

**UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL**

**MESURE DES CT D'INACTIVATION DES  
BACTÉRIES SPORULANTES AÉROBIES  
PAR OXYDATION AVEC LE BIOXYDE DE CHLORE**

**ISABELLE MYRE**

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

**MÉMOIRE PRÉSENTÉ EN VUE DE L'OBTENTION  
DU DIPLÔME DE MAÎTRISE ÈS SCIENCE APPLIQUÉES  
(GÉNIE CIVIL)**

**MARS 1999**



National Library  
of Canada

Acquisitions and  
Bibliographic Services  
  
395 Wellington Street  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

Bibliothèque nationale  
du Canada

Acquisitions et  
services bibliographiques  
  
395, rue Wellington  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

Your file Votre référence

Our file Notre référence

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

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

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

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

0-612-42919-9

Canadä

**UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL**

**ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL**

**Ce mémoire est intitulé:**

**MESURE DES CT D'INACTIVATION DES  
BACTÉRIES SPORULANTES AÉROBIES PAR  
OXYDATION AVEC LE BIOXYDE DE CHLORE**

présenté par: **MYRE Isabelle**

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. DESJARDINS Raymond, M.Ing., membre et directeur de recherche**

**M. LAVOIE Jean, M.Sc.A, M.B.A., membre**

*À Lucien Labelle  
(1920-1949)*  
*Pour avoir cru en ses principes*

*À Armande Savage  
(1918- )*  
*et*  
*Gabrielle Tréant*  
*(1916-1997)*

*Pour avoir cru en l'éducation*

## **REMERCIEMENTS**

J'aimerais prendre quelques instants pour remercier les nombreuses personnes qui ont contribué à ce projet. Tout d'abord, je remercie M. Raymond Desjardins, mon directeur de recherche, dont les interrogations, les commentaires et la patience m'ont poussé à mieux connaître mon sujet de recherche et à mieux l'expliquer. Je tiens à remercier Mme Michèle Prévost et M. Jean Lavoie, surintendant en eau potable à la Ville de Laval, d'avoir accepté de juger ce mémoire.

J'aimerais souligner l'aide précieuse de M. Benoît Barbeau, Mme Josée Coallier, M. Boniface Koudjonou, Mme Jacinthe Mailly, Mme Julie Philibert et Mme Catherine Poirier dans l'élaboration et l'exécution de ce projet. Un grand merci aussi à Mme Micheline Desmeules et à Mme Marielle Thivierge du département de microbiologie de l'Université de Montréal. Je dois un sincère merci aussi à ma famille pour leur support moral et à Paul pour son support mathématique, logistique ainsi que moral.

Finalement, j'aimerais remercier les partenaires de la Chaire Industrielle CRSNG en Eau Potable (Générale des Eaux, VLA, John Meunier, Ville de Montréal, Ville de Laval) pour leur support financier.

## RÉSUMÉ

Depuis les débuts de la désinfection, c'est surtout le chlore qui a été utilisé. La découverte d'un lien possible entre des sous-produits de désinfection par le chlore, les trihalométhanes (THM), et certains types de cancer a favorisé l'utilisation de d'autres désinfectants tel que le bioxyde de chlore. Une raison autre pour utiliser le bioxyde de chlore en tant que désinfectant est que le chlore est peu efficace contre *Cryptosporidium*. *Giardia* et *Cryptosporidium* sont responsables de plusieurs épidémies reliées à de l'eau potable, 1/3 pour 1993-94, qui respectait les normes de qualité, environ la moitié des épidémies dues aux protozoaires. Étant donné que ces protozoaires sont difficiles à détecter et à énumérer, un indicateur d'efficacité de traitement est nécessaire. Le traitement à l'étude étant la désinfection, les bactéries sporulantes aérobies (BSA) ont été sélectionnées comme indicateur. De plus, ces bactéries sont faciles à cultiver et à énumérer. La résistance à la désinfection, dans la présente étude, est traitée en utilisant le concept des Ct. Si les Ct des BSA sont supérieurs aux Ct des protozoaires, les BSA seront de bons indicateurs d'efficacité de la désinfection par le bioxyde de chlore.

Les deux souches de BSA utilisées lors des essais sont *Bacillus subtilis* et une souche d'origine environnementale. Les deux souches ont été recultivées sur un milieu pauvre, le

R2A. L'énumération a été faite par dilution et filtration des échantillons sur des filtres de 0,45 µm. Les filtres ont été incubés, après avoir été pasteurisés, sur des tampons imbibés d'un milieu de tripticase de soya (tripticase soya broth, TSB), pour une période de 18 à 24 heures, à 35°C. Les comptes ont ensuite été faits et les résultats exprimés en unités formant des colonies (UFC).

Le bioxyde de chlore est volatile. Pour minimiser les pertes à l'atmosphère, un réacteur par temps de contact a été utilisé. Il n'y avait pas de col d'air de présent dans ces réacteurs. Des flacons ambrés ont été utilisés pour éviter la photodécomposition du bioxyde de chlore. De l'eau MilliQ™ tamponnée est utilisée lors des essais et ces derniers ont été effectués à température de la pièce, soit, environ 20°C ± 2.

Les Ct ont été calculés pour 1,2 et 3 log d'inactivation en utilisant le modèle de Chick-Watson. Pour *B. subtilis*, les Ct obtenus à pH 6,5 pour 1 mg/l sont de 216,9; 343,9 et 589,3 mg\*min/l. À pH 7,5, les Ct obtenus pour 1 mg/l sont de 213,6; 372,6 et 472,3 mg\*min/l. À pH 8,3, les Ct pour 1 mg/l sont de 133,1; 251,5 et 326,7 mg\*min/l. Pour la souche environnementale, à pH 6,5, les Ct pour 1 mg/l sont de 39,7; 106,9 et 373 mg\*min/l. À pH 7,5, les Ct sont de 52,7; 201,3 et 540,8 mg\*min/l. À pH 8,3, les Ct obtenus sont de 80,5; 165,7 et 333,3 mg\*min/l. D'après ces résultats, la souche de *B. subtilis* utilisée lors des essais est plus résistante que la souche environnementale. Les Ct obtenus pour la

désinfection des BSA par le bioxyde de chlore varient de façon importante en fonction du pH. Cet effet n'est pas le même d'une souche à l'autre. Les Ct varient aussi selon le microorganisme utilisé lors des essais. Il faut donc tenir compte du pH et de la souche lors de l'analyse des Ct.

La comparaison des Ct et les relations établies ne peuvent être valables que pour les souches de BSA utilisées lors des essais. Ces essais sont à refaire à chaque changement de souche, de pH, de type d'eau, d'oxydant et de température.

Il est observé que la souche de *B. subtilis* est plus résistante au ClO<sub>2</sub> que ne le sont *Giardia* (Sous-Comité Fédéral Provincial sur l'Eau Potable, 1997) et *Cryptosporidium* (Korich *et al.*, 1990, Li *et al.*, 1998, Ruffell *et al.* 1998). La souche environnementale est plus résistante que *Giardia* seulement.

## ABSTRACT

Since the beginnings of disinfection, chlorine has been the disinfectant of choice. The discovery of a possible link between chlorine's disinfection by-products, trihalomethanes (THMs) and certain types of cancer has prompted the use of alternative disinfectants such as chlorine dioxide. An other reason for the use of chlorine dioxide is that *Cryptosporidium* is resistant to chlorine. *Giardia* and *Cryptosporidium* are responsible for many epidemics tied to drinking water, 1/3 of the epidemics for 1993-94, that was within quality parameters, half the epidemics caused by protozoans. Since those protozoans are difficult to detect and enumerate, a treatment efficiency indicator is necessary. Disinfection being to treatment considered in this study, aerobic sporulating bacteria (ASB) were selected as indicators. This type of bacterium is easy to produce and count. The Ct concept is used in this study to measure the resistance to disinfection. If the bacteria's Ct is greater than that of the protozoans then, the ASB will be good efficiency indicators for the disinfection by chlorine dioxide.

The two ASB strains used in the experiments are *Bacillus subtilis* and an environmental strain. The two strains were grown on R2A which is considered to be a low nutrients media. The bacterial count was made by diluting and filtering samples on 0,45  $\mu\text{m}$  filters. The filters

were incubated, after being pasteurized, on tripticase soya broth (TSB) soaked pads for 18 to 24 hours, at 35°C. The ASB were then counted and results expressed as colony forming units.

Because chlorine dioxide is volatile, multiple reactors were used, that is to say that one reactor was needed for each contact time. This was done so that the loss of chlorine dioxide could be minimized. Amber flasks were used to stop photodecomposition of the oxidant. Buffered MilliQ™ water was used for the experiments and these were done at room temperature (~20°C ± 2).

The Cts were calculated for 1,2 and 3 inactivation logs using Chick-Watson's law. For *B. subtilis*, the Cts obtained for a pH of 6,5 and 1 mg/l of ClO<sub>2</sub> are 216,9; 343,9 and 589,3 mg\*min/l. At a pH of 7,5 and 1 mg/l of ClO<sub>2</sub> the Cts obtained are 213,6; 372,6 and 472,3 mg\*min/l. At a pH of 8,3 and 1 mg/l of ClO<sub>2</sub> the Cts are 133,1; 251,5 and 326,7 mg\*min/l. For the environmental strain, the Cts obtained for a pH of 6,5 and 1 mg/l of ClO<sub>2</sub> are 39,7; 106,9 and 373 mg\*min/l. At a pH of 7,5 and 1 mg/l of ClO<sub>2</sub> the Cts obtained are 52,7; 201,3 and 540,8 mg\*min/l. At a pH of 8,3 and 1 mg/l of ClO<sub>2</sub> the Cts are 80,5; 165,7 and 333,3 mg\*min/l. According to these results, the *B. subtilis* strain used for these experiments is more resistant than the environmental strain. The Cts calculated for the disinfection of the ASB by chlorine dioxide varies greatly with the pH. The variations due to the pH are

different from one strain to the next. The Cts also vary according to the microorganism used in the experiments. Therefore, the pH and the microorganism must be taken into account in the analysis of Cts.

The comparisons and relations established are only applicable to the strains used in this study. The experiments have to be done again for every and any change in strains, pH, type of water, oxidant and temperature.

The *B. subtilis* strain is found to be more resistant than either *Giardia* (Sous-Comité Fédéral Provincial sur l'Eau Potable, 1997) or *Cryptosporidium* (Korich *et al.*, 1990, Li *et al.*, 1998, Ruffell *et al.* 1998). The environmental strain is more resistant than *Giardia* but not *Cryptosporidium*.

**TABLE DES MATIÈRES**

<b>DÉDICACE</b> .....	iv
<b>REMERCIEMENT</b> .....	v
<b>RÉSUMÉ</b> .....	vi
<b>ABSTRACT</b> .....	ix
<b>LISTE DES TABLEAUX</b> .....	xvi
<b>LISTE DES TABLEAUX EN ANNEXE</b> .....	xviii
<b>LISTE DES FIGURES</b> .....	xix
<b>LISTE DES FIGURES EN ANNEXE</b> .....	xxii
<b>LISTE DES ABRÉVIATIONS</b> .....	xxiv
<b>LISTE DES ANNEXES</b> .....	xxv
<b>INTRODUCTION</b> .....	1
<b>CHAPITRE I : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE</b> .....	5
1.1 Mise en contexte .....	5
1.2 Les protozoaires et la santé .....	7
1.3 Les normes et les réglementations .....	12
1.4 Les indicateurs .....	12

<b>1.5 Les spores de BSA .....</b>	<b>15</b>
<b>1.6 Le b oxyde de chlore .....</b>	<b>17</b>
<b>1.6.1 Particularités du b oxyde de chlore .....</b>	<b>17</b>
<b>1.6.2 Toxicité du b oxyde de chlore et de ses sous-produits .....</b>	<b>18</b>
<b>1.6.3 Le pouvoir désinfectant du b oxyde de chlore .....</b>	<b>20</b>
<b>1.6.4 Avantages du b oxyde de chlore par rapport au chlore .....</b>	<b>22</b>
<b>1.7 Les Ct et le b oxyde de chlore .....</b>	<b>23</b>
 <b>CHAPITRE II : MATÉRIEL ET MÉTHODES .....</b>	 <b>24</b>
<b>2.1 Procédure générale .....</b>	<b>24</b>
<b>2.1.1 Préparation des échantillons .....</b>	<b>25</b>
<b>2.1.2 Désinfection .....</b>	<b>25</b>
<b>2.1.3 Prélèvement des échantillons .....</b>	<b>26</b>
<b>2.1.4 Calcul des Ct .....</b>	<b>26</b>
<b>2.2 Préparation du matériel .....</b>	<b>30</b>
<b>2.2.1 Verrerie .....</b>	<b>30</b>
<b>2.2.2 Solutions .....</b>	<b>31</b>
<b>2.2.3 Préparation de l'ACVK .....</b>	<b>32</b>
<b>2.3 Bactéries sporulantes aérobies (BSA) .....</b>	<b>33</b>
<b>2.3.1 Préparation du milieu de culture .....</b>	<b>33</b>

<b>2.3.2 Préparation des cultures bactériennes</b>	34
<b>2.3.3 Mesure des BSA</b>	35
<b>2.4 Bioxyde de chlore</b>	35
<b>2.4.1 Préparation du ClO<sub>2</sub></b>	35
<b>2.4.2 Mesure du ClO<sub>2</sub></b>	37
<b>CHAPITRE III : RÉSULTATS</b>	41
<b>3.1 Effets du bioxyde de chlore sur <i>Bacillus subtilis</i> (ATCC 6633)</b>	41
<b>3.1.1 Concentrations résiduelles de bioxyde de chlore</b>	41
<b>3.1.2 Abattement de <i>B. subtilis</i></b>	44
<b>3.2 Effets du bioxyde de chlore sur une souche environnementale</b>	49
<b>3.2.1 Concentrations résiduelles de bioxyde de chlore</b>	49
<b>3.2.2 Abattement de la souche environnementale</b>	52
<b>3.3 Évaluation des Ct</b>	57
<b>3.3.1 Calcul des Ct de <i>B. subtilis</i></b>	57
<b>3.3.2 Les Ct de la souche environnementale</b>	63
<b>CHAPITRE IV : DISCUSSION</b>	70
<b>4.1 Le bioxyde de chlore</b>	70
<b>4.2 Les BSA</b>	71

4.2.1 Effet du pH sur l'abattement des souches .....	72
4.3 Les Ct .....	77
4.3.1 Les Ct en fonction du pH .....	77
4.3.2 Les Ct en fonction de la souche .....	82
4.3.3 Les Ct des souches et les protozoaires .....	83
4.4 Comparaison avec le chlore et l'ozone .....	85
<b>CHAPITRE V : CONCLUSION .....</b>	<b>87</b>
<b>RÉFÉRENCES .....</b>	<b>88</b>

**LISTE DES TABLEAUX**

<u>Tableau 1.1:</u> Ct pour différents microorganismes .....	21
<u>Tableau 2.1:</u> Quantité de produits utilisés pour fabriquer les tampons à différents pH.	32
<u>Tableau 3.1:</u> Écarts-types et concentrations résiduelles moyennes de ClO <sub>2</sub> en contact avec <i>B. subtilis</i> . .....	44
<u>Tableau 3.2:</u> Écart-types et concentrations résiduelles moyennes de ClO <sub>2</sub> en contact avec la souche environnementale, à différents pH. ....	52
<u>Tableau 3.3:</u> Formules des Ct par pH pour <i>B. subtilis</i> . ....	60
<u>Tableau 3.4:</u> Valeurs de n par pH, par le nombre de log d'inactivation visé, pour <i>B. subtilis</i> . ....	61
<u>Tableau 3.5:</u> Valeurs de Ct pour une concentration de ClO <sub>2</sub> de 1 mg/l, pour <i>B. subtilis</i> .	62
<u>Tableau 3.6:</u> Formules des Ct pour la souche environnementale. ....	67
<u>Tableau 3.7:</u> Valeurs de n par pH, par le nombre de log d'inactivation visé, pour la souche environnementale. ....	68

<b>Tableau 3.8:</b> Valeurs de Ct pour une concentration de ClO <sub>2</sub> de 1 mg/l, pour la souche environnementale. ....	69
<b>Tableau 4.1:</b> Comparaison des Ct des souches de BSA .....	83

**LISTE DES TABLEAUX EN ANNEXE**

<u>Tableau IV.1:</u> Pertes de ClO <sub>2</sub> par essai à pH 6,5 pour <i>B. subtilis</i> . . . . .	105
<u>Tableau IV.2:</u> Pertes de ClO <sub>2</sub> par essai à pH 7,5 pour <i>B. subtilis</i> . . . . .	106
<u>Tableau IV.3:</u> Pertes de ClO <sub>2</sub> par essai à pH 8,3 pour <i>B. subtilis</i> . . . . .	107
<u>Tableau VI.1:</u> Pertes de ClO <sub>2</sub> par essai à pH 6,5 pour la souche environnementale. . . . .	110
<u>Tableau VI.2:</u> Pertes de ClO <sub>2</sub> par essai à pH 7,5 pour la souche environnementale. . . . .	111
<u>Tableau VI.3:</u> Pertes de ClO <sub>2</sub> par essai à pH 8,3 pour la souche environnementale. . . . .	112
<u>Tableau IX.1:</u> Résultats bruts de la souche environnementale à pH 6,5 . . . . .	118
<u>Tableau IX.1:</u> Résultats bruts de <i>B. subtilis</i> à pH 6,5 . . . . .	119

## LISTE DES FIGURES

<u>Figure 1.1:</u>	Répartition des épisodes en fonction des mois (N=28, sans les empoisonnement par nitrates)	8
	Tirée de Kramer <i>et al.</i> , 1996.	
<u>Figure 1.2:</u>	Répartition des causes de maladies transmises par l'eau potable en 1993-94. Tirée de Kramer <i>et al.</i> , 1996.	9
<u>Figure 1.3:</u>	Répartition des origines des contaminations	
	Tirée de Kramer <i>et al.</i> , 1996.	10
<u>Figure 2.1:</u>	Évolution du ClO <sub>2</sub> résiduel dans le temps, pour <i>B. subtilis</i> à pH 6,5	30
<u>Figure 2.2:</u>	Montage pour la production du ClO <sub>2</sub> .	37
<u>Figure 3.1:</u>	Évolution du ClO <sub>2</sub> résiduel dans le temps à pH 6,5, pour <i>B. subtilis</i>	42
<u>Figure 3.2:</u>	Courbes d'abattement de <i>B. subtilis</i> à pH 6,5.	46
<u>Figure 3.3:</u>	Courbes d'abattement de <i>B. subtilis</i> à pH 7,5.	47
<u>Figure 3.4:</u>	Courbes d'abattement de <i>B. subtilis</i> à pH 8,3.	48
<u>Figure 3.5:</u>	Évolution du ClO <sub>2</sub> résiduel dans le temps à pH 6,5, pour la souche environnementale.	50

<u>Figure 3.6:</u>	Courbes d'abattement de la souche environnementale à pH 6,5.	54
<u>Figure 3.7:</u>	Courbes d'abattement de la souche environnementale à pH 7,5.	55
<u>Figure 3.8:</u>	Courbes d'abattement de la souche environnementale à pH 8,3.	56
<u>Figure 3.9:</u>	Courbes de Ct pour <i>B. subtilis</i> à pH 6,5.	58
<u>Figure 3.10:</u>	Courbes de Ct pour <i>B. subtilis</i> à pH 7,5.	59
<u>Figure 3.11:</u>	Courbes de Ct de <i>B. subtilis</i> pH 8,3.	59
<u>Figure 3.12:</u>	Valeurs de Ct pour <i>B. subtilis</i> .	63
<u>Figure 3.13:</u>	Courbes de Ct pour la souche environnementale à pH 6,5.	64
<u>Figure 3.14:</u>	Courbes de Ct pour la souche environnementale à pH 7,5.	65
<u>Figure 3.15:</u>	Courbes de Ct pour la souche environnementale à pH 8,3.	66
<u>Figure 3.16:</u>	Valeurs de Ct pour la souche environnementale.	69
<u>Figure 4.1:</u>	Abattement de <i>B. subtilis</i> à 5 mg/l, pour différents pH.	73
<u>Figure 4.2:</u>	Abattement de la souche environnementale à 5 mg/l, pour différents pH.	75

**Figure 4.3:** Ct de la souche environnementale en fonction du pH. .... 79

**Figure 4.4:** Comparaison des Ct des spores de BSA et des kystes de protozoaires

..... 85

**LISTE DES FIGURES EN ANNEXE**

<u>Figure I.1:</u> Courbe de calibration pour la spectrophotométrie aux rayons UV à 360nm.	101
<u>Figure II.1:</u> Courbe de calibration pour la spectrophotométrie avec ACVK, à 548 nm.	102
<u>Figure III.1:</u> Évolution du ClO <sub>2</sub> résiduel dans le temps à pH 7,5, pour <i>B. subtilis</i> .	103
<u>Figure III.2:</u> Évolution du ClO <sub>2</sub> résiduel dans le temps à pH 8,3, pour <i>B. subtilis</i> .	104
<u>Figure V.1:</u> Évolution du ClO <sub>2</sub> résiduel dans le temps à pH 7,5, pour la souche environnementale.	108
<u>Figure V.2:</u> Évolution du ClO <sub>2</sub> résiduel dans le temps à pH 8,3, pour la souche environnementale.	109
<u>Figure VII.1:</u> Courbes d'abattement lors de l'utilisation de différents tampons, sans oxydant.	113
<u>Figure VIII.1:</u> Intervalles de confiance pour <i>B. subtilis</i> à un pH 6,5.	114
<u>Figure VIII.2:</u> Intervalles de confiance pour <i>B. subtilis</i> à un pH 7,5.	115

<u>Figure VIII.3:</u> Intervalles de confiance pour <i>B. subtilis</i> à un pH 8,3.	115
<u>Figure VIII.4:</u> Intervalles de confiance pour la souche d'origine environnementale à un pH 6,5.	116
<u>Figure VIII.5:</u> Intervalles de confiance pour la souche d'origine environnementale à un pH 7,5.	116
<u>Figure VIII.6:</u> Intervalles de confiance pour la souche d'origine environnementale à un pH 8,3.	117

**LISTE DES ABREVIATIONS**

<b>AOX:</b>	<b>Organohalogénés adsorbables sur charbon actif</b>
<b>BHA:</b>	<b>Bactéries Hétérotrophes Aérobies</b>
<b>BSA:</b>	<b>Bactéries Sporulantes Aérobies</b>
<b>CDC:</b>	<b>Centers for Disease Control and Prevention</b>
<b>CFR:</b>	<b>Code of Federal Regulations</b>
<b>PL:</b>	<b>Public Law</b>
<b>SDWA:</b>	<b>Safe Drinking Water Act</b>
<b>SWTR:</b>	<b>Surface Water Treatment Rule</b>
<b>THM:</b>	<b>Trihalométhanes</b>
<b>TSA:</b>	<b>Tripticase Soya Agar</b>
<b>TSB:</b>	<b>Tripticase Soya Broth</b>
<b>TTC:</b>	<b>Triphenyl Tetrazolium Chloride</b>
<b>UFC:</b>	<b>Unité formant une colonie</b>
<b>USEPA:</b>	<b>United States Environmental Protection Agency</b>

**LISTE DES ANNEXES**

<b>ANNEXE I: COURBE DE CALIBRATION POUR LA MESURE DU BIOXYDE DE CHLORE PAR LA MÉTHODE AUX RAYONS UV, À 360 nm.</b>	101
<b>ANNEXE II: COURBE DE CALIBRATION POUR LA MESURE DU BIOXYDE DE CHLORE PAR LA MÉTHODE À L'ACVK, 548 nm.</b>	102
<b>ANNEXE III: GRAPHIQUES DES CONCENTRATIONS DE ClO<sub>2</sub> RÉSIDUEL <i>B. SUBTILIS</i> POUR LES pH 7,5 ET 8,3.</b>	103
<b>ANNEXE IV: PERTES INITIALES DE ClO<sub>2</sub> POUR <i>B. SUBTILIS</i></b>	105
<b>ANNEXE V: GRAPHIQUES DES CONCENTRATIONS DE ClO<sub>2</sub> RÉSIDUEL POUR LA SOUCHE ENVIRONNEMENTALE À pH 7,5 ET 8,3</b>	108
<b>ANNEXE VI: PERTES INITIALES DE ClO<sub>2</sub> POUR LA SOUCHE ENVIRONNEMENTALE</b>	110
<b>ANNEXE VII: TESTS D'AGGLUTINATION POUR LA SOUCHE ENVIRONNEMENTALE</b>	113

ANNEXE VIII: INTERVALLES DE CONFIANCE DES COURBES DE CT	114
ANNEXE IX: RÉSULTATS BRUTS	118

## INTRODUCTION

À l'aube du XXième siècle, la désinfection systématique de l'eau potable a été implantée dans plusieurs villes d'Amérique de Nord. Le but de la désinfection est d'éliminer les microorganismes pathogènes pour protéger la santé publique. Cela entraîna une diminution du nombre de maladies transmises par l'eau de consommation. Au cours des années 70, la découverte des trihalométhanes (THM) a mis en évidence certains effets négatifs de la désinfection par le chlore. Ceci a provoqué une remise en question de l'utilisation de ce désinfectant. Afin de solutionner ce problème, plusieurs études ont été entreprises. Certaines avaient pour objectif l'enlèvement des précurseurs des THM et par voie de conséquence, la moindre formation de THM lors de l'ajout du chlore. D'autres chercheurs ont plutôt tenté de trouver des produits de remplacement pour le chlore. C'est ce qui a conduit à la réalisation de plusieurs études sur le bioxyde de chlore.

Tous les microorganismes ne peuvent être mesurés. Des indicateurs peuvent être utilisés pour s'assurer que la plupart des microorganismes sont enlevés ou inactivés. Un bon indicateur est un organisme ou une particule qui se comporte de la même façon que l'organisme ou le groupe d'organismes visé en ce qui a trait aux traitements de potabilisation de l'eau et qui est plus facile à détecter et à mesurer. Un indicateur d'efficacité ne renseigne

pas sur la présence ou l'absence du microorganisme pathogène, mais il témoigne plutôt de l'efficacité de la chaîne de traitement à enlever ou à inactiver des particules ou des microorganismes. Présentement, les coliformes fécaux servent à la vérification de la qualité de l'eau brute; ils indiquent s'il y a eu une contamination récente par des eaux usées. Les coliformes totaux servent d'indicateurs de la qualité de l'eau traitée. Ils sont mesurés à la sortie de l'usine et dans le réseau de distribution. La réglementation en place (Règlement sur l'Eau Potable, 1997) exige une absence quasi totale des coliformes totaux dans l'eau de consommation. L'étude de Payment *et al.* (1993) a mis en évidence les faiblesses des indicateurs utilisés maintenant. Ainsi, même lorsque la réglementation est respectée, l'eau potable peut avoir un effet sur la santé du public, comme en témoignent certains événements malheureux tel que l'épidémie de Milwaukee (Kramer *et al.*, 1996). De nouveaux indicateurs sont envisagés. Les principaux sont la turbidité, les comptes de particules et les spores de bactéries sporulantes aérobies (BSA). La turbidité est facilement mesurée à l'aide d'un turbidimètre alors que les particules sont mesurées par un compteur de particules qui est beaucoup plus coûteux et difficile à utiliser. Il n'y a pas de norme qui existe pour le nombre de particules. Lorsque ces variables sont mesurées le long d'une chaîne de traitement, l'efficacité d'enlèvement physique des différentes unités de traitement peut être déterminée.

Les BSA sont principalement du genre *Bacillus* et elles sont entraînées dans l'eau par le

ruissellement et le lessivage du sol bordant le cours d'eau. Elles peuvent aussi être présentes dans l'eau usée, mais elles ne sont pas représentatives d'une intrusion d'eau usée dans l'eau potable (Sneath *et al.*, 1984). Selon plusieurs auteurs, le genre *Bacillus* est généralement non pathogène (Rice *et al.*, 1994, 1996, Sneath *et al.*, 1984). Ces bactéries forment des endospores qui, sauf exception, sont inférieures à 1  $\mu\text{m}$  de diamètre (Sneath *et al.*, 1984). Elles peuvent être plus résistantes que les kystes et les oocystes des protozoaires, du moins dans le cas du chlore (Barbeau, 1996). Les endospores sont formées en présence de conditions défavorables. La mesure de leur concentration dans l'eau est aisée et peu coûteuse (Barbeau, 1996, Lytle *et al.*, 1996). Il est donc facile de suivre leur concentration dans une usine de traitement et d'ainsi évaluer l'efficacité de chacune des unités de traitement. En général, les BSA ne sont pas dangereuses pour la santé humaine (Sneath *et al.*, 1984, Lytle *et al.*, 1996). Elles peuvent être utilisées comme indicateurs de l'inactivation des protozoaires à cause de leur résistance face à la chloration égale ou supérieure à celle des *Giardia* (Barbeau, 1996). Les BSA n'indiquent pas la présence ou l'absence des protozoaires mais, leurs variations de densité indiquent plutôt l'efficacité du traitement pour les enlever ou les inactiver. À partir de mesure de concentrations de BSA dans une chaîne de traitement, une évaluation de l'efficacité des différents procédés pour éliminer ces microorganismes peut être faite (Barbeau, 1996, Ndiongue, 1999). Il est ensuite possible de supposer que les unités de traitement qui ont pour but l'élimination des particules seront au moins aussi efficace pour enlever les kystes et les oocystes de protozoaires qui sont de

plus grande taille que les BSA.

Le Ct est un concept selon lequel un même pourcentage d'enlèvement des microorganismes est obtenu lorsque le produit de la concentration du désinfectant par le temps de contact est maintenu constant. En d'autres mots, il est possible de maintenir le même taux d'enlèvement lorsque la concentration du désinfectant diminue d'un certain facteur à la condition d'augmenter le temps de contact par un même facteur. Les modèles mathématiques pour le calcul des Ct ont des facteurs, en exposant, qui viennent modifier la concentration ou le temps ou les deux. En utilisant ce concept, il est possible de comparer la résistance de divers microorganismes et l'efficacité de divers désinfectants dans des conditions données. Barbeau (1996) a mesuré les Ct des BSA pour le chlore. Il a ensuite comparé les résultats obtenus avec les Ct de *Giardia* publiés dans le guide du United-States Environmental Agency (USEPA, 1991).

