

**Évaluation de la photoréactivation chez *Escherichia coli* et chez les entérocoques
après désinfection des eaux usées par les rayons ultraviolets**

Par
Josée Demers

Mémoire présenté pour l'obtention du grade
de Maître ès sciences (M.Sc.) en Virologie et Immunologie

Jury d'évaluation

Président du Jury et
examineur interne

Richard Villemur, INRS-IAF

Examineur externe

**Marc Sirois, département de
Chimie-Biologie, UQTR**

Directeur de recherche

Pierre Payment, INRS-IAF

Résumé

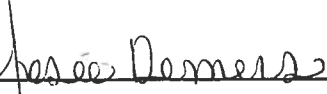
La désinfection par les rayonnements ultraviolets est un moyen efficace de contrôler les microorganismes pathogènes présents dans l'eau usée. Le mécanisme d'action des rayons UV consiste essentiellement à inactiver les microorganismes contenus dans l'eau par une dimérisation des résidus thymines présents dans l'ADN. Certains microorganismes peuvent réparer cette modification de leur ADN par la photoréactivation, un processus qui vise à éliminer directement les lésions formées par les dimères à l'aide de la photolyase. Selon la littérature, seulement quelques espèces de bactéries, dont *E. coli*, sont susceptibles de photoréactivation. Les *E. coli* étant les principaux composants des coliformes thermotolérants, il sont ainsi utilisés comme indicateurs de pollution fécale. Il est donc important que les usines de traitement des eaux usées considèrent cette réactivation potentielle pour répondre aux normes de rejet imposées par le Ministère de l'Environnement (MENV). Présentement, au Québec, un facteur de dix est appliqué pour compenser à la photoréactivation des indicateurs.

Le présent projet visait à évaluer la photoréactivation chez *E. coli* et chez les entérocoques provenant d'une eau désinfectée par rayonnements ultraviolets. Pour les expériences de photoréactivation et afin de reproduire une lumière du jour, les échantillons d'eau ont été placés sous des lampes fluorescentes d'intensités lumineuses de 1600 et de 6000 lux. Les effets de l'intensité et du temps d'exposition à la lumière de photoréactivation, de la température ainsi que l'effet de la dose UV reçue par les microorganismes sur la photoréactivation ont été évalués.

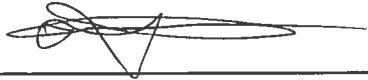
La photoréactivation n'a pas été observée chez les entérocoques et ce, quel que soit l'intensité lumineuse appliquée ou la température. Par contre, les dénombrements d'*E. coli* ont augmenté de façon significative, atteignant un maximum de réactivation de 22 fois sur une période de 6 heures et ce, à une intensité lumineuse élevée (6000 lux). La température influence le niveau de photoréactivation puisque les *E. coli* provenant de l'eau désinfectée maintenue à 4°C ont montré une réactivation inférieure à celle observée

à 25°C. De plus, en augmentant la dose UV appliquée à l'eau, le phénomène de photoréactivation se voyait atténué.

Cette étude a démontré que les *E. coli*, présents dans une eau désinfectée aux UV, sont capables d'effectuer la photoréactivation jusqu'à un facteur de trente fois selon les conditions environnementales, la dose UV appliquée et le type de lampe UV utilisé (lampe au mercure à basse ou moyenne pression). D'après ces observations, une révision du facteur de sécurité utilisé par le MENV s'impose. L'utilisation des entérocoques comme indicateurs de la désinfection pourrait être une alternative intéressante aux coliformes thermotolérants puisque nous n'avons pas observé le phénomène de la photoréactivation chez ceux-ci.



Étudiante



Directeur de recherche

Remerciements

Plusieurs personnes m'ont aidé et supporté tout au long de la réalisation de mon projet de recherche. J'aimerais particulièrement remercier mon directeur de recherche Pierre Payment pour ses connaissances et son encouragement, le personnel du laboratoire : Louise Courtemanche, Martine Caplette et Kathleen Gauthier pour leur aide et leurs conseils ainsi que tous les étudiants : Véronica Martinez, Marie-Christine Hains, Annie Locas, Louise-Michelle Verrier et Simon Paquette. De plus, j'aimerais remercier le personnel des stations d'épuration de Fabreville et de St-Eustache pour leur collaboration et leur aide précieuse lors des échantillonnages.

Table des matières

Résumé	1
Remerciements	3
Table des matières	4
Table des illustrations	6
Liste des abréviations	8
Introduction	9
Chapitre 1 : Revue de la littérature	12
1.1 Eaux usées	13
1.1.1 Microorganismes pathogènes.....	13
1.1.2 Indicateurs de pollution fécale	14
1.2 Traitements des eaux usées	16
1.2.1 Pré-traitements.....	18
1.2.2 Traitements primaires	18
1.2.3 Traitements physico-chimiques	18
1.2.4 Désinfection.....	19
1.3 Désinfection des eaux usées par les rayons UV	21
1.3.1 Lampes	21
1.3.2 Effets germicides	22
1.3.3 Facteurs qui influencent la désinfection.....	24
1.3.4 Avantages et désavantages.....	25
1.3.5 Réactivation des microorganismes.....	26
1.4 Photoréactivation.....	27
1.4.1 Mécanisme.....	27
1.4.2 Microorganismes impliqués.....	28
1.4.3 Facteurs qui influencent la photoréactivation.....	29
1.4.4 Implications	30
Chapitre 2 : Matériel et méthodes.....	31
2.1 Dénombrement des E. coli et entérocoques.....	32
2.1.1 Calcul du niveau de photoréactivation	33

2.2 Essais préliminaires.....	33
2.3 Échantillons.....	33
2.4 Essais de photoréactivation.....	34
2.4.1 Source lumineuse.....	34
2.4.2 Effet du temps d'exposition et de l'intensité.....	35
2.4.3 Effet de la température.....	35
2.4.4 Effet des radiations solaires	35
2.4.5 Effet de la dose UV	36
2.4.6 Effet du type de lampe UV	38
Chapitre 3 : Résultats.....	39
3.1 Essais préliminaires.....	40
3.2 Essais de photoréactivation.....	42
3.3 Effet du temps d'exposition et de l'intensité lumineuse.....	45
3.4 Effet de la température	49
3.5 Effet des radiations solaires	51
3.6 Effet de la dose UV	53
3.7 Effet du type de lampe UV.....	57
Chapitre 4 : Discussion	59
4.1 Essais préliminaires.....	60
4.2 Effet du temps d'exposition et de l'intensité lumineuse.....	60
4.3 Effet de la température	61
4.4 Effet des radiations solaires	62
4.5 Effet de la dose UV	62
4.6 Effet du type de lampe UV.....	64
Conclusions.....	65
Références.....	67

Table des illustrations

Figure 1: Intensité lumineuse observée à l'extérieur en fonction de la période de la journée et selon la condition météorologique.

Figure 2: Intensité lumineuse à la surface d'un échantillon d'eau en fonction de la distance de celui-ci par rapport aux lampes fluorescentes.

Figure 3: Intensité lumineuse en fonction de la profondeur de l'échantillon d'eau avec une distance de 3 cm entre les lampes fluorescentes et l'échantillon.

Figure 4: Essai de photoréactivation d'*E. coli* provenant d'une eau désinfectée par les UV à la station de Fabreville en fonction du temps d'exposition et de l'intensité lumineuse.

Figure 5: Essai de photoréactivation sur une période de 24 heures d'*E. coli* provenant d'une eau désinfectée par les UV à la station de Fabreville en fonction du temps d'exposition et de l'intensité lumineuse.

Figure 6: Essai de photoréactivation des entérocoques provenant d'une eau désinfectée par les UV à la station de Fabreville en fonction du temps d'exposition et de l'intensité lumineuse.

Figure 7: Essai de photoréactivation d'*E. coli* provenant d'une eau désinfectée par les UV à la station de Fabreville en fonction du temps d'exposition à la lumière et de la température de l'eau.

Figure 8: Essai de photoréactivation d'*E. coli* provenant d'une eau désinfectée par les UV à la station de Fabreville en fonction du temps d'exposition à la lumière solaire.

Figure 9: Graphique représentant l'inactivation de MS2 en fonction de la dose UV appliquée à l'aide des lampes UV à faisceaux collimatés du laboratoire.

Figure 10: Niveau de photoréactivation d'*E. coli* provenant d'une eau usée traitée, désinfectée en laboratoire en fonction du temps d'exposition à la lumière de photoréactivation. La dose UV reçue lors de la désinfection était de 17 mJ/cm^2 .

Figure 11: Niveau de photoréactivation d'*E. coli* provenant d'une eau désinfectée en laboratoire en fonction de la dose UV reçue.

Figure 12: Niveau de photoréactivation d'*E. coli* en fonction du temps d'exposition à la lumière et selon le type de lampe utilisé lors de la désinfection.

Liste des abréviations

APHA : American Public Health Association

DBO: Matière organique biodégradable

ECT : Équation de la Courbe Tendance

EPA : Environmental Protection Agency

ER : Exigences de Rejet

MENV : Ministère de l'Environnement du Québec

PAEQ : Programme d'Assainissement des Eaux du Québec

TSA : Trypticase Soy Agar

UFC: Unités Formant des Colonies

UV : Ultraviolet

Introduction

Il est reconnu depuis longtemps que le rejet d'eaux usées a un impact négatif sur l'écosystème du cours d'eau récepteur ainsi que sur la santé publique puisqu'elles sont chargées de polluants chimiques, de matières organiques, de nutriments et de microorganismes pathogènes. Depuis quelques décennies, les municipalités québécoises se sont équipées d'installations permettant l'assainissement des rejets d'eaux usées provenant de la population (Payment, 2003). Ces installations ont comme objectifs généraux d'améliorer et de conserver la qualité des eaux pour satisfaire les besoins de la population, notamment l'approvisionnement en eau potable, les usages et les activités de loisir et de récréation. De plus, elles contribuent au maintien des milieux aquatiques équilibrés qui permettent aux ressources biologiques d'évoluer normalement (PAEQ, 1996). Les stations d'épuration appliquent des traitements de nature physique ou chimique aux eaux usées afin d'en diminuer les polluants. Les stations d'épuration ont comme mandat de diminuer la charge organique, les nutriments et la matière en suspension.

L'eau usée est une source incontestable de microorganismes (virus, bactéries et parasites) dont certains sont pathogènes puisqu'elle comporte les rejets sanitaires de la population. L'eau usée qui est rejetée dans un cours d'eau et qui contient des microorganismes pathogènes constitue un risque pour les populations qui s'y approvisionnent en eau potable, pour les baigneurs et pour les consommateurs de mollusques. Les stations d'épuration ne sont pas toujours en mesure de réduire de façon efficace cette charge en microorganismes pathogènes. (Payment *et al.*, 2000, Payment, 2003)

Le rendement des stations d'épuration est variable selon la nature des traitements appliqués. L'efficacité des différents traitements est mesurée par la réduction de la charge en matière organique biodégradable (DBO), en phosphore, en matière en suspension et par la quantité de coliformes thermotolérants.

Un important projet de recherche dirigé par Pierre Payment portant sur l'enlèvement des microorganismes pathogènes et des bactéries indicatrices par les stations de traitement des eaux usées municipales situées sur la rivière des Mille Îles a été mené au cours des deux dernières années (Payment, 2003). Ce projet visait essentiellement à évaluer les risques microbiens pour les populations utilisant les eaux du St-Laurent ou de ses affluents à des fins récréatives ou pour l'approvisionnement en eau potable (Payment, 2003). Une partie de cette étude avait comme objectif d'évaluer l'efficacité des différents traitements utilisés en traitement des eaux usées. Cette évaluation a été faite à l'aide de bactéries indicatrices dont les coliformes thermotolérants, *Escherichia coli* et les entérocoques qui sont quantifiées à l'affluent ainsi qu'à l'effluent du traitement étudié.

Un des traitements étudiés dans ce projet était celui de la désinfection par les rayons ultraviolets. Ce procédé, utilisé dans plus d'une trentaine de stations, est le traitement final avant le rejet de l'eau usée dans le cours d'eau récepteur. L'évaluation de l'efficacité de la désinfection se fait de façon standard à l'aide des bactéries indicatrices. Par contre, un problème peut survenir lors de l'évaluation de l'efficacité de la désinfection par les rayons UV; *E. coli*, une des bactéries contenues dans le groupe des coliformes thermotolérants, est susceptible de se réactiver suite à une exposition à la lumière visible. Ce phénomène est connu sous le nom de photoréactivation.

La photoréactivation peut être observée chez les microorganismes qui possèdent une enzyme de réparation; la photolyase. Cette enzyme répare, à l'aide de la lumière visible, les dimères de thymines formés dans l'ADN des microorganismes lorsqu'ils ont été exposés aux rayons ultraviolets lors de la désinfection. La photoréactivation peut donc faire revivre des bactéries présentes dans l'eau usée qui ont été inactivées lors de la désinfection par les rayons UV (Gehr et Nicell, 1996, Gehr, Comair et Cairns, 1993). Ce phénomène amène à surestimer la présence de matière fécale dans l'eau et à sous-estimer l'efficacité de la désinfection par les UV. Pour compenser à cette augmentation des bactéries indicatrices, le Ministère de l'Environnement (MENV) utilise un facteur de 10 fois.