La présente étude concerne l'évaluation des Ct des BSA en présence de bioxyde de chlore. Dans un premier temps, des courbes de Ct seront déterminées pour l'inactivation d'un souche de référence: *Bacillus subtilis*. Par la suite, des courbes de Ct seront déterminées pour une souche d'origine environnementale. L'efficacité du bioxyde de chlore pour inactiver les BSA sera vérifiée en fonction du pH, en eau ultra-pure tamponnée pour les deux souches de BSA.

## **CHAPITRE I**

### **REVUE BIBLIOGRAPHIQUE**

#### **1.1 Mise en contexte**

Au début du siècle, plusieurs maladies, telles que le choléra et la fièvre typhoïde, causées par des bactéries transportées par l'eau ont promu l'implantation de la désinfection par le chlore. Le chlore a permis de réduire de façon importante ces maladies. Ce fut un avantage important pour un inconvénient mineur, c'est-à-dire, les goûts transmis à l'eau par le chlore lorsqu'il réagit avec des composés azotés (chloramines) (Desjardins, 1997). En 1974, la découverte d'un lien entre la chloration et les trihalométhanes (THM), soupçonnés être cancérogènes, (Rook, 1974) a fait en sorte que l'utilisation du chlore comme désinfectant de l'eau potable a été remise en question. Les THM sont des produits de réaction entre le chlore et les précurseurs présents dans l'eau naturelle. Les précurseurs de THM sont des composés organiques qui sont présents dans l'eau naturelle et qui peuvent réagir avec le chlore (Christman et Gjessing, 1983). Deux stratégies peuvent être appliquées pour inhiber la formation de THM. Les précurseurs de THM peuvent être retirés de l'eau avant l'ajout du chlore par des traitements physico-chimiques telle que la coagulation-flocculation, la décantation et la filtration. L'autre stratégie est d'utiliser des oxydants qui ne formeront pas

de THM lorsque mis en contact avec les précurseurs.

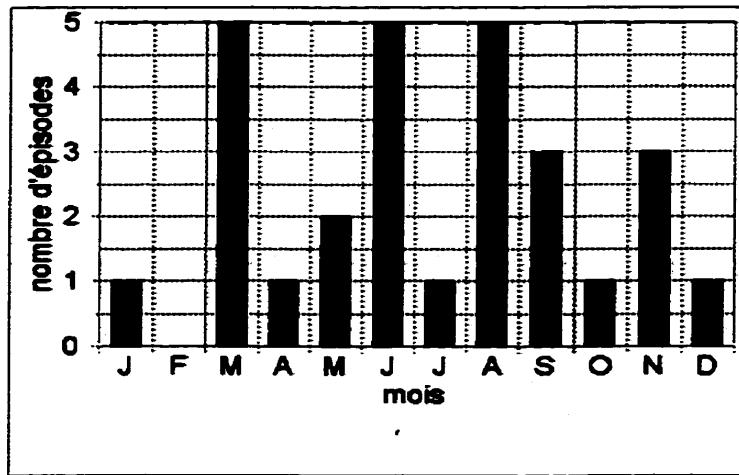
Plusieurs types de microorganismes peuvent affecter la santé. Par exemple, l'hépatite A est causée par un virus, la giardiose est causée par un protozoaire. Chaque type de microorganismes a ses propres caractéristiques, telles que sa taille et sa résistance aux différents oxydants. Les virus sont petits, de 0,02 à 0,1  $\mu\text{m}$  (APHA *et al.*, 1992) et peuvent passer facilement au travers des filtres. Les formes résistantes des protozoaires, kystes et oocystes, sont de plus grande taille, soit de 5 à 12  $\mu\text{m}$  (Dubey *et al.*, 1990). Dans certaines conditions, ils peuvent passer à travers les filtres de 1  $\mu\text{m}$  (Bitton, 1994). Ces deux types de microorganismes montrent une bonne résistance face au chlore. Les Ct du virus de l'hépatite A avec le  $\text{ClO}_2$  varient entre 1,8  $\text{mg}^*\text{min/l}$  à pH 6,0 et 12,3 $\text{mg}^*\text{min/l}$  à pH 10,0 pour 99,99% d'inactivation, à 5°C (Sobsey, 1989); de 3 $\text{mg}^*\text{min/l}$  à pH 6,0 et de 6  $\text{mg}^*\text{min/l}$  à pH 10,0, à 25°C (Sobsey, 1989). Les kystes du protozoaire *Giardia lamblia* ont un Ct de 54  $\text{mg}^*\text{min/l}$  à pH 6,0 à 192  $\text{mg}^*\text{min/l}$  à pH 8,0, à 5°C (Sobsey, 1989). Les Ct élevés pour inactiver les kystes et les oocystes des protozoaires ont amené les chercheurs à s'interroger sur l'importance des protozoaires comme cause de maladies. Comme ces microorganismes sont peu abondants et très difficiles à détecter, des travaux ont été orientés vers la recherche d'indicateurs de présence ou d'indicateurs de performance des chaînes de traitement pour les éliminer. Les spores de BSA sont considérées comme d'éventuels indicateurs de performance de traitement pour enlever ou inactiver les kystes et les oocystes des

protozoaires. Des travaux ont été faits pour montrer la résistance des spores de BSA au chlore (Barbeau, 1996) et à l'ozone (Facile, 1998). La résistance de ces microorganismes au bioxyde de chlore est peu documentée. L'efficacité du ClO<sub>2</sub> a inactiver les spores de BSA sera étudiée et comparée à l'efficacité du chlore.

## 1.2 Les protozoaires et la santé

Dans une étude américaine, Kramer *et al.* (1996) a dénombré 30 épidémies de maladies causées par l'eau de consommation dans 17 états et dans un territoire durant les années 1993-94, aux États-Unis. Cela a affecté 405 366 personnes. Il va de soi que seul les épidémies rapportés ont été analysés. Les auteurs doutent que toutes les épidémies aient été reconnues et rapportées. La compilation des données a été faite par le Centers for Disease Control and Prevention (CDC), le US Environmental Protection Agency (USEPA) et le Concil of State and Territorial Epidemiologists. La figure 1.1 montre la répartition des maladies en fonction des mois pour les années 1993-1994.

Sur les 30 épidémies, 16,7% sont de cause inconnue, 23,3% sont causées par des bactéries, 26,7% par des contaminants chimiques et 33,3% par des protozoaires (voir figure 1.2). Les origines de ces contaminations sont nombreuses (figure 1.3). Le réseau de distribution est mis en cause dans 26,7% des cas. La cause du problème, recroissance ou intrusion, n'est

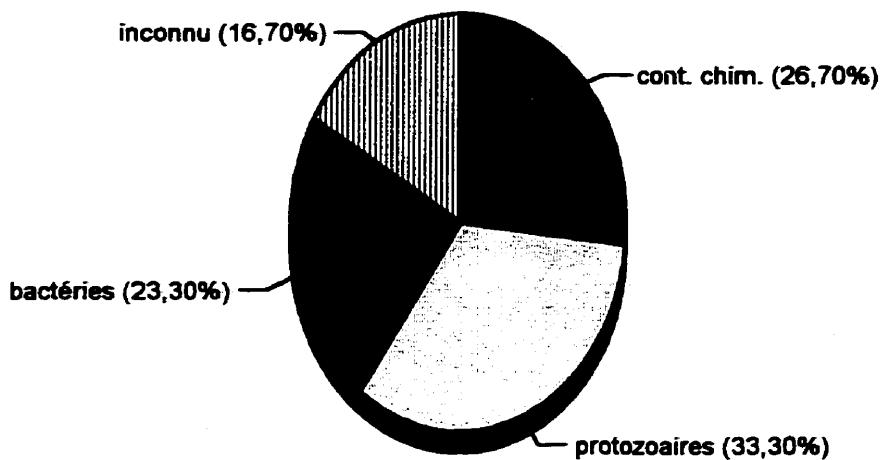


**Figure 1.1: Répartition des épidémies en fonction des mois**

(N=28, sans les empoisonnements par nitrates)

Tirée de Kramer *et al.*, 1996.

pas spécifiée pour tous les cas. Au moins un cas serait dû à l'intrusion. Une défaillance du traitement serait responsable de 23,3% des cas, l'utilisation d'eau souterraine non-traitée de 36,7% des cas alors que 13,3% des cas ne peuvent pas être expliqués. Dans cette étude, 14 épidémies ont été causées par l'utilisation de l'eau à des fins récréatives, ceci en plus des 30 épidémies reliées à l'eau de consommation. Dans 71,5% des cas, un protozoaire non spécifié était la cause de la maladie.

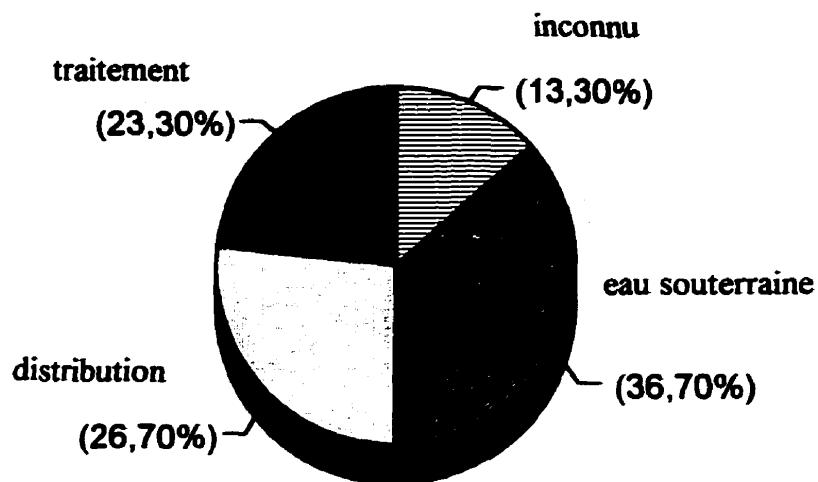


**Figure 1.2:** Répartition des causes de maladies transmises par l'eau potable en 1993-94. Tirée de Kramer *et al.*, 1996.

Une compilation plus récente des maladies reliées à l'eau potable (Schneider, 1998), montre que les protozoaires sont responsables de près de 25% des épidémies entre 1976 et 1994. Cette même étude montre que *Cryptosporidium* et *Giardia* sont responsables de 24% des épidémies et de 82,4% des maladies (Shneider, 1998).

Les deux protozoaires les plus associés aux infections et aux maladies sont *Giardia lamblia* et *Cryptosporidium parvum*. Ils sont très résistants à la désinfection (Dubey *et al.*, 1990, Sobsey, 1989). Les kystes de *Giardia* sont de forme ovale et ils ont une longueur de 8 à 12  $\mu\text{m}$  et un diamètre de 7 à 10  $\mu\text{m}$ . L'épaisseur de leur paroi est de 0,3 à 0,5  $\mu\text{m}$  (Sheffield, 1979). Les oocystes de *Cryptosporidium* ont environ 5  $\mu\text{m}$  de diamètre (Dubey *et al.*,

1990). Leur récupération, leur détection ainsi que leur mesure sont très difficiles (Hancock *et al.*, 1998). La mesure de ces microorganismes doit être faite par microscopie en contraste de phase (Hancock *et al.*, 1998) et l'observation est difficile. Ces difficultés rendent l'utilisation d'indicateurs de qualité souhaitable. À défaut d'avoir un tel indicateur, un indicateur de performance du traitement pour l'enlèvement et l'inactivation de ces microorganismes doit être trouvé.



**Figure 1.3:** Répartition des origines des contaminations de l'eau potable.

Tirée de Kramer *et al.*, 1996.

Lors d'une étude sur la qualité des eaux souterraines, Hancock *et al.* (1998) ont prélevé 253 échantillons dans 149 puits verticaux, 82 dans 35 sources, 45 dans 4 galeries d'infiltration et 83 dans 11 puits horizontaux, pour un total de 463 échantillons dans 199 sites. Ces sites sont situés dans 23 des 48 états contigus. Cinq pour cent des puits verticaux contenaient des *Cryptosporidium* et/ou des *Giardia*, alors que 26% des sources, 50% des galeries d'infiltration et 45% des puits horizontaux contenaient des *Cryptosporidium* et/ou des *Giardia*. La détection des protozoaires a été faite par immunofluorescence et la confirmation a été faite par microscopie en contraste de phase (interférence différentielle ou modulation de Hoffman).

Lors d'une synthèse bibliographique de 1978 à 1986, Sobsey (1989) dénombre 92 épidémies impliquant 24 365 personnes qui ont été causées par *Giardia* et un épisode impliquant 117 personnes causé par *Cryptosporidium*. Il y a 251 épisodes touchant 61 478 personnes dont l'agent étiologique n'a pu être identifié. Les seules épidémies considérées dans cette étude sont celles qui ont été rapportées au CDC ou à l'USEPA. Dans la compilation de Scheider (1998), 15 839 personnes ont été atteintes de gairdiose entre 1976 et 1994, et 419 932 ont été atteintes de cryptosporidiose.

### **1.3 Les normes et les réglementations**

La réglementation actuelle sur la qualité de l'eau potable est basée sur deux groupes de microorganismes coliformes soit les coliformes totaux et les coliformes fécaux. Selon le règlement sur l'eau potable (Règlement sur l'Eau Potable, 1997) "au moins 90% des échantillons doivent être exempts de toutes bactéries coliformes et aucun échantillon ne doit contenir au total plus de dix bactéries coliformes dans 100 ml d'eau, dans le cas où plus de 10 échantillons sont prélevés sur une période de 30 jours consécutifs." Lorsque moins de 10 échantillons sont prélevés dans un mois, pas plus d'un échantillon ne doit contenir des bactéries coliformes et il ne doit pas y avoir plus que 10 bactéries coliformes dans 100 ml d'eau. Selon le Safe Drinking Water Act (Public Law, 1986), les microorganismes suivant doivent être absents: *G. lamblia*, *Legionella*, les coliformes totaux et les virus. Dans le Surface Water Treatment Rule (Code of Federal Regulation ou CFR, 1989), un enlèvement de 3 log de *G. lamblia* et un enlèvement de 4 log des virus entériques sont exigés. Depuis le 30 novembre 1998, le niveau de contamination accepté pour *Cryptosporidium* est de zéro (Code of Federal Regulation, 1998).

### **1.4 Les indicateurs**

Les coliformes totaux servent d'indicateurs de la qualité de l'eau après le traitement et les

coliformes fécaux servent d'indicateurs de pollution fécales et de la qualité de l'eau brute. Kramer *et al.* (1996) ont noté que sur 9 épidémies causées par des protozoaires, il y en avait 4 où les normes sur les coliformes étaient respectées en tout temps. Les coliformes ne semblent donc pas être de bons indicateurs de la qualité de l'eau potable. Payment *et al.* (1993) n'ont pas mesuré de relation entre les épidémies gastrointestinales et les indicateurs de qualité d'eau qu'ils ont évalués. D'après les auteurs de ces deux études, les indicateurs utilisés actuellement (coliformes totaux et fécaux) ne permettent pas de prédire les effets de l'eau potable sur la santé. Ce sont plutôt des indicateurs de pollution de la source d'eau brute (coliformes fécaux) ou des indicateurs de la qualité microbiologique de l'eau traitée (coliformes totaux). Les coliformes seraient de mauvais indicateurs de la qualité de l'eau, parce qu'ils sont éliminés bien avant les virus entériques et les protozoaires (Payment *et al.*, 1993). Il faut donc trouver de meilleurs indicateurs.

Les principaux indicateurs à l'étude sont la turbidité (Ndiongue, 1999), les compteurs de particules (Nour, 1998, Ndiongue, 1999), *Clostridium perfringens*, les bactéries hétérotrophes aérobies (BHA) et les bactéries sporulantes aérobies (BSA) (Rice *et al.*, 1994, 1996, Lytle *et al.*, 1996). Pour vérifier l'efficacité de la désinfection, il est préférable d'utiliser un microorganisme facile à mesurer et plus résistant que les coliformes. Rice *et al.* (1994, 1996) ont suggéré l'utilisation des bactéries du genre *Bacillus*. Le genre *Bacillus* est généralement non pathogène (Rice *et al.*, 1994, 1996, Sneath *et al.*, 1984). Ces bactéries

sont simples à cultiver et elles sont présentes en grand nombre dans la plupart des eaux brutes. Elles se multiplient dans le sol et non dans l'usine de traitement. Le suivi de leur concentration le long d'une chaîne de traitement permet de mesurer l'efficacité de l'enlèvement physique par les procédés de coagulation-flocculation-décantation-filtration (Ndiongue, 1999) et de l'inactivation chimique par le procédé de désinfection (chlore, ozone ou oxyde de chlore) (Barbeau, 1996, Facile, 1998, Rice *et al.*, 1994, 1996, Lytle *et al.*, 1996). De plus, ce genre est résistant à la désinfection (Rice *et al.*, 1994, 1996). Si un organisme indicateur est utilisé pour l'inactivation des protozoaires, le niveau de désinfection va dépendre de la résistance de l'indicateur et de la relation établie entre les deux organismes (Narkis *et al.*, 1995).

La résistance des BSA au chlore est importante (Barbeau, 1996). Elle est du même ordre de grandeur que celle de *Giardia*, soit un Ct d'environ 100 mg\*min/l pour la souche d'origine environnementale de l'usine Atwater, ville de Montréal (Barbeau, 1996) comparé à un Ct de 122 pour *Giardia* à 10°C (SWTR) pour un enlèvement de 3 log à un pH 7. Pour ces conditions, le Ct de la souche d'origine environnementale est plus faible que celui de *Giardia*. Les valeurs de Ct de la souche environnementale et de *Giardia* sont semblables pour 3 log d'inactivation à 20°C, soit de 60 mg\*min/l pour la souche d'origine environnementale de l'usine Atwater; d'environ 275 mg\*min/l pour la souche d'origine environnementale de l'usine Ste-Rose, ville de Laval (Barbeau, 1996) et 58 mg\*min/l pour

*Giardia* (SWTR). Le Ct de la souche de *Bacillus subtilis* étudiée était de 200 mg\*min/l pour 3 log d'inactivation à 20°C (Barbeau, 1996).

### 1.5 Les spores de BSA

Les spores sont des formes résistantes des bactéries. Cette résistance est causée par leur paroi qui est composée majoritairement de protéines (~70%) (Murrell, 1967, Rose, 1968). La paroi contient aussi du dipicolinate de calcium, des lipides et des hydrates de carbone (Murrell, 1967). L'intérieur des spores, ou le cortex, contient surtout des glycopeptides (Rose, 1968). Pour fins de comparaison, les kystes de protozoaires ont une paroi composée de glycoprotéines (Kreiker et Baker, 1987) et de chitine (Fayer, 1997, Meyer, 1990).

Les protéines sont présentes dans les parois des spores de BSA et des kystes de protozoaires. Les protéines en général ont quatre niveaux de structure: 1) leur séquence d'acides aminés; 2) la structure secondaire qui est une série de repliements sur 2 dimensions, soit en hélice, soit en feuille; 3) la structure tridimensionnelle qui rend le polypeptide actif biologiquement et 4) l'organisation de plusieurs polypeptides en protéine à sous-unité multiples (Horton *et al.*, 1992). Les protéines peuvent être dénaturées. La dénaturation est le changement de la conformation de la protéine qui engendre la perte de son activité biologique (Horton *et al.*, 1992). Ceci peut être causé par des changements

environnementaux ou des traitements chimiques (Horton *et al.*, 1992). Le pH peut engendrer la dénaturation en changeant l'état ionique des chaînes ionisables des protéines ce qui peut causer 1) le bris de liens hydrogène et 2) la création de zone de répulsion (Horton *et al.*, 1992). La température peut causer la dénaturation en augmentant l'énergie de vibration et de rotation ce qui déstabilise les liens les plus fragiles de la structure tridimensionnelle (Horton *et al.*, 1992). De faibles changement de température ou de pH cause une dénaturation qui n'est pas permanente. Les protéines retrouvent leur conformation lorsque les conditions reviennent normales. Un changement excessif de ces facteurs engendre une dénaturation permanente (Horton *et al.*, 1992).

D'autres composants importants sont les lipides. Ce sont des composés qui sont insolubles dans l'eau (Horton *et al.*, 1992). Ils sont aussi affectés par le pH. Au niveau de la paroi, ou de la membrane, la couche de lipides devient plus perméable lorsque le pH augmente (Sproul *et al.*, 1983).

L'abattement des spores de BSA peut ne pas être linéaire (Haas *et al.*, 1995). À la fin des courbes d'abattement, un ralentissement est observé. Ce ralentissement de la vitesse d'abattement est généralement attribué à quatre phénomènes: 1) le passage à une forme plus résistante (de bactérie à spore) pendant l'inactivation; 2) l'existence de variations génétiques dans la population; 3) la protection d'une sous-population ou une variation de la dose

d'oxydant reçue; 4) l'agglutination d'une sous-population (Haas *et al.*, 1995).

## 1.6 Le bioxyde de chlore

### 1.6.1 Particularités du bioxyde de chlore

Le bioxyde de chlore est un gaz, il est donc sensible à la température et à la pression (Latshaw, 1994). L'instabilité de ce composé rend son transport dangereux et il doit donc être produit sur place. Il est explosif à des concentrations supérieures à 10% dans l'air (White, 1986). Dans cette étude, le bioxyde de chlore en solution aqueuse est utilisé. Le dosage du ClO<sub>2</sub> en solution aqueuse peut être fait par titrage iodométrique (APHA *et al.*, 1992) ou par colorimétrie à l'ACVK (Masschelein *et al.*, 1989). Le bioxyde de chlore se décompose en chlorites et en chlorates. Cette réaction augmente avec le pH pour devenir totale à un pH de 11 (Doré, 1989).

La demande en ClO<sub>2</sub> est affectée par la qualité de l'eau. Par conséquent, cette demande varie le long d'une filière de traitement. La filtration sur sable (5m/h) fait légèrement baisser la demande en bioxyde de chlore de 0,1 à 0,5 mg/l par rapport à l'eau brute et l'ozonation la fait baisser encore de 0,25 mg/l par rapport à l'eau filtrée (Morissette *et al.*, 1996). La filtration sur charbon actif biologique fait baisser la demande en bioxyde de chlore 2 à 3 fois

plus que l'ozonation soit environ 0,7 mg/l (Morissette, 1993). Puisque la matière en suspension peut protéger les microorganismes en effectuant une demande en oxydant (Narkis et al., 1995), les étapes de traitement précédant la désinfection sont importantes.

Le bioxyde de chlore ne forme pas de THM (Doré, 1989). Par contre, il peut réagir avec la matière organique (Hoigné et Bader, 1994). Hoigné et Bader ont montré que le  $\text{ClO}_2$  réagit avec les phénols avec des constantes de réaction qui varient de 46 à  $1,4 \times 10^8 \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ . Ces auteurs ont aussi montré que le  $\text{ClO}_2$  réagit peu avec les composés azotés ou sulfurés, les constantes de réactions allant de  $1 \times 10^6$  à  $6 \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ . Les composés qui ne comportent pas de phénol dans leur composition sont en général peu réactif lorsqu'ils sont en présence de  $\text{ClO}_2$  (Hoigné et Bader, 1993).

### **1.6.2 Toxicité du bioxyde de chlore et de ses sous-produits**

Quelques vérifications bibliographiques sur la toxicité du bioxyde de chlore ont été faits. Ces études portent sur les effets des sous-produits tel les chlorites ( $\text{ClO}_2^-$ ) et les chlorates ( $\text{ClO}_3^-$ ) plutôt que sur ceux du bioxyde de chlore. Ceci est dû surtout au fait que 70% du bioxyde de chlore en solution diluée est rapidement décomposé en  $\text{ClO}_2^-$  puis une petite quantité, non-spécifiée, passe en  $\text{ClO}_3^-$  (Noack et Doerr, 1981, Werdenhoff et Singer, 1987). Lorsque les sous-produits du bioxyde de chlore, les chlorites ( $\text{ClO}_2^-$ ) et les chlorates ( $\text{ClO}_3^-$ ),

sont *in vivo* ils peuvent conduire à la production de peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ). Ceci cause l'anémie hémolytique par l'oxydation de l'hémoglobine en métoglobin (Couri *et al.*, 1982, Heffernan *et al.*, 1979). Il est possible de diminuer le  $ClO_2^-$  en utilisant un traitement au charbon activé granulaire, par contre, le  $ClO_3^-$  est beaucoup plus difficile à retirer de l'eau (Gonc et Voudrias, 1994).

Daniel *et al.* (1990) ont comparé les effets toxicologiques du chlore, des monochloramines et du bioxyde de chlore. Les essais ont été faits sur des rats en utilisant des concentrations que les auteurs considèrent comme étant subchroniques. Les auteurs ont noté que le chlore n'avait pas d'effet toxicologique. Les rats qui consommaient une eau contenant 200 mg/l de monochloramines se sont développés moins rapidement. Leur gain de poids moyen n'était que de 51% de celui du groupe contrôle. Enfin, les auteurs ont noté que les rats qui consommaient une eau contenant 200 mg/l de  $ClO_2$  avaient un gain de poids d'environ 26% inférieur par rapport aux rats qui consommaient une eau sans désinfectant. L'effet le plus important est le dommage causé à la section antérieure de la cavité nasale qui a été observé à toute les concentrations de  $ClO_2$ . L'étude de Daniel *et al.* (1990) n'est pas applicable à la réalité avec des doses aussi fortes de désinfectant puisque la concentration maximale acceptable suggérée de bioxyde de chlore résiduel, incluant ses sous-produits, est de 1 mg/l dans l'eau de consommation (Contuovo et Vogt, 1985, Masschelein, 1992, Peeters *et al.*, 1989).

### 1.6.3 Le pouvoir désinfectant du b oxyde de chlore

Plusieurs facteurs tel que le pH, la température, le temps de contact, le type d'eau, etc., influencent la désinfection des spores de *Bacillus* au b oxyde de chlore. Selon Botzenhart *et al.* (1993), l'efficacité du ClO<sub>2</sub> pour détruire *Bacillus subtilis* augmente d'un facteur de 2,5 lorsque le pH passe de 6 à 8 et d'un facteur de 2 lorsque la température augmente de 10°C. La concentration de ClO<sub>2</sub> diminue avec le temps (Narkis *et al.*, 1995). Ceci est observé lors de l'utilisation d'un réacteur en présence d'un col d'air. Par contre, une étude (Katz *et al.*, 1994) a été faite en ajoutant en même temps, dans la même eau, des concentrations égales de chlore et de b oxyde de chlore. Les auteurs ont alors noté une augmentation de la concentration de ClO<sub>2</sub>, dans le temps. Ceci serait du à une oxydation des ions chlorites en b oxyde de chlore par le chlore, libre ou combiné. Ces combinaisons de désinfectants donnent aussi un résiduel plus élevé de désinfectant et un meilleur abattement des microorganismes tels que les coliformes totaux, les coliformes fécaux, les streptocoques fécaux et les E-coliphages (virus) (Katz *et al.*, 1994). Une autre étude (Walker et Morales, 1997) fait mention de l'obtention d'un abattement de 99,69% pour les bactéries libres et un abattement de 99,94% pour le biofilm, avec une concentration, dans les deux cas, de 1 mg/l de ClO<sub>2</sub> pour un temps de contact de une minute, dans un contenant non agité qui contient la solution de désinfectant à la concentration désirée.

Sobsey (1989) a fait une synthèse bibliographique sur l'inactivation de microorganismes affectant la santé des humains. Il présente des valeurs de Ct pour des bactéries, des virus et des protozoaires face au chlore, aux chloramines, aux rayons UV, à l'ozone et au bioxyde de chlore. Une partie de ces données, ainsi que d'autres provenant de différents auteurs, sont présentées au tableau 1.1. Pour fins de comparaison, *Cryptosporidium* a un Ct de 7200 mg\*min/l, pour 2 log d'inactivation avec le chlore à pH 7, à une température de 25°C.

Tableau 1.1: Ct pour différents microorganismes

Références	Microorganisme	pH	Température °C	log inactivation	Ct mg de ClO <sub>2</sub> *min/l
Sobsey (1989)	<i>Giardia muris</i>	7	25	2	5,1
"	<i>Giardia muris</i>	7	5	2	10,7
"	<i>Escherichia coli</i>	7	5	2	0,48
"	virus de l'hépatite A	6	5	2	1,7
Korich <i>et al.</i> (1990)	<i>Cryptosporidium</i>	7	25	1	78
Berg <i>et al.</i> (1988)	<i>E. coli</i>	7	25	3	1,5
"	<i>E. coli</i>	7	25	4	11,3
Botzenhart <i>et al.</i> (1993)	<i>Bacillus subtilis</i>	8	5	4	25

#### 1.6.4 Avantages du bioxyde de chlore par rapport au chlore

Le chlore réagit avec la matière organique et forme des THM. La norme du SDWA pour les THM totaux est de 0,1 mg/l (PL 104-182). Le chloroforme, le dichlorobromométhane, le chlorodibromométhane et le bromoforme sont les formes les plus courantes. Le bioxyde de chlore ne produit pas de THM et seulement une petite quantité de composés adsorbables sur charbon actif (AOX). Une étude de Richardson *et al.* (1994) a mis en évidence qu'une désinfection au ClO<sub>2</sub> suivie d'un ajout de chlore engendre la formation de THM ainsi que d'autres sous-produits organohalogénés (AOX). Bien que les concentrations ne soient pas mentionnées, la liste des composés formés lors du traitement de désinfection est présentée dans un tableau. Il y a plus de AOX dans les échantillons qui ont subi une post-chloration, soit 46, que dans les échantillons traités seulement avec le bioxyde de chlore, soit 36. Des THM ont été détectés dans les échantillons traités avec le chlore. Aucun THM n'a été détecté dans les échantillons traités seulement avec le bioxyde de chlore.

Le bioxyde de chlore forme des ions chlorites et chlorates (Condie, 1986, Couri *et al.*, 1982, Katz *et al.*, 1994). Des essais utilisant des combinaisons chlore/bioxyde de chlore ont montré qu'il est possible de faire baisser la concentration des chlorites (Katz *et al.*, 1994). Le bioxyde de chlore réduit considérablement l'infectivité de *Cryptosporidium parvum* à faible concentration (0,4 mg/l) (Peeters *et al.*, 1989) alors que le chlore est presqu'inefficace

à concentration usine envers ce protozoaire et ce même après 18 heures d'exposition (Peeters *et al.*, 1989). Korich *et al.* (1990) ont aussi trouvé une bonne réduction de l'infectivité des oocystes de *Cryptosporidium parvum*, soit de 0,5 à 0,9 log en 45 minutes lorsque la dose de  $\text{ClO}_2$  est de 1,3 mg/l. L'auteur a aussi montré l'inefficacité du chlore envers ce microorganisme.

### **1.7 Les Ct et le b oxyde de chlore**

Le Ct est un concept utilisé pour quantifier l'inactivation des microorganismes. Le Ct, tel que défini par le USEPA, est la concentration résiduelle du désinfectant, noté C, en mg/l, multipliée par le temps de contact, noté t, en minutes (Haas *et al.*, 1995). La résistance de différents microorganismes à un même désinfectant ou l'efficacité de divers désinfectants pour inactiver un microorganisme peuvent être comparés en comparant les Ct. Les différents modèles de Ct seront vus plus en détail dans la section 2.1.4 dans le chapitre de matériel et méthodes.

## **CHAPITRE II**

### **MATÉRIEL ET MÉTHODES**

Ce chapitre est divisé en deux parties soit: 1) la procédure générale; 2) les procédures détaillées. Dans la procédure générale, présentée à la section 2.1, le déroulement des travaux est expliqué. Les sections 2.2 à 2.4, décrivent en détail les méthodes utilisées.

#### **2.1 Procédure générale**

La procédure générale comporte quatre étapes: 1) la préparation de l'échantillon; 2) la désinfection; 3) le prélèvement des échantillons et la mesure du b oxyde de chlore résiduel et des spores de bactéries sporulantes aérobies (BSA); 4) le calcul des Ct. Les essais sont faits en duplicata, à température de la pièce. Les réacteurs utilisés sont des flacons ambrés de 247 à 268 ml. Ces flacons ont été utilisés par Morissette (1993) pour mesurer la demande en b oxyde de chlore. Un flacon différent doit être utilisé pour chaque temps de contact. En effet, lorsque le flacon est ouvert pour la prise de l'échantillon, il peut y avoir une perte importante de b oxyde de chlore par volatilisation.

### **2.1.1 Préparation des échantillons**

La préparation d'un échantillon comprend l'ajout d'une solution tampon à un litre d'eau MilliQ, la mesure du pH et l'ajustement de cette solution qui est ensuite autoclavée. Les essais sont effectués à trois pH différents soit, 6,5; 7,5 et 8,3. Des volumes de solution, de 247 à 268 ml, sont ensuite prélevés, mesurés à l'aide d'un cylindre gradué et placés dans les réacteurs. Il est important de ne pas laisser de col d'air dans les réacteurs à cause de la volatilité du bioxyde de chlore. Un certain volume d'une suspension de spores de bactéries sporulantes aérobies (BSA) est ensuite ajouté dans le réacteur. Ce volume dépend de la concentration de la suspension de spores de BSA et de la concentration de spores de BSA désirée dans le réacteur. Les réacteurs sont ensuite agités pour obtenir une dispersion homogène.

### **2.1.2 Désinfection**

L'ajout du bioxyde de chlore est effectué le plus rapidement possible après la préparation de l'échantillon. Le volume de la solution de bioxyde de chlore ajouté dépend de la concentration de la solution-mère, du volume du réacteur et de la concentration finale de ClO<sub>2</sub> désirée. Ces concentrations finales se situent entre 1,6 et 10,5 mg ClO<sub>2</sub> /l.

### **2.1.3 Prélèvement des échantillons**

La production des solutions-mères de spores de BSA est décrite à la section 2.3.2.

L'obtention de la solution-mère de bioxyde de chlore est décrite à la section 2.4.1.

Les temps de contact pour les essais les plus complets sont 0, 15, 30, 60, 75, 90, 120, 180, 240 et 480 minutes. Certains essais ont duré 24 heures soit, 1440 minutes. Pour la plupart des essais, les temps de contact sont de: 0, 30, 60, 90, 120 et 240 minutes. Ces temps de contact sont utilisés lorsqu'il est prévu que le ClO<sub>2</sub> aura peu d'effet dans les 15 premières minutes, et que 240 minutes seront suffisantes pour obtenir 3 log d'inactivation. Après chaque période de contact, des échantillons ayant des volumes variant de 53 à 65 ml sont prélevés dans chaque réacteur. Ces échantillons sont utilisés pour la mesure du ClO<sub>2</sub> résiduel. Une fois ces échantillons prélevés, du thiosulfate de sodium 10% est ajouté à raison de 0,1ml de thiosulfate pour 120 ml d'échantillon, afin d'arrêter la réaction de désinfection dans le réacteur. La suspension résultante est utilisée pour le dénombrement des spores de bactéries sporulantes aérobies (BSA).

### **2.1.4 Calcul des Ct**

La cinétique de désinfection obtenue à l'aide d'un oxydant devrait suivre la loi de Chick-

**Watson (1908):**

$$\ln N/N_0 = -k C^n t \quad (1.1).$$

où  $N$  = nombre de microorganismes mesuré,

$N_0$  = nombre de microorganismes initial,

$C$  = concentration de l'oxydant (mg/l),

$t$  = temps (minutes),

$k$  et  $n$  = constantes (Haas *et al.*, 1995).

Cette loi est valable s'il n'y a pas de consommation de désinfectant lors de l'essai (Haas *et al.*, 1995). C'est celle utilisée par Masschelein (1992) pour décrire la cinétique de désinfection obtenue par le bioxyde de chlore. Ce modèle est le plus simple à appliquer. D'autres modèles existent, tel que celui de Hom (1972) qui est une modification du modèle de Chick-Watson:

$$\ln N/N_0 = -k C^n t^m \quad (1.2).$$

où  $m$  = constante.

Ce modèle est utilisé pour décrire les cinétiques d'inactivation plus complexes (Haas *et al.*, 1995). Un autre modèle, le modèle rationnel, est utilisé pour décrire l'inactivation en tenant compte de la variation de la concentration du désinfectant (Haas *et al.*, 1995). Le modèle est:

$$\ln N/No = -(m/nk^*)^m k C^a (1 - \exp(-nk^* t/m))^m \quad (1.3).$$

Dans la présente étude, le modèle de Chick-Watson a été utilisé. Ceci est dû au fait que la majorité des points utilisés pour le calcul des Ct sont situés dans la partie droite de la courbe et une courbe moyenne pourrait facilement être faite. Les coefficients de corrélation des courbes de Ct sont élevés dans les deux cas, soit supérieur à 0,76 pour *B. subtilis* et 0,78 pour la souche d'origine environnementale. Il n'a pas été jugé nécessaire de changer de modèle pour la souche environnementale.

Pour les deux souches de BSA utilisées dans cette étude, la courbe d'inactivation suit les points obtenus expérimentalement (courbe "best fit"). Étant donné la présence d'un temps de réaction minimal non-négligeable, une courbe moyenne n'est pas recommandée. Une courbe de type "best fit" tient compte de ce temps de réaction.

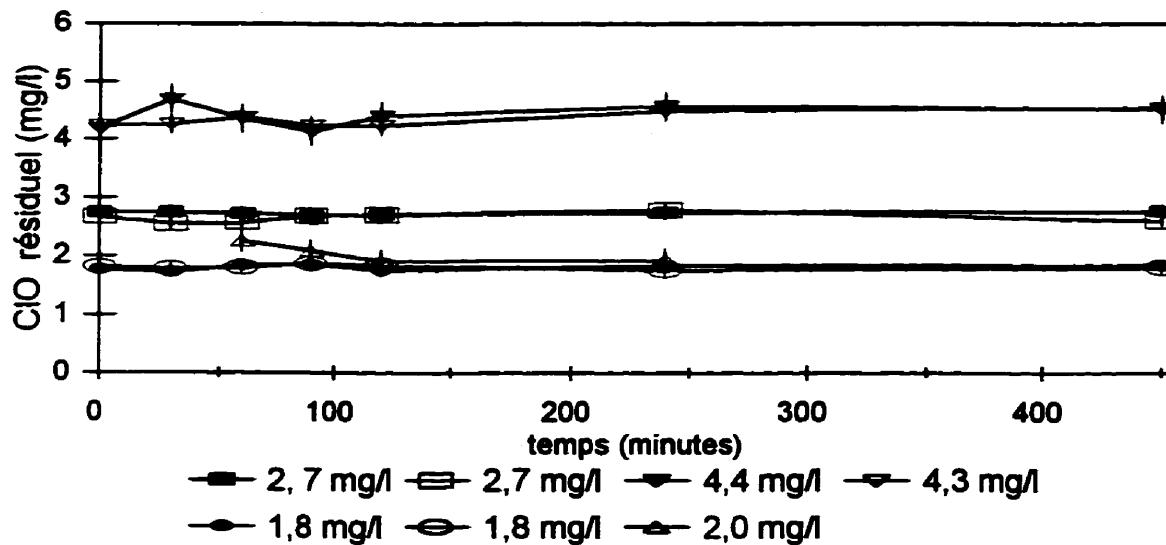
La loi de Chick-Watson,  $\ln (N/No) = -kC^a t$ , est applicable dans ce cas-ci parce qu'il n'y a pas de demande en oxydant lors des essais (Haas *et al.*, 1995), tel que montré à la figure 2.1. Les Ct sont calculés pour un enlèvement constant et à un pH constant.

Voici les étapes à suivre pour calculer un Ct:

1. Tracer les courbes d'abattement de  $\log N/N_0$  en fonction du temps à partir des résultats obtenus.
2. Choisir le modèle mathématique à utiliser en fonction de l'allure de ces courbes. Dans cette étude, le modèle de Chick-Watson est utilisé.
3. Tracer des droites horizontales à  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  et  $10^{-3}$ .
4. Tracer des droites verticales à l'interception de la courbe expérimentale et des droites horizontales.
5. Lire le temps. Ceci donne une paire de valeurs ( $C$ ,  $t$ ) où  $C$  est la concentration initiale, moyenne ou finale. Cette concentration doit être précisée. Pour les besoins de cette étude,  $C$  sera la concentration moyenne de l'essai.
6. Refaire les étapes 3 à 5 pour toutes les courbes d'abattement provenant des mêmes conditions (type d'eau, pH, température, souche...)
7. Utiliser les paires de valeurs pour un même enlèvement (1, 2 ou 3 log) et faire une régression de  $\log t$  en fonction de  $\log C$ . Ceci devrait donner une droite de formule  $\log t = (-n) * (\log C) + (\log b)$ . Dans cette étude, les régressions sont calculées à l'aide du logiciel QuattroPro 8.0 de Corel.
8. Refaire les étapes 3 à 7 en utilisant les autres groupes de résultats.

La concentration moyenne du réplicat peut être utilisée parce qu'il n'y a pas de consommation significative de  $\text{ClO}_2$  lors de l'essai (figure 2.1). La désinfection au  $\text{ClO}_2$  ne

requiert que peu de  $\text{ClO}_2$  de plus qu'il n'en faut pour combler la demande en oxydant du milieu (Latshaw, 1994).



**Figure 2.1:** Évolution du  $\text{ClO}_2$  résiduel dans le temps, pour *B. subtilis* à pH 6,5.

## 2.2 Préparation du matériel

### 2.2.1 Verrerie

Les flacons utilisés comme réacteur sont d'abord lavés avec du savon Neodisher A-8, puis rincés une fois à l'eau du robinet et deux fois à l'eau déminéralisée. Les flacons sont ensuite mis en contact avec une solution concentrée de  $\text{ClO}_2$  pendant 24 heures. Cela permet de satisfaire la demande en oxydant du verre (Morissette, 1993). La solution est récupérée et

les flacons sont rincés trois fois avec de l'eau déminéralisée et trois fois avec de l'eau MilliQ. Les flacons sont ensuite passés à l'autoclave (Market Forge Sterilmatic) pendant 15 minutes à 121 °C. Ils sont finalement remplis d'une solution tamponnée stérile, mesurée à l'aide d'un cylindre gradué, en conditions aseptiques. Les volumes d'échantillon variant de 247 à 268 ml sont notés et les fioles sont marquées.

Les bouchons sont mis à tremper pendant quelques heures dans de l'eau chaude et savonneuse puis, ils sont rincés à l'eau du robinet. Par la suite, ils sont rincés trois fois avec de l'eau déminéralisée et trois fois avec de l'eau MilliQ. Ils sont mis à sécher inversés sur un papier d'aluminium propre (Morissette, 1993). Ils sont stérilisés aux UV juste avant leur utilisation.

Les cellules du spectrophotomètre (5 cm) sont rincées avec de l'eau du robinet, trois fois avec de l'eau déminéralisée et avec de l'eau MilliQ. Ces cellules sont finalement rincées au méthanol et séchées sous pression d'air propre (Morissette, 1993). Ce lavage est fait à la fin de chaque journée d'essai. Les cellules sont rincées trois fois avec de l'eau déminéralisée et avec de l'eau MilliQ entre chaque mesure.

### 2.2.2 Solutions

De l'eau tamponnée est utilisée pour les différents essais. Les trois tampons sont tous des

tampons phosphates. Les solutions mères ont toutes une force ionique de 1,8 mol/L. Les solutions sont composées de différentes quantités de phosphate de sodium monobasique et de phosphate de potassium dibasique. Les quantités utilisées pour chaque tampon sont présentées au tableau 2.1. Pour un litre d'eau tamponnée, 1000 ml d'eau ultra-pure et 10 ml de solution mère du tampon pour le pH désiré sont utilisés. Le pH est ajusté avec du NaOH 0,1 N et la force ionique finale est d'environ 0,018 mol/l.

**Tableau 2.1 : Quantité de produits utilisés pour fabriquer les tampons à différents pH.**

	pH 6,8	pH 7,5	pH 8,3
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	35,78 g/l	74,81 g/l	84,04 g/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	142,87 g/l	29,87 g/l	3,36 g/l

### 2.2.3 Préparation de l'ACVK

La solution d'ACVK est faite à partir d'Alizarin violet 3R 6408-63-5 (C.I. 61710)(Aldrich) ayant une masse moléculaire de 622,59 g/mole. Voici les étapes de fabrication :

\* ajouter 62,259 mg d'Alizarin violet dans un ballon de 500 ml contenant un peu d'eau

MilliQ;

\* ajouter 10,0 mg d'hexamétaphosphate de sodium ;

\* ajouter 24,25 g de chlorure d'ammonium grade analytique ;

- \* ajouter 3,2 ml d'une solution d'ammoniaque à 28% en NH<sub>3</sub> ;
- \* compléter à 500 ml avec de l'eau MilliQ ;
- \* agiter à la noirceur pendant une nuit ;
- \* transvider la solution dans une bouteille opaque en verre ;
- \* laisser reposer la solution 24 heures au réfrigérateur et à l'obscurité.

(Masschelein *et al.*, 1989, Morissette, 1993)

Une dilution 1:10 de la solution devrait avoir une absorbance de 0,136 cm<sup>-1</sup> à 548 nm et un pH entre 8,1 et 8,5. La stabilité de la solution est d'environ un mois (Masschelein *et al.*, 1989). Le pH est maintenu à l'aide de chlorure d'ammonium et d'ammoniaque (tampon NH<sub>4</sub><sup>+</sup> - NH<sub>3</sub>), ce qui élimine l'interférence du chlore. L'hexamétaphosphate de sodium est ajouté pour éviter la précipitation des réactifs (Morissette, 1993).

## 2.3 Bactéries sporulantes aérobies (BSA)

### 2.3.1 Préparation du milieu de culture

Un milieu de culture modifié est utilisé pour la culture bactérienne, soit du Trypticase Soy Broth (TSB) (4311768,BBL) additionné de 2,3,5- Triphenyl Tetrazolium Chloride (TTC) (T-413, Aldrich). La solution de TTC est préparée en ajoutant 0,3 g de TTC à 10 ml d'eau

MilliQ. La solution est ensuite filtrée et conservée à 5°C. Un ml de cette solution est ajouté dans chaque 300 ml de milieu préalablement autoclavé. Les bactéries absorbent et métabolisent le TTC et les colonies deviennent rouge. Ceci facilite le comptage des colonies.

### 2.3.2 Préparation des cultures bactériennes

Des essais ont été prévus pour une souche de référence et une souche environnementale. La souche de référence est *Bacillus subtilis* (ATCC 6633, Difco). La souche environnementale a été isolée d'un échantillon d'eau brute de la station Ste-Rose (Ville de Laval). L'échantillon de l'usine Ste-Rose a été dilué (1:5) puis filtré sur un filtre de 0,45 µm. Le filtre a été incubé sur un tampon imprégné de TSB, le tout en duplicata. Les pétris ont été pasteurisés 15 minutes à 75°C avant d'être incubés. La souche a été repiquée sur un milieu solide (Trypticase Soy Agar, TSA, 0369-01-4, Difco) pour la purifier. Après la purification, les deux souches ont été repiquées sur du R2A(1826-17-1, Difco). L'incubation s'est faite à 35°C pour une durée de 14 à 21 jours. Les cultures sont vérifiées au microscope pour s'assurer d'un bon taux de sporulation ( $\geq 95\%$ ). Les géloses sont rincées à l'eau tamponnée de microbiologie (pH 7, APHA *et al.*, 1992). L'eau de rinçage est centrifugée (centrifugeuse Beckman J2-HS) et lavée trois fois. Les tubes sont ensuite pasteurisés 15 minutes à 75°C pour s'assurer que toutes les bactéries viables soient sous formes de spores. La concentration de bactéries sporulantes aérobies (BSA) dans chaque tube est obtenue par dilution et filtration

(voir section 2.3.3).

### **2.3.3 Mesure des BSA**

L'échantillon d'eau est filtré sur une membrane 0,45 µm qui est par la suite placée sur un tampon imbibé de 1,5 ml de TSB dans une boîte de pétri. Les pétris sont placés dans deux sacs étanches, un dans l'autre, dans lesquels le vide est fait avant de les fermer. Les sacs sont submersés dans un bain-marie à 75°C pendant 15 minutes. Les boîtes de pétri sont ensuite incubés à 35°C pendant 18 et 24 heures (Barbeau *et al.*, 1997). Les comptes utilisés pour les courbes d'inactivation doivent être entre 20 et 200 UFC/ml. Dans cette étude, la méthode a permis d'aller chercher des résultats utilisables aussi faible que 15 UFC/ 100 ml. Des résultats bruts sont présentés à l'annexe IX. La méthode de mesure des BSA ressemble beaucoup à la méthode de compte par filtration (APHA *et al.*, 1992). L'erreur entre les duplicata des courbes d'abattement est d'au plus 10%.

## **2.4 Bioxyde de chlore**

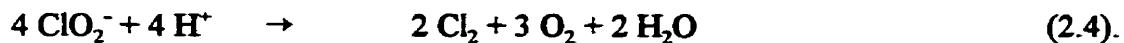
### **2.4.1 Préparation du ClO<sub>2</sub>**

La solution-mère de bioxyde de chlore (ClO<sub>2</sub>) est fabriquée à l'aide du montage présenté à la

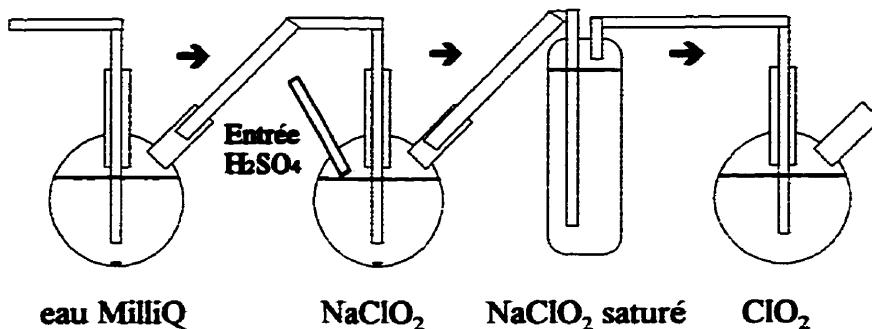
figure 2.2 (APHA *et al.*, 1992). La première fiole est remplie avec environ 300 ml d'eau MilliQ. Elle a pour fonction de débarrasser l'air de ses impuretés. La deuxième fiole est le réacteur qui contient environ 800 ml d'une solution de chlorite de sodium ( $\text{NaClO}_2$ , 56g/l). Le bioxyde de chlore est formé par une réaction entre le  $\text{NaClO}_2$  et l'acide sulfurique ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) (Doré, 1989):



La production du bioxyde de chlore peut être accompagnée des réactions suivantes :



Le bioxyde de chlore formé passe ensuite dans une solution saturée de  $\text{NaClO}_2$  (550g/l) dans le but de débarrasser des traces de chlore qui aurait pu être formé pendant la réaction. Le  $\text{ClO}_2$  ainsi purifié est récupéré dans la dernière fiole qui contient environ un litre d'eau MilliQ (Morissette, 1993).



**Figure 2.2:** Montage pour la production du ClO<sub>2</sub>.

L'acide sulfurique utilisé est dilué à 50%. Son addition à la solution de NaClO<sub>2</sub> se fait à raison de 5 ml aux 5 minutes, pour un ajout total de 20 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Après le dernier ajout, on laisse barbotter pendant environ une heure (Morissette, 1993). Il est préférable de vérifier la concentration de la solution finale à partir de 30 minutes après le dernier ajout d'acide. Ceci permet d'éviter des pertes de bioxyde de chlore par un barbottage excessif. Cette procédure permet d'obtenir une solution-mère avec une concentration se situant entre 1,5 et 3,0 g/l de ClO<sub>2</sub> et un pH d'environ 4. Des mesures de sécurité doivent être prises lors des manipulations (Morissette, 1993): le montage doit être placé sous une hotte; tous les joints du montage doivent être étanches; le port de lunettes de sécurité et de gants sont obligatoires.

#### 2.4.2 Mesure du ClO<sub>2</sub>

Deux méthodes ont été utilisées pour mesurer la concentration de ClO<sub>2</sub>, une première pour

doser la solution mère (UV) et une seconde pour mesurer le ClO<sub>2</sub> résiduel lors des essais lorsque la concentration de départ ne dépasse pas 5 mg/l (ACVK). Le spectrophotomètre utilisé dans les deux cas est un Spectronic 1001 plus de Milton Roy.

Pour la mesure par UV, la solution mère est diluée à raison de 1:100 et l'absorbance est ensuite mesurée à 360 nm. L'équation pour obtenir la concentration en mg/l de ClO<sub>2</sub> est la suivante :

$$C = [(A_{UV} / L_c) + 0,00154] * 5779,34 \quad (2.5)$$

où      C = concentration ClO<sub>2</sub> (mg/l),

A<sub>UV</sub> = absorbance UV mesurée à 360 nm (cm<sup>-1</sup>),

L<sub>c</sub> = longueur de la cellule (cm).

La courbe de calibration est présentée à l'annexe I. Cette courbe a été obtenue en utilisant de solutions dont les concentrations ont été mesurées à l'aide de la méthode iodométrique (APHA *et al.*, 1992, Ben Amor, 1988).

La méthode à l'ACVK est utilisée pour mesurer les concentrations résiduelles ClO<sub>2</sub>. Une faible quantité d'ACVK est ajoutée dans l'échantillon soit 0,05 ml ACVK/ml échantillon. Cette quantité permet de maintenir un rapport molaire ACVK/ClO<sub>2</sub> entre 1,5 et 2 pour des

concentrations de 0 à 0,5 mg/l de ClO<sub>2</sub> (Morissette, 1993). La linéarité de la courbe de calibration de l'ACVK a été vérifiée entre 0 et 1 mg/l de ClO<sub>2</sub>.

Le volume d'échantillon utilisé est de 15 ml, ce qui permet l'utilisation de cellules de 5 cm de longueur optique. Dans une éprouvette contenant 0,75 ml de la solution d'ACVK, 15 ml d'échantillon est ajouté à l'aide d'une pipette. Pour éviter la perte de ClO<sub>2</sub> à l'atmosphère, la pointe de la pipette est placée dans l'ACVK. Si la concentration de ClO<sub>2</sub> est supérieure à 1 mg/l, une dilution est faite dans l'éprouvette en ajoutant un volume d'eau de dilution (x) à l'ACVK avant d'ajouter le volume de l'échantillon (15-x). L'eau de dilution utilisée est la même eau tamponnée qui a été utilisée lors de l'essai. Un témoin est fait, i.e., le ClO<sub>2</sub> de l'échantillon est neutralisé avec un excès de bisulfite de sodium (environ 20 mg NaSO<sub>3</sub> pour 50 ml d'échantillon) (Morissette, 1993). Le témoin est agité pendant une minute et est laissé au repos pendant 5 minutes. La même dilution est appliquée au témoin et à l'échantillon. La méthode de prélèvement se résume ainsi :

1. prélèvement de 3 à 15 ml de l'échantillon pour la mesure du ClO<sub>2</sub> résiduel (ce volume est immédiatement versé dans l'éprouvette contenant l'ACVK et l'eau de dilution) ;
2. prélèvement de 50 ml d'échantillon dans lesquels 20 mg de NaSO<sub>3</sub> sont ajoutés ;
3. ajout de thiosulfate de sodium pour neutraliser le ClO<sub>2</sub> et prélèvement d'un échantillon qui sera utilisé pour mesurer les BSA.

La concentration de ClO<sub>2</sub> résiduel est calculée à l'aide de l'équation suivante :

$$C = \frac{FC * (AMB - AE) - OR}{PCC} \quad (2.6)$$

PCC

où      C = concentration de ClO<sub>2</sub> (mg/l)

FC = facteur de dilution,

AMB = absorbance moyenne des blancs (cm<sup>-1</sup>) à 548 nm,

AE = absorbance de l'échantillon (cm<sup>-1</sup>) à 548 nm,

OR = ordonnée à l'origine (0,00027),

PCC = pente de la courbe de calibration (0,207927).

La courbe de calibration pour la méthode à l'ACVK est présentée à l'annexe II. L'absorbance est mesurée à 548 nm et les solutions sont stables pour 30 minutes. Les facteurs de dilution sont toujours inférieurs ou égale à 5. Des facteurs de dilution supérieurs à cinq entraînent une trop grande erreur sur le calcul de la concentration (Morissette, 1993).

## CHAPITRE III

### RÉSULTATS

Les expériences sont effectuées sur deux souches de bactéries sporulantes: *Bacillus subtilis* et une souche environnementale isolée de l'eau brute de l'usine Sainte-Rose, Ville de Laval. Tous les essais sont réalisés à la température de la pièce, soit environ 20°C. L'effet du pH est évalué en réalisant des essais successifs aux pH 6,5, 7,5 et 8,3. Les sections 3.1 et 3.2 traitent respectivement des résultats de la souche de *B. subtilis* et de la souche environnementale. Les Ct de ces deux souches sont présentés dans la section 3.3.

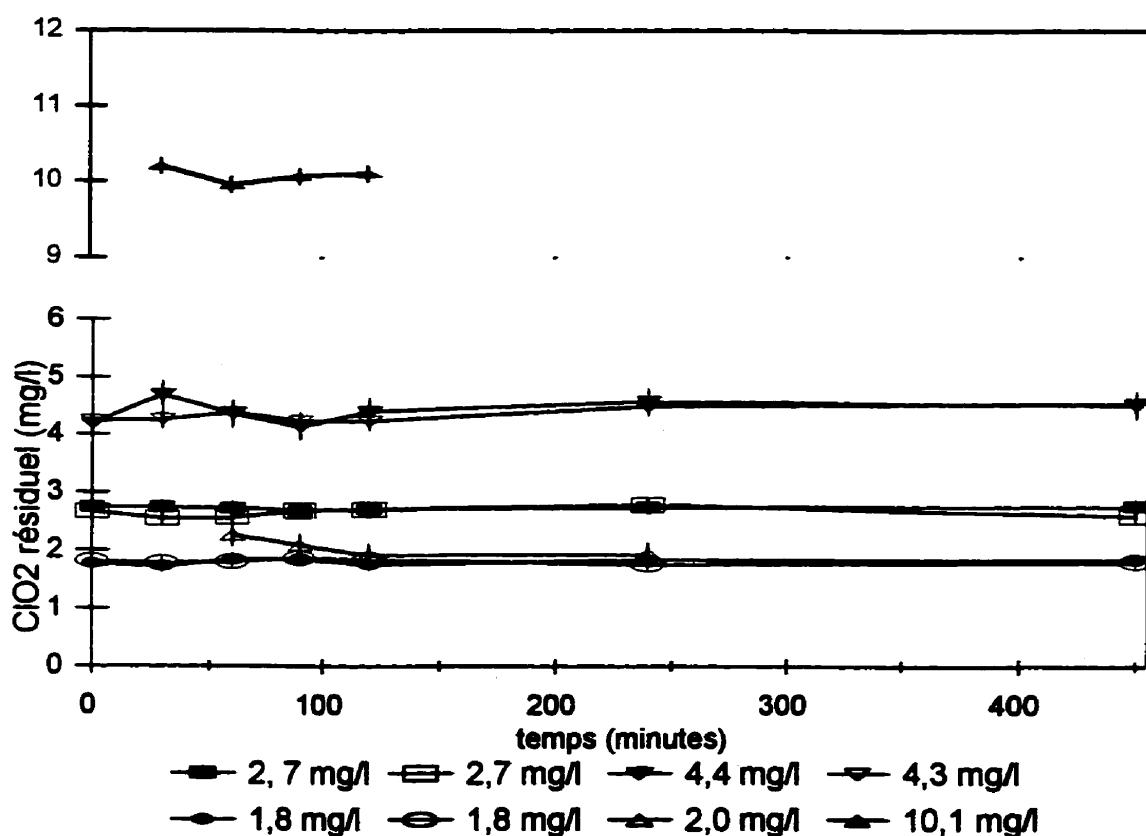
#### **3.1 Effets du bioxyde de chlore sur *Bacillus subtilis* (ATCC 6633)**

La section 3.1 est divisée en deux parties. Dans la première partie, les résultats qui ont trait aux concentrations de bioxyde de chlore utilisées sont présentés. Dans la seconde, les résultats relatifs à l'abattement de la souche de *B. subtilis* sont présentés.