Plusieurs études ont montré que le niveau de photoréactivation peut varier en fonction de paramètres tels la dose UV appliquée à l'eau, la température de celle-ci et l'intensité de la lumière de photoréactivation (Oguma, Katamaya et Ohgaki, 2002, Lindenauer et Darby, 1994, Kashimada *et al.*, 1996).

Le projet suivant consistait à évaluer le niveau de photoréactivation d'*E. coli* et des entérocoques en fonction des différents paramètres et de valider le facteur de sécurité de 10 fois employé par le MENV.

Afin d'atteindre les objectifs de cette étude, des essais de photoréactivation sur *E. coli* et sur les entérocoques ont été effectués. Les paramètres étant le temps d'exposition et l'intensité de la lumière de photoréactivation, la température de l'eau, l'exposition aux radiations solaires ainsi que la dose UV reçue. Les bactéries indicatrices ont été isolées par filtration sur membrane selon la méthode standard pour l'analyse de l'eau et de l'eau usée (APHA, 2000).

Chapitre 1 : Revue de la littérature

Essentielle à la vie, l'eau est l'une des ressources naturelles les plus précieuses de la terre. Seule une infime partie de l'eau douce présente sur la planète peut être utilisée pour faire de l'eau potable (König, 2001). Puisque l'eau est une ressource dont le volume est constant, et que l'Homme l'utilise à plusieurs fins, celle-ci doit être traitée afin de pouvoir être réutilisée.

1.1 Eaux usées

Les eaux sont dites usées lorsqu'elles ont été utilisées par l'homme. Celles-ci peuvent être d'origine domestique et comprendre les eaux usées sanitaires et les eaux grises. Les eaux usées sanitaires sont constituées essentiellement d'urine et de matières fécales d'humains tandis que les eaux grises proviennent principalement des tâches ménagères. De plus, les eaux usées peuvent provenir de la pluie, de la fonte des neiges ainsi que des milieux agricoles et industriels. Les eaux usées sont chargées de matières organiques et minérales, de substances nutritives (azote, phosphate), de détergents, de métaux toxiques et de microorganismes (Bitton, 1999). Plusieurs contaminants retrouvés dans ces eaux peuvent nuire grandement à la qualité des plans d'eau récepteurs et par le fait même à la santé publique. Ces eaux doivent donc être traitées avant d'être rejetées dans l'environnement afin d'éviter d'affecter les écosystèmes des cours d'eau récepteurs ainsi que la santé publique.

1.1.1 Microorganismes pathogènes

Les eaux usées contiennent une certaine quantité de matière fécale et celle-ci est la source principale de microorganismes. Plusieurs de ces microorganismes sont pathogènes et peuvent causer des maladies gastro-intestinales (Payment, 2001). Parmi les microorganismes pathogènes présents dans l'eau, on retrouve des bactéries Gram-négatif anaérobies facultatives tels certaines souches d'*Escherichia coli*, *Shigella* et *Vibrio*. Des virus pathogènes (dont le virus de l'Hépatite A, le poliovirus, le réovirus, l'adénovirus, le rotavirus, etc.) ainsi que des parasites pathogènes (*Giardia lamblia* et *Cryptosporidium*

parvum) peuvent aussi être contenus dans la matière fécale et se retrouver dans l'eau usée. Ces derniers ont causé plusieurs épidémies de diarrhées aux États-Unis (Payment, 2001).

Le rejet d'eau usée non-traitée cause une contamination microbienne susceptible de compromettre les écosystèmes des cours d'eau récepteurs. De plus, le rejet d'eau usée non-traitée affecte la sécurité de nombreux usages de l'eau, comme la consommation de mollusques ainsi qu'une multitude d'activités récréatives de contact direct avec l'eau (dont la baignade, le ski nautique et la planche à voile) et de contact indirect avec l'eau (dont la pêche sportive, le canotage et la voile). Sans compter qu'une piètre qualité d'eau brute peut augmenter les difficultés de traitement de l'eau potable (Ministère de l'Environnement du Québec (MEQ), 2003, Payment *et al.*, 2000).

1.1.2 Indicateurs de pollution fécale

Afin de mesurer le niveau de pollution fécale de l'eau, des microorganismes indicateurs sont utilisés. Il est possible d'établir un lien entre la présence d'indicateurs de pollution fécale et celle de microorganismes pathogènes. Pour qu'un microorganisme soit un bon indicateur, il doit remplir plusieurs conditions :

- Il doit être présent lorsqu'il y a présence d'une source de microorganismes pathogènes et absent lorsque l'eau n'est pas contaminée.
- Il doit survivre dans les mêmes conditions environnementales (ex : température et pH) que les microorganismes pathogènes.
- Il ne doit pas se multiplier dans l'environnement.
- Il ne doit pas être pathogène.
- Il doit être présent en plus grand nombre que les pathogènes.
- Il doit être facilement ainsi que rapidement isolable à des coûts abordables.

La présence de l'indicateur dans l'eau, indique la présence de matière fécale potentiellement source de microorganismes pathogènes. Par contre, il n'y a pas de corrélation directe entre le nombre d'indicateurs et la quantité de pathogènes entériques présents dans l'eau (Ashbolt, Grabow et Snozzi, 2001). Une corrélation peut être établie dans des circonstances locales seulement et permet de faire un lien entre une quantité d'indicateurs et une probabilité de retrouver des microorganismes pathogènes (Ashbolt, Grabow et Snozzi, 2001).

Les indicateurs de pollution fécale utilisés sont les coliformes thermotolérants. Les coliformes thermotolérants font partie de la famille des *Enterobacteriaceae* qui contient des bacilles droits Gram-négatifs à flagelles péritriches ou non-mobiles, facultativement anaérobies (Prescott, Harley et Klein, 1995). Le groupe des coliformes thermotolérants comporte toutes les espèces bactériennes qui fermentent le lactose à l'aide de la β -galactosidase à 44,5°C et qui sont présentes dans les intestins d'animaux à sang chaud. Les coliformes thermotolérants comprennent entre autre le genre *Escherichia* et certaines espèces de *Klebsiella*, d'*Enterobacter* et de *Citrobacter*. De ces espèces, seuls les *E. coli* sont d'origine fécale. *E. coli* peut se retrouver dans les fèces humaines, en plus de se retrouver dans celles d'autres mammifères et d'oiseaux. De plus, cette espèce bactérienne laisse présager une pollution fécale récente puisqu'elle ne survie pas longtemps à l'extérieur des intestins de son hôte. Les coliformes thermotolérants autres qu'*E. coli* peuvent être d'origine organique (proviennent de matière végétale en décomposition) et pourraient ainsi être retrouvés dans de l'eau dépourvue de matière fécale (Payment, Waite et Dufour, 2003).

Le genre *Enterococcus* est un sous-groupe des streptocoques fécaux et est aussi présent dans les fèces humaines et animales. Les entérocoques comportent les bactéries en forme de sphère et sont aussi présents dans les fèces humaines et animales. Les entérocoques sont constitués de plusieurs espèces telles *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. durans* et *E. hirae* (Ashbolt, Grabow et Snozzi, 2001). Ces bactéries Gram-positif sont tolérantes au pH alcalin et au chlorure de sodium. La plupart des espèces de ce genre peuvent être indicateurs de pollution fécale (Payment, Waite et Dufour, 2003). Les entérocoques

répondent aux conditions nécessaires énumérées précédemment pour être un bon indicateur (Ashbolt, Grabow et Snozzi, 2001).

Il existe d'autres microorganismes indicateurs de pollution fécale tels *Clostridium perfringens* et les bactériophages. Par contre, ceux-ci ne sont pas utilisés au Québec puisque les méthodes de détection sont plus complexes. Il a été suggéré que ces indicateurs de pollution fécale seraient plus appropriés pour évaluer la présence de parasites et de virus entériques humains (Payment et Franco, 1993). Le groupe entier des coliformes peut être utilisé comme indicateur. Par contre, il n'est pas un indicateur spécifique à la pollution fécale. Le groupe des bifidobactéries peut aussi être utilisé comme indicateur puisque il se compose majoritairement de bactéries qui sont retrouvées dans les fèces des animaux à sang chaud (Ashbolt, Grabow et Snozzi, 2001).

1.2 Traitements des eaux usées

Afin d'éviter les risques reliés au rejet des eaux usées dans les cours d'eau, des stations d'épuration ont été implantées près des grandes municipalités du Québec. Ces stations ont plusieurs objectifs à atteindre en ce qui a trait à la décontamination et à la réduction des charges organiques et inorganiques des eaux usées. Les principaux objectifs des traitements de ces stations consistent en une réduction des charges organiques, particulaires, et phosphore (afin de limiter les risques d'eutrophisation des cours d'eau) et en une réduction des métaux toxiques. De plus, certains traitements des eaux usées ont comme but d'inactiver ou de réduire les microorganismes pathogènes (Bitton, 1999). Les stations d'épuration du Québec doivent rencontrer des normes de rejet fixées par le ministère de l'Environnement. Les exigences de rejet (ER) sont spécifiques à chaque station d'épuration. Celles-ci sont basées sur les contraintes hydrodynamiques du cours d'eau récepteur et sur les usages prévus. Un cours d'eau récepteur peut avoir une vocation récréative ou servir de prise d'eau pour les usines de filtration. Les ER varient selon la saison durant laquelle l'eau est rejetée. Les ER à atteindre sont plus restrictives en période estivale qu'en période hivernale. Cette restriction est expliquée par le fait qu'il y a plus de contacts entre la population humaine et les cours d'eau en saison estivale

(ex : baignade et sport nautique) (Babineau *et al.*, 1999). Les exigences de rejet sont basées sur trois paramètres soit, le nombre de coliformes thermotolérants par 100 ml, la quantité de matières en suspension en mg/L et la quantité de phosphore en mg/L. Pour répondre aux ER, plusieurs traitements peuvent être appliqués aux eaux usées (voir tableau I). Les types de traitements appliqués aux eaux usées sont surtout fonction de la composition de celles-ci et du débit de conception des stations d'épuration. Les stations d'épuration qui sont présentes près des grandes municipalités québécoises sont généralement dotées d'équipements mécanisés qui permettent un traitement à grande échelle des eaux usées c'est-à-dire qu'elles peuvent assurer le traitement des eaux usées des municipalités ayant de grands débits. Ce traitement à grande échelle est habituellement constitué de pré-traitements, de traitements primaires, de traitements secondaires, de traitement tertiaires et de traitements physico-chimiques. D'autres traitements biologiques tels ceux par les boues activées ainsi que par les biofiltres peuvent aussi être appliqués à l'eau usée. Le traitement par les boues activées est un processus qui consiste en une oxydation de la matière organique pour la transformer en CO₂, en H₂O, en NH₄ et en une nouvelle biomasse cellulaire (Bitton, 1999). Le traitement de l'eau usée par les biofiltres consiste en une nitrification, en une oxydation et en une digestion anaérobique de la matière organique. Le traitement par les étangs aérés est celui le plus commun au Québec. C'est un traitement qui abaisse la concentration en matière organique et la quantité de nutriments (azote et phosphore) dans l'eau usée. Ce procédé constitue une alternative peu coûteuse et qui demande moins d'énergie comparativement aux autres traitements (Bitton, 1999).

Type de station	Nombre
Boues activées	26
Biodisques	5
Biofiltres	8
Dégrilleurs	20
Étangs aérés	286
Étangs à rétention réduite	9
Physicochimiques	13
Divers	14

Tableau I : Énumération des différents types de station d'épuration retrouvées au Québec.

(tiré du rapport d'évaluation de performance, Gouvernement du Québec, 2003)

1.2.1 Pré-traitements

Les pré-traitements ont pour objectif principal de minimiser la charge des particules les plus lourdes et les plus grosses présentes dans l'eau usée. Ces particules pourraient être nuisibles lors des traitements ultérieurs. Plusieurs pré-traitements sont appliqués à l'eau usée. Parmi ceux-ci, on retrouve le dégrillage, le dessablage ainsi que le dégraissage. Le dégrillage permet l'élimination des matières flottantes ayant un gros volume. Le dégraissage est essentiel afin de retenir les graisses et huiles rejetées. L'élimination préalable de ces matières permet de limiter le nettoyage des appareils suivants dans la chaîne des traitements et par le fait même, permet l'optimisation de ces traitements ultérieurs.

1.2.2 Traitements primaires

Les traitements primaires sont de nature physique. Ces traitements visent à éliminer de façon importante la matière en suspension présente dans l'eau usée. Habituellement, un traitement primaire consiste en une décantation dans de grands bassins. Lorsque l'eau est traitée dans une station à grand débit, l'efficacité du traitement primaire est optimisée par des traitements physico-chimiques.

1.2.3 Traitements physico-chimiques

Les traitements physico-chimiques visent à optimiser l'élimination des matières en suspension par le traitement primaire. Ces traitements physico-chimiques consistent généralement en une coagulation ainsi qu'une floculation, et sont suivis de la décantation. La coagulation est obtenue à l'aide de l'alun ou du chlorure ferrique qui sont des agents coagulants qui éliminent les forces répulsives entre les différentes particules présentes dans l'eau usée. Pour sa part, la floculation est obtenue à l'aide de polymères tels les polyélectrolytes anioniques qui favorisent l'agglomération des particules préalablement déstabilisées par la coagulation (Bitton, 1999). Le principe de la

décantation repose sur le fait que les agglomérats produits sont suffisamment gros pour permettre, sous l'effet de la gravité, une précipitation et une sédimentation dans un décanteur.

1.2.4 Désinfection

Plusieurs stations d'épuration québécoises traitant un important débit d'eau usée font usage de la désinfection. La désinfection est le traitement final de l'eau usée avant qu'elle soit rejetée dans le cours d'eau récepteur. Un moyen de désinfection de l'eau est considéré efficace selon le Ministère de l'Environnement du Québec, s'il remplit cinq (5) conditions :

- Il doit être efficace contre la plupart des microorganismes pathogènes sous différentes conditions;
- Il doit y avoir absence de sous-produit indésirable formé à la suite de son utilisation;
- La désinfection ne doit pas employer quelconques produits dangereux soit pour les humains et pour la vie aquatique;
- Il doit être un moyen facile à opérer;
- La désinfection doit se faire à faibles coûts d'investissement et d'exploitation.

En principe, il existe plusieurs méthodes de désinfection efficaces des eaux usées mais les seules privilégiées sont la chloration, la chloration-déchloration, l'ozonation et le rayonnement ultraviolet.

La chloration est une technique de désinfection relativement peu coûteuse qui est efficace surtout contre les bactéries, les virus et les parasites (Bitton, 1999, Lehrer et Cabelli, 1993). La chloration peut être faite à l'aide de plusieurs produits tels le chlore gazeux, l'hypochlorite de sodium (eau de javel) et le bioxyde de chlore. Tous ces produits sont

oxydants et nécessitent des manipulations particulièrement sécuritaires de la part des opérateurs. De plus, le chlore résiduel est toxique pour la vie aquatique et certains sous-produits organochlorés tels des chloroamines et des trihalométhanes pourraient être cancérigènes (MEQ, 2003, Bitton, 1999, Kashimada *et al.*, 1996).

La chloration-déchloration emploie le même principe que la chloration seule, par contre, une déchloration par le bioxyde de soufre est effectuées afin d'éliminer la toxicité associée au chlore. Du point de vue environnemental, cette technique est moins nocive que la chloration. Le procédé de la chloration-déchloration nécessite l'usage de plus de produits chimiques et est, par conséquent, plus risquées pour les opérateurs (MEQ, 2003).

L'ozonation est une transformation de l'oxygène de sa forme O_2 en oxygène sous sa forme O_3 . L'ozone est un gaz instable ayant des propriétés oxydantes qui est généré à la station d'épuration au moyen d'une décharge électrique produite dans l'oxygène. L'ozonation est un type de désinfection rapide et efficace contre les microorganismes pathogènes. De plus, la désinfection par l'ozone génère moins de sous-produits indésirables dans l'environnement et est plus sécuritaire que la chloration pour les employés de l'usine. Par contre, l'ozonation est un procédé qui entraîne des coûts élevés d'investissement et d'exploitation (MEQ, 2003).

Au Québec, les seules méthodes de désinfection approuvées sont le rayonnement ultraviolet et l'ozonation. Par contre, seule la désinfection par les UV est utilisée dans les stations d'épuration puisque ses coûts d'exploitation sont moins élevés (MENV, 2003).

1.3 Désinfection des eaux usées par les rayons UV

La technologie de désinfection par rayons UV est employée en traitement des eaux usées municipales du Québec depuis 1986 et une trentaine de municipalités utilisent ce mode de désinfection (Babineau *et al.*, 1999). La désinfection par les rayons ultraviolets est un moyen efficace de contrôler les microorganismes pathogènes présents dans l'eau (MENV, 2003).

1.3.1 Lampes

Les sources de radiations utilisées pour désinfecter l'eau sont constituées de tubes de quartz, lesquels transmettent les rayons UV émis. Ces tubes renferment de la vapeur de mercure qui est ionisée par un courant électrique. Les atomes de mercure sont excités par l'électricité et des radiations ultraviolettes sont émises en réponse au retour de ces atomes à leur état fondamental. Le spectre d'émission des rayons UV se retrouve principalement entre 185 et 400 nm (UVA, UVB et UVC) avec un maximum d'effet germicide qui se situe entre 200 et 300 nm (UVC) (Topas, 2001). Les spectres d'émission et intensité des lampes UV dépendent de la pression du mercure dans les lampes. L'intensité des UV transmise est également fonction du voltage, de la température autour de la lampe, de son âge et de son degré d'encrassement. Le degré d'encrassement est l'accumulation de matière organique et inorganique sur les parois extérieures des lampes.

Les lampes au mercure à basse pression contiennent de la vapeur de mercure sous une pression de moins de 1 mbar et émettent des radiations ultraviolettes dites monochromatiques (König, 2001). Ces radiations, contenues dans la bande la plus germicide, sont de longueur d'onde de 254 nm et sont de plus faible intensité que les rayons émis par les lampes au mercure à moyenne pression. La durée de vie moyenne des lampes au mercure à basse pression se situe autour de 9000 heures et la température optimale est entre 40°C et 50°C (Topas, 2001, Mofidi *et al.*, 2001).

Les lampes au mercure à moyenne pression (1 bar) produisent des rayons UV contenus dans un large spectre de longueurs d'onde (de 185 nm à 400 nm) (König, 2001). Ces lampes sont dites polychromatiques. Les lampes au mercure à moyenne pression nécessitent plus d'énergie que celle à basse pression et ont une durée de vie équivalente au tiers de celle des lampes à basse pression. Leur effet germicide est plus diversifié et les rayons UV produits affectent de façon plus importante les microorganismes, comme on le verra plus loin. La température d'opération optimale des lampes au mercure à moyenne pression se situe entre 600°C et 800°C (Topas, 2001).

Les deux types de lampe au mercure sont utilisés pour la désinfection de l'eau usée au Québec même si plusieurs auteurs rapportent que celle à moyenne pression est plus efficace pour inactiver les microorganismes (Kalisvaart, 2002, Zimmer et Slawson, 2001).

La dose de rayons UV appliquée à l'eau est mesurée en mJ/cm^2 et est le produit de l'intensité de la lampe par le temps d'exposition de l'eau à celle-ci.

1.3.2 Effets germicides

Pour chaque longueur d'onde émise, des photons présentant des énergies spécifiques sont produits. Ces photons sont absorbés par différentes molécules selon leur énergie. Le temps requis pour l'absorption d'un photon par un atome ou une molécule est de 10^{-15} seconde (Kalisvaart, 2002). À 254 nm, les photons qui composent les rayons ultraviolets sont absorbés par les acides nucléiques de l'ADN (ou de l'ARN) des microorganismes présents dans l'eau. Cette absorption a pour effet une dimérisation des résidus thymine qui sont adjacents dans l'ADN ce qui entraîne une stérilisation reproductive des microorganismes. Lors de cette dimérisation, deux résidus thymine adjacents deviennent liés de façon covalente créant ainsi un anneau cyclobutyle (cycle de quatre (4) carbones) (Kalisvaart, 2002, Zimmer et Slawson, 2002). Il semble qu'il puisse aussi se former des dimères de cytosines et thymine-cytosine mais, moins fréquemment (Voet et Voet, 1998). Ces dimères de pyrimidines déforment localement la double hélice d'ADN, de telle façon

qu'elle ne peut plus servir de matrice adéquate à la transcription ni à la réplication. Il a été établi que le nombre de dimères dans l'ADN d'un microorganisme augmente en fonction de la dose UV appliquée (Oguma, Katamaya et Ohgaki, 2002).

Lorsque le spectre de longueurs d'onde des rayons UV est plus large, comme par exemple celui émis par les lampes au mercure à moyenne pression, les protéines et différentes structures de la membrane cellulaire peuvent aussi absorber des radiations et en être altérées. Par exemple, les protéines présentent un large spectre d'absorption dont le plus important est celui qui se situe à 280 nm. Par contre, ce ne sont que les longueurs d'ondes qui sont inférieures à 240 nm qui peuvent être dommageables pour les protéines les empêchant ainsi de remplir leur rôle habituellement vital (Kalisvaart, 2002).

Si des rayons à des longueurs d'onde entre 320 et 400 nm sont émis, il est possible qu'il y ait une excitation des molécules photosensibles à l'intérieur des cellules. Les molécules photosensibles regroupent des riboflavines, des porphyrines, des stéroïdes, les vitamines A et des caroténoïdes (Kalisvaart, 2002). Ces biomolécules produisent des composés actifs (O_2 , H_2O_2 et OH) qui endommagent directement le génome et d'autres molécules (Oguma, Katayama et Ohgaki, 2002).

Les microorganismes ne sont pas tous sensibles de la même façon aux rayons UV. Par exemple, il a été démontré que comparativement à *E. coli*, les virus sont trois (3) fois plus résistants aux rayons ultraviolets et les spores le sont quatre (4) fois plus (EPA, 1999, Shaban, El-Taweel et Ali, 1997). Cette divergence au niveau de la résistance serait le résultat de différences au niveau du génome et de certaines structures de la membrane. Plus le génome est gros, plus le nombre de dimères de thymines doit être important pour l'inactivation d'un microorganisme. C'est ce qui expliquerait que certains virus, comme le poliovirus, soient plus sensibles aux rayons UV que d'autres, comme le réovirus et l'adénovirus (Harris *et al.*, 1987). Des variations du niveau de résistance aux rayons UV sont également observables à l'intérieur d'une même espèce. C'est ce qui a été démontré pour *E. coli* (Tosa et Hirata, 1999).

1.3.3 Facteurs qui influencent la désinfection

Plusieurs facteurs doivent être contrôlés afin d'obtenir une désinfection adéquate de l'eau. Ces facteurs peuvent être soit liés au fonctionnement des lampes UV ou à la qualité de l'eau à désinfecter.

En premier lieu, la dose UV appliquée à l'eau doit être suffisante pour inactiver la quantité voulue de microorganismes. Cette dose est le produit de l'intensité des lampes par le temps d'exposition de l'eau à celles-ci. L'intensité des UV est fonction du nombre de lampes en fonctionnement (Sommer *et al.*, 1997) et de la distance par rapport à celles-ci. L'âge et la température des lampes ont également un impact considérable sur l'intensité des rayons produits (Mackey, Crushing et Wright, 2001). De son côté, le temps d'exposition de l'eau aux lampes UV est fonction du débit qui passe à travers les installations (Wojtenko, Stinson et Field, 2001). En plus de tous ces facteurs, la dose peut être mitigée par une accumulation de matières organiques et inorganiques sur les tubes de quartz des lampes UV ce qui en diminue l'intensité (Wojtenko, Stinson et Field, 2001). Les lampes doivent donc être nettoyées régulièrement afin de limiter le degré d'encrassement. Le nettoyage des lampes peut se faire de façon manuelle ou automatiquement lorsque celles-ci sont dotées d'équipement auto-nettoyant.

La qualité de l'eau à désinfecter influence de façon importante le rendement de la désinfection. La concentration en matières en suspension dans l'eau affecte l'efficacité de la désinfection ; plus la quantité de matières en suspension est élevée, moins la désinfection est efficace puisque plusieurs microorganismes se trouvent à être protégés des rayons UV (Otaki *et al.*, 2003). Ce phénomène est appelé masquage. Les microorganismes ainsi protégés ne sont donc pas inactivés et peuvent continuer à se multiplier (dans le cas des bactéries) lors de leur rejet dans le cour d'eau récepteur (Brown et Gehr, 1998). Différents traitements physiques ou chimiques sont appliqués à la station avant la désinfection afin de diminuer la quantité de matières en suspension.

La transmission UV (en %) joue aussi un rôle essentiel dans l'efficacité de la désinfection. Lorsque la transmission des rayons UV diminue, l'efficacité de la désinfection diminue elle aussi (Bolton et Stefan, 2001). Le pourcentage de transmission des rayons UV se trouve à être diminué lorsqu'il y a présence de matière organique ou de certains composés qui absorbent les rayonnements à la place des microorganismes. Par exemple, le peroxyde d'hydrogène, les ions d'hypochlorite, les sulfates, l'ozone, le fer ainsi que les agents de coloration interfèrent avec la transmission des rayons UV dans la région entre 200 et 300 nm (Bolton et Stefan, 2001). Il a été démontré que la transmission doit être plus grande que 50% pour optimiser le processus de désinfection des eaux usées. Pour ce qui est de la désinfection en vue de la production de l'eau potable, la transmission UV doit être d'au moins 90%. La transmission peut être améliorée grâce aux traitements préalables qui réduisent ou éliminent les composés organiques et inorganiques qui interfèrent avec les rayons UV. Le pourcentage de transmission des rayons UV varie en fonction de la distance entre la lampe et l'eau. Il a été établi que pour les eaux usées, la transmission est généralement acceptable jusqu'à une profondeur de 4 cm. Pour ce qui est de l'eau potable, la transmission est adéquate jusqu'à une profondeur de plus de 10 cm (Bolton et Stefan, 2001).

1.3.4 Avantages et désavantages

La désinfection de l'eau usée par les rayons UV est utilisée au Québec puisqu'elle comporte plusieurs avantages. Dans un premier temps, une station d'épuration qui fait usage de ce type de désinfection ne nécessite pas de réservoir ou d'espace supplémentaire (Chandrakanth *et al.*, 2001, Wojtenko, Stinson et Field, 2001). L'eau à désinfecter passe entre les tubes des lampes dans un canal et ne requiert pas de temps de rétention.