##### **3.1.1 Concentrations résiduelles de bioxyde de chlore**

La figure 3.1 présente l'évolution du bioxyde de chlore résiduel dans de l'eau MilliQ

tamponnée à pH 6,5, à la température de la pièce (~20°C), en présence d'environ  $10^{4,5}$  UFC (unité formant colonie)/ml de *B. subtilis* ou  $3,2 \times 10^4$ . Dans la légende, la concentration moyenne de ClO<sub>2</sub> de l'essai est présentée. À 0,2 mg/l près pour *B. subtilis* et à 0,4 mg/l près pour la souche d'origine environnementale, soit les écarts-types maximaux, la concentration de ClO<sub>2</sub> demeure constante dans le temps. Pour des concentrations allant de 1,8 à 10,1 mg/l, les résultats des essais effectués en duplicita sont très reproductibles. Cette reproductibilité est aussi observée pour les autres pH. L'écart-type a été calculé pour chaque courbe, il



**Figure 3.1:** Évolution du ClO<sub>2</sub> résiduel dans le temps à pH 6,5, pour *B. subtilis*.

oscille entre 0,04 et 0,2 mg/l. Les barres d'erreur sur la plupart des graphiques sont masquées par les symboles de la légende.

Pour les pH 7,5 et 8,3, une stabilité semblable du ClO<sub>2</sub> dans le temps est observée. Les graphiques des concentrations de ClO<sub>2</sub> pour ces deux pH sont présentés dans l'annexe III. Pour le pH 7,5, l'écart-type varie entre 0,03 et 0,2 mg/l alors que pour le pH 8,3, il varie de 0,07 à 0,3 mg/l.

Le tableau 3.1 présente les écarts-types pour les essais effectués avec *B. subtilis*. Aucune valeur a été rejetée. Les concentrations moyennes et les écart-types sont calculés pour chaque essai. Un essai comprend de 4 à 8 valeurs de ClO<sub>2</sub> résiduel. Les concentrations mesurées diffèrent des concentrations visées. Par exemple, lorsque 5 mg/l de ClO<sub>2</sub> est visé une concentration de 4,2 mg/l est obtenue. Cette perte est différente à chaque essai bien qu'elle soit du même ordre de grandeur. Elle se situe entre 0 et 18 % (annexe IV). Pour les concentrations de 5 mg/l et moins, une perte de ClO<sub>2</sub> lors de l'ajout est noté mais, par la suite les concentrations de ClO<sub>2</sub> demeurent stables. Pour les concentrations de 10 mg/l, des pertes initiales ne sont pas observées et les concentrations n'ont presque pas varié dans le temps. Ces différences sont dues au fait qu'il s'écoule du temps entre la mesure de la concentration de la solution-mère de ClO<sub>2</sub> et l'injection de la solution de ClO<sub>2</sub> dans les réacteurs, soit le temps de faire les calculs de la quantité de solution de ClO<sub>2</sub> à ajouter à chaque réacteur.

**Tableau 3.1:** Écarts-types et concentrations résiduelles moyennes de ClO<sub>2</sub> en contact avec *B. subtilis*.

Concentration moyenne [ClO <sub>2</sub> ] (mg/l) pH 6,5	Écart- type (mg/l)	[ClO <sub>2</sub> ] (mg/l) pH	Écart- type (mg/l)	[ClO <sub>2</sub> ] (mg/l) pH	Écart- type (mg/l)
2,7	0,06	4,2	0,03	4,3	0,2
2,7	0,07	4,2	0,08	4,2	0,1
4,4	0,20	2,6	0,1	2,6	0,1
4,3	0,10	2,6	0,07	2,6	0,09
1,8	0,05	1,7	0,04	1,8	0,3
1,8	0,04	1,7	0,07	1,8	0,1
2,0	0,20	4,1	0,2	1,9	0,2
10,1	0,09	4,6	0,04	2,8	0,1
				10,2	0,07

### 3.1.2 Abattement de *B. subtilis*

Les figures 3.2, 3.3 et 3.4 présentent les courbes d'inactivation de *B. subtilis* en fonction du temps, à trois pH différents et pour des doses variables de ClO<sub>2</sub>. Les essais ont été faits en duplicita et montrent une bonne reproductibilité au niveau des tendances d'abattement. Une différence d'abattement entre les duplicita de concentration moyenne semblable est aussi

observée et ce à tout les temps de contact, mais ces duplicita montrent tous la même tendance. Pour le pH 6,5 (figure 3.2), la différence d'abattement entre les groupes de concentrations différentes se situe dans les premières 120 minutes sauf dans le cas de 10,1 mg/l. À cette concentration, l'abattement est très rapide dès les premières minutes. Pour les autres concentrations, c'est à partir de 120 minutes qu'une baisse linéaire est observée (logarithme du nombre de microorganismes en fonction du temps). Les temps requis pour observer des baisses de 2 ou 3 logs diminuent lorsque la concentration résiduelle de ClO<sub>2</sub> passe de 2,0 mg/l à 4,4 mg/l. Par contre, une concentration résiduelle de 2,7 mg/l ne semble pas plus efficace qu'un concentration de 2,0 mg/l.

Les courbes d'abattement pour le pH 7,5 sont présentées à la figure 3.3. Dans les premières 120 minutes de l'essai, un plateau est observé. Par la suite, la baisse du nombre de microorganismes est beaucoup plus rapide. Il y a peu de différence d'abattement entre les différentes concentrations pour le premier log d'inactivation mais il y a une différence importante pour le deuxième et troisième log. Par exemple, pour 2 log d'abattement, 190 minutes sont nécessaires à 2,6 mg/l alors qu'à 4,2 mg/l, 130 minutes sont requises.

Les courbes d'abattements pour le pH 8,3 sont représentées à la figure 3.4. L'absence quasi-totale d'un plateau est observée. Dans leur ensemble, les courbes d'abattement sont plus linéaires que celles obtenues aux pH 6,5 et 7,5. Les courbes montrent une inactivation

plus rapide à un pH de 8,3.

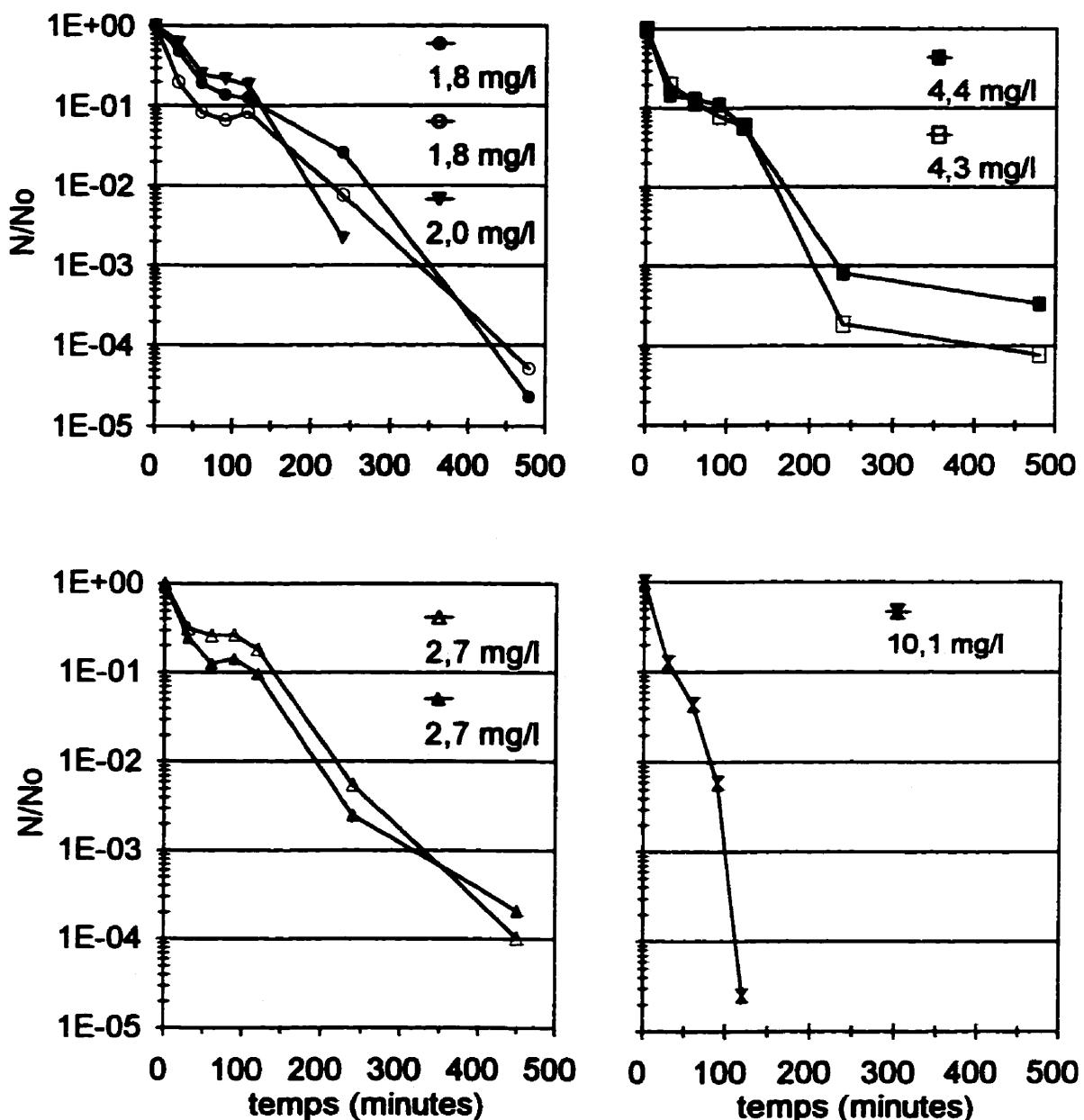
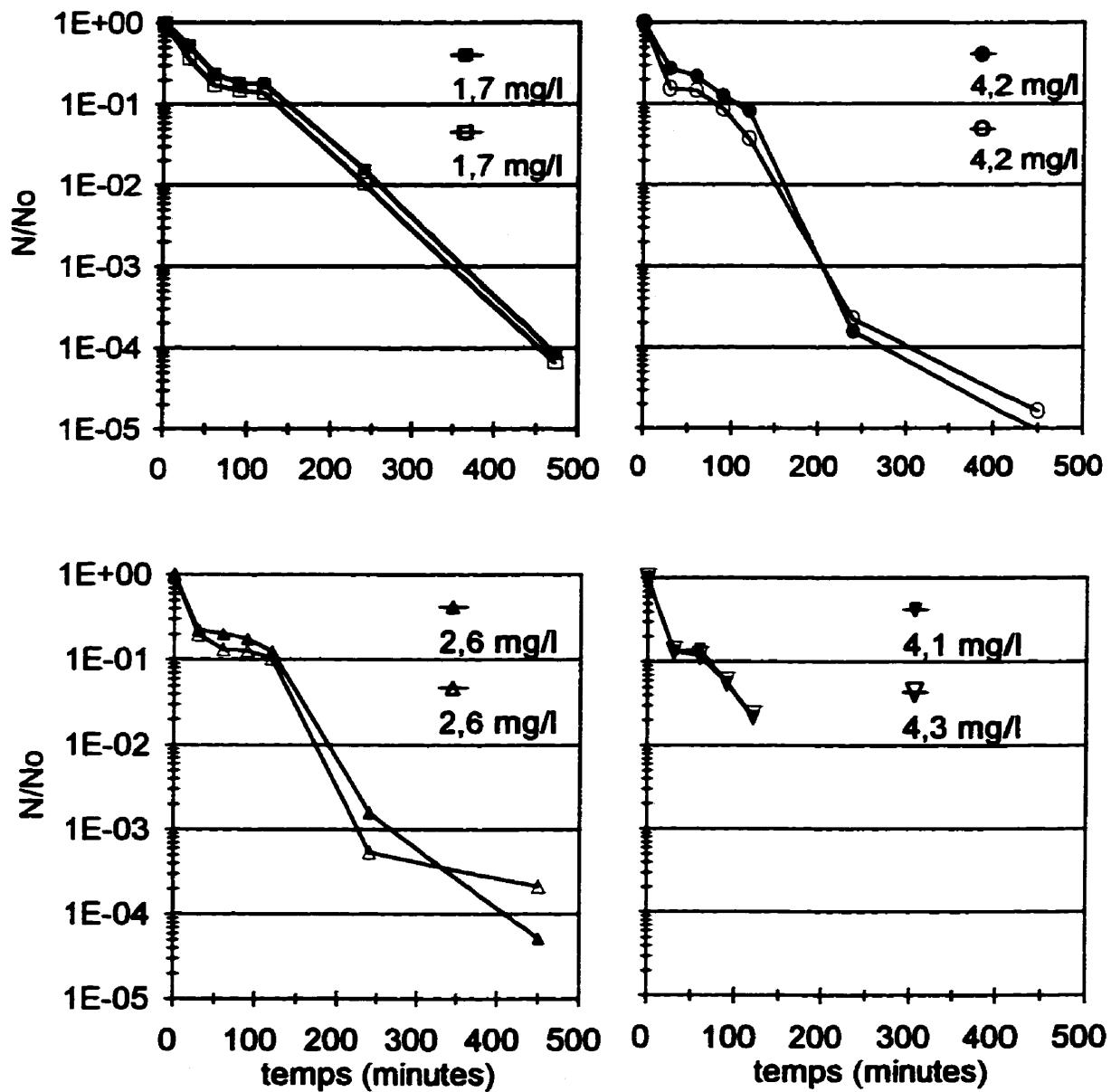


Figure 3.2: Courbes d'abattement de *B. subtilis* à pH 6,5.



**Figure 3.3:** Courbes d'abattement de *B. subtilis* à pH 7,5.

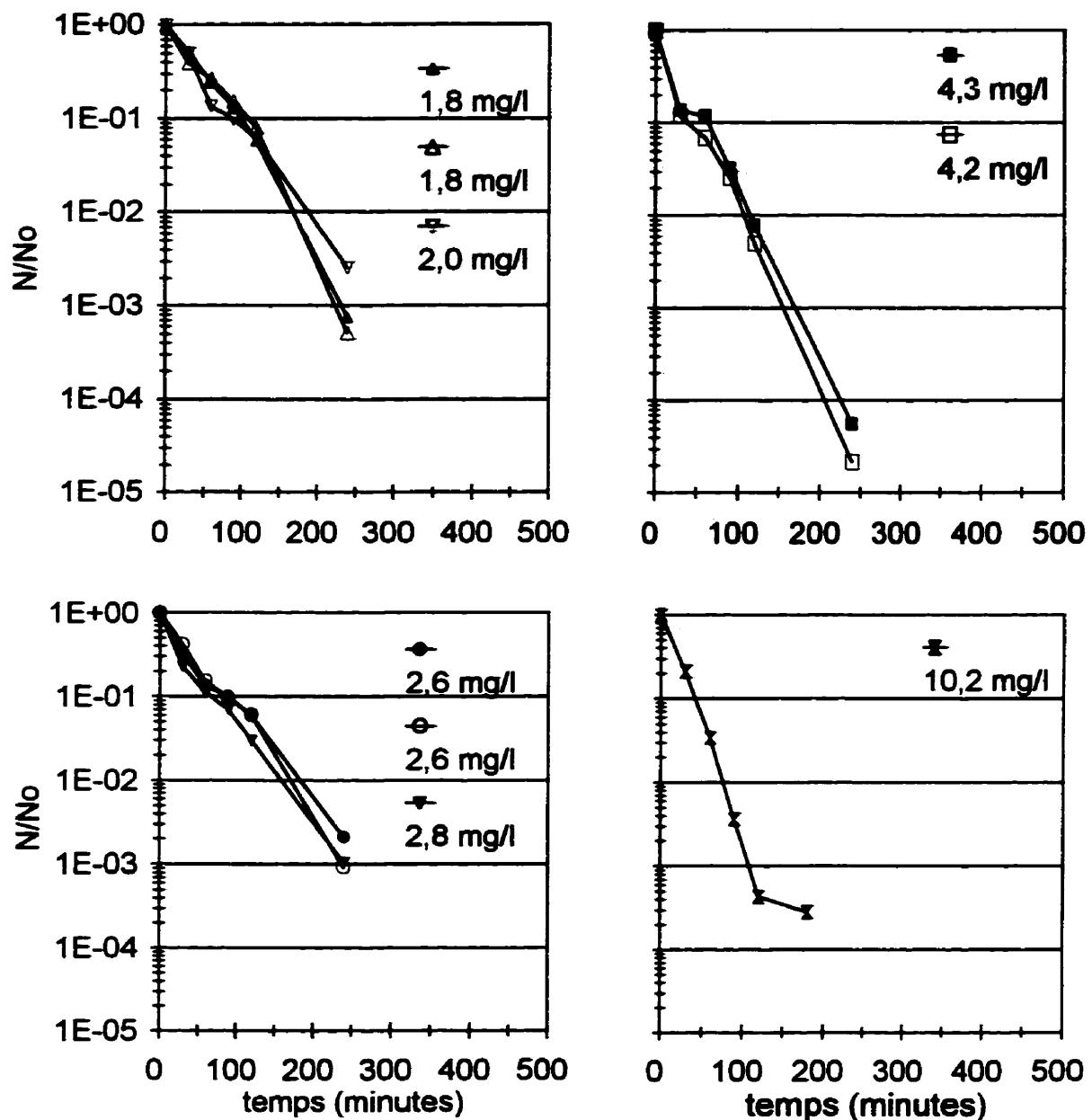


Figure 3.4: Courbes d'abattement de *B. subtilis* à pH 8,3.

### **3.2 Effets du bioxyde de chlore sur une souche environnementale**

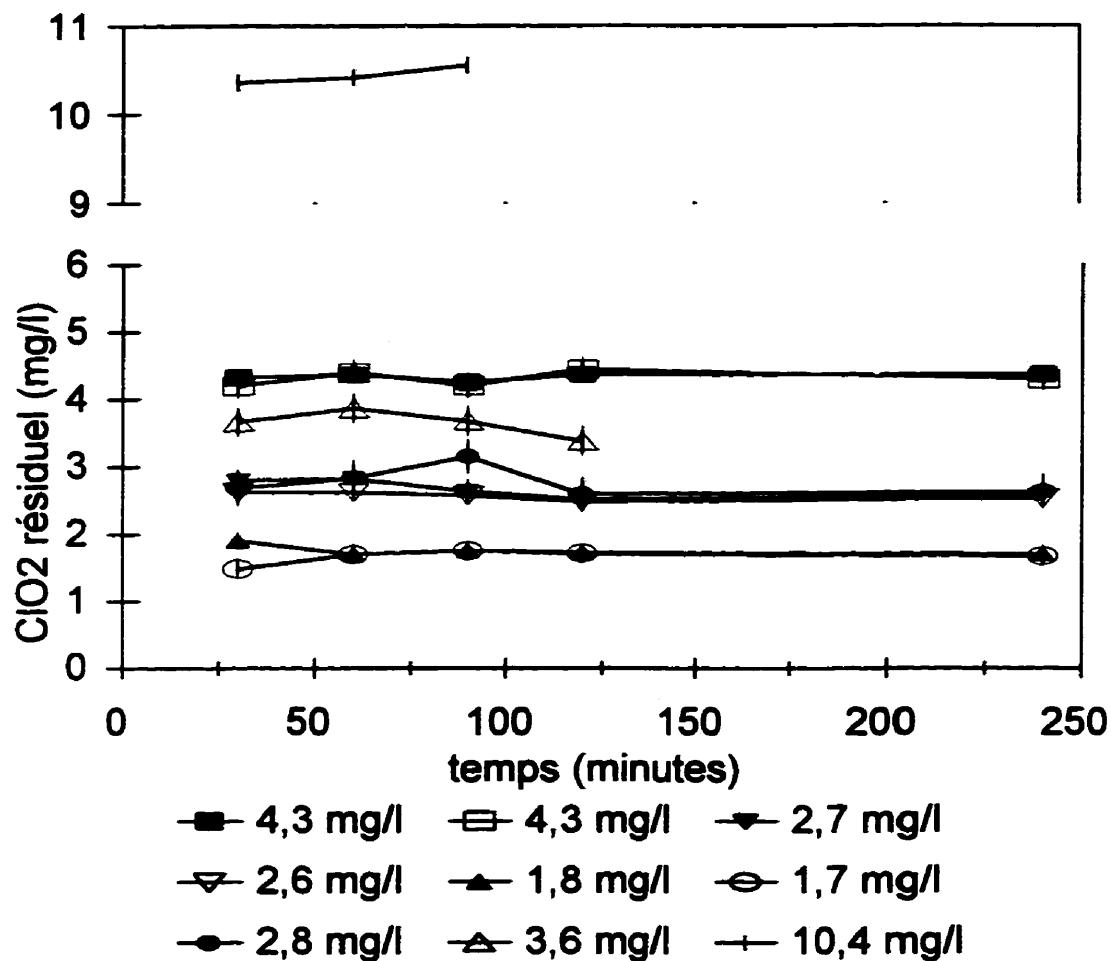
La section 3.2 est divisée en deux parties. Dans la première, les résultats qui ont trait aux concentrations de bioxyde de chlore utilisées sont présentés. La seconde partie traite des résultats de l'inactivation de la souche environnementale.

#### **3.2.1 Concentrations résiduelles de bioxyde de chlore**

La figure 3.5 présente les mesures de ClO<sub>2</sub> résiduel dans de l'eau MilliQ tamponnée contenant environ 10<sup>4,5</sup> UFC/ml de la souche environnementale, à un pH de 6,5, à la température de la pièce (~20°C). Comme pour les essais de *B. subtilis*, les concentrations résiduelles de ClO<sub>2</sub> ne varient pas dans le temps. La reproductibilité entre les duplicata demeure bonne pour des concentrations de ClO<sub>2</sub> variant de 1,7 à 10,4 mg/l, tel que montré par les courbes du graphique. Les écart-types pour le pH 6,5 varient de 0,05 à 0,2 mg/l. Les barres d'erreur sur la plupart des graphiques sont masquées par les symboles de la légende.

Les graphiques pour les pH 7,5 et 8,3 indiquent une stabilité semblable. Les évolutions des concentrations de ClO<sub>2</sub> dans des eaux ayant des pH de 7,5 et 8,3 sont présentées à l'annexe V. Pour le pH 7,5, les écart-types varient de 0,02 à 0,1 mg/l. Pour le pH 8,3, ils oscillent

entre 0,05 et 0,4 mg/l.



**Figure 3.5:** Évolution du  $\text{ClO}_2$  résiduel dans le temps à pH 6,5, pour la souche environnementale.

Les écarts-types pour tous les essais effectués avec la souche environnementale sont

présentés au tableau 3.2. La concentration de ClO<sub>2</sub> moyenne indiquée est celle d'un essai. Chacun de ces essais comprend de 3 à 5 mesures. Aucune valeur n'a été rejetée lors des calculs de la moyenne et de l'écart-type.

Dans le cas des essais avec la souche environnementale, les concentrations mesurées diffèrent aussi des concentrations cibles. Par exemple, lorsque 5 mg/l est visé, 4,1 mg/l est obtenu, soit une différence de 0,9 mg/l. Cette différence varie d'un essai à l'autre. Elle est cependant du même ordre de grandeur, soit de 4 à 18%. Ces différences sont présentées pour chaque essai et pour chaque pH dans l'annexe VI. Pour les concentrations de 5 mg/l et moins, une perte de ClO<sub>2</sub> est notée lors de l'ajout pour les mêmes raisons que pour la souche de *B. subtilis*. Pour les concentrations de 10 mg/l, il y a 0,4 mg/l de différence entre les valeurs cibles et mesurées. Par la suite, la concentration mesurée demeure stable dans le temps.

**Tableau 3.2 : Écart-types et concentrations résiduelles moyennes de ClO<sub>2</sub> en contact avec la souche environnementale, à différents pH.**

Concentration moyenne [ClO <sub>2</sub> ] (mg/l)	Écart- type (mg/l)	[ClO <sub>2</sub> ] pH	Écart- type (mg/l)	[ClO <sub>2</sub> ] pH	Écart- type (mg/l)
pH 6,5		7,5		8,3	
4,3	0,05	1,7	0,1	1,9	0,3
4,3	0,1	1,7	0,06	1,7	0,05
2,7	0,1	2,5	0,02	2,4	0,1
2,6	0,05	2,5	0,08	2,5	0,1
1,8	0,08	4,3	0,04	4,4	0,4
1,7	0,09	4,3	0,1	4,1	0,1
2,8	0,2			2,6	0,2
3,6	0,2			3,5	0,3
10,4	0,07			10,4	0,1

### 3.2.2 Abattement de la souche environnementale

Les figures 3.6, 3.7 et 3.8 présentent les courbes d'inactivation de la souche environnementale en fonction du temps, à trois pH différents et pour des doses variables de ClO<sub>2</sub>. Les essais ont été faits en duplicata et montrent une bonne reproductibilité au niveau

des tendances d'abattement. Sur la figure 3.6, les courbes d'inactivation pour la souche environnementale sont présentées, pour le pH 6,5. L'absence d'un pseudo-plateau est observé sauf pour 1,7 mg/l et 1,8 mg/l où il y a un plateau de 60 à 120 minutes. Une inactivation rapide est remarquée dans tous les essais. Une différence entre les abattements des essais à concentration de ClO<sub>2</sub> semblable est observée mais la tendance d'abattement demeure la même. Les mêmes observations sont faites pour les autres pH. Après 60 minutes, un ralentissement de l'inactivation est remarqué pour les concentrations de 1,7 mg/l à 3,6 mg/l. À 4,3 mg/l de ClO<sub>2</sub> ou plus, le ralentissement se situe après 120 minutes. Ce plateau en fin de courbe peut être dû à un manque de bactéries à la fin de ces essais. Le nombre de bactéries ajouté au début de tous les essais est de 10<sup>4,5</sup> bactéries/ml mais, il est courant avec la souche environnementale de n'obtenir que 10<sup>3,5</sup> à 10<sup>4</sup> bactéries/ml. Ceci expliquerait l'épuisement observé. Une valeur aberrante est observée à 4,3 mg/l mais, elle n'a pas d'effet sur le calcul des Ct puisqu'elle se situe après la ligne de 3 log d'abattement.

Les courbes d'inactivation de la souche environnementale sont présentées pour le pH 7,5 à la figure 3.7. Aucun plateau n'est observé. Les courbes obtenues avec 1,7 mg/l de ClO<sub>2</sub> sont plutôt linéaires par rapport aux autres courbes. Un ralentissement de l'inactivation est observé à 120 minutes pour la concentration de 2,5 mg/l et à 90 minutes pour la concentration de 4,3 mg/l.

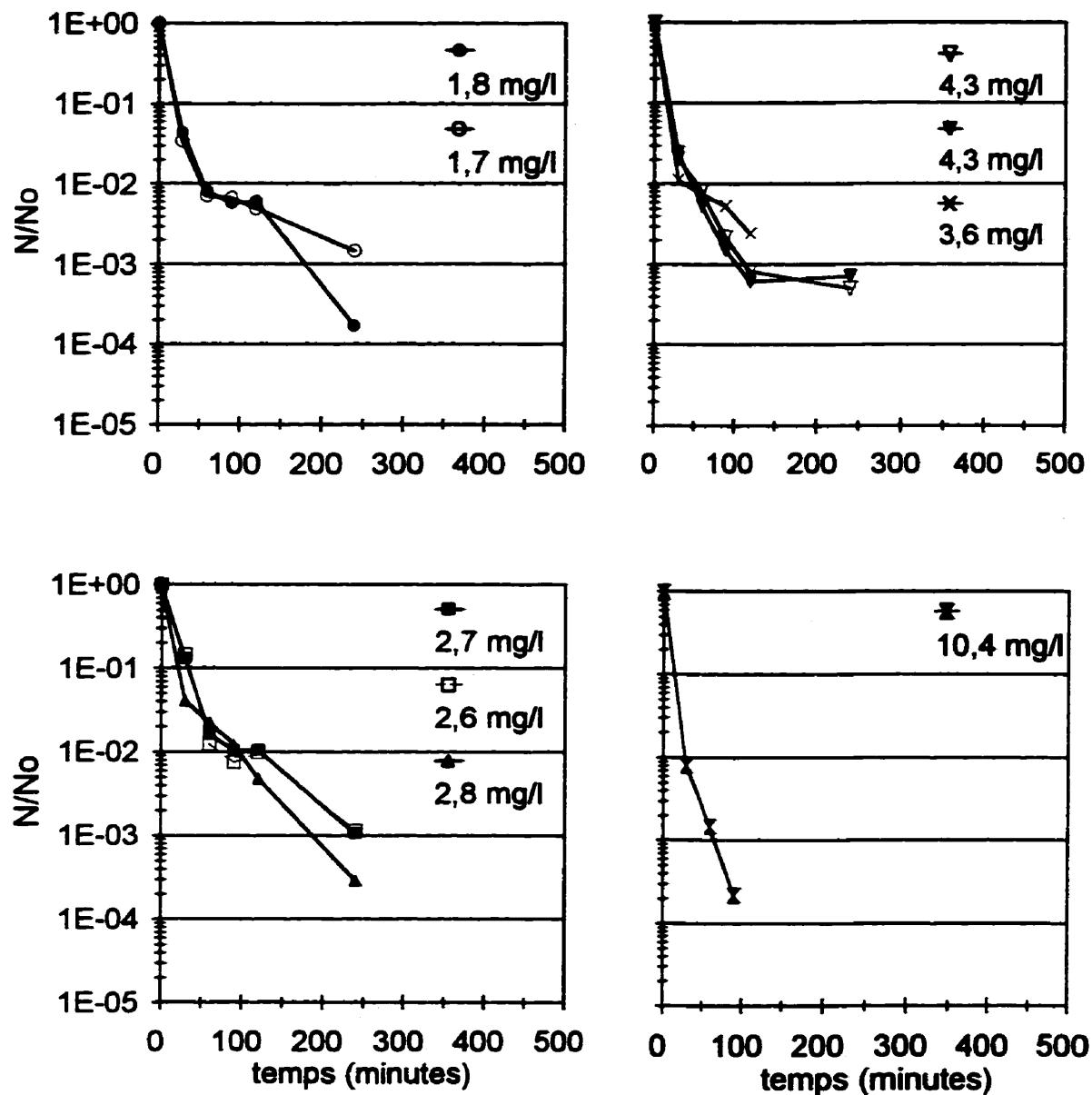


Figure 3.6: Courbes d'abattement de la souche environnementale à pH 6,5.

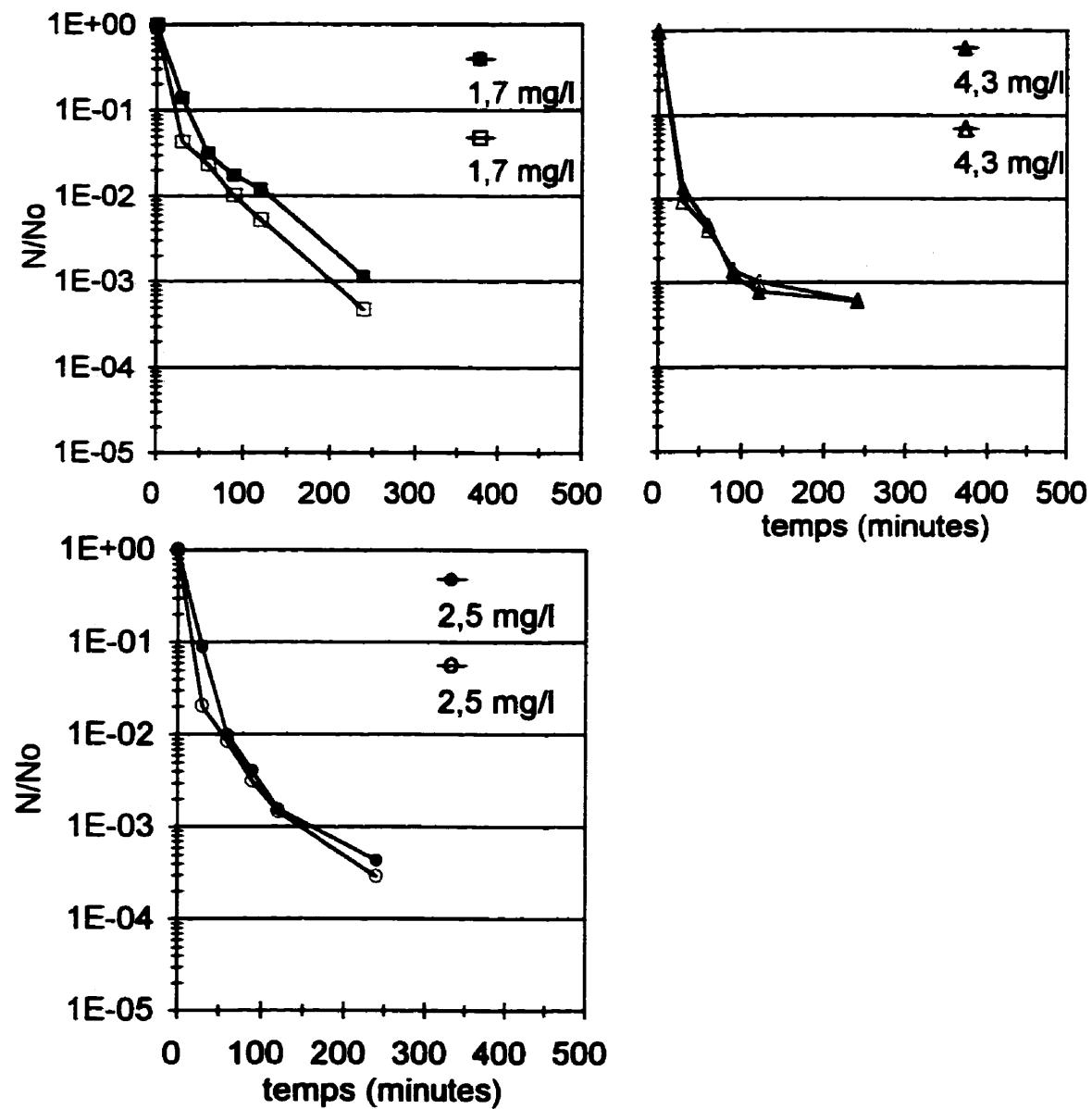


Figure 3.7: Courbes d'abattement de la souche environnementale à pH 7,5.

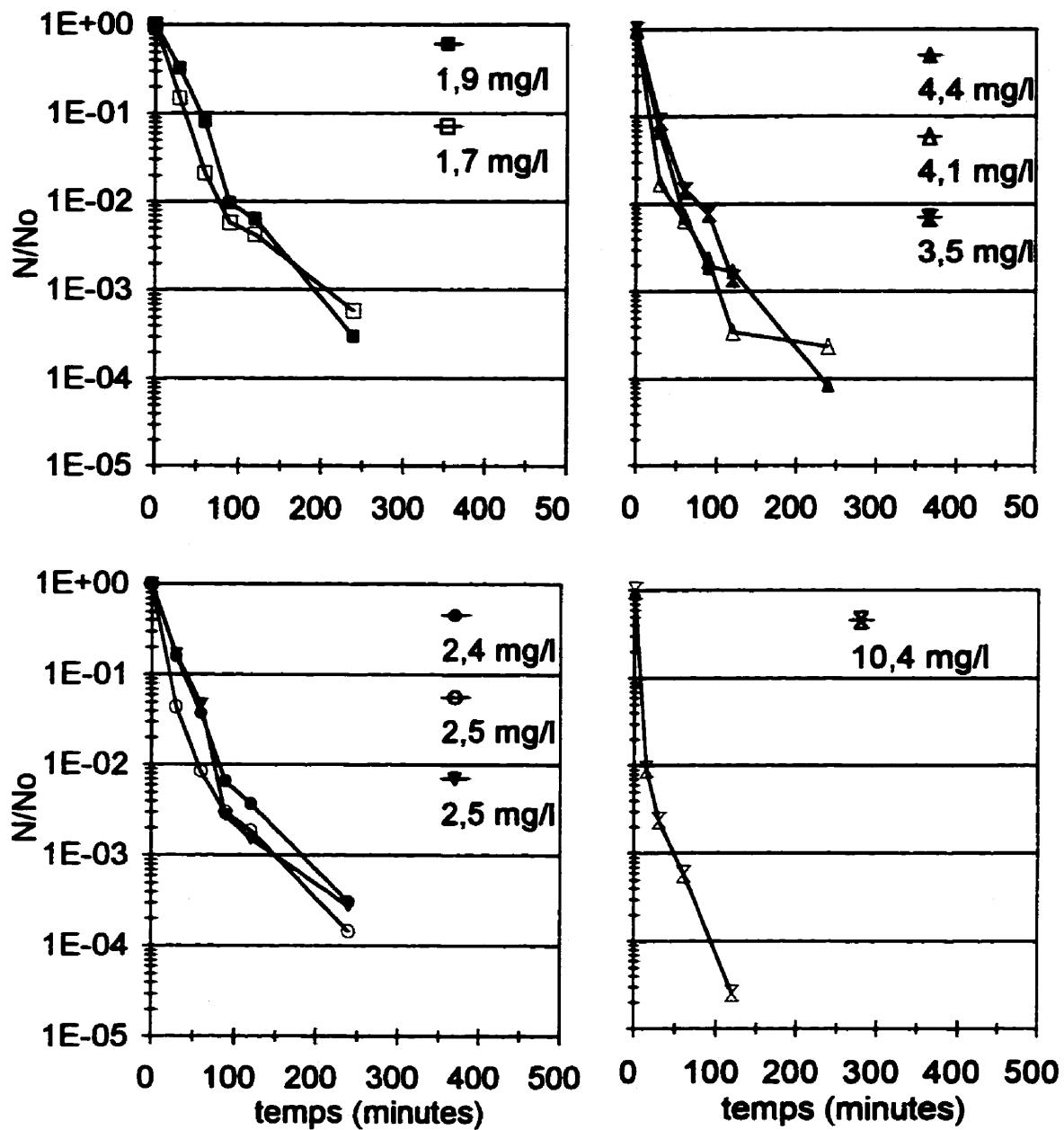


Figure 3.8: Courbes d'abattement de la souche environnementale à pH 8,3.

Les courbes d'inactivation sont présentées pour le pH 8,3, à la figure 3.8. Pour la concentration de 4,1 mg/l, un ralentissement de l'inactivation est observé après 120 minutes. Les courbes en général montrent une meilleure linéarité que les courbes de concentrations semblables aux autres pH.

### 3.3 Évaluation des Ct

Cette section est divisée en deux parties. La première partie traite des résultats de la souche de *B. subtilis* et la deuxième traite des résultats de la souche environnementale. Le même modèle de calcul des Ct a été utilisé pour les deux souches. Comme expliqué dans le chapitre 2, le modèle utilisé est celui de Chick-Watson étant donné la stabilité des concentrations de ClO<sub>2</sub>. Ce modèle est utilisé même si les courbes ne sont pas parfaitement linéaires. Les corrélations étant tout de même bonnes, supérieures à 0,76 (tableaux 3.3 et 3.6), les résultats ont été conservés. Les intervalles de confiance pour les courbes de Ct sont présentés à l'annexe VIII.

#### 3.3.1 Calcul des Ct de *B. subtilis*

Les courbes de Ct sont identifiées par le nombre de log d'inactivation visé, soit 1 log identifie la courbe de Ct calculée pour 1 log d'inactivation. Chaque courbe d'abattement de

microorganismes en fonction du temps de contact (TC) (figures 3.2 à 3.4 et 3.6 à 3.8) a permis de déterminer trois points (1 log, TC1; 2 log, TC2; 3 log, TC3) qui ont ensuite été utilisés dans le calcul des Ct. Les courbes de Ct présentées ont été obtenues par régression linéaire du temps en fonction de la concentration. Ces courbes sont présentées sur des graphiques avec les échelles des axes x et y en logarithme.

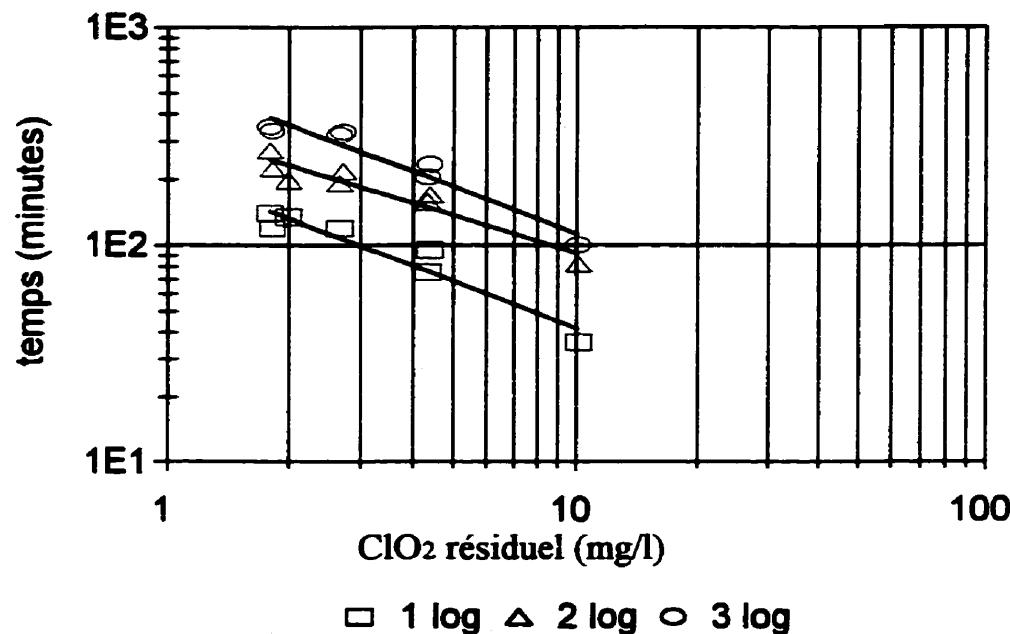


Figure 3.9: Courbes de Ct pour *B. subtilis* à pH 6,5.

Les courbes de Ct pour *B. subtilis* sont présentées pour le pH 6,5, sur la figure 3.9. La différence entre les courbes de 1 log et 2 log d'inactivation est plus grande que celle entre les courbes de 2 log et 3 log d'inactivation. Ceci est aussi observé sur les figures 3.10 (pH

7,5) et 3.11 (pH 8,3).

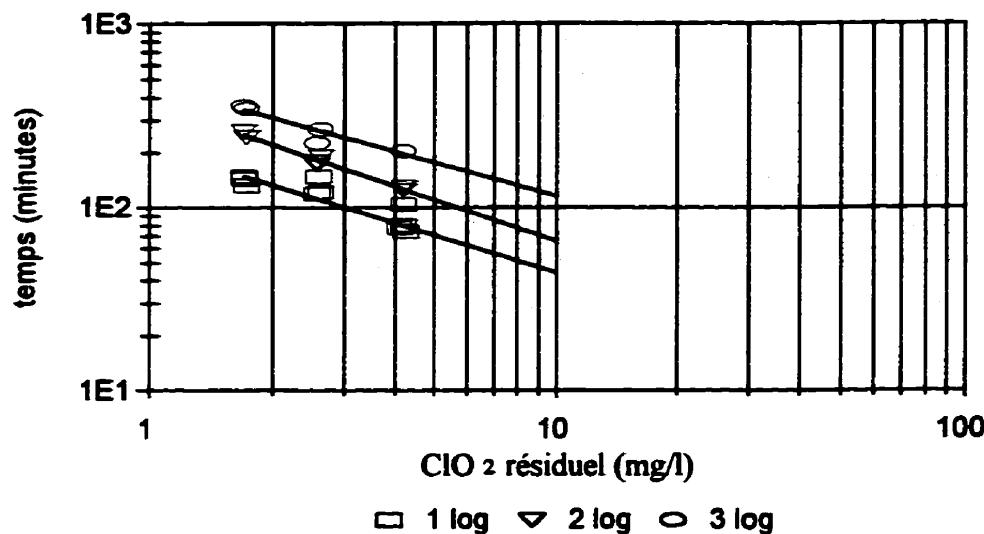


Figure 3.10: Courbes de Ct pour *B. subtilis* à pH 7,5.

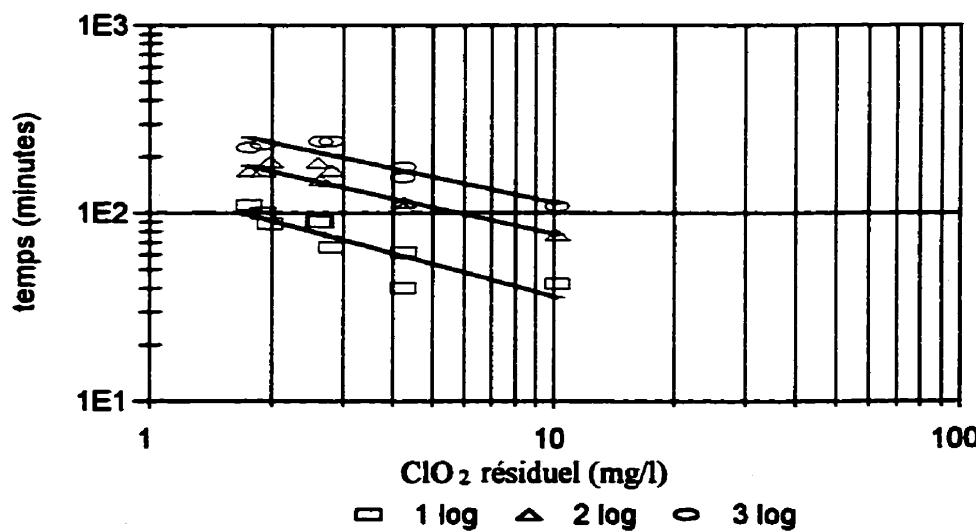


Figure 3.11: Courbes de Ct de *B. subtilis* pH 8,3.

**Tableau 3.3: Formules des Ct par pH pour *B. subtilis*.**

pH	log visé	Formules des courbes de Ct	r <sup>2</sup>	n° équation
6,5	1 log	$\log t = -0,72432 * (\log C) + 2,342399$	0,92	(3.1)
6,5	2 log	$\log t = -0,57907 * (\log C) + 2,542588$	0,90	(3.2)
6,5	3 log	$\log t = -0,71579 * (\log C) + 2,770311$	0,93	(3.3)
7,5	1 log	$\log t = -0,68418 * (\log C) + 2,329542$	0,94	(3.4)
7,5	2 log	$\log t = -0,75282 * (\log C) + 2,571254$	0,98	(3.5)
7,5	3 log	$\log t = -0,61098 * (\log C) + 2,674197$	0,90	(3.6)
8,3	1 log	$\log t = -0,57844 * (\log C) + 2,133646$	0,76	(3.7)
8,3	2 log	$\log t = -0,48113 * (\log C) + 2,367771$	0,92	(3.8)
8,3	3 log	$\log t = -0,45561 * (\log C) + 2,514125$	0,85	(3.9)

Les formules décrivant les courbes des figures 3.9, 3.10 et 3.11 sont présentées dans le tableau 3.3. Les coefficients de régression pour ces formules, sont tous supérieurs à 0,76. De plus, 7 des 9 courbes ont des coefficients de régression supérieurs à 0,9. Les formules montrent très bien la relation entre la concentration de ClO<sub>2</sub> et le temps de contact.

**Tableau 3.4:** Valeurs de n par pH, par le nombre de log d'inactivation visé, pour *B. subtilis*.

pH	log visé	n
6,5	1 log	0,72432
6,5	2 log	0,57907
6,5	3 log	0,71579
7,5	1 log	0,68418
7,5	2 log	0,75282
7,5	3 log	0,61098
8,3	1 log	0,57844
8,3	2 log	0,48113
8,3	3 log	0,45561

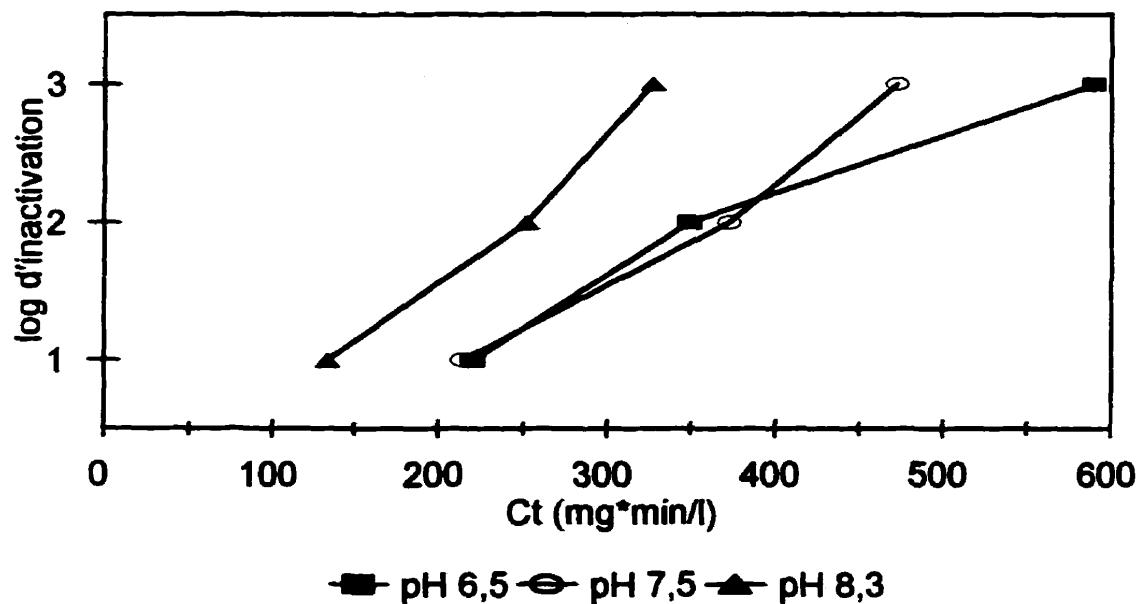
Au tableau 3.4, les valeurs de n sont présentées pour les courbes de Ct des figures 3.9, 3.10 et 3.11. Les valeurs de n sont obtenues en prenant la valeur négative de la pente des courbes de Ct décrites dans le tableau 3.3. Il n'y a pas de n supérieur ou égal à 1. Trois sont supérieurs à 0,7, deux sont entre 0,6 et 0,7, deux sont entre 0,5 et 0,6 et deux sont inférieurs à 0,5. Les n inférieurs à 0,6 sont observés à pH 6,5 lorsqu'un enlèvement de 2 log est souhaité et à pH 8,3 pour tous les log d'enlèvement. Lorsque n est inférieur à 1, la concentration a plus d'importance que le temps de contact dans la cinétique de désinfection. En d'autres mots, une faible baisse du temps de contact doit être compensée par un augmentation importante de la concentration. Lorsque n est supérieur à 1, le temps de contact est plus important que la concentration. Dans ce cas-ci, une faible diminution de la

concentration doit être compensé par une forte augmentation du temps de contact. Pour *B. subtilis*, ce cas n'est pas observé. Si le  $n$  tend vers 1 alors, le temps est aussi important que la concentration.

Les valeurs de  $C_t$  calculées pour 1 mg/l, à partir des formules du tableau 3.3, sont présentées au tableau 3.5 et à la figure 3.12. Les  $C_t$  pour le pH 8,3 sont plus faibles que pour les autres pH, pour tous les log d'enlèvement. Pour 1 log d'inactivation, les  $C_t$  aux pH 6,5 et 7,5 sont presque égaux avec une différence de 6 mg\*min/l. Pour 2 log d'inactivation, le  $C_t$  à pH 6,5 est plus faible que le  $C_t$  à pH 7,5. La différence entre ces deux  $C_t$  est de 24 mg\*min/l. Pour 3 log d'inactivation, le  $C_t$  à pH 7,5 est plus faible que celui mesuré à pH 6,5. La différence de 117 mg\*min/l. Ceci laisse entrevoir un effet du pH sur la désinfection par le b oxyde de chlore.

Tableau 3.5: Valeurs de  $C_t$  pour une concentration de  $\text{ClO}_2$  de 1 mg/l, pour *B. subtilis*.

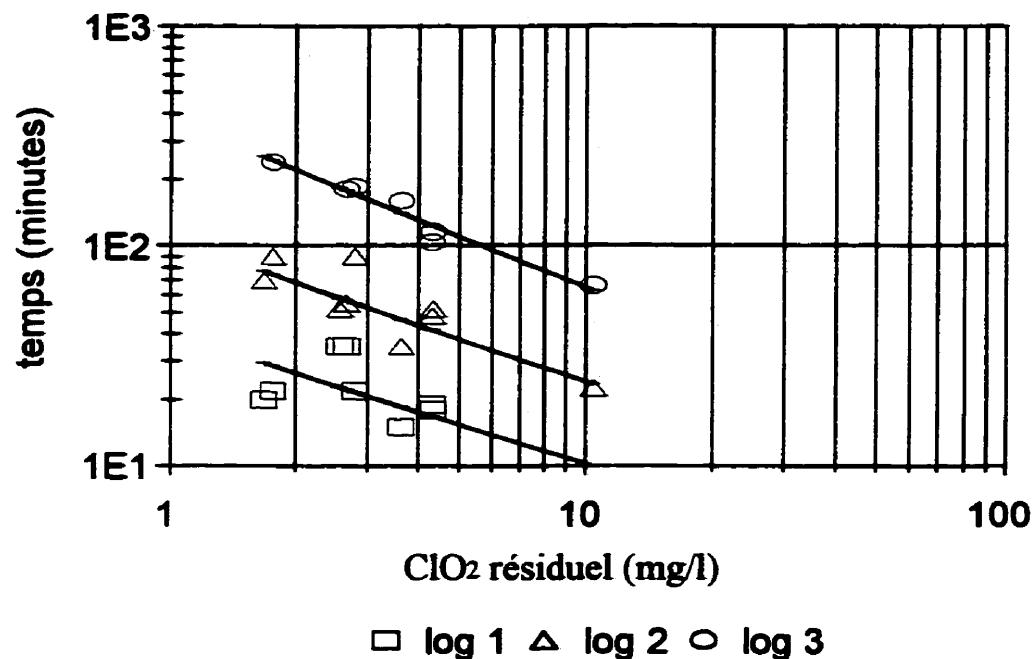
pH	1 log	2 log	3 log
6,5	220	349	589
7,5	214	373	472
8,3	136	233	324



**Figure 3.12:** Valeurs de Ct pour *B. subtilis*.

### 3.3.2 Les Ct de la souche environnementale

La légende des graphiques de courbes de Ct pour la souche environnementale est présentée de la même façon que celle de *B. subtilis*. Les courbes sont présentées sur des graphiques dont les axes x et y sont en échelle logarithmique.



**Figure 3.13:** Courbes de Ct pour la souche environnementale à pH 6,5.

Les courbes de Ct pour la souche environnementale sont présentées pour le pH 6,5 à la figure 3.13. La différence entre les courbes de 1 log et 2 log d'inactivation est environ la même que celle entre les courbes de 2 log et 3 log d'inactivation. Les droites sur ce graphique semblent être parallèles. Ceci n'est pas observé avec *B. subtilis*.

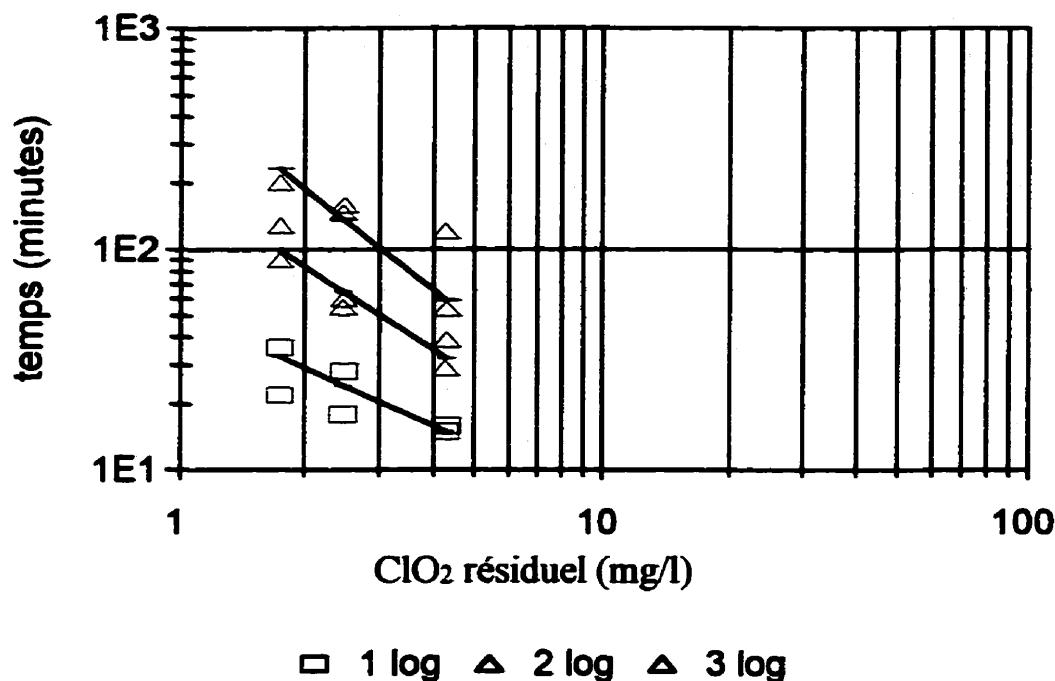


Figure 3.14: Courbes de Ct pour la souche environnementale à pH 7,5.

Les courbes de Ct mesurées à pH 7,5 pour la souche environnementale sont présentées sur la figure 3.14. La différence entre les courbes de 1 log et 2 log d'inactivation est légèrement supérieure à celle entre les courbes de 2 log et de 3 log d'inactivation. Les droites de régression ne sont pas parallèles. Les pentes semblent augmenter avec l'enlèvement des microorganismes.

Les courbes de Ct mesurées à pH 8,3 pour la souche environnementale sont présentées sur la figure 3.15. La différence entre les courbes de 1 log et de 2 log d'inactivation est

légèrement inférieure à celle entre les courbes de 2 log et 3 log d'inactivation.

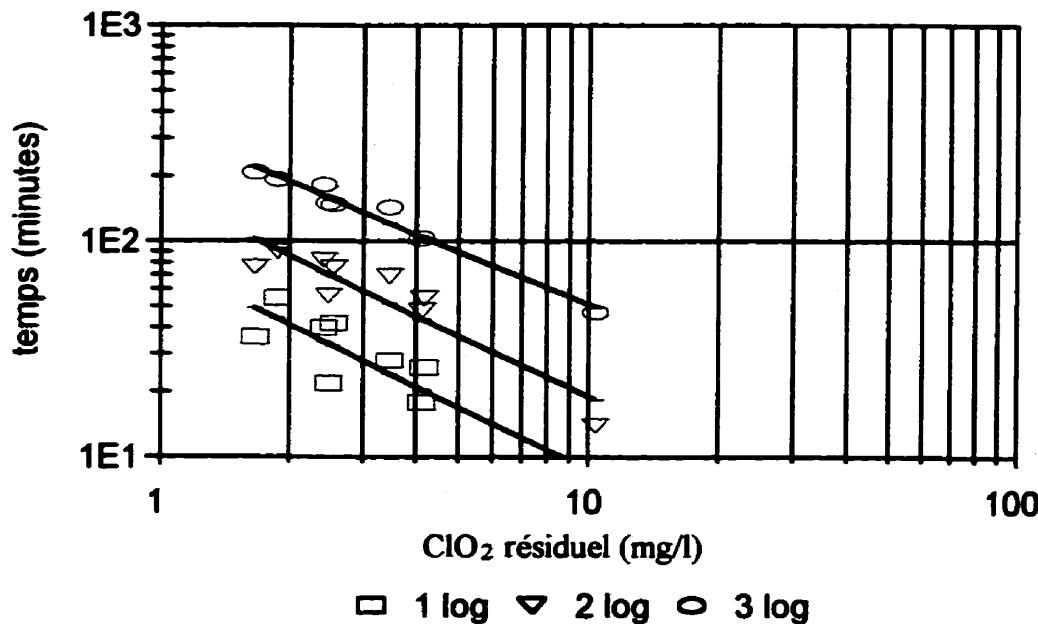


Figure 3.15: Courbes de Ct pour la souche environnementale à pH 8,3.

Les formules décrivant les courbes de Ct des figures 3.13, 3.14 et 3.15 sont notées au tableau 3.6. Tous les coefficients de régression sauf un sont supérieures à 0,78 et 3 des 9 équations ont des coefficients de régression supérieurs à 0,94. Les équations décrivent la relation entre la concentration et le temps de contact. Les coefficients de régression pour 1 log d'enlèvement sont plus faibles qu'aux autres log d'enlèvement. Ceci est dû au fait qu'au début d'un essai l'erreur relative est plus importante. Une minute peut être attribuée à l'erreur de manipulation, dans le pire des cas. L'erreur au début est de 1/15 minutes (7%)

tandis qu'à la fin elle est de 1/240 minutes (0,4%).