De plus, une désinfection par les rayons UV ne requiert pas l'utilisation de produits chimiques. Ce point est particulièrement intéressant, car il rend la désinfection beaucoup plus sécuritaire tant au niveau de la santé des opérateurs que du public car il n'y a pas de manipulation ni de transport de produits dangereux (Wojtenko, Stinson et Field, 2001). Étant donné qu'il n'y a pas d'ajout de produits chimiques, la désinfection par

rayonnement UV ne modifie aucunement les caractéristiques physico-chimiques de l'eau et n'engendre pas d'odeurs désagréables (Chandrakanth *et al.*, 2001, Wolfe, 1990). Il a également été démontré que les radiations UV utilisées lors de la désinfection n'entraînent pas d'effet génotoxique sur les hépatocytes de rats (Haider *et al.*, 2001).

La désinfection par rayonnement UV est un moyen parmi les plus économiques (Wojtenko, Stinson et Field, 2001, Babineau *et al.*, 1999) et est efficace pour l'inactivation d'un large spectre de microorganismes comprenant les plus résistants tels les spores de bactéries et le rotavirus (Wojtenko, Stinson et Field, 2001).

Par contre, ce mode de désinfection comporte quelques désavantages. La dose UV reçue par les microorganismes présents dans l'eau n'est pas nécessairement celle qui a été appliquée. Tel que mentionné précédemment, plusieurs facteurs peuvent interférer avec les rayonnements UV. Des traitements préalables sont donc nécessaires afin de maximiser le pouvoir désinfectant des rayons ultraviolets. Dans un deuxième temps, les lampes au mercure requièrent une maintenance régulière afin d'éviter des accumulations organiques et inorganiques sur celles-ci. Finalement, certains microorganismes sont capables de se réactiver en réparant les dommages causés par les rayons UV à leur ADN (Wojtenko, Stinson et Field, 2001).

1.3.5 Réactivation des microorganismes

Étant donné que les microorganismes ont longtemps été exposés aux radiations ultraviolettes du soleil, certains ont acquis des mécanismes de réparation pour compenser aux dommages causés à leur ADN (Zimmer et Slawson, 2001). Il a été estimé que ceux-ci peuvent réparer, à l'aide de différentes enzymes, jusqu'à 90% des dimères de thymine formés suite à une exposition aux rayons ultraviolets à une longueur d'onde de 254 nm (Kalisvaart, 2002). Ces microorganismes peuvent réparer leur ADN par excision des nucléotides (ou réparation à la noirceur). Ce phénomène ne requiert pas de lumière et consiste essentiellement en l'élimination des nucléotides altérés par une endonucléase de réparation. Une polymérase intervient ensuite pour reconstruire la partie manquante du

brin et le tout est restauré par une ligase (Lodish *et al.*, 1997). Ce type de réparation est beaucoup moins important que la photoréactivation (ou réactivation à la lumière) et nécessite beaucoup plus d'énergie de la part de l'organisme puisqu'il emploie une variété d'enzymes nécessitant la transformation de plusieurs nutriments.

Certains microorganismes ont acquis un mécanisme de réparation moins coûteux en énergie, celui de la photoréactivation.

1.4 Photoréactivation

1.4.1 Mécanisme

Le mécanisme principal de la photoréactivation est une monomérisation directe des dimères de thymines réalisée par la photolyase (ou enzyme de photoréactivation). La photolyase est une enzyme monomérique ayant un poids moléculaire se situant entre 55 et 65 kDa (Voet et Voet, 1998). Le processus de photoréactivation requiert l'énergie de la lumière qui se situe entre 300 et 500 nm et s'effectue en deux étapes (Zimmer et Slawson, 2001, Lindenauer et Darby, 1994).

La première consiste en la formation d'un complexe enzyme-dimère et ne dépend pas de la lumière. La génération du complexe est réversible mais la cinétique de formation est favorisée. Le taux de formation de complexes peut varier en fonction du pH, de la température et des forces ioniques. La quantité de photolyases dans le microorganisme est le facteur limitant de cette étape et cette quantité varie d'un organisme à l'autre (Lindenauer et Darby, 1994). Par exemple, chaque cellule d'*Escherichia coli* comporte entre dix (10) et (20) photolyases et chacune d'entre elle peut réparer environ cinq (5) dimères de thymines par minute (Burger, Raymer et Bockrath, 2002, Zimmer et Slawson, 2001).

La deuxième étape est celle qui nécessite l'énergie lumineuse. La photolyase est une enzyme qui comporte des chromophores et qui fait partie de la famille des flavoprotéines. Ces chromophores sont des groupements chimiques (N⁵-N¹⁰-méthényltétrahydrofolate) qui captent les photons de la lumière qui se situe dans le spectre de longueurs d'onde compris entre 300 et 500 nm. En captant l'énergie lumineuse, les chromophores transfèrent l'énergie d'excitation à un FADH⁻ qui est lié de façon non-covalente. L'électron superflu est transféré au dimère de thymine et est ensuite transporté de carbone en carbone faisant ainsi le tour du dimère (anneau cyclobutyle) ce qui brise les liens covalents entre les deux résidus thymine. L'électron revient finalement vers le chromophore de la photolyase qui se détache pour aller faire son travail sur un autre dimère sur le brin d'ADN (Voet et Voet, 1998, Christine *et al.*, 2002). Les deux résidus redeviennent alors séparés et le microorganisme peut alors se multiplier normalement.

1.4.2 Microorganismes impliqués

Seulement quelques espèces de microorganismes pouvant être retrouvés dans l'eau sont capables d'effectuer la photoréactivation. Parmi ces espèces, on retrouve le groupe des coliformes thermotolérants (Kashimada *et al.*, 1996, Lindenauer et Darby, 1994) dont *Escherichia coli* (Kalisvaart, 2002, Sommer *et al.*, 2001, Tosa et Hirata, 1999, Lindenauer et Darby, 1994, Sommer *et al.*, 2000), *Klebsiella pneumoniae* (Hancock et Davis, 1999), *Citrobacter freundii* (Hancock et Davis, 1999) et *Enterobacter cloacae* (Hancock et Davis, 1999). Il a été démontré que la photoréactivation permet aux coliformes thermotolérants de se réactiver et d'augmenter leur croissance jusqu'à un facteur de 3 log (Harris *et al.*, 1987). Par contre, d'autres études ont montré que les coliformes thermotolérants se photoréactivent jusqu'à un facteur de 1 log seulement (Gehr et Nicell, 1996). Certains auteurs ont observé le phénomène de la photoréactivation chez les entérocoques (Harris *et al.*, 1987), alors que d'autres n'en ont pas rapporté (Lindenauer et Darby, 1994). Chez d'autres microorganismes comme *Cryptosporidium parvum* (Kalisvaart, 2002), les virus (Kalisvaart, 2002), *Clostridium perfringens* (Lindenauer et Darby, 1994) et les phages MS2 (Kalisvaart, 2002), la photoréactivation n'a pas été observée. Le fait qu'un microorganisme puisse être photoréactivé ou non dépend du fait

qu'il possède ou non la photolyase. De plus, le niveau de photoréactivation peut varier d'un organisme à l'autre et cette variation est fonction du nombre de molécules de photolyases. Les résultats de photoréactivation obtenus par les différentes études sont très divergents et les résultats sont difficiles à comparer étant donné le peu de documentation à ce sujet et puisque les expériences n'ont pas été effectuées uniformément.

1.4.3 Facteurs qui influencent la photoréactivation

Certains facteurs ont été identifiés comme faisant varier le niveau de photoréactivation des microorganismes. Par exemple, la dose lumineuse reçue est déterminante pour le niveau de réactivation. La photoréactivation augmente en fonction de la dose de la lumière de photoréactivation et n'atteint pas de sommet sur une période de vingt-quatre (24) heures (Lindenauer et Darby, 1994). Le temps d'exposition à la lumière aurait plus d'influence que l'intensité de celle-ci sur le niveau de photoréactivation. Ce phénomène s'explique par le fait que la fréquence d'attachement de la photolyase aux dimères est le facteur limitant de la réaction. Plus le temps d'exposition est long, plus les photolyases peuvent s'associer et se dissocier des dimères et ainsi réparer les dommages de l'ADN causés par les rayons UV (Oguma, Katayama et Ohgaki, 2002).

Enfin, plusieurs études démontrent que la dose UV appliquée aux microorganismes a un impact majeur sur le degré de photoréactivation. Le phénomène de photoréactivation est atténué lorsque la dose UV augmente (Kashimada *et al.*, 1996, Lindenauer et Darby, 1994). Ce phénomène peut s'expliquer par le fait que plus la dose UV augmente, plus il y a formation de dimères de thymines ce qui rend la réparation plus difficile.

La température pourrait aussi jouer un rôle dans le processus de photoréactivation puisque pour la majorité des enzymes, une augmentation de température entraîne un accroissement de la cinétique.

Étant une enzyme, la photolyase est également influencée par le pH du milieu ou celui de la bactérie. Le pH agit sur plusieurs facteurs : (1) la liaison du substrat à l'enzyme, (2) l'activité catalytique de l'enzyme, (3) l'ionisation du substrat, et (4) les variations de la structure de l'enzyme (Voet et Voet, 1998).

1.4.4 Implications

Au Québec, le Ministère de l'Environnement exige des usines de traitement des eaux qui utilisent la désinfection par les rayons UV, qu'elles tiennent compte d'un facteur de dix (10) pour compenser à la photoréactivation. Autrement dit, les usines d'épuration doivent désinfecter l'eau usée afin d'obtenir dix fois moins de coliformes thermotolérants que la quantité permise par le Ministère de l'Environnement. Or, étant donné qu'*E. coli* compose le groupe des coliformes thermotolérants à 90% et que ceux-ci sont présentement utilisés comme indicateurs de pollution fécale, la photoréactivation est la cause d'une surestimation de la quantité de pollution fécale présente dans l'eau (Zimmer et Slawson, 2001). Le phénomène de la photoréactivation d'*E. coli* n'est pas représentatif de ce qui se passe chez les autres microorganismes présents dans l'eau.

Chapitre 2 : Matériel et méthodes

2.1 Dénombrement des *E. coli* et entérocoques

Afin de déterminer le niveau de photoréactivation selon les différentes conditions testées, il a été nécessaire de dénombrer *E. coli* et les entérocoques. Pour ce faire, différentes dilutions des échantillons ont été filtrées sur des membranes de nitrocellulose ayant des pores de 45 µm (Millipore #9004-70-0). La technique de filtration sur membrane a été effectuée selon la méthode standard pour l'analyse de l'eau et de l'eau usée (APHA, 2000). Les membranes ont ensuite été transférées sur des milieux de culture gélosés spécifiques à *E. coli* et aux entérocoques.

Le milieu de culture utilisé pour énumérer *Escherichia coli* était le mTEC (Difco #233410). Ce milieu contient suffisamment de nutriments pour supporter la croissance d'*E. coli* et il comprend différents sels qui inhibent la croissance des bactéries Gram-positif. Les membranes apposées sur ce milieu ont été incubées une (1) heure à 35°C afin de restaurer les bactéries qui auraient pu être stressées lors des différentes manipulations. Ensuite, la membrane et le milieu ont été incubés pendant 22 heures à 44,5°C, température servant à inhiber la croissance des coliformes non-thermotolérants. Suite à cette incubation, une autre sélection a été faite avant le compte des colonies. Les membranes ont été transférées sur des tampons (Millipore #AP1004750) saturés de solution d'urée (Difco #0190-17) pour identifier *E. coli*. Les bactéries autres qu'*E. coli* qui sont susceptibles d'être retrouvées sur la membrane possèdent une enzyme qui dégrade l'urée, l'uréase. La dégradation de l'urée crée un environnement alcalin qui devient mauve (Difco manual, 2000). Les colonies qui sont demeuré jaunes ou brunâtres ont été comptées comme faisant partie d'*E. coli*. Le nombre de colonies est équivalent à la quantité d'unités bactériennes présentes dans l'échantillon filtré et ce nombre a été rapporté en UFC (unités formant des colonies) par 100 ml d'eau.

Le milieu de culture utilisé pour isoler les entérocoques était le mE (Difco #233320). Ce milieu est hautement spécifique et contient tous les éléments essentiels à la croissance des entérocoques. Il contient de l'acide nalidixique et de l'azide de sodium qui inhibent la croissance des bactéries Gram-négatif (Difco manual, 2000). Les membranes ont été

apposées sur ce milieu et ont été incubées de 22-24 heures à 41°C. Ce sont les colonies bleues qui ont été dénombrées et rapportées en UFC/100 ml d'eau.

2.1.1 Calcul du niveau de photoréactivation

Le niveau de photoréactivation a été calculé en comparant le nombre de colonies par 100 ml d'eau dénombré à un temps donné (N) par rapport au nombre de colonies observé au temps zéro (N_0). Toutes les données obtenues ont été compilées et traitées à l'aide du logiciel Microsoft Excel.

2.2 Essais préliminaires

Lors des différents essais, tous les paramètres étaient contrôlés afin de reproduire les conditions environnementales retrouvées dans le cours d'eau récepteur lors du rejet de l'eau désinfectée.

Des essais préliminaires ont été effectués afin de connaître les intensités lumineuses observées dans l'environnement selon différentes conditions météorologiques. Les intensités ont été mesurées à l'aide d'un luxmètre (VWR Scientific #62344-944). Les mesures ont été prises à toutes les heures, soit de 6 à 21 heures, pendant 10 jours (entre le 4 et le 18 juin 2002) et ont été compilées selon le type de journée (ensoleillée ou nuageuse). Ces mesures ont permis d'établir les intensités lumineuses avec lesquelles les essais de photoréactivation ont été effectués soit celles de 1600 lux et de 6000 lux.

2.3 Échantillons

Les échantillons d'eau usée ont été obtenus aux stations d'épuration de Fabreville et de St-Eustache sur les périodes de juin à août 2002 et de février à mars 2003. Ces deux stations n'utilisent pas le même type de lampes UV pour la désinfection de l'eau. La station de Fabreville désinfecte l'eau avec des lampes UV au mercure à moyenne pression

tandis que la station de St-Eustache utilise des lampes UV à basse pression. Dans les deux cas, l'eau a été prélevée à l'effluent de la station et celle-ci était désinfectée ou non. Les eaux désinfectée et non-désinfectée ont été prélevées à l'aide de deux (2) bouteilles de plastique de quatre (4) litres préalablement stérilisées. Les bouteilles étaient enveloppées de papier d'aluminium afin de garder leur contenu à l'obscurité. La dose UV appliquée à l'eau et la transmittance de l'eau ont été notées à chaque visite à la station. Suite à l'échantillonnage, l'eau était rapidement transportée jusqu'au laboratoire (15 minutes) dans une glacière afin de garder sa température constante.

2.4 Essais de photoréactivation

Les essais de photoréactivation ont été effectués sous des conditions se rapprochant le plus possible de celles observées dans l'environnement. De plus, toutes les expériences ont été effectuées en triplicata.

2.4.1 Source lumineuse

Pour simuler la lumière du jour, deux (2) lampes fluorescentes "Daylight Deluxe" (40W, 48", *Sylvania* modèle F40T12-DX) produisant une lumière comprenant les longueurs d'onde de 400 à 700 nm ont été utilisés. L'intensité de la lumière a été modifiée en faisant varier la distance entre les lampes fluorescentes et les échantillons. Des mesures de l'intensité lumineuse ont été prises en faisant varier la distance entre un échantillon et les lampes fluorescentes (voir figure 2). Ces mesures ont permis de déterminer la distance idéale de l'échantillon par rapport aux lampes afin d'obtenir les intensités lumineuses désirées (1600 et 6000 lux). De plus, des mesures de l'intensité lumineuse ont été prises en faisant varier la profondeur d'un échantillon d'eau permettant ainsi de déterminer la profondeur appropriée pour obtenir une intensité lumineuse uniforme (voir figure 3). Pour les expériences de photoréactivation, des échantillons de 500 ml ont été placés à découvert, dans des bols de pyrex, à quatre (4) et 35 cm sous les lampes. Ces

échantillons étaient sous agitation constante sur une plaque agitatrice afin de simuler le brassage de la rivière.

2.4.2 Effet du temps d'exposition et de l'intensité

Afin de vérifier l'effet de l'intensité de la lumière de photoréactivation sur le niveau de réactivation, les échantillons d'eau désinfectée à Fabreville ont été exposés dans des contenants de pyrex à grande ouverture de 1 litre à une forte intensité (6000 lux) et à une faible intensité lumineuse (1600 lux) tout en étant sous agitation constante. Un échantillon témoin a été conservé à l'obscurité pour évaluer le niveau de réactivation à la noirceur et celui-ci était aussi sous agitation constante. Des prélèvements de 100 ml de chaque échantillon ont été effectués à 0, 2, 4 et 6 heures pour vérifier l'effet du temps d'exposition de l'eau désinfectée à la lumière sur le niveau de photoréactivation.

2.4.3 Effet de la température

Pour déterminer l'influence de la température sur la photoréactivation d'*E. coli*, de l'eau désinfectée provenant de la station d'épuration de Fabreville a été placée dans des contenants de pyrex à grande ouverture de 1 litre sous les lampes fluorescentes afin d'obtenir une forte intensité (6000 lux). Lors de cette expérience, deux températures ont été testées, soit 4°C et 25°C. L'échantillon à 4°C était gardé sur un bain de glace. Deux échantillons témoins (4°C et 25°C) étaient toujours gardés à l'obscurité et tous étaient sous agitation constante. Des prélèvements de 100 ml de chaque échantillon ont été effectués à 0, 2, 4 et 6 heures pour obtenir une cinétique de la photoréactivation d'*E. coli* en fonction de la température de l'eau.

2.4.4 Effet des radiations solaires

Certains auteurs ont rapporté que les longueurs d'onde de 310 à 400 nm émises le soleil étaient dommageables pour l'ADN des microorganismes, il était alors pertinent de

vérifier l'effet de ces radiations sur la photoréactivation d'*E. coli*. Pour ce faire, un échantillon d'eau désinfectée à Fabreville a été placé dans un contenant de pyrex à grande ouverture de 1 litre sous le soleil à l'extérieur pour une période de 6 heures à une température de 25°C. Un autre échantillon a été gardé à l'obscurité sous les mêmes conditions. Des prélèvements de 100 ml de chaque échantillon ont été effectués à 0, 2, 4 et 6 heures pour obtenir une cinétique de la photoréactivation.

2.4.5 Effet de la dose UV

Afin de vérifier l'effet de la dose UV reçue par *E. coli* sur la photoréactivation, une désinfection de l'eau en laboratoire a été effectuée. L'eau non-désinfectée utilisée lors de ces essais provenait de l'affluent des lampes UV de la station de Fabreville. En désinfectant l'eau en laboratoire, il a été possible de déterminer, en fonction de différents paramètres, la dose réelle reçue par les microorganismes et ainsi établir une cinétique de la photoréactivation d'*E. coli* en connaissant la dose exacte de rayons UV reçue.

Le module utilisé en laboratoire était constitué de deux lampes au mercure à basse pression de 48" (75 W) fournis par Trojan et de tubes collimateurs. Ces tubes collimateurs, longs de 66 cm et ayant un diamètre de 10 cm, étaient nécessaires afin de produire des faisceaux collimatés qui étaient dirigés de façon perpendiculaire et parallèle sur les échantillons. L'intérieur de ces tubes était recouvert de carton noir afin de minimiser la réflexion des rayons.

Lors de la désinfection, les échantillons étaient placés sous les faisceaux collimatés de rayons UV dans des Petri de plastique ouverts (9 cm de diamètre). Les échantillons étaient sous agitation constante sur des plaques agitatrices. L'intensité des rayons UV émis étant constante, c'est le temps d'exposition qui a été modifié pour faire varier la dose appliquée aux échantillons. L'intensité des rayons UV a été mesurée à l'aide d'un radiomètre (International light #IL1400) et était enregistrée tout au long de la désinfection pour s'assurer de sa constance. La dose réelle reçue par les échantillons a été calculée en

tenant compte des différents paramètres tels l'absorbance de l'échantillon, sa profondeur, un facteur Petri (facteur de compensation de la non-uniformité de l'intensité à la surface du Petri) et le temps d'exposition selon l'équation suivante :

$$I \times t \times P = \frac{1 - 2,718282^{-(A \times D)}}{A \times D}$$

où,

I = Intensité des UV (mW/cm²)

t = Temps d'exposition (sec)

P = Facteur Pétri

A = Absorbance de l'échantillon (cm⁻¹)

D = Profondeur de l'échantillon (mm)

(Zimmer *et al.*, 2002)

Une validation de l'appareil a été effectuée en réalisant une courbe dose-réponse avec des bactériophages MS2 (voir Appendice A; graphique 4). L'énumération des bactériophages exposés à différentes doses UV a été effectuées selon la méthode 1602 pour l'analyse de l'eau et de l'eau usée (U.S Environmental Protection Agency, 2001). Lors de cette étape, les différentes dilutions de bactériophages irradiés ont été mélangées à de l'agar inoculé d'*E. coli* en phase logarithmique. Les mélanges ont ensuite été versés sur des Pétri contenant du TSA (Trypticase Soy Agar) 1,5% solidifié. Le tout a été incubé à 37°C pendant 16 heures. Les plages de lyses ont été énumérées et le nombre de bactériophages a été rapporté par ml. L'expérience de l'inactivation de MS2 par les UV a été répétée trois (3) fois afin de s'assurer de la constance et de la reproductibilité de la désinfection par la lampe UV à faisceaux collimatés du laboratoire.

Des essais de photoréactivation d'*E. coli* ont été effectués en appliquant une dose UV connue aux échantillons. Ces essais ont permis de déterminer la cinétique de la photoréactivation d'*E. coli* en connaissant la dose exacte reçue par les bactéries. La dose reçue par les bactéries était de 17 mJ/cm². Les échantillons désinfectés ont été mis sous les lampes fluorescentes ainsi qu'à l'obscurité et des prélèvements de 100 ml ont été effectués à 0, 2, 4 et 6 heures.

Afin de vérifier l'effet de la dose UV sur la photoréactivation d'*E. coli*, des échantillons d'eau pris à l'affluent des lampes UV à la station de Fabreville ont été exposés à différentes doses UV à l'aide de la lampe UV à faisceaux collimatés du laboratoire. Ces doses étaient de 0, 6, 12, 18 et 24 mJ/cm². Suite à la l'exposition aux rayons UV, les différents échantillons ont été placés sous les lampes fluorescentes (6000 lux) et à l'obscurité pour une période de 6 heures. Des prélèvements ont été effectués à 0, 2, 4 et 6 heures pour établir une cinétique de la photoréactivation d'*E. coli* en fonction de la dose UV reçue.

2.4.6 Effet du type de lampe UV

Pour cette expérience, dont l'objectif était de vérifier l'effet du type de lampe utilisé lors de la désinfection sur la photoréactivation d'*E. coli*, des échantillons d'eau désinfectée ont été prélevés à la station de Fabreville ainsi qu'à la station de St-Eustache.

Chapitre 3 : Résultats

3.1 Essais préliminaires

Les courbes de la figure 1 sont le résultat des observations des différentes intensités lumineuses retrouvées dans l'environnement entre le 4 et le 18 juin 2002. Le maximum d'intensité lumineuse atteint lors d'une journée ensoleillée a été d'environ 115000 lux et de 40000 lux pour une journée nuageuse. Ces sommets ont été atteints à 12 heures. Les essais préliminaires ont été effectués afin de connaître les intensités lumineuses présentes dans l'environnement nous permettant ainsi de reproduire les conditions retrouvées dans le cours d'eau récepteur.

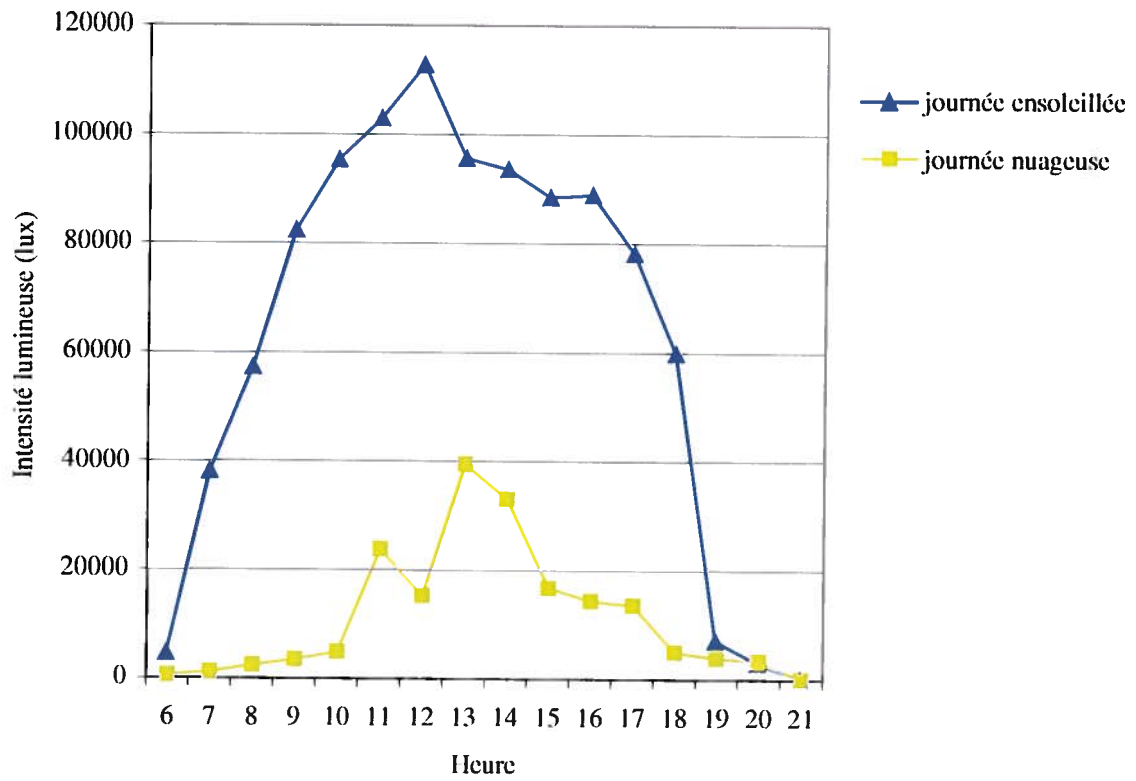


Figure 1: Intensité lumineuse observée à l'extérieur en fonction de la période de la journée et selon la condition météorologique.