**Tableau 3.6: Formules des Ct pour la souche environnementale.**

pH	log visé	Formule des courbes de Ct	r <sup>2</sup>	n° équation
6,5	1 log	$\log t = -0,59047 * (\log C) + 1,600532$	0,55	(3.10)
6,5	2 log	$\log t = -0,64627 * (\log C) + 2,029328$	0,83	(3.11)
6,5	3 log	$\log t = -0,76271 * (\log C) + 2,575973$	0,95	(3.12)
7,5	1 log	$\log t = -0,85904 * (\log C) + 1,72155$	0,79	(3.13)
7,5	2 log	$\log t = -1,25798 * (\log C) + 2,303752$	0,89	(3.14)
7,5	3 log	$\log t = -1,51638 * (\log C) + 2,733022$	0,94	(3.15)
8,3	1 log	$\log t = -0,96253 * (\log C) + 1,90597$	0,81	(3.16)
8,3	2 log	$\log t = -0,93832 * (\log C) + 2,219247$	0,84	(3.17)
8,3	3 log	$\log t = -0,81493 * (\log C) + 2,522773$	0,97	(3.18)

Au tableau 3.7, les valeurs de n sont présentées pour les courbes des figures 3.13, 3.14 et 3.15. La valeur de n est obtenue en prenant la valeur négative de la pente des courbes de Ct décrites dans le tableau 3.6. Il y a deux n supérieurs à 1, deux sont entre 0,9 et 1,0, deux sont entre 0,8 et 0,9 et trois sont entre 0,58 et 0,8. Les n inférieurs à 0,8 sont tous observés à pH 6,5 et les n supérieurs à 1 sont tous deux à pH 7,5.

Les valeurs de Ct calculées pour 1 mg/l de ClO<sub>2</sub> à partir des formules du tableau 3.6 sont

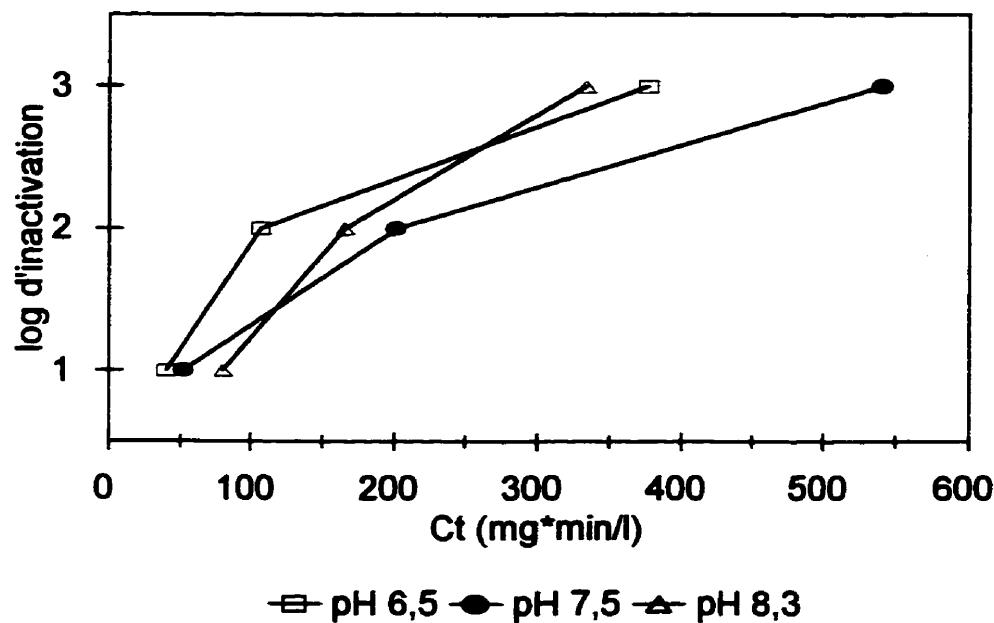
présentées au tableau 3.8 et à la figure 3.16. Pour 1 log et 2 log d'inactivation, les Ct les plus faibles sont observés lorsque le pH est de 6,5. Pour 3 log d'inactivation, le Ct le plus faible est obtenu à pH 8,3. Le Ct le plus élevé pour 1 log d'inactivation est à pH 8,3. Pour 2 et 3 log d'inactivation, les Ct les plus forts sont à pH 7,5. Ceci laisse entrevoir que différentes souches réagissent différemment à la désinfection à des pH différents.

**Tableau 3.7:** Valeurs de n par pH, par le nombre de log d'inactivation visé, pour la souche environnementale.

pH	log visé	n
6,5	1 log	0,59047
	2 log	0,64627
	3 log	0,76271
7,5	1 log	0,85904
	2 log	1,25798
	3 log	1,51638
8,3	1 log	0,96253
	2 log	0,93832
	3 log	0,81493

**Tableau 3.8:** Valeurs de Ct pour une concentration de  $\text{ClO}_2$  de 1 mg/l, pour la souche environnementale.

pH	1 log	2 log	3 log
6,5	39,9	107	377
7,5	52,7	201	541
8,3	80,5	166	333



**Figure 3.16:** Valeurs de Ct pour la souche environnementale.

## CHAPITRE IV

### DISCUSSION

#### 4.1 Le bioxyde de chlore

Lors des essais de désinfection de *Bacillus subtilis* et d'une souche environnementale, les concentrations de bioxyde de chlore sont demeurées stables tel que montré sur les figures 3.1 et 3.5. L'utilisation des concentrations moyennes de ClO<sub>2</sub> pour le calcul des Ct est donc justifié. Cette stabilité du ClO<sub>2</sub> a été rendue possible par l'utilisation de réacteurs multiples remplis sans laisser de col d'air, tel que décrit au chapitre 2. Cette méthode n'est pas utilisée par tous les auteurs. C'est le cas de Narkis *et al.* (1995) qui ont utilisé un seul réacteur pour toute la durée de l'expérience. Ils ont observé une baisse de la concentration de ClO<sub>2</sub> de 16% probablement causée par la volatilisation du bioxyde de chlore qui s'est fort probablement produit lors des ouvertures fréquentes des flacons pour y prélever des échantillons. La constante de Henry du bioxyde de chlore est de 0,0914 g ClO<sub>2</sub>/l par mm Hg, à 25°C (IUPAC, 1983). Pour fin de comparaison, l'oxygène a une constante de Henry de 5,39 × 10<sup>-5</sup> par mm Hg<sup>1</sup>, à 25°C (Doré, 1989). Cette constante est inversement

---

<sup>1</sup> Voici la conversion faite à partir des données tirée de Doré (1989):

$$\frac{40,4\text{mg}}{\text{bar} \cdot \text{l}} \cdot \frac{1\text{g}}{1000\text{mg}} \cdot \frac{1,0133\text{bar}}{760\text{mmHg}} = \frac{5,39 \cdot 10^{-5}\text{g}}{\text{l} \cdot \text{mmHg}}$$

proportionnelle à la solubilité du gaz et elle augmente en fonction de la température (Doré, 1989). De plus, la tension de vapeur du bioxyde de chlore à 25°C est de 34,5 mm Hg (Merk Research Laboratories, 1996). Il est donc volatil et peut être éliminé facilement par aération (Doré, 1989).

La variation de la concentration du ClO<sub>2</sub> dans le temps est de 0,03 à 0,3 mg/l pour *B. subtilis* (tableau 3.1) et de 0,02 à 0,4 mg/l pour la souche environnementale (tableau 3.2). Cela montre l'efficacité des précautions prises pour minimiser les pertes de ClO<sub>2</sub>.

La stabilité des concentrations de ClO<sub>2</sub> est observée à tous les pH, et pour les deux souches. Malgré la constance de la concentration, un abattement des BSA est noté aux trois pH testés. Ceci est conforme aux propos de Latshaw (1994) qui affirme que le ClO<sub>2</sub> lui-même est indépendant du pH et qu'il est efficace en désinfection entre les pH 4 et 10. Ce qui ne veut pas dire que l'efficacité du ClO<sub>2</sub> à inactiver les spores est indépendant du pH.

#### 4.2 Les BSA

La comparaison des courbes d'abattement des deux souches montre une période de latence seulement pour *B. subtilis*. Il est peu probable que cette période de latence soit le résultat d'une erreur expérimentale étant donné sa durée et sa récurrence à travers les essais. Une

période de latence pour l'abattement de *B. subtilis* aux pH de 6,5 (figure 3.2) et 7,5 (figure 3.3) est observé lorsque la concentration de bioxyde de chlore appliquée est inférieure à 5 mg/l. À pH 8,3 (figure 3.4), une période de latence est observée pour une concentration de ClO<sub>2</sub> de 4,3 mg/l seulement. À ce pH, l'abattement de *B. subtilis* est plus linéaire qu'aux autres pH. Les plateaux observés laissent supposer que *B. subtilis* est plus résistant initialement que la souche environnementale. Le premier log d'inactivation de *B. subtilis* est après 90 minutes alors qu'il est après 30 minute pour la souche d'origine environnementale. Par contre, les deux souches présentent un ralentissement de la vitesse d'abattement (ou "tailing") à la fin des courbes, tel que présenté sur les figures 3.2 (pH 6,5) et 3.3 (pH 7,5) pour *B. subtilis* et sur les figures 3.6 à 3.8 pour la souche environnementale.

#### 4.2.1 Effet du pH sur l'abattement des souches

Pour *B. subtilis*, l'abattement le plus fort est observé à pH 8,3. Ceci a aussi été observé par Botzenhart *et al.* (1993) pour *B. subtilis*. Cette dernière étude mettait en évidence un abattement plus rapide à un pH de 8 qu'à un pH de 6 pour une même température. Ces auteurs ont observé une corrélation positive entre le pH et la vitesse d'inactivation avec le ClO<sub>2</sub>, pour *B. subtilis*. Par contre, ils n'ont testé que deux pH. La comparaison des courbes d'inactivation de *B. subtilis*, pour les différents pH est présentée sur la figure 4.1. Les courbes d'abattement aux pH 6,5 et 7,5 ont la même allure jusqu'à 4 log d'abattement. Une

démarcation claire n'est observée qu'à partir de 3 log d'abattement. La corrélation pH et vitesse d'inactivation est présente entre les pH 6,5 et 8,3 et est observable surtout par le plateau plus court au pH 8,3.

Sur la figure 4.1, la présence d'un plateau (60 minutes pour le pH 8,3, 120 minutes pour les pH 6,5 et 7,5) et d'un ralentissement de la vitesse d'abattement (après 240 minutes) est notée. La présence d'une épaule dans la courbe d'abattement peut être attribué à l'agglutination de la souche (Haas *et al.*, 1995). Ceci est improbable dans notre cas. En effet, des vérifications faites au microscope ont permis de vérifier que les spores ne sont pas

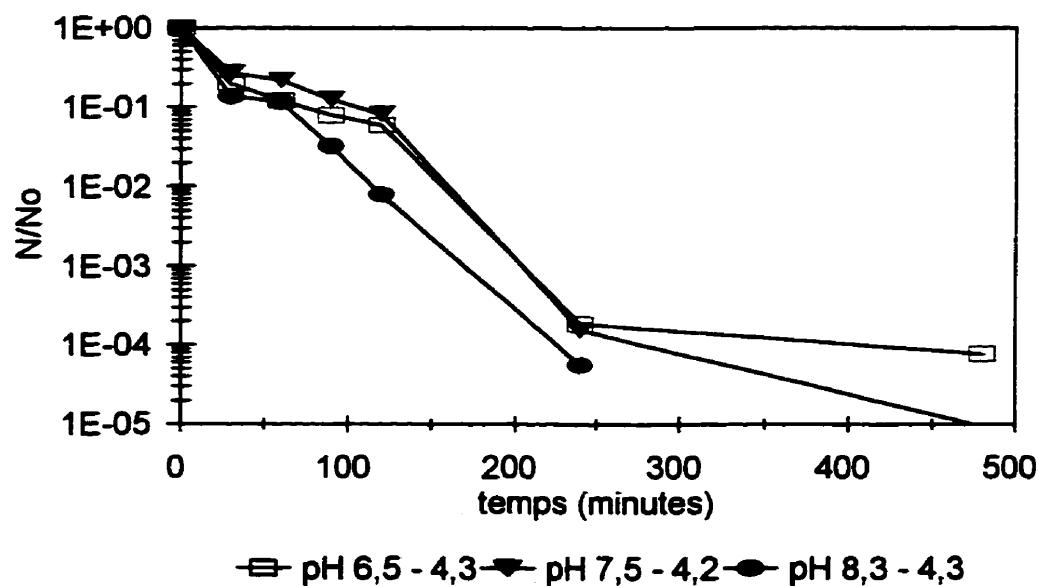
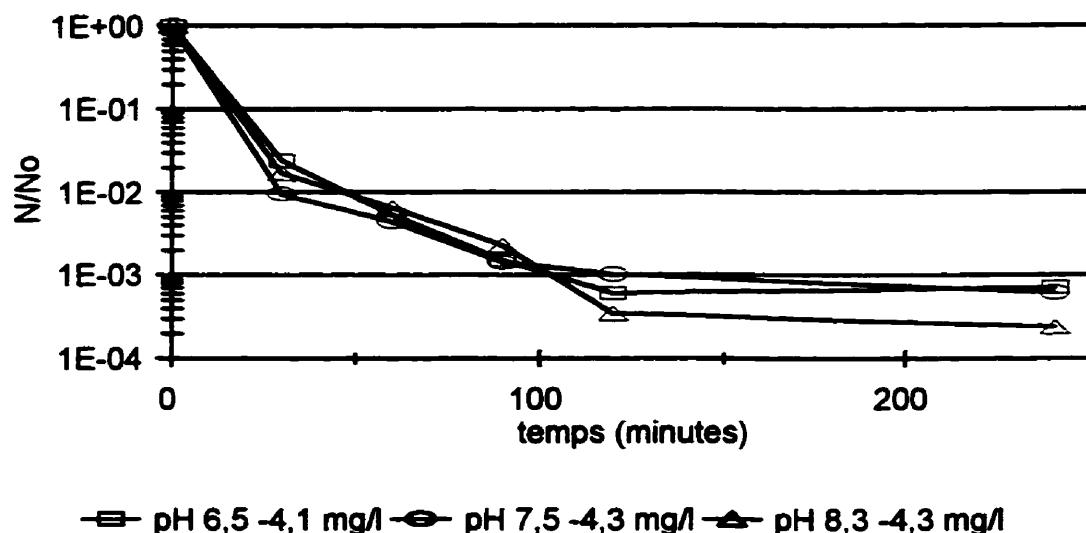


Figure 4.1: Abattement de *B. subtilis* à 5 mg/l, pour différents pH.

agglutinantes. Au début des courbes de la figure 4.1, un abattement de près d'un log est observé. Cet abattement rapide peut être dû à la mort des individus plus sensibles de la population. Le ralentissement de l'abattement qui suit peut être dû au temps nécessaire pour que le b oxyde de chlore réagisse suffisamment avec les spores pour causer une inactivation. La différence de résistance à l'intérieur d'une même population peut être causée par une différence dans le code génétique qui influencerait la composition de la paroi de la spore. Tel qu'il a été mentionné au chapitre 1 (section 1.5), le ralentissement de la vitesse d'abattement, observé à la fin des essais, est généralement attribué à quatre phénomènes: 1) le passage à une forme plus résistante (de bactérie à spore) pendant l'inactivation; 2) l'existence de variations génétiques dans la population; 3) la protection d'une sous-population ou une variation de la dose d'oxydant reçue; 4) l'agglutination d'une sous-population (Haas *et al.*, 1995). Des spores ont été utilisées pour les essais. Le passage à une forme plus résistante est improbable, les spores étant déjà la forme résistante de ces bactéries. Il ne devrait pas y avoir d'activité métabolique, ou s'il y en a, cette activité devrait être réduite, lorsque les bactéries sont sous la forme de spore. L'homogénéité du mélange a été vérifiée en ajoutant du colorant et en mesurant le temps jusqu'à sa dispersion complète, sous la même agitation à laquelle les réacteurs ont été soumis. Tel que mentionné plus tôt, l'agglutination a aussi été vérifiée. L'hypothèse des variations génétiques semble être la seule explication dans ce cas-ci. D'autres auteurs (Berg *et al.*, 1988) ayant travaillé avec des coliformes, ont écrit que la fraction résistante d'une population est plus importante chez les

populations qui se sont développées dans des conditions de nutrition limitantes. Ces mêmes auteurs ont mentionné que la méthode de culture, réacteurs batch ou chemostat, peut affecter le Ct. Les populations de BSA utilisées lors de nos travaux ont été développées sur du R2A qui est considéré comme un milieu pauvre en nutriments. La méthode de culture utilisée a, semble-t-il, produit des BSA très résistants à la désinfection au ClO<sub>2</sub>. La fraction résistante pourrait aussi être due à une réaction de la souche à son milieu de culture, ou son



**Figure 4.2:** Abattement de la souche environnementale à 5 mg/l, pour différents pH.

environnement, et non à la génétique. Certains auteurs (Haas et Morrison, 1981) expliquent la fraction résistante d'une population à l'aide de facteurs physiologiques et non héréditaires, lors de travaux avec des coliformes exposés au chlore. Boulos (1996) a montré que la

résistance de *E. coli* au chlore varie en fonction des conditions de culture. Une température faible et un milieu pauvre augmente la résistance de *E. coli* au chlore. Une autre possibilité est qu'il n'y avait que 4,5 log de spore /ml au début des essais et qu'il y a un épuisement du stock de spores à la fin. La méthode utilisée pour récupérer les spores permet de récupérer jusqu'à un minimum de 15 UFC/ 100 ml. Des résultats inférieurs à ceci n'était pas considéré comme étant représentatifs. Dans certains cas, à la fin des essais, il peut y avoir seulement 1 à 10 UFC/ 100 ml (annexe IX). À ce moment-là, la limite de détection est considérée comme étant atteinte. L'erreur entre les duplicata des courbes d'abattement peut aller jusqu'à 10%.

Pour la souche environnementale, les abattements aux trois pH sont semblables (figure 4.2). Dans ce cas-ci, le ralentissement des abattements peut être expliqué par un problème d'agglutination. Ceci est confirmé par des analyses microscopiques. Des suivis, dans le temps, de la variation de la concentration des BSA dans les différentes solutions tampons utilisées ont aussi été faits. Ceci a été fait en plaçant une quantité de spores dans des éprouvettes contenant les différentes solutions d'eau tamponnée. La concentration initiale a été mesurée puis, elle fut de nouveau mesurée le lendemain matin. Ces suivis ont révélé que l'agglutination est moins importante à pH 7,5 et que le pH a un effet sur l'agglutination de cette souche de BSA. Les résultats de ces vérifications sont détaillés à l'annexe VII (graphique N/No en fonction du temps). L'agglutination peut être causée par des

exopolymères, tel que ceux produits dans les biofilms. Ceci est probable à en juger par l'apparence des colonies qui sont très lustrées et entourées d'un halo clair. La méthode de culture utilisée comprend l'addition d'un composé, le TTC (voir chapitre 2), pour colorer les colonies. Les bactéries se colorent en rouge. La substance autour de la colonie est claire et gluante. Cette substance serait probablement un des exopolymères. La souche d'origine environnementale utilisée dans les essais n'est peut être pas représentative de la totalité de la population de spores dans l'environnement. Ce n'est qu'une souche parmi plusieurs. Lors de l'isolement de cette souche, au moins quatre autres ont été rejetées.

### 4.3 Les Ct

#### 4.3.1 Les Ct en fonction du pH

Les Ct requis pour l'abattement de 1,2 et 3 log de *B. subtilis* sont plus faibles à pH 8,3 qu'aux pH 6,5 et 7,5 (figure 3.12). Pour 2 log d'abattement, le Ct le plus élevé est observé à pH 7,5. Alors que pour 1 et 3 log d'inactivation le Ct le plus élevé est observé à pH 6,5. La tendance des Ct est à la baisse lorsque le pH passe de 6,5 à 8,3 pour 1,2 et 3 log d'inactivation. Ce même phénomène a été observé par Botzenhart *et al.* (1993) pour *B. subtilis* entre les pH 6 et 8, à 5 et 15°C.

Les Ct requis pour l'abattement de 1 et 2 log de la souche environnementale est plus faible à pH 6,5 qu'aux autres pH étudiés. Pour un log d'abattement, les Ct croissent avec le pH. Pour 2 log d'inactivation, les Ct croissent lorsque les pH sont classés comme suit: pH 6,5; 8,3 et 7,5. La tendance des Ct en fonction du pH a l'apparence d'une cloche avec un maximum situé à pH 7,5 (figure 4.3). Les intervalles de confiances pour les courbes de Ct sont présentés à l'annexe VII. Cette même allure de cloche est observée dans le cas des Ct requis pour 3 log d'abattement, sauf que le Ct minimal est à pH 8,3, mais de peu. Ceci n'est pas décrit dans la littérature, qui présente surtout des effets causés par la variation de la température. Cette allure de cloche pourrait signifier la présence d'une protéine à la surface de la paroi ou d'une enzyme ou d'une protéine à l'intérieur de la spore. En effet, les allures en forme de cloche pour les variations de pH sont souvent observées lorsqu'il y a une activité enzymatique d'une protéine (Horton *et al.*, 1992).

Les parois des spores sont composées surtout de protéines (Murrell, 1967, Rose, 1968). Dans la plupart des espèces de *Bacillus*, la paroi de la spore a une composition semblable à celle de la paroi de la bactérie (Murrell, 1967). Les parois des kystes de protozoaire ont une composition semblable à celle de la membrane du protozoaire (Kreiker *et al.*, 1987). En plus, la paroi a un pourcentage de chitine (Fayer, 1997, Meyer, 1990). Tel que présenté dans le chapitre 1 (section 1.5), les protéines et les lipides sont affectés par un changement

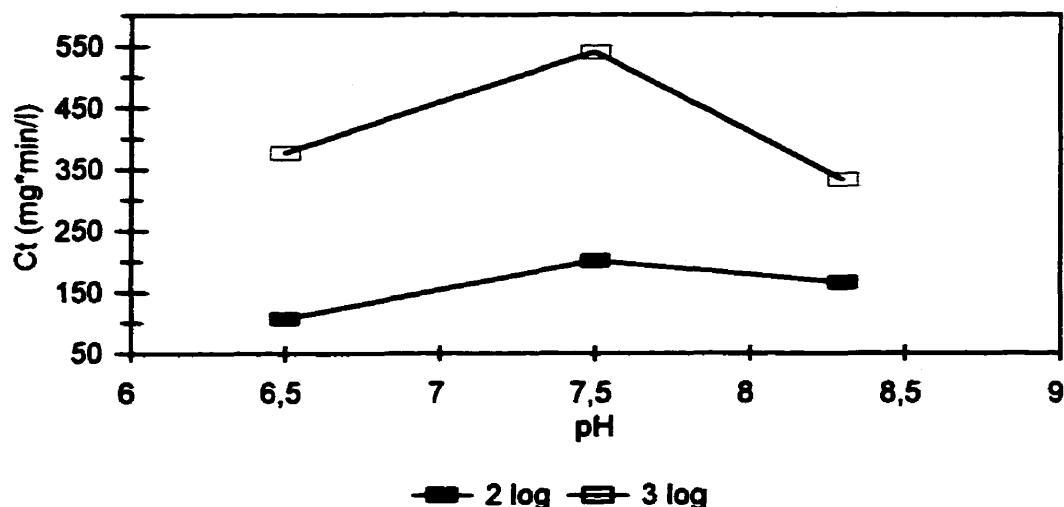


Figure 4.3: Ct de la souche environnementale en fonction du pH.

de pH. Le bioxyde de chlore réagit surtout avec les acides aminés (Aieta *et al.*, 1986, Masschelein, 1992) qui sont des composantes des protéines et avec certains acides gras (Aieta *et al.*, 1986). Un changement de pH modifie les charges des acides aminés et modifie la configuration tridimensionnelle de la protéine (Horton *et al.*, 1992). Le changement de cette configuration peut changer les accès aux sites oxydables par le ClO<sub>2</sub>, soit en rendant accessible de nouveaux sites, soit en coupant l'accès aux sites existants.

La raison pour laquelle l'allure de cloche de ces courbes (figure 4.3) peut être attribuée à une protéine contenue dans la paroi de la spore est le mode d'action reconnu jusqu'à maintenant du ClO<sub>2</sub>. L'inactivation des bactéries et des spores par le ClO<sub>2</sub> dépend d'une part de

l'intégrité de la paroi et du contrôle de la perméabilité de la paroi bactérienne (Berg *et al.*, 1986). Le bioxyde de chlore lui-même aurait un effet sur la perméabilité de la membrane en attaquant les protéines et les lipides de celle-ci (Aieta *et al.*, 1986). Une protéine ou une enzyme de la paroi rendrait cette dernière moins perméable au ClO<sub>2</sub> en changeant de configuration tridimensionnelle. Une autre hypothèse mise de l'avant est qu'en augmentant le pH, la couche de lipides de la paroi devient plus perméable, permettant ainsi l'accès du ClO<sub>2</sub> aux molécules vitales, qui sont essentielles au fonctionnement de la cellule (Sprout *et al.*, 1983). Un des mécanismes dominant de l'action bactéricide du ClO<sub>2</sub> serait par la suite, la réaction entre l'oxydant et des acides aminés (hydroxyproline, proline, histidine, cystéine, cystine, tyrosine et tryptophane) (Masschlein, 1992). Une autre action du ClO<sub>2</sub> serait d'inhiber la synthèse de protéines (Denver Russell *et al.*, 1997) bien que cette action ne soit pas la plus importante (Aieta *et al.*, 1986). Donc, il peut y avoir une protéine ou une enzyme présente à l'intérieur de la spore qui aurait pour rôle secondaire de rendre plus difficile l'accès du bioxyde de chlore, ou des autres oxydants, aux molécules vitales.

Deux hypothèses peuvent donc être émises pour expliquer les résultats obtenus. La première est qu'il y a une protéine dans ou sur la paroi qui est affectée de façon maximale par le ClO<sub>2</sub> à un pH d'environ 7,5. Cela réduirait la perméabilité de la paroi de la cellule au ClO<sub>2</sub>. La seconde hypothèse est qu'il y aurait une protéine ou un enzyme à l'intérieur de la cellule qui réagirait plus rapidement avec le ClO<sub>2</sub> à un pH de 7,5 ce qui protégerait les molécules

vitales. Ces deux hypothèses ne sont valables que pour la souche environnementale avec laquelle les essais ont été effectués puisque la composition en protéines (la séquence d'acides aminés), tel que les SASP ("small acid soluble proteins" ou petites protéines acidophiles), varient d'une espèce à l'autre et même d'une souche à l'autre (Setlow, 1994).

Le mode d'action du ClO<sub>2</sub> décrit plus haut explique la tendance observée chez la souche de *B. subtilis* utilisée. L'activité bactéricide du ClO<sub>2</sub> augmente avec le pH pour les cystes d'amibes (Chen *et al.*, 1985). Chen *et al.* (1985) ont émit deux hypothèses soit il y a un changement à la surface du microorganisme, soit l'efficacité du ClO<sub>2</sub> à inactiver ce microorganisme augmente avec le pH. Certains auteurs (Setlow et Setlow, 1993, Popham *et al.*, 1995) attribuent la résistance de *B. subtilis* au peroxyde et aux UV à la présence de petites protéines acidophiles (SASP : small acid soluble protein) qui se lieraient avec l'ADN de la cellule ou qui affecteraient le contenu en eau de la cellule, augmentant ainsi la résistance des cellules qui en sont munies.

Si la résistance de *B. subtilis* est attribuée à la présence de certaines protéines, telles que les SASP, lorsque d'autres méthodes de désinfection sont utilisées, il est plausible de poser une hypothèse semblable lorsque le ClO<sub>2</sub> est utilisé comme désinfectant. Ceci pourrait aussi être applicable dans le cas d'une autre souche de *Bacillus*, comme la souche d'origine environnementale utilisée dans la présente étude.

#### 4.3.2 Les Ct en fonction de la souche de BSA

Les comparaisons des Ct entre les deux souches de BSA sont présentées au tableau 4.1.

Afin d'obtenir 2 log d'abattement, le Ct de *B. subtilis* est 3,3 fois plus élevé que celui de la souche environnementale à pH 6,5. Le Ct de *B. subtilis* est 1,9 fois plus élevé que celui de la souche environnementale à pH 7,5 et le Ct de *B. subtilis* est 1,4 fois plus élevé que celui de la souche environnementale à pH 8,3. Lorsque 3 log d'abattement sont requis, le Ct de *B. subtilis* est 1,6 fois plus élevé que celui de la souche environnementale, à pH 6,5. Le Ct de *B. subtilis* est 1,2 fois plus faible que celui de la souche environnementale, à pH 7,5 et à pH 8,3, les deux sont sensiblement pareils. La différence entre les deux souches diminue lorsque le pH augmente et lorsque le nombre de log d'inactivation augmente. *B. subtilis* est, en général, plus difficile à inactiver que la souche environnementale et ce, même si les deux souches ont été incubées sur le même milieu de culture. À 3 log d'abattement, la fraction de la population qui survit encore, à en juger par les graphiques d'abattement, peut être considérée comme la fraction résistante tel qu'expliqué par Berg *et al.* (1988) pour *E. coli*. La limite de la méthode de mesure n'est pas précisée dans cet article (Berg *et al.*, 1988). Ceci pourrait expliquer que les deux souches qui ont des Ct très différents à 1 et 2 log d'abattement, ont des Ct à 3 log d'abattement qui tendent à se ressembler. Les fractions résistantes des deux souches tendent à avoir la même résistance alors que la population générale des souches ont des résistances différentes.

**Tableau 4.1: Comparaison des Ct des souches de BSA.**

	1 log	2 log	3 log
Bs pH 6,5	220	349	589
SE pH 6,5	39,9	107	377
	5,5x	3,3x	1,6x
Bs pH 7,5	214	373	472
SE pH 7,5	52,7	201	541
	4x	1,9x	1,2x
Bs pH 8,3	136	233	324
SE pH 8,3	80,5	166	333
	1,7x	1,4x	1,03x

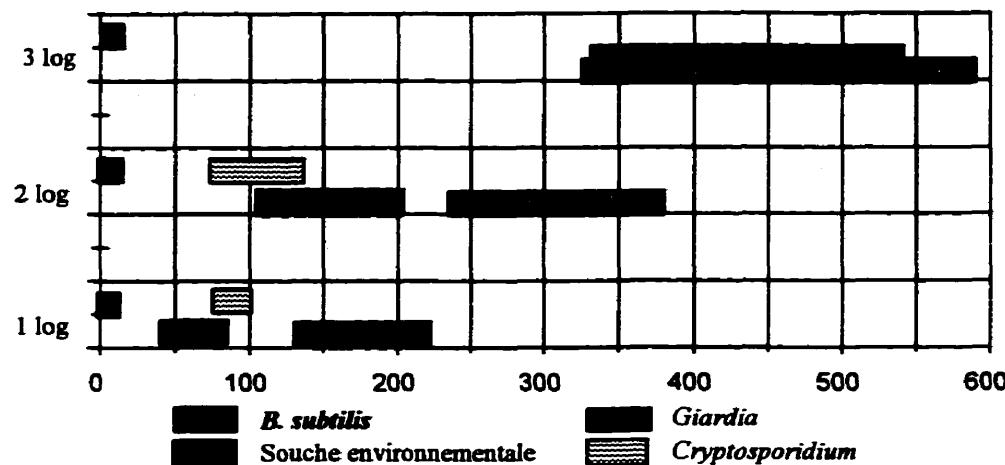
Bs : *B. subtilis* ; SE: Souche environnementale.

#### 4.3.3 Les Ct des souches de BSA et des kystes ou oocystes de protozoaires

Les comparaisons des Ct sont illustrées à la figure 4.4. Des valeurs de Ct pour l'inactivation de *Giardia* ont été publiés par le Sous-Comité Fédéral Provincial sur l'Eau Potable (1997). Malheureusement, ces Ct ne tiennent pas compte de la variation du pH. Pour une inactivation de 2 log, à 20°C, le Ct de *Giardia* est de 10 mg\*min/l et pour une inactivation de 3 log, il est de 15 mg\*min/l. Les Ct de la souche environnementale pour 2 log d'inactivation varient de 107 à 201,3 mg\*min/l. Les Ct de *B. subtilis* pour 2 log

d'inactivation sont entre 233,2 et 372,6 mg\*min/l. Dans les deux cas de BSA, les Ct dépassent largement la valeur donnée pour *Giardia*. Dans le cas des Ct pour 3 log d'inactivation, pour la souche environnementale, les valeurs varient entre 333,3 et 540,8 mg\*min/l et pour *B. subtilis*, les Ct varient entre 326,7 et 589,3 mg\*min/l. Encore ici, les valeurs de Ct pour les BSA dépassent de beaucoup le Ct de *Giardia*.

Pour ce qui est du protozoaire *Cryptosporidium*, les Ct proposés dans la littérature pour un pH de 6 sont de 120 mg\*min/l à 20°C pour 2 log d'inactivation (Ruffell *et al.*, 1998) et de 144 mg\*min/l à 22°C pour 2,1 log d'inactivation (Li *et al.*, 1998). À pH 7, Korich *et al.* (1990) ont trouvé un Ct de 78 mg\*min/l, à 20°C, pour 1 log d'inactivation. Pour le pH 8, Ruffell *et al.* (1998) ont trouvé un Ct de 75 mg\*min/l, à 20°C, pour 2 log d'inactivation. Le Ct de la souche environnementale que nous avons mesurés à pH 6,5 est de 107 mg\*min/l, pour 2 log d'inactivation. Le Ct requis pour inactiver *Cryptosporidium* est supérieur à celui de la souche environnementale. Dans le cas de la souche de *B. subtilis* utilisée, les Ct que nous avons mesuré sont tous supérieurs aux Ct proposés pour *Cryptosporidium*. Cette souche peut être un bon indicateur d'efficacité d'inactivation pour ce protozoaire.



**Figure 4.4:** Comparaison des Ct des spores de BSA et des kystes de protozoaires.

#### 4.4 Comparaison avec le chlore et l'ozone

La résistance des spores de BSA au chlore (Barbeau, 1996) et à l'ozone (Facile, 1998) a aussi été étudiée. Barbeau (1996) a montré que les espèces de BSA ont chacune leur résistance au chlore. Selon ce même auteur, les spores de BSA sont des bons indicateurs de l'inactivation de *Giardia*. Facile (1998) a montré que le taux d'inactivation des spores par l'ozone augmente lorsque le pH baisse. Ce même auteur a montré que la souche d'origine environnementale est moins résistante que *B. subtilis* (ATCC 6633) et que les spores de BSA sont de bons indicateurs de l'inactivation des kystes et des oocystes de

*Giardia* et de *Cryptosporidium*.

Dans la présente étude, il est montré que, tout comme avec l'ozone, la souche d'origine environnementale est moins résistante que *B. subtilis*. Il est aussi montré que bien que le pH ait un effet sur la désinfection, il est impossible de prédire dans quel direction va cet effet, puisqu'il dépend de la souche de BSA. Tel que montré avec le chlore et l'ozone, les spores de BSA sont des bons indicateurs de l'inactivation des kystes de *Giardia* par le bioxyde de chlore. De plus, les spores de BSA sont des bons indicateurs de l'inactivation des oocystes de *Cryptosporidium* par l'ozone et par le bioxyde de chlore, bien que ce ne soit pas le cas de toutes les souches de BSA en ce qui à trait au bioxyde de chlore.

## CHAPITRE V

### CONCLUSION

À partir des résultats obtenus pour les deux souches utilisées, il peut être conclut que la résistance de *B. subtilis* diffère de la résistance de la souche environnementale utilisée pour les essais. Il peut y avoir des variations d'une souche environnementale à une autre. Donc, la résistance varie d'une souche à l'autre. La résistance des deux souches mesurée lors des essais de cette étude est supérieure à la résistance de *Giardia* proposée dans la bibliographie. La résistance des spores montre aussi des variations avec le pH. La variation de résistance en fonction du pH n'est pas la même d'une souche à l'autre.

Les Ct calculés pour la souche environnementale et pour *B. subtilis* sont de beaucoup supérieurs aux Ct proposés dans la littérature pour *Giardia*. Ils sont tellement plus élevés qu'ils ne sont pas nécessairement de bons indicateurs. Par contre, si ces souches sont utilisées comme indicateurs, il est certain que le Ct pour *Giardia* sera respecté. Pour ce qui est de *Cryptosporidium*, seul *B. subtilis* peut être considérée comme étant un indicateur acceptable. À la lumière de ces résultats, une prise de conscience de l'effet du pH lors de l'utilisation du bioxyde de chlore est de mise. Ceci ne pourra qu'avantager les utilisateurs de ces oxydants. Enfin, le bioxyde de chlore est une bonne alternative au chlore.

## RÉFÉRENCES

- AIETA, E.M. et BERG, J.D. (1986). A review of chlorine dioxide in drinking water treatment. JAWWA, 78(6), 62-72.
- APHA, AWWA et WEF. (1992). Standard Methods for the examination of water and wastewater. American Public Health Association. Washington, DC.
- BARBEAU, B. (1996). Évaluation des bactéries sporulantes aérobies comme indicateur de l'efficacité du traitement d'une filière d'eau potable. Mémoire de maîtrise, École Polytechnique de Montréal, Canada, 110 p.
- BARBEAU, B., BOULOS, L., DESJARDINS, R., COALLIER, J., PRÉVOST, M. et DUCHESNE, D. (1997). A modified method for the enumeration of aerobic spore-forming bacteria. Can. J. Microbiol., 43, 976-980.
- BEN AMOR, H. (1988). Le bioxyde de chlore dans la filière de production des eaux de consommation: Contribution à l'étude de son mécanisme d'action sur des molécules modèles et sur les substances humiques aquatiques. Thèse de doctorat, Université de Poitiers, France.

BERG, J.D., HOFF, J.C., ROBERTS, P.V. et MATIN, A. (1988). Resistance of bacterial subpopulations to disinfection by chlorine dioxide. JAWWA **80**(9), 115-119.

BERG, J.D., ROBERTS, P.V. et MATIN, A. (1986). Effect of chlorine dioxide on selected membrane functions of *Escherichia coli*. Jour. Appl. Bacteriol., **60**, 213-220.

BITTON, G. (1994). Pathogens and parasites in domestic wastewater. Wastewater Microbiology. Wiley-Liss, New York, 77-100.

BOTZENHART, K., TARSON G. M. et OSTRUSCHKA, M. (1993). Inactivation of bacteria and coliphages by ozone and chlorine dioxide in a continuous flow reactor. Wat. Sci. Technol., **27**(3-4), 363-370.

BOULOS, L. (1996). Influence de l'état physiologique des coliformes sur leur résistance à la désinfection. Mémoire de maîtrise, École Polytechnique de Montréal, Canada, 124 p.

CHEN, Y., SPROUL, O. et RUBIN, A. (1985). Inactivation of *Naegleria gruberi* cysts by chlorine dioxide. Water Research, **19**(6), 783-789.

CHRISTMAN, R.F. et GJESSING, E.T. (1983). Aquatic and terrestrial humic materials.

Ann Arbor Science Publishers, Ann Arbor, Michigan.

CODE OF FEDERAL REGULATIONS.(1998). Enhanced Surface Water Treatment Rule,  
40 CFR 141 à 142, États-Unis.

CODE OF FEDERAL REGULATIONS. (1989). Surface Water Treatment Rule, 40 CFR  
141,70 à 141,75, États-Unis.

CONDIE, L.W. (1986). Toxicological problems associated with chlorine dioxide. JAWWA,  
78(6), 73-78.

COTRUVO, J.A. et VOGT, C.D. (1985). Regulatory aspects of disinfection. Water  
chlorination Environmental impact and health effects. vol. 5. R.L. Jolley *et al.* eds, Lewis  
Publishers Inc., Chelsea, Michigan.

COURI, D., ABDEL-RAHMAN, M.S. et BULL, R.J. (1982). Toxicological effects of  
chlorine dioxide, chlorite and chlorate. Envir. Health Perspectives, 46, 13-17.

DANIEL, F.B., CONDIE, L.W., ROBINSON, M., STOBER, J.A., YORK, R.G., OLSON,  
G.R. et WANG, S-H. (1990). Comparative subchronic toxicity studies of three disinfectants.

JAWWA, 82(10), 61-69.

DENVER RUSSELL, A., FURR, J.R. et MAILLART, J.-Y. (1997). Microbial susceptibility and resistance to biocides. ASM News, 63(9), 481-487.

DESJARDINS, R. (1997). Le traitement des eaux, 2<sup>e</sup> ed. École Polytechnique de Montréal, Montréal, 304 p.

DORÉ, M. (1989). Chimie des oxidants et traitement des eaux. Lavoisier, Technique et documentation, Paris, 505 p.

DUBEY, J.P., SPEER, C.A. et FAYER, R. (eds) (1990). Cryptosporidiosis of man and animals. CRC Press, Boca Raton, Ann Arbor, Boston. 1-58.

FACILE, N. (1998). Mesure des Ct d'inactivation des bactéries sporulantes aérobie par ozonation. Mémoire de maîtrise, École Polytechnique de Montréal, Canada, 94 p.

FAYER, R. (ed.) (1997). Cryptosporidium and Cryptosporidiosis. CRC Press, Boca Raton, 251 p.

GONCE, N. et VOUDRIAS, E.A. (1994). Removal of chlorite and chlorate ions from water using granular activated carbon. Wat. Res., 28(5), 1059-1069.

HAAS, C.N. et MORRISON, E.C. (1981). Repeated exposure of *E. coli* to free chlorine: production of strains possessing altered sensitivity. Water, Air and Soil Pollution, 16(2), 233-242.

HAAS, C.N., JOFFE, J., ANMAUGANDLA, U. et HORNBERGER, J.C. (1995). Development and validation of rational design methods of disinfection. AWWARF, Denver.

HANCOCK, C.M., ROSE, J.B. et CALLAHAN, M. (1998). Crypto and Giardia in US groundwater. JAWWA, 90(3), 58-61.

HEFFERNAN, W.P., GUION, C. et BULL, R.J. (1979). Oxidative damage to the erythrocyte induced by sodium chlorite, In Vivo. J. Envir. Pathol. and Toxicol., 2, 1487-1499.

HOIGNÉ, J. et BADER, H. (1993). Kinetics of reactions of chlorine dioxide (OClO) in water - I. Rate constants for inorganic and organic compounds. Wat. Res., 28(1), 45-55.

HOM, L.W. (1972). Kinetics of chlorine disinfection of an ecosystem. Journ. San. Eng. Div.  
Am. Soc. Civil Eng., **98**, 183-194.

HORTON, H.R., MORAN, L.A., OCHS, R.S., RAWN, J.D. et SCRIMGEOUR, K.G.  
(1992). Principles of biochemistry. Neil Patterson Publishers, Prentice Hall, Englewood  
Cliffs, New-Jersey.

IUPAC. (1983). Solubility data series vol. 12: sulfur dioxyde, chlorine, fluorine and chlorine  
oxides. Pergamon Press, Oxford, New York, Toronto, Sydney, Paris, Frankfurt. 477 p.

KATZ, A., NARKIS, N., ORSHANSKY, F., FRIEDLAND, E. et KOTT, Y. (1994).  
Disinfection of effluent by combinations of equal doses of chlorine dioxide and chlorine  
added simultaniously over varying contact times. Wat. Res., **28**(10), 2133-2138.

KORICH, D.G., MEAD, J.R., MADORE, M.S., SINCLAIR, N.A. et STERLING, C.R.  
(1990). Effects of ozone, chlorine dioxide, chlorine and monochloramine on  
*Cryptosporidium parvum* oocyste viability. Applied Envir. Microbiol., **56**(5), 1423-1428.

KRAMER, M.H., HERWALDT, B.L., CRAUN, G.F., CALDERON, R.L. et JURANEK,  
D.D. (1996). Waterborne disease: 1993 and 1994. JAWWA, **88**(3), 66-80.

KREIKER, J.P. et BAKER, J.R. (1987). Parasitic protozoa. Allen & Unwin, Inc., Winchester, Mass., 241 p.

LATSHAW, C.L. (1994). Chlorine dioxide : effective, broadspectrum biocide for white-water systems. Tappi Journal, 78(4), 163-166.

LI, H., FINCH, G.R. NEWMANN, N. et BELOSEVIC, M. (1998). Inactivation of *Cryptosporidium* by chlorine dioxide at 1°C. Water Quality Technology Conference Proceedings, American Water Works Association, San Diego, Californie.

LYTLE, D.A., FOX, K.R., RICE, E.W., OWENS, J. et JOHNSON, C.H. (1996). The use of aerobic spore forming bacteria for evaluating drinking water treatment performance. Annual Conference Proceedings, American Water Works Association, Toronto, Ontario.

MASSCHELEIN, W.J. (1992). Unit process in drinking water treatment. Marcel Dekker inc., New York, Basel, Hong Kong, 635 p.

MASSCHELEIN, W.J., FRANOLET, G., LAFORGE, P. et SAVOIR, R. (1989). Determination of residual ozone or chlorine dioxide in water with ACVK - an update version. Ozone Science and Engineering, 11, 209-215.

MERCK RESEARCH LABORATORIES, DIVISION OF MERCK & CO., INC. (1996). The Merck Index: an encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals. Whitehouse Station, New Jersey.

MEYER, E.A. (1990). Giardiasis, Human parasitic diseases vol.3, Elsevier Science Pub. Co., New York, 368 p.

MORISSETTE, C. (1993). Impact du traitement sur la demande en oxydant et sur la formation de sous-produits d'oxydation. Mémoire de maîtrise, École Polytechnique de Montréal, Canada.

MORISSETTE, C., PRÉVOST, M. et LANGLAIS, B. (1996). Impact de différents traitements d'eau potable sur la consommation en bioxyde de chlore et sur la formation de sous-produits d'oxydation. Aqua, 45(5), 232-243.

MURRELL, H.G. (1967). The biochemistry of the bacterial endospore. Advances in microbial physiology, vol 1. Academic Press, London, 275 p.

NARKIS, N., ARMON, R., OFFER, R., ORSHANSKY, F. et FRIEDLAND, E. (1995). Effect of suspended solids on wastewater disinfection efficiency by chlorine dioxide. Wat.

Res., 29(1), 227-236.

NDIONGUE, S. (1999). Évaluation de la performance de la filtration directe par les compteurs de particules, les spores aérobies et la turbidité. Thèse de doctorat, École Polytechnique de Montréal.

NOACK, M.G. et DOERR, R.L. (1981). Reactions of chlorine, ClO<sub>2</sub> and mixtures thereof with humic acid. Water chlorination. Environmental impact and Health effects, vol. 2, Jolley *et al.* eds. Ann Arbor Science Publication, Ann Arbor, Michigan.

NOUR, S. (1998). Évaluation des procédures d'étalonnage et évaluation de la qualité des données de compteurs de particules. Mémoire de Maîtrise, École Polytechnique de Montréal.

PAYMENT, P., FRANCO, E. et SIEMIATYCKI, J. (1993). Absence of relationship between health effects due to tap water consumption and drinking water quality parameters. Wat. Sci. Tech., 27(3-4), 137-143.

PEETERS, J.E., ARES MAZAS, E., MASSCHELEIN, W.J., VILLACORTA MARTINEZ DE MATURANA, I. et DEBACKER, E. (1989). Effects of disinfection of drinking water

with ozone or chlorine dioxide on survival of *Cryptosporidium parvum* oocysts. Appl. Envir. Microbiol., 55(6), 1519-1522.

POPHAM, D.L., SENGUPTA, S. et SETLOW, P. (1995). Heat, hydrogen peroxide and UV resistance of *Bacillus subtilis* spores with increased core water content and with or without major DNA-binding proteins. Appl. Envir. Microbiol., 61(10), 3633-3638.

PUBLIC LAW. (1986). Safe Drinking Water Act, 104-182, États-Unis.

RÈGLEMENT SUR L'EAU POTABLE. (1997). Q-2, r.4.1, Éditeur officiel du Québec.

RICE, E.W., FOX, K.R., MILTNER, R.J., LYTLE, D.A. et JOHNSON, C.H. (1994). A microbiological surrogate for evaluating treatment efficiency. Water Quality Technology Conference Proceedings, American Water Works Association, San Fransisco, California, 2035-2045.

RICE, E.W., FOX, K.R., MILTNER, R.J., LYTLE, D.A. et JOHNSON, C.H. (1996). Evaluating plant performance with endospores. JAWWA, 88(9), 122-130.

RICHARDSON, S.D., THRUSTON, Jr, A.D., COLLETTE, T.W., SCHENCK

PATTERSON, K., LYKINS, Jr., B.W., MAJETICH, G. et ZHANG, Y. (1994). Multispectral identification of chlorine dioxide disinfection by-products in drinking water. Environ. Sci. Technol., **28**, 592-599.

ROOK, J.J. (1974). Formation of haloforms during chlorination of natural waters. Journal of Water Treatment Examiner, **23**(2), 234-243.

ROSE, A.H. (1968). Chemical microbiology. 2nd edition. Butterworth and Co. Ltd., London, 312 p.

RUFFEL, M.K., RENNECKER, J.L. et MARÍNAS, B.J. (1998). Inactivation kinetics of *Cryptosporidium parvum* oocysts with chlorine dioxide. Water Quality Technology Conference Proceedings, American Water Works Association, San Diego, California.

SCHNEIDER, O. (1998). Trends in acute waterborne disease 1976 - 1994. Water Quality Technology Conference Proceedings, American Water Works Association, San Diego, California.

SETLOW, B. et SETLOW, P. (1993). Binding of small, acid soluble spore proteins to DNA plays a significant role in the resistance of *Bacillus subtilis* spores to hydrogen peroxide.

Appl. Envir. Microbiol., 59(10), 3418-3423.

SETLOW, P. (1994). Mechanisms which contribute to the long term survival of spores of *Bacillus* species. Jour. Appl. Bacteriol. symposium suppl., 76, 49S-60S

SHEFFIELD, H.G. (1979). The ultra structural aspects of *Giardia*. Waterborn transmission of giardiosis. USEPA, Cincinnati.

SNEATH, H.A., MAIR, N.S., SHARPE, M.E. et HOLT, J.G. (eds). (1984). Bergey's manual of systematic bacteriology Vol.2. Williams and Wilkins, Baltimore, Hong Kong, London, Munich, Philadelphia, Sydney, Tokyo. 1104-1139.

SOBSEY, M.D. (1989). Inactivation of health-related microorganisms in water by disinfection processes. Wat. Sci. Tech., 21(3), 179-195.

SOUS-COMITÉ FÉDÉRAL PROVINCIAL SUR L'EAU POTABLE. (1997). Les protozoaires dans l'eau potable. Documentation pour consultation publique, Santé Canada.

SPROUL, O., CHEN, Y.S.R., ENGEL, J.P. et RUBIN, A.J. (1983). Comparison on chlorine and chlorine dioxide for the inactivation of an amoebic cyste. Environ. Technol.

lett., 4(8-9), 335-342.

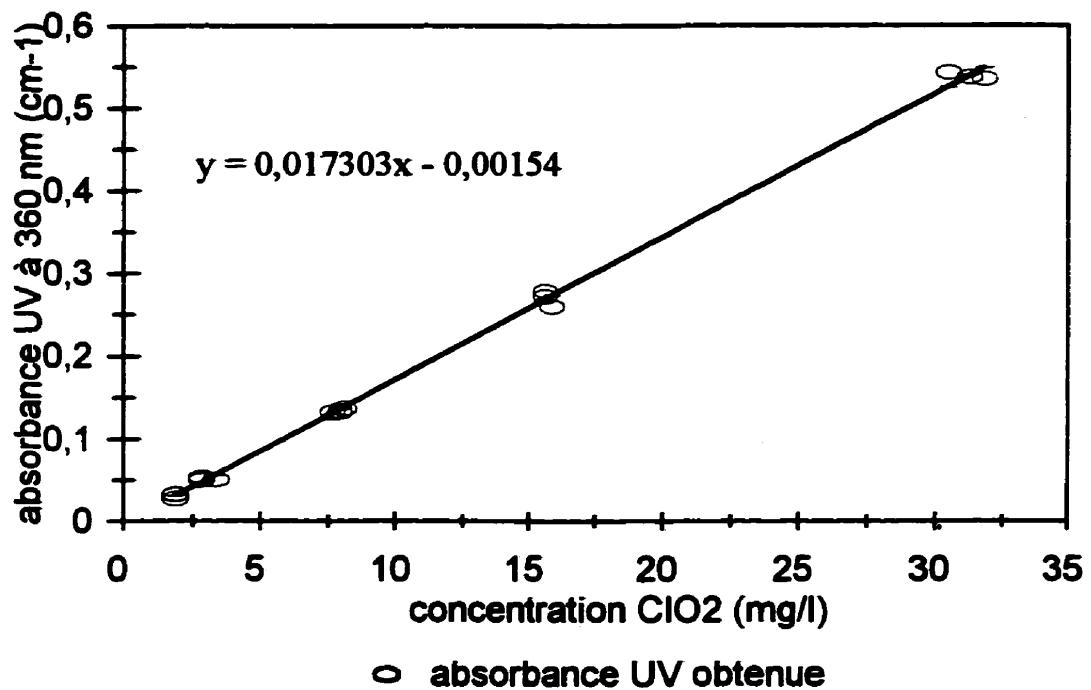
USEPA. (1991). Guidance manual for compliance with filtration and disinfection requirements for public water systems using surface water sources. USEPA, Washington, DC.

WALKER, J.T. et MORALES, M. (1997). Evaluation of chlorine dioxide (ClO<sub>2</sub>) for the control of biofilms. Wat. Sci. Tech., 35(11-12), 319-323.

WERDENHOFF, K.S. et SINGER, P.C. (1987). Chlorine dioxide effects on THMFP, TOXFP, and the formation of inorganic by-products. JAWWA, 79(9), 107-113.

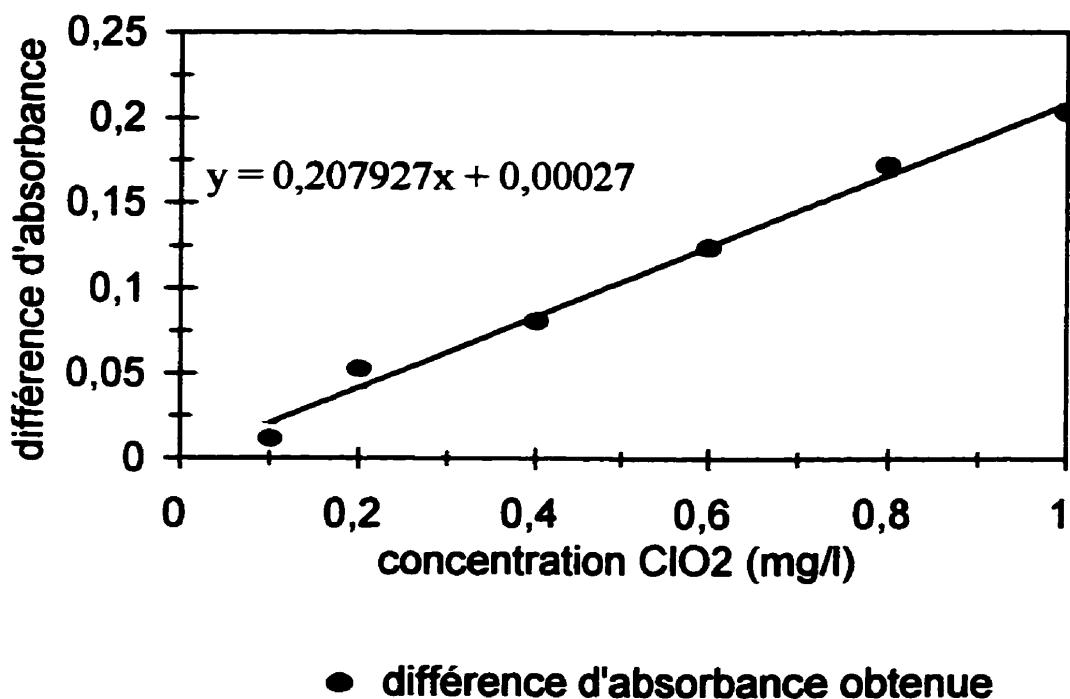
WHITE, G.C. (1986). Handbook of chlorination 2nd edition, Van Nostrand Reinhold Co., New-York.

**ANNEXE I: COURBE DE CALIBRATION POUR LA MESURE  
DU BIOXYDE DE CHLORE PAR  
LA MÉTHODE AUX RAYONS UV, À 360 nm.**



**Figure I.1:** Courbe de calibration pour la spectrophotométrie aux rayons UV à 360nm.

**ANNEXE II: COURBE DE CALIBRATION POUR  
LA MESURE DU BIOXYDE DE CHLORE PAR  
LA MÉTHODE À L'ACVK, 548 nm.**



**Figure II.1:** Courbe de calibration pour la spectrophotométrie avec ACVK, à 548 nm.

**ANNEXE III: GRAPHIQUES DES CONCENTRATIONS  
DE ClO<sub>2</sub> RÉSIDUEL *B. SUBTILIS* POUR LES pH 7,5 ET 8,3.**

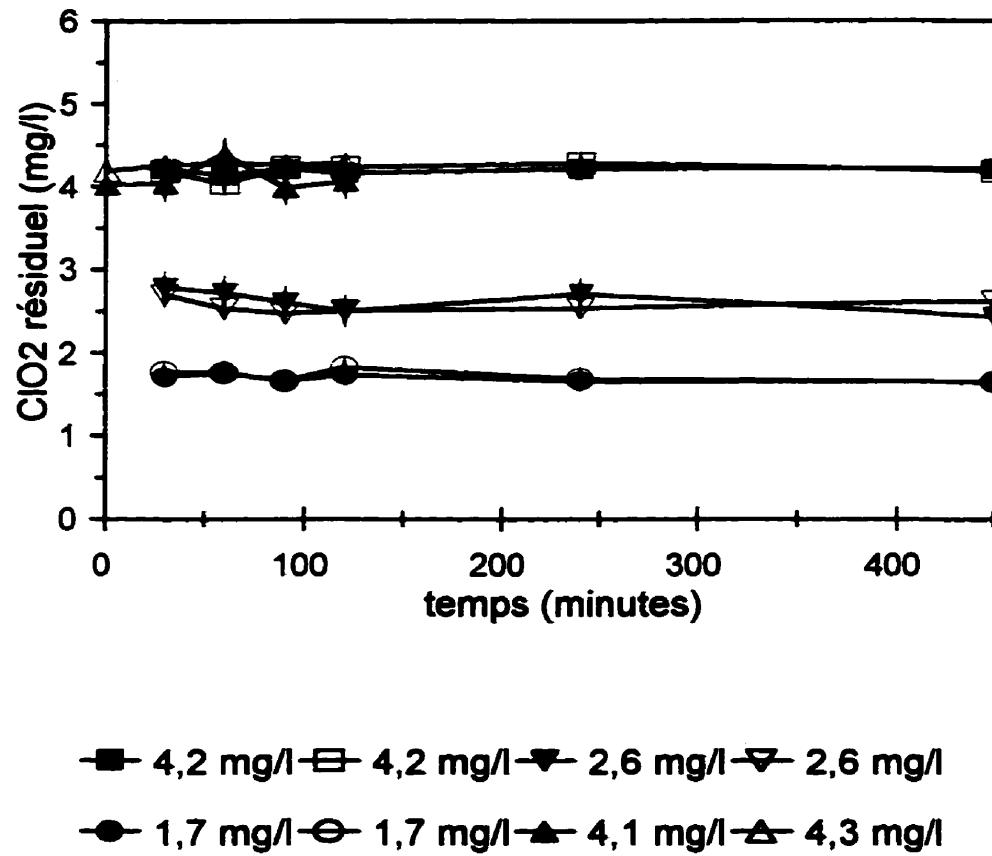
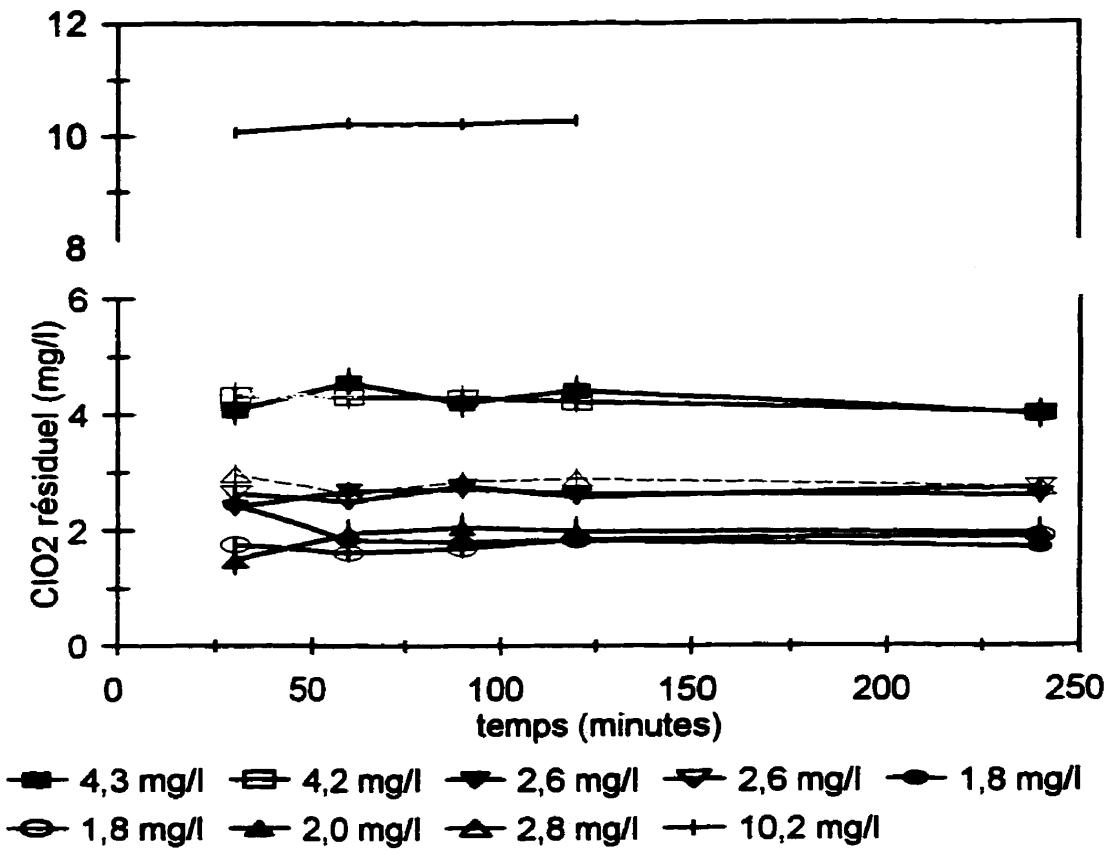


Figure III.1: Évolution du ClO<sub>2</sub> résiduel dans le temps à pH 7,5, pour *B. subtilis*.