3.2 Essais de photoréactivation

La figure 2 montre que l'intensité lumineuse émise par les lampes fluorescentes utilisées lors des essais de photoréactivation diminue lorsque la distance de l'échantillon augmente (Équation de la courbe de tendance (ECT) : $y = -144,35x + 6615,4$). Pour obtenir les intensités lumineuses désirées (1600 et 6000 lux), les échantillons d'eau ont dû être placés respectivement à quatre (4) et 35 cm sous les lampes.

La courbe de la figure 3 illustre l'intensité lumineuse émises par les lampes en fonction de la profondeur de l'échantillon d'eau. Lors de ces essais, la distance entre les lampes et l'échantillon était de 3 cm et l'intensité lumineuse était mesurée sous l'échantillon. Selon ce graphique, l'intensité lumineuse reçue par l'échantillon d'eau diminue lorsque la profondeur de celui-ci augmente.

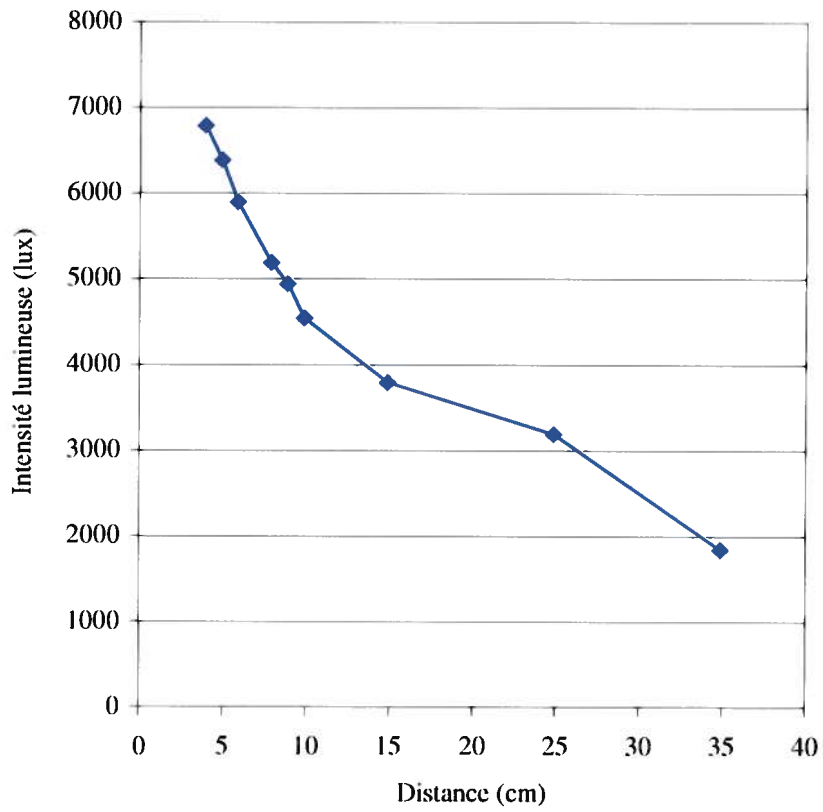


Figure 2: Intensité lumineuse à la surface d'un échantillon d'eau en fonction de la distance de celui-ci par rapport aux lampes fluorescentes.

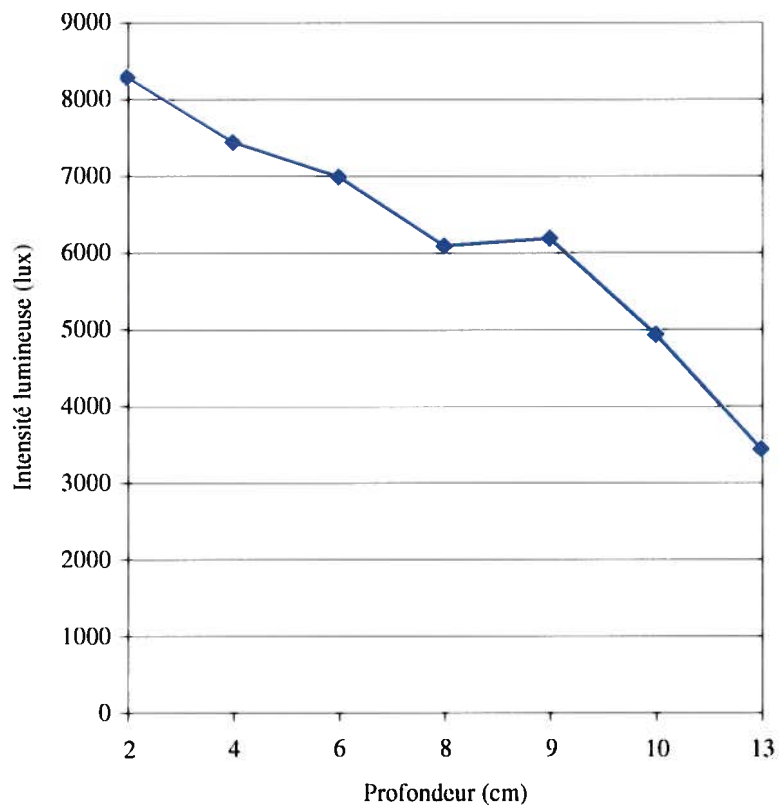


Figure 3: Intensité lumineuse en fonction de la profondeur de l'échantillon d'eau avec une distance de 3 cm entre les lampes fluorescentes et l'échantillon.

3.3 Effet du temps d'exposition et de l'intensité lumineuse

La figure 4 présente les résultats des essais de photoréactivation d'*E. coli* provenant d'une eau désinfectée (Fabreville) en fonction du temps d'exposition et de l'intensité de la lumière de photoréactivation. Le nombre d'*E. coli* a augmenté en fonction du temps d'exposition à la lumière de photoréactivation. Sous une intensité de 6000 lux, le nombre d'*E. coli* a augmenté jusqu'à un facteur de 8 fois sur une période de 6 heures (équation de la courbe de tendance (ECT) : $y = 1,1474x + 1,4988$). Le nombre d'*E. coli* provenant d'une eau exposée à une intensité de 1600 lux a augmenté de 4 fois sur une période de 6 heures (ECT : $y = 0,5099x + 0,8563$). Dans les deux cas, le niveau de photoréactivation s'est accru de façon linéaire dans le temps. Il n'y a pas eu de croissance significative d'*E. coli* dans l'échantillon témoin gardé à l'obscurité (ECT : $y = 0,0029x + 0,9219$).

Puisque aucun sommet de photoréactivation d'*E. coli* n'a été observé sur une période de 6 heures, une expérience complémentaire a été effectuée. Les résultats obtenus montrent qu'il n'y a toujours pas de plateau de photoréactivation d'*E. coli* sur une période de 24 heures (figure 5). Le nombre d'*E. coli* provenant de l'eau désinfectée exposée à une lumière de photoréactivation de 6000 lux a augmenté de 17 fois (ECT : $y = 0,6068x + 2,9919$). Le nombre d'*E. coli* exposés à une lumière de 1600 lux a augmenté de 6 fois (ECT : $y = 0,201x + 1,7095$).

Quant aux entérocoques, aucune augmentation significative n'a été observée sur une période de 6 heures à forte intensité (ECT : $y = 0,0904x + 0,9819$) ou faible intensité (ECT : $y = 0,1088x + 0,9712$) (figure 6). Le nombre d'entérocoques est également resté constant lorsque gardés à l'obscurité pendant 6 heures (ECT : $y = 0,0473x + 1,0437$).

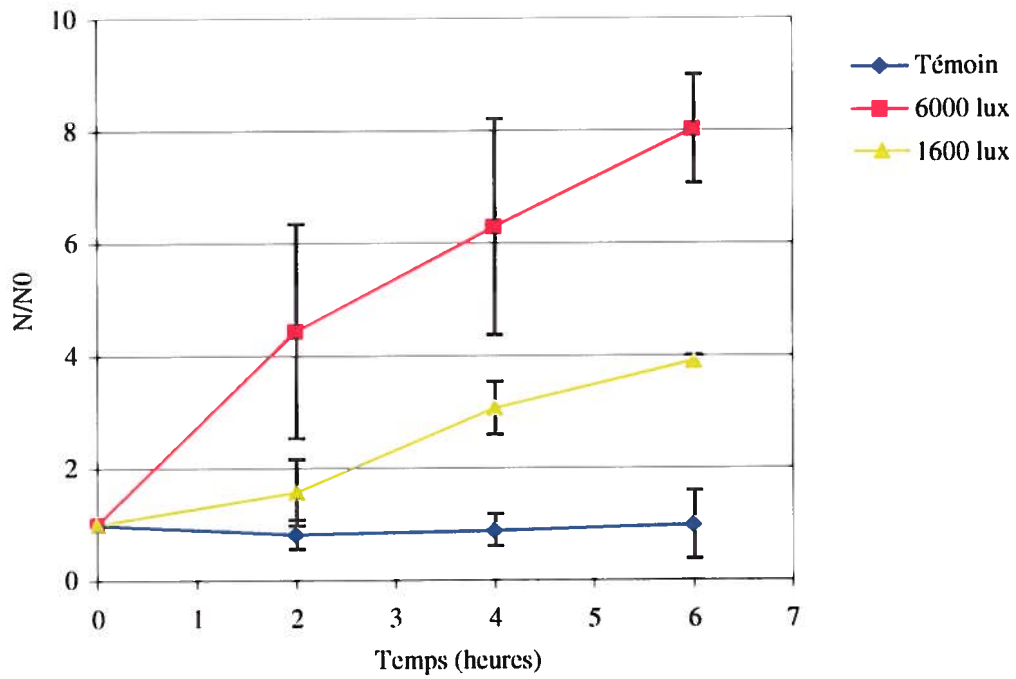


Figure 4: Essai de photoréactivation d'*E. coli* provenant d'une eau désinfectée par les UV à la station de Fabreville en fonction du temps d'exposition et de l'intensité lumineuse.

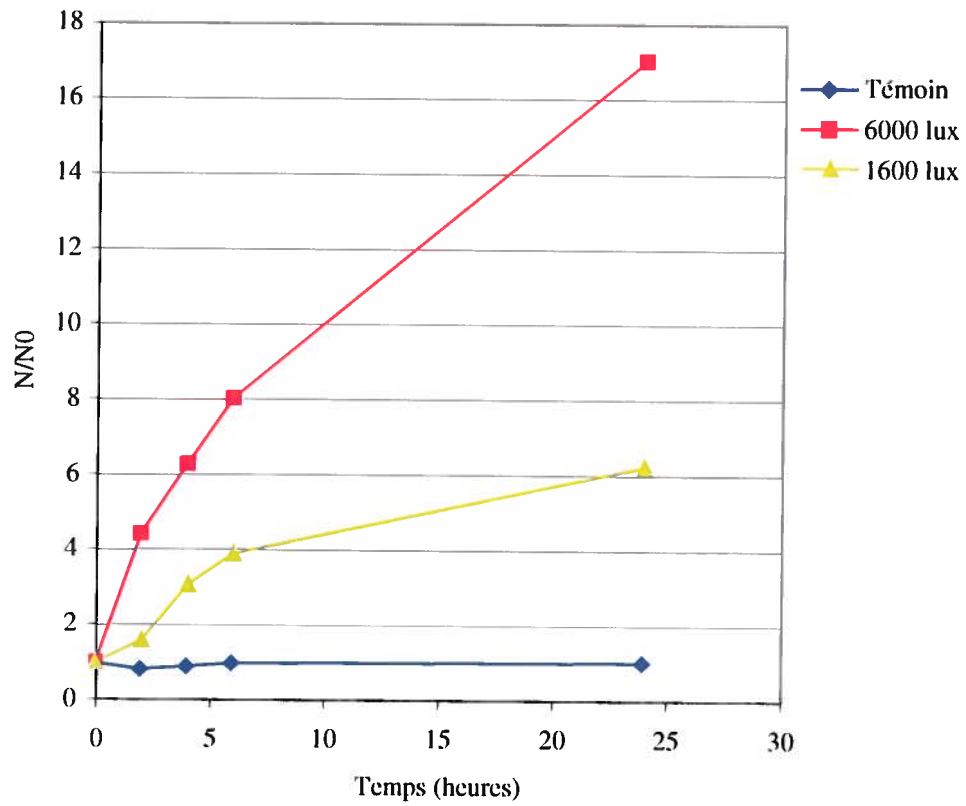


Figure 5: Essai de photoréactivation sur une période de 24 heures d'*E. coli* provenant d'une eau désinfectée par les UV à la station de Fabreville en fonction du temps d'exposition et de l'intensité lumineuse.