**Figure III.2:** Évolution du ClO<sub>2</sub> résiduel dans le temps à pH 8,3, pour *B. subtilis*.

**ANNEXE IV: PERTES INITIALES DE ClO<sub>2</sub> POUR *B. subtilis***

**Tableau IV.1:** Pertes de ClO<sub>2</sub> par essai à pH 6,5 pour *B. subtilis*.

<b>Concentrations visées</b> <b>(mg/l)</b>	<b>Concentrations obtenues à pH 6,5</b> <b>(mg/l)</b>	<b>Pertes de ClO<sub>2</sub></b>	
		<b>(mg/l)</b>	<b>(%)</b>
2,0	1,8	0,2	10
2,0	1,8	0,2	10
2,0	2,0	0,0	0
3,0	2,7	0,3	10
3,0	2,7	0,3	10
5,0	4,4	0,6	12
5,0	4,3	0,7	14
10,0	10,1	-0,1	-1

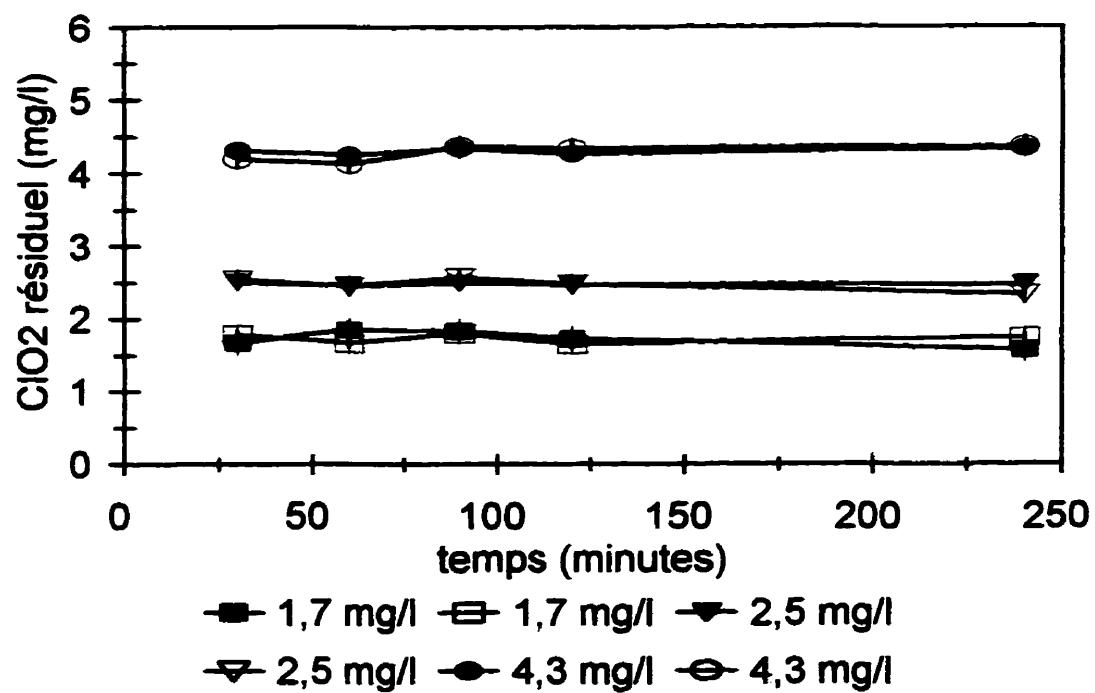
**Tableau IV.2: Pertes de ClO<sub>2</sub> par essai à pH 7,5 pour *B. subtilis***

<b>Concentrations visées</b> <b>(mg/l)</b>	<b>Concentrations obtenues à pH 7,5</b> <b>(mg/l)</b>	<b>Pertes de ClO<sub>2</sub></b>	
		<b>(mg/l)</b>	<b>(%)</b>
2,0	1,7	0,3	15
2,0	1,7	0,3	15
3,0	2,6	0,4	13
3,0	2,6	0,4	13
5,0	4,1	0,9	18
5,0	4,2	0,8	16
5,0	4,2	0,8	16
5,0	4,6	0,4	8

**Tableau IV.3: Pertes de ClO<sub>2</sub> par essai à pH 8,3 pour *B. subtilis***

<b>Concentrations visées (mg/l)</b>	<b>Concentrations obtenues à pH 6,5 (mg/l)</b>	<b>Pertes de ClO<sub>2</sub>, (mg/l) (%)</b>	
2,0	1,8	0,2	10
2,0	1,8	0,2	10
2,0	1,9	0,1	5
3,0	2,6	0,4	13
3,0	2,6	0,4	13
3,0	2,8	0,2	7
5,0	4,2	0,8	16
5,0	4,3	0,7	14
10,0	10,2	-0,2	-2

**ANNEXE V: GRAPHIQUES DES CONCENTRATIONS  
DE ClO<sub>2</sub> RÉSIDUEL POUR  
LA SOUCHE ENVIRONNEMENTALE À pH 7,5 ET 8,3**



**Figure V.1:** Évolution du ClO<sub>2</sub> résiduel dans le temps à pH 7,5, pour la souche environnementale.

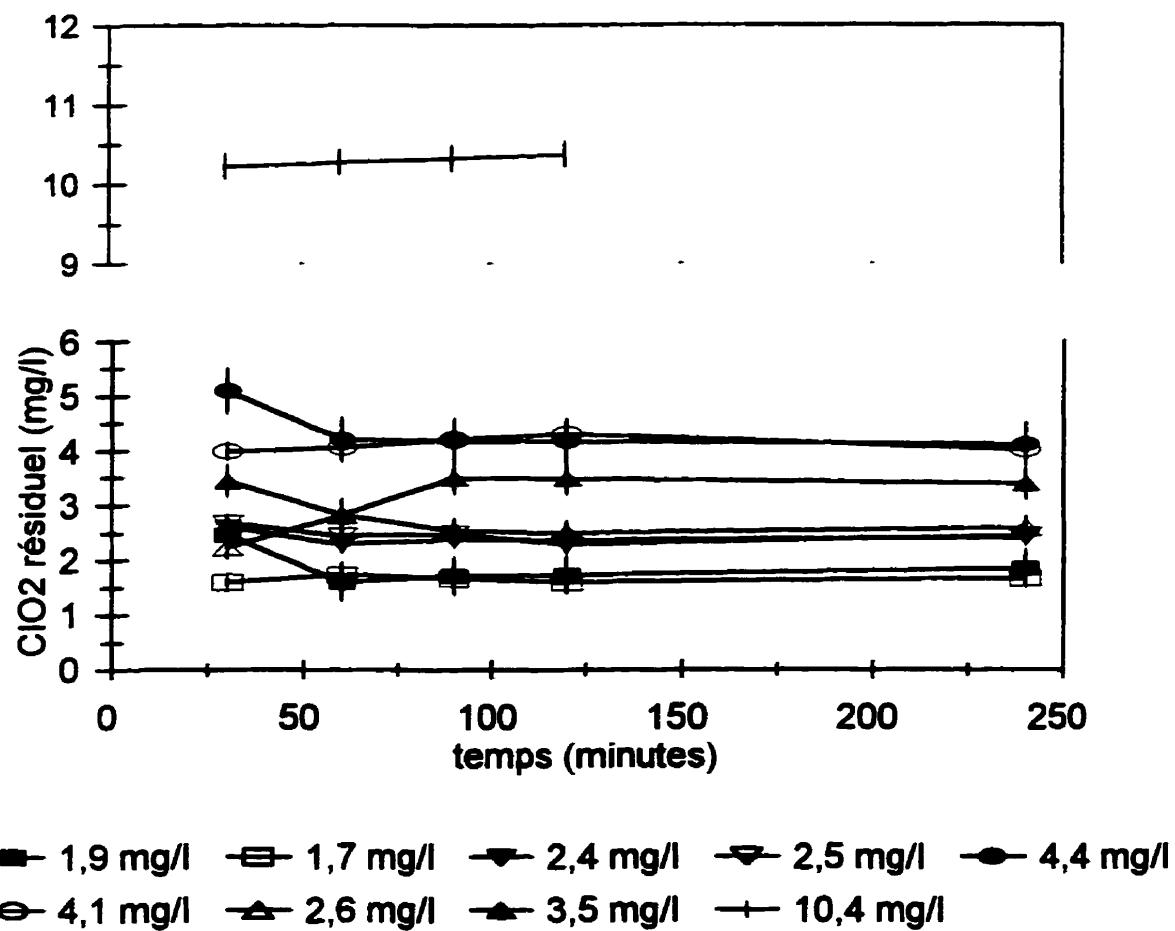


Figure V.2: Évolution du ClO<sub>2</sub> résiduel dans le temps à pH 8,3, pour la souche environnementale.

**ANNEXE VI: PERTES INITIALES DE ClO<sub>2</sub>  
POUR LA SOUCHE ENVIRONNEMENTALE**

**Tableau VI.1: Pertes de ClO<sub>2</sub> par essai à pH 6,5 pour la souche environnementale.**

<b>Concentrations visées (mg/l)</b>	<b>Concentrations obtenues à pH 6,5 (mg/l)</b>	<b>Pertes de ClO<sub>2</sub> (mg/l) (%)</b>	
2,0	1,7	0,3	15
2,0	1,8	0,2	10
3,0	2,6	0,4	13
3,0	2,7	0,3	10
3,0	2,8	0,2	7
4,0	3,6	0,4	10
5,0	4,3	0,7	14
5,0	4,3	0,7	14
10,0	10,4	-0,4	-4

**Tableau VI.2:** Pertes de ClO<sub>2</sub> par essai à pH 7,5 pour la souche environnementale.

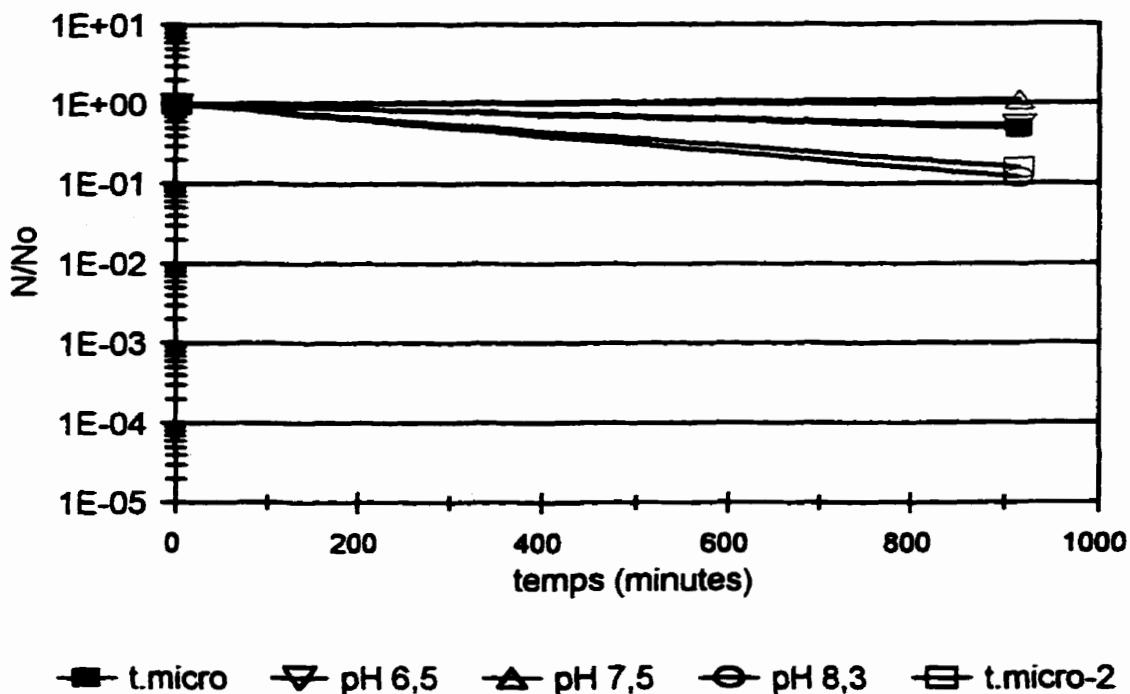
<b>Concentrations visées (mg/l)</b>	<b>Concentrations obtenues à pH 7,5 (mg/l)</b>	<b>Pertes de ClO<sub>2</sub> (mg/l) (%)</b>	
2,0	1,7	0,3	15
2,0	1,7	0,3	15
3,0	2,5	0,5	17
3,0	2,5	0,5	17
5,0	4,3	0,7	14
5,0	4,3	0,7	14

**Tableau VI.3:** Pertes de ClO<sub>2</sub> par essai à pH 8,3 pour la souche environnementale.

<b>Concentrations visées (mg/l)</b>	<b>Concentrations obtenues à pH 6,5 (mg/l)</b>	<b>Pertes de ClO<sub>2</sub> (mg/l) (%)</b>	
2,0	1,7	0,3	15
2,0	1,9	0,1	5
3,0	2,4	0,6	20
3,0	2,5	0,5	17
3,0	2,6	0,4	13
4,0	3,5	0,5	13
5,0	4,1	0,9	18
5,0	4,4	0,6	12
10,0	10,4	-0,4	-4

## ANNEXE VII: TESTS D'AGGLUTINATION

### POUR LA SOUCHE ENVIRONNEMENTALE

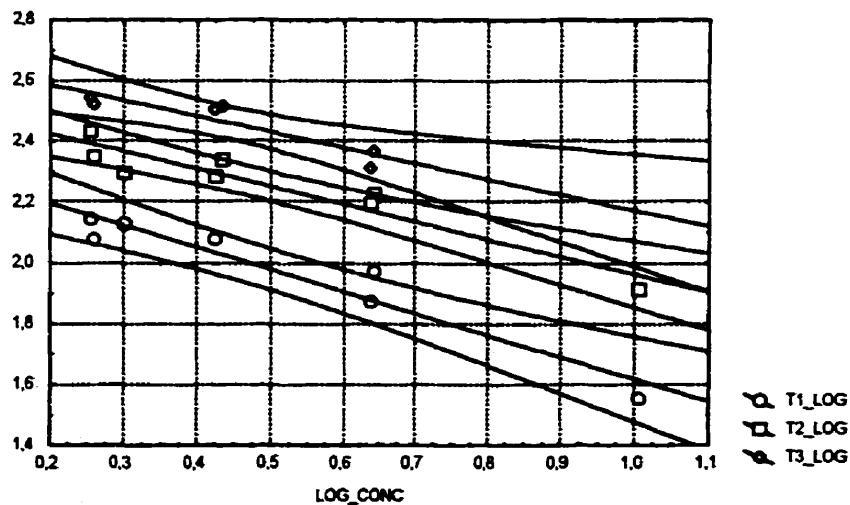


**Figure VII.1:** Courbes d'abattement lors de l'utilisation de différents tampons, sans oxydant.

Note: t.micro, t.micro-2: tampon utilisé lors de l'entreposage des BSA environ à pH 7 (APHA et al., 1992), témoins.

**ANNEXE VIII: INTERVALLES DE CONFIANCE  
DES COURBES DE CT**

Les intervalles de confiance ont été calculés à l'aide du logiciel Statistica version 5.1 pour Windows, de StatSoft, Inc. Les courbes des graphiques sont des régressions linéaires (lignes droites, pleines) accompagnées de leur intervalle de confiance respectif (pointillés). Les intervalles de confiance sont calculés sur la moyenne de chaque groupe de points. Les axes sont le log du temps en ordonnée et le log de la concentration en abscisse. La légende est comme suit: T1\_LOG pour 1 log d'inactivation; T2\_LOG pour 2 log d'inactivation et T3\_LOG pour 3 log d'inactivation.



**Figure VIII.1: Intervales de confiance pour *B. subtilis* à un pH 6,5.**

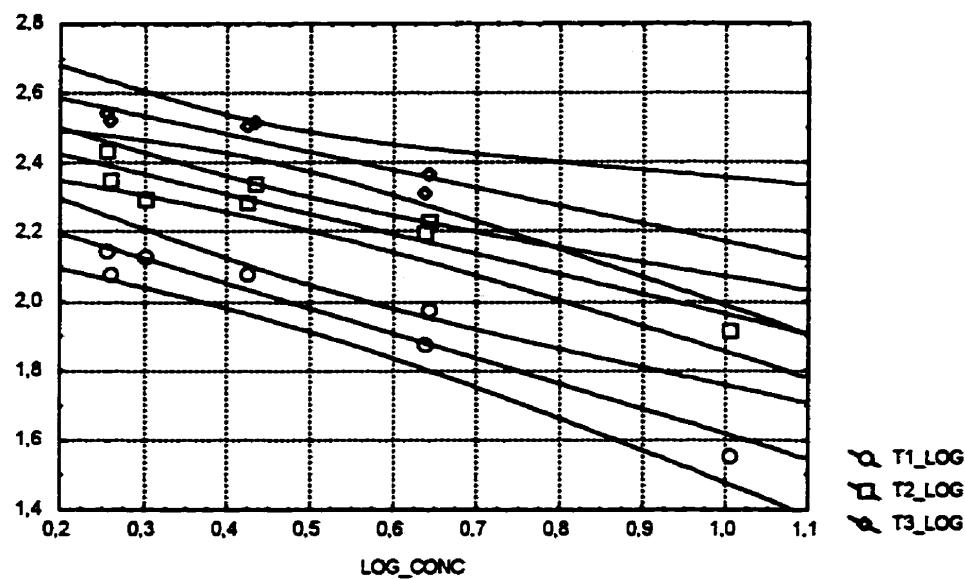


Figure VIII.2: Intervalles de confiance pour *B. subtilis* à un pH 7,5.

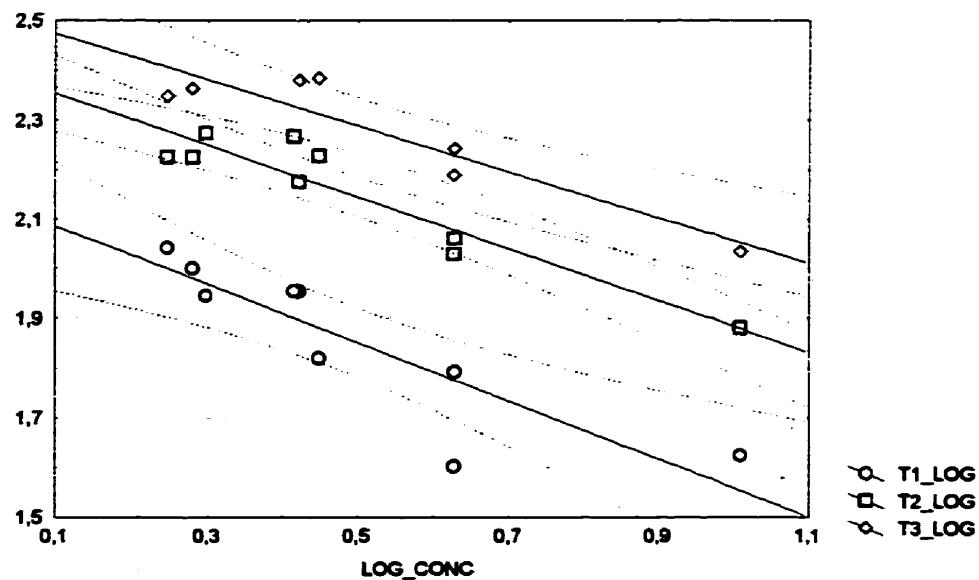
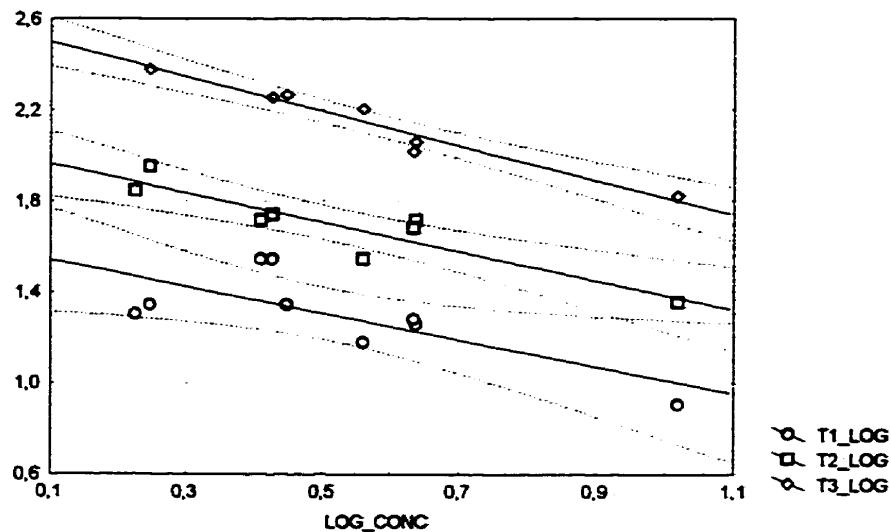
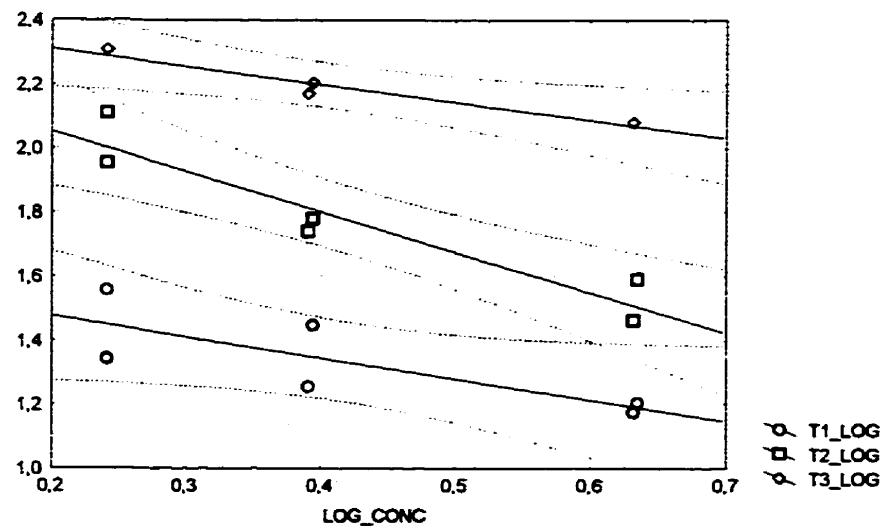


Figure VIII.3: Intervalles de confiance pour *B. subtilis* à un pH 8,3.



**Figure VIII.4:** Intervalles de confiance pour la souche d'origine environnementale à un pH 6,5.



**Figure VIII.5:** Intervalles de confiance pour la souche d'origine environnementale à un pH 7,5.

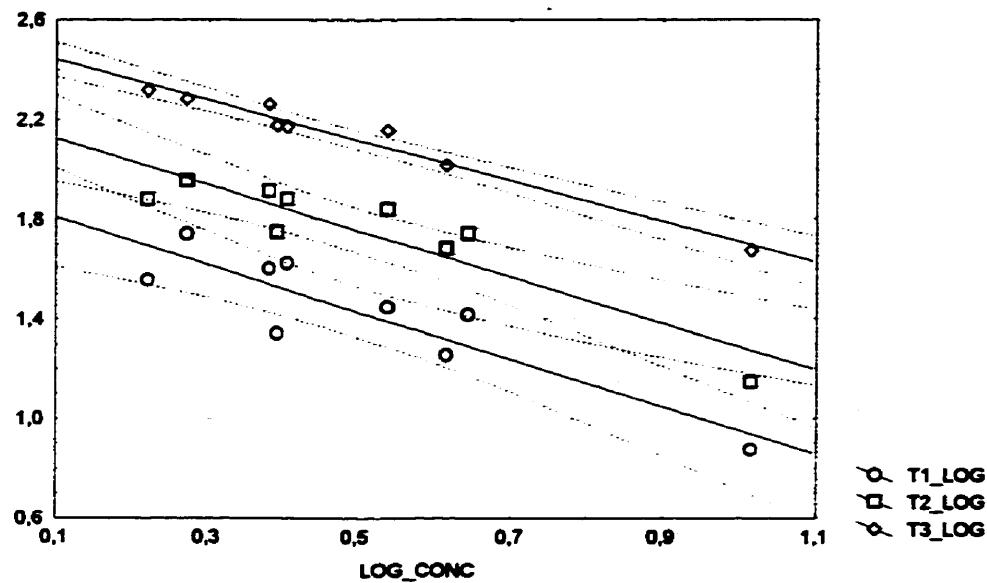


Figure VIII.6: Intervalles de confiance pour la souche d'origine environnementale à un pH 8,3.

### ANNEXE IX: RÉSULTATS BRUTS

Tableau IX.1: Résultats bruts de la souche environnementale à pH 6,5.

Minutes	N	200 ml	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>0</sup>	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	N/No
<b>4,3 mg/l</b>								
0	1950							1
30	40							0,0205
60	15,5							0,00795
90	4,2							0,00215
120	1,6							0,000821
240	0,98	196	42	15,5	4	19,5	1	0,000503
			16	2	2	0		
			2	1,5				
<b>4,3 mg/l</b>								
0	2050							1
30	50							0,0244
60	11							0,00537
90	3,1							0,00151
120	1,25							0,000610
240	1,475	295	31	11	5	20,5	2	0,000720
			12,5	4,5	1,5	0		
			1					
<b>2,7 mg/l</b>								
0	2000							1
30	260							0,13
60	32,5							0,0163
90	20,8							0,0104
120	20,85							0,0104
240	2,12	424	208	32,5	26	20	0,5	0,00106
			208,5	15,5	3,5	2		
			23	23,5				
<b>2,6 mg/l</b>								
0	2550							1
30	370							0,145
60	31							0,0122
90	19,15							0,00751
120	25,3							0,00992
240	2,95		191,5	31	37	25,5	3,5	0,00116
			253	24	1	1,5		
			29,5	18,5				

**Tableau IX.2: Résultats bruts de *B. subtilis* à pH 6,5.**

<b>Minutes</b>	<b>10 ml</b>	<b>10<sup>0</sup></b>	<b>10<sup>-1</sup></b>	<b>10<sup>-2</sup></b>	<b>10<sup>-3</sup></b>	<b>10<sup>-4</sup></b>	<b>N/N<sub>0</sub></b>
<b>4,4 mg/l</b>							
0		24500			24,5	1	1
30		3600		36	4,5		0,147
60		3200		32	4		0,131
90		2700		27	1,5		0,110
120		1400		14	2		0,0571
240		20		0			0,000816
450	16,5	8,25					0,000337
1410	3,5	0,35					1,43E-05
<b>4,3 mg/l</b>							
0		27000			27	4	1
30		5300		53	4		0,196
60		3250		32,5	5		0,120
90		2150		21,5	2		0,0796
120		1600		16	1,5		0,0593
240		5	0,5	0			0,000185
480	21	2,1					7,78E-05
1410	6,5	0,65					2,41E-05
	<b>100 ml</b>	<b>10 ml</b>	<b>10<sup>0</sup></b>	<b>10<sup>-1</sup></b>	<b>10<sup>-2</sup></b>	<b>10<sup>-3</sup></b>	<b>N/N<sub>0</sub></b>
<b>2,7 mg/l</b>							
0			51000			51	1
30			16000		160	12	0,314
60			13450		134,5	12,5	0,264
90			13650		136,5	7,5	0,268
120			9350		93,5	9	0,183
240			280		4		0,00549
480	tnpc	52	5,2				0,000102
1410	473		4,73				9,27E-05
<b>2,7 mg/l</b>							
0			88500			88,5	1
30			22050		220,5	16,5	0,249
60			11050		110,5	16	0,125
90			12800		128	9,5	0,145
120			8600		86	9	0,0972
240			220		22	2	0,00249
480	tnpc	185,5	18,55				0,000210
1410	1550		15,5				0,000175

tnpc: trop nombreux pour compter.