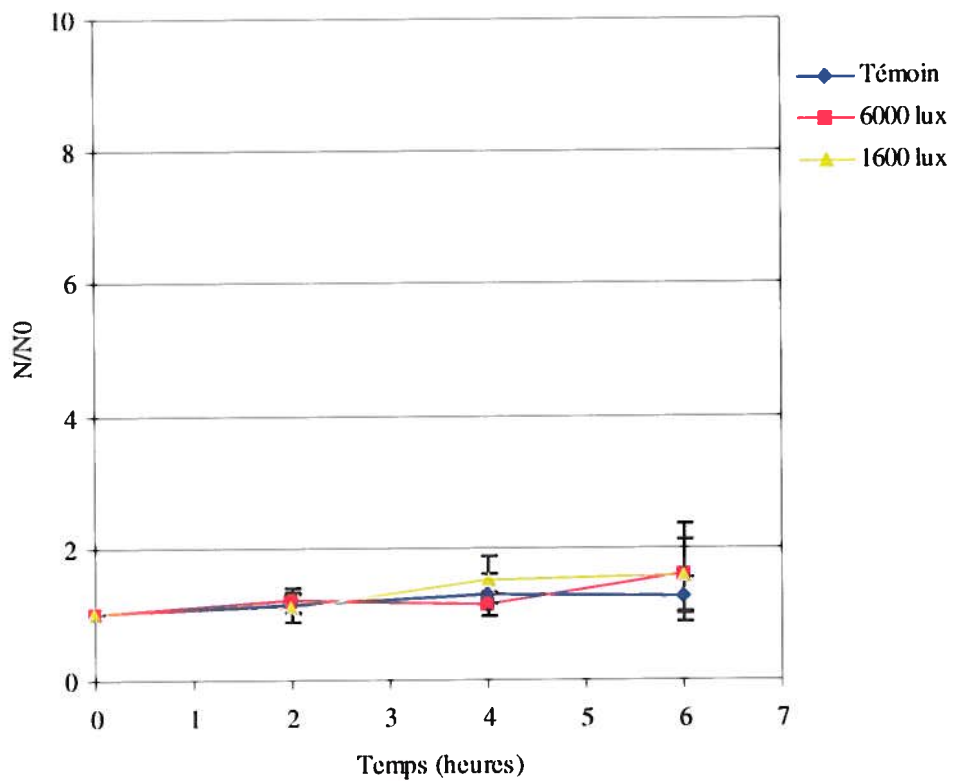


Figure 6: Essai de photoréactivation des entérocoques provenant d'une eau désinfectée par les UV à la station de Fabreville en fonction du temps d'exposition et de l'intensité lumineuse.

3.4 Effet de la température

La figure 7 présente les résultats de l'essai de photoréactivation d'*E. coli* dans l'eau désinfectée de la station de Fabreville en fonction du temps d'exposition à différentes températures. Le niveau de photoréactivation d'*E. coli* a augmenté jusqu'à un facteur de 9 fois à une température de 25°C (ECT : $y = 1,4175x + 0,671$) tandis qu'à 4°C, il augmentait d'environ 5 fois (ECT : $y = 0,7985x + 0,9765$). Dans les échantillons témoins maintenus à l'obscurité, aucune croissance significative n'a été observée que ce soit à 4°C (ECT : $y = 0,1604x + 0,8726$) ou à 25°C (ECT : $y = 0,1665x + 0,8815$).

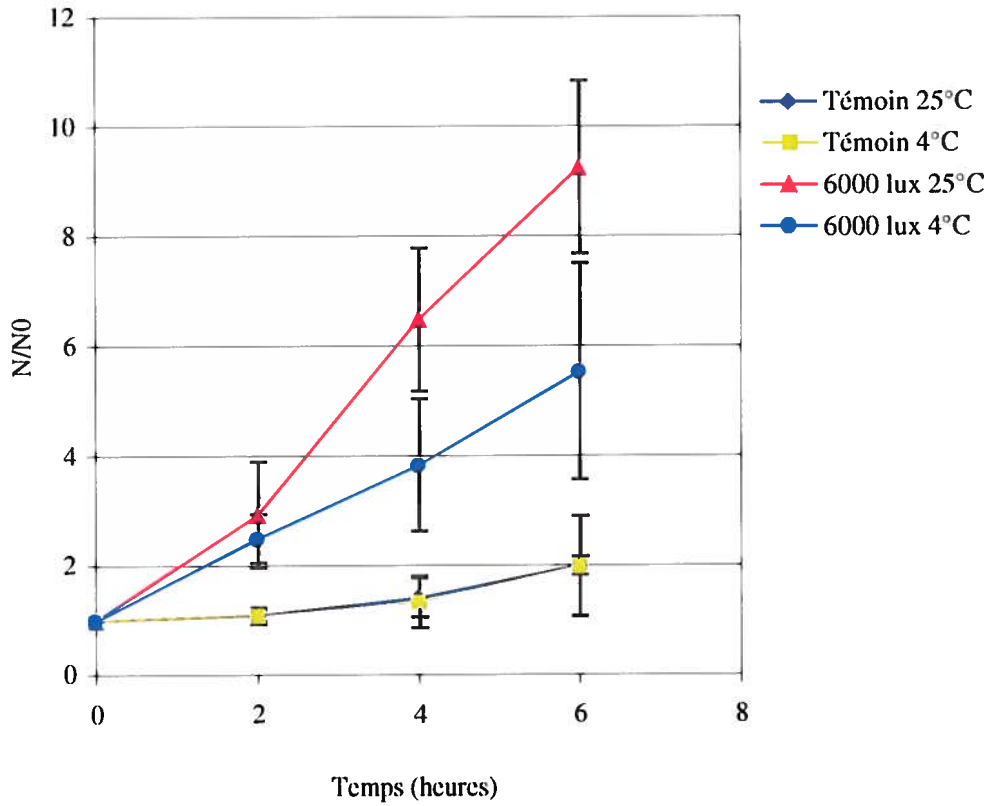


Figure 7: Essai de photoréactivation d'*E. coli* provenant d'une eau désinfectée par les UV à la station de Fabreville en fonction du temps d'exposition à la lumière et de la température de l'eau.

3.5 Effet des radiations solaires

La figure 8 présente les résultats des essais de réactivation d'*E. coli* provenant d'eau désinfectée à la station de Fabreville en fonction du temps d'exposition à la lumière solaire. Le dénombrement d'*E. coli* a augmenté jusqu'à un facteur d'environ 5 fois sur une période de 6 heures (ECT : $y = 0,6892x + 0,7841$). Pour sa part, *E. coli* provenant de l'échantillon témoin conservé à l'obscurité n'a démontré aucune croissance significative (ECT : $y = 0,0365x + 1,0108$) (figure 5).

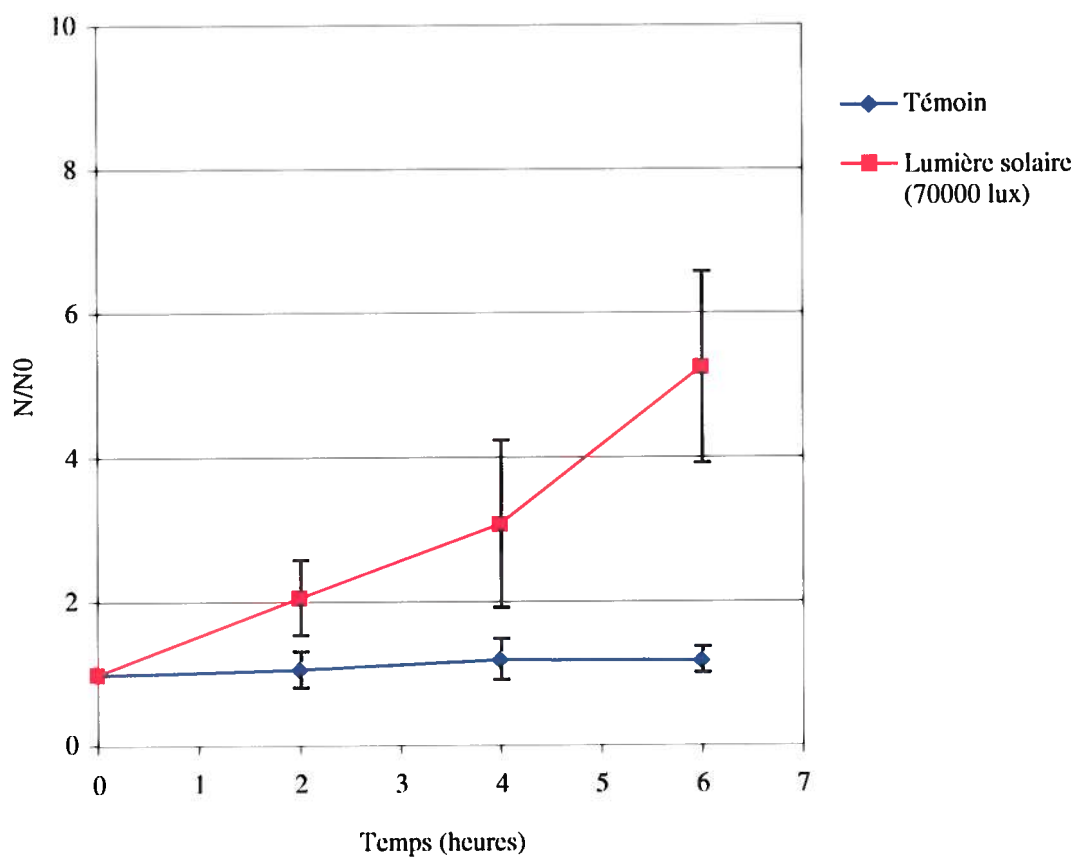


Figure 8: Essai de photoréactivation d'*E. coli* provenant d'une eau désinfectée par les UV à la station de Fabreville en fonction du temps d'exposition à la lumière solaire.

3.6 Effet de la dose UV

Afin de valider le module de désinfection utilisé en laboratoire, une courbe dose-réponse des bactériophages MS2 a été effectuée (figure 9). Cette courbe montre que l'inactivation de MS2 augmente de façon linéaire en fonction de la dose UV appliquée (ECT : $y = 0,0514x + 0,1264$). Les résultats obtenus lors de la validation de l'appareil sont similaires à ceux retrouvés dans la littérature (Mofidi *et al.*, 2001).

Lors de la désinfection en laboratoire, la dose UV appliquée aux échantillons était de 17 mJ/cm, après 360 secondes d'exposition. Cette dose a été utilisée puisqu'elle était similaire à celle appliquée à l'usine de traitement des eaux de Fabreville.

La figure 10 illustre les résultats et le niveau de photoréactivation d'*E. coli* provenant d'eau non-désinfectée de la station de Fabreville en fonction du temps d'exposition et de l'intensité de la lumière de photoréactivation suite à une désinfection en laboratoire à l'aide d'une lampe au mercure à basse pression. D'après ce graphique, le niveau de photoréactivation d'*E. coli* augmente jusqu'à un facteur d'environ 22 fois pour ceux exposés à 6000 lux (ECT : $y = 3,6006x + 1,0516$) et jusqu'à un niveau de 9 fois pour ceux exposés à une lumière de 1600 lux (ECT : $y = 1,3809x + 0,9934$) pendant 6 heures. Les *E. coli* provenant de l'eau gardée à l'obscurité n'ont pas démontré de croissance significative sur une période de 6 heures (ECT : $y = 0,1644x + 0,96$).

La figure 11 montre que le niveau de photoréactivation d'*E. coli* diminue en fonction de la dose UV appliquée lors de la désinfection en laboratoire à l'aide de la lampe au mercure à basse pression (figure 11). En effet, le niveau de photoréactivation passe d'un facteur de 56 fois lorsqu'une dose de 6 mJ/cm² était appliquée à un facteur de 14 fois lorsque la dose était de 24 mJ/cm².

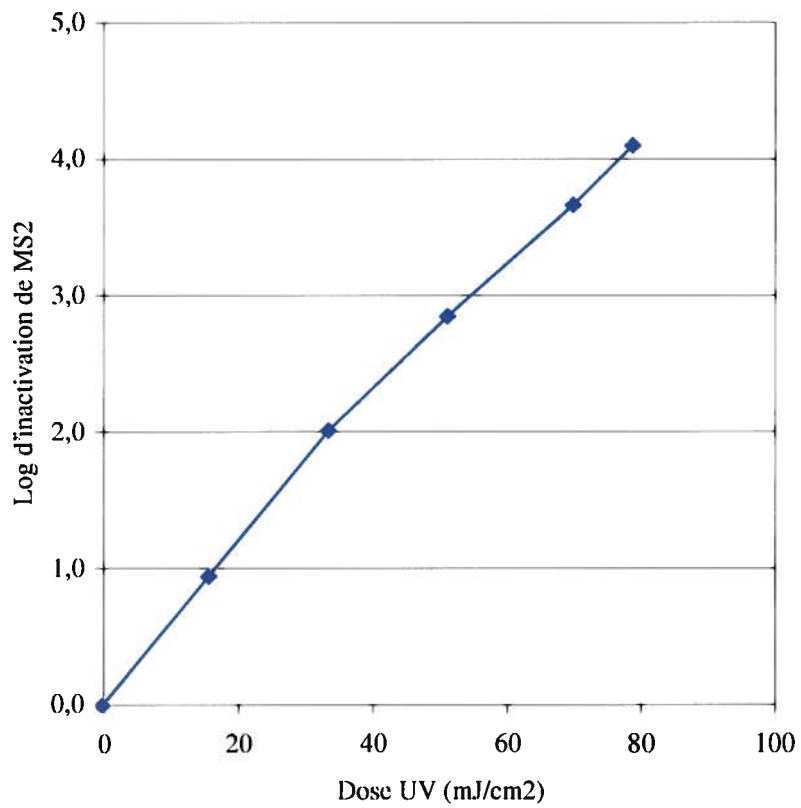


Figure 9: Graphique représentant l'inactivation de MS2 en fonction de la dose UV appliquée à l'aide des lampes UV à faisceaux collimatés du laboratoire.

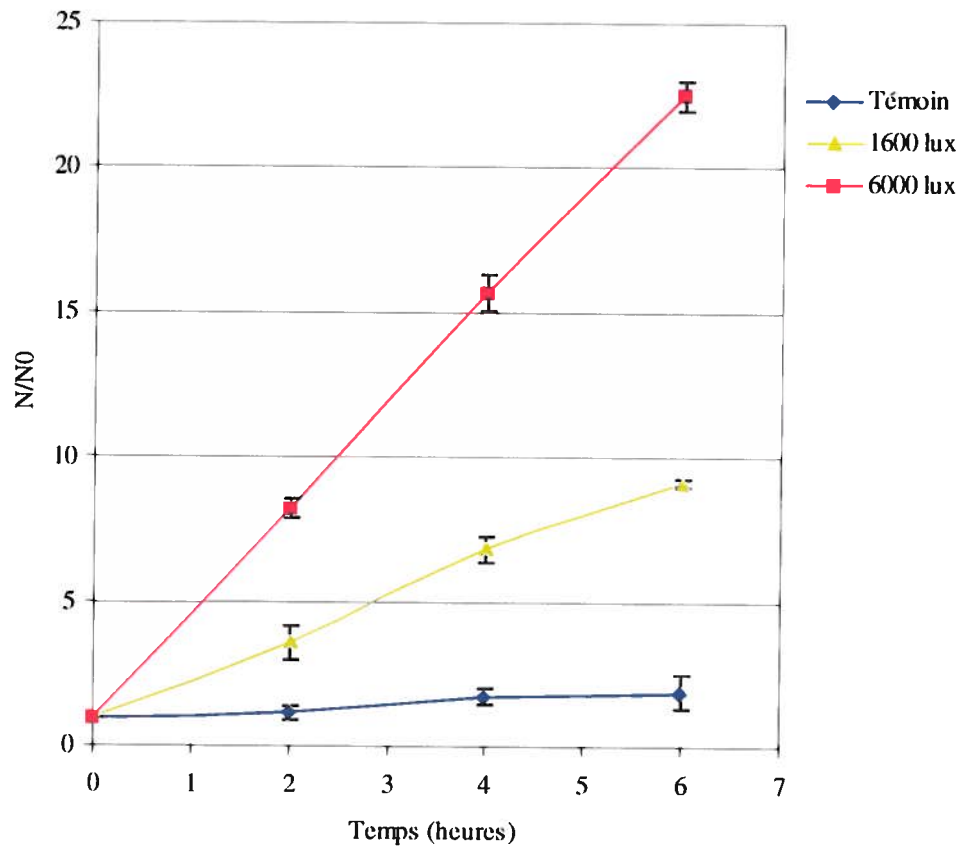


Figure 10: Niveau de photoréactivation d'*E. coli* provenant d'une eau usée traitée, désinfectée en laboratoire en fonction du temps d'exposition à la lumière de photoréactivation. La dose UV reçue lors de la désinfection était de 17 mJ/cm².

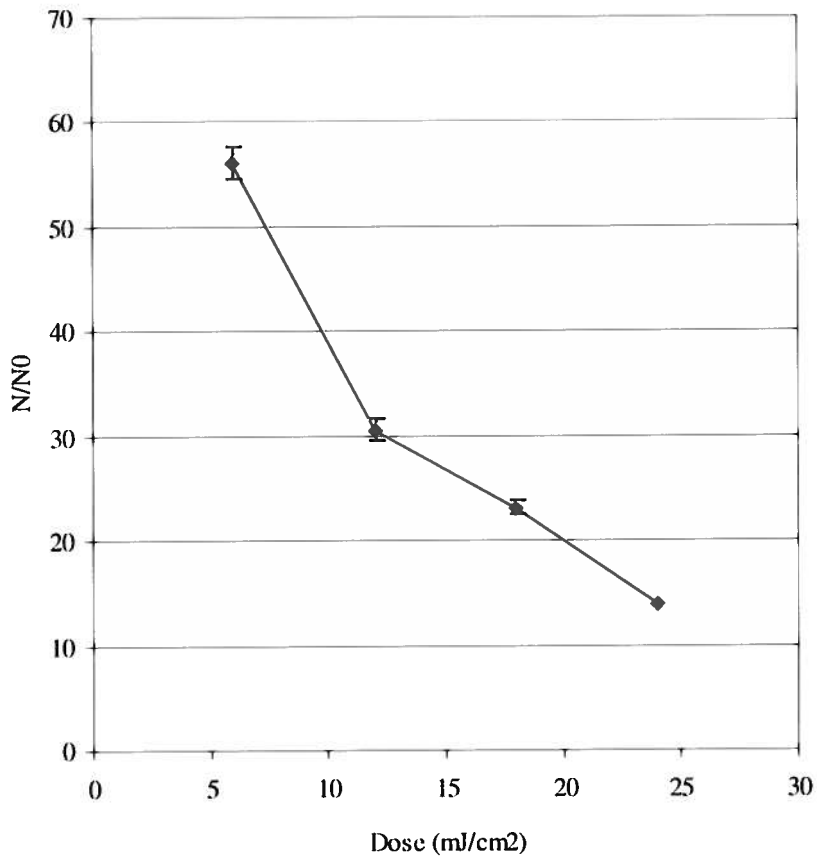


Figure 11: Niveau de photoréactivation d'*E. coli* provenant d'une eau désinfectée en laboratoire en fonction de la dose UV reçue.

3.7 Effet du type de lampe UV

Nous avons remarqué que le niveau de photoréactivation d'*E. coli*, pour une période de 6 heures, est fonction du type de lampe UV utilisé lors de la désinfection. Lorsque inactivé à l'aide d'une lampe UV à moyenne pression (Fabreville), *E. coli* peut effectuer la photoréactivation et augmenter son nombre jusqu'à 8 fois et, lorsque l'inactivation d'*E. coli* a été effectuée à l'aide d'une lampe UV à basse pression (laboratoire), la photoréactivation peut atteindre un facteur de 22 fois.

Des essais de photoréactivation ont donc été effectués à partir d'eau désinfectée à la station de Fabreville (moyenne pression) et à la station de St-Eustache (basse pression).

La figure 12 illustre clairement que le niveau de photoréactivation est beaucoup plus élevé suite à une désinfection faite par une lampe UV à basse pression. La croissance d'*E. coli* a augmenté de 22 fois suite à la désinfection par une lampe UV à basse pression (ECT : $y = 3,5861x - 0,6057$) et a augmenté de 8 fois suite à la désinfection par une lampe UV à moyenne pression (ECT : $y = 1,1474x + 1,4988$).

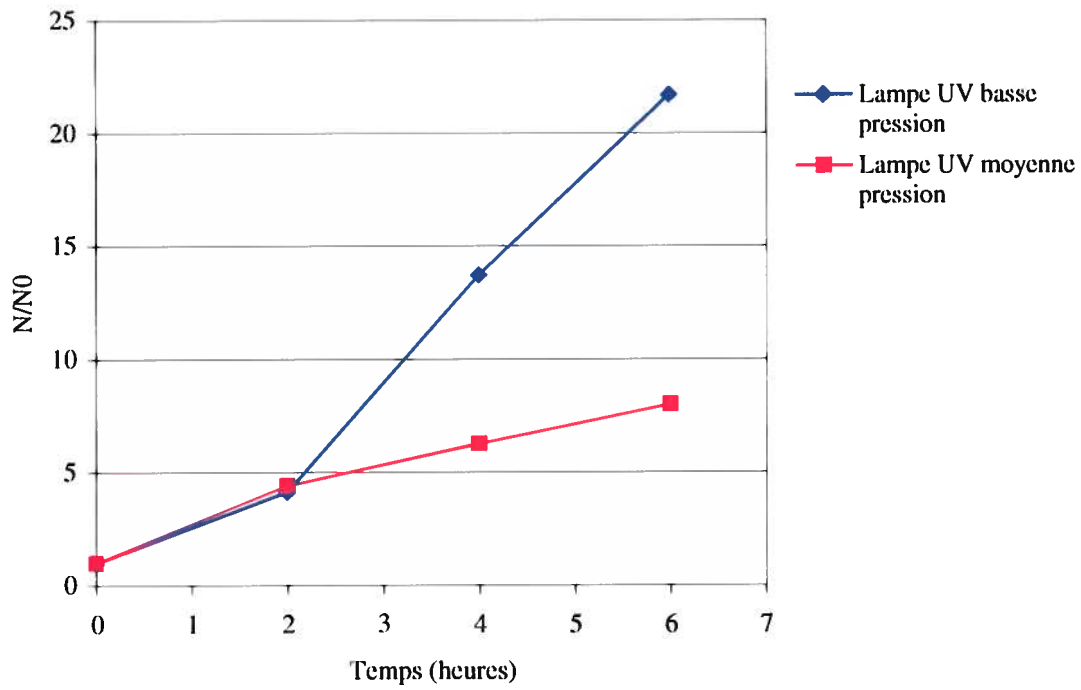


Figure 12: Niveau de photoréactivation d'*E. coli* en fonction du temps d'exposition à la lumière et selon le type de lampe utilisé lors de la désinfection.

Chapitre 4 : Discussion

4.1 Essais préliminaires

Les intensités lumineuses qui ont été choisies pour les essais de photoréactivation sont 1600 lux et 6000 lux. Les intensités lumineuses choisies sont moins importantes que celles observées dans l'environnement. Celles-ci ont été choisies puisqu'elles représentent celles retrouvées dans la rivière où se fait le rejet. L'intensité lumineuse dans l'eau décroît rapidement en fonction de la profondeur de la rivière puisqu'elle est absorbée par les composants organiques et inorganiques de l'eau (Gehr et Nicell, 1996, Payment, 2003, Whitby et Palmateer, 1993).

4.2 Effet du temps d'exposition et de l'intensité lumineuse

D'après les résultats obtenus, le niveau de photoréactivation d'*E. coli* augmente en fonction de l'intensité de la lumière et du temps d'exposition à celle-ci et ce, sans atteindre de sommet sur une période de 24 heures. Ces résultats sont semblables à ceux obtenus par Lindenauer et Darby (1994).

Selon la littérature, la photoréactivation est observable chez *E. coli* et celle-ci posséderait donc l'enzyme de photoréactivation; la photolyase. En effet, cette espèce bactérienne peut posséder jusqu'à 20 photolyases par unité d'*E. coli* et chacune de ces enzymes a la possibilité de réparer environ 5 dimères de thymine par minute (Burger, Raymer et Bockrath, 2002, Zimmer et Slawson, 2001).

Le temps d'exposition à la lumière a plus d'influence que l'intensité de celle-ci sur le niveau de photoréactivation. Ce phénomène s'explique par le fait que la fréquence d'attachement de la photolyase aux dimères de thymine est le facteur limitant de la réaction. Plus le temps d'exposition à la lumière de photoréactivation est long, plus les photolyases peuvent s'associer et se dissocier des dimères (Oguma, Katayama et Ohgaki, 2002).

Une fois la photoréactivation réussie, la bactérie peut se multiplier. La courbe de la figure 5 comprend donc probablement deux éléments. Le premier étant le moment où les bactéries inactivées par les rayons UV subissent un phénomène de revivification par la photoréactivation et le suivant étant la croissance normale et la multiplication d'*Escherichia coli*. C'est probablement ce qui explique qu'aucun sommet n'est observé sur les courbes de la figure 5. Il est donc inquiétant de constater qu'*E. coli*, qui est utilisé comme indicateur de désinfection pour mesurer l'efficacité du traitement, peut se réactiver jusqu'à un tel point dans l'environnement et ainsi causer une surestimation de la pollution fécale dans le cours d'eau récepteur. Cette surestimation a ainsi un impact sur le suivi du milieu.

Aucune photoréactivation ni croissance n'ont été observées chez les entérocoques provenant de l'eau désinfectée à Fabreville. Des résultats similaires ont été obtenus (Lindenauer et Darby, 1994) et il a été suggéré que ce groupe de bactéries ne possède pas la photolyase et qu'elles ne peuvent donc effectuer la photoréactivation.

Les entérocoques ne montrant pas de photoréactivation, seul *E. coli* a été utilisé pour les essais subséquents.

4.3 Effet de la température

La figure 7 montre que la photoréactivation de *E. coli* est beaucoup plus importante dans une eau à 25°C que dans une eau à 4°C. Ceci peut être expliqué par le principe qui stipule qu'une hausse de la température augmente de façon générale la cinétique de la majorité des enzymes (Prescott, Harley et Klein, 1995). De plus, une hausse de la température, jusqu'à un certain point, a une influence positive sur la croissance d'*E. coli* (Prescott, Harley et Klein, 1995). La température de l'eau des rivières du Québec varie généralement entre 4°C (l'hiver) et 25°C (l'été). Le niveau de photoréactivation d'*E. coli* serait donc moins important l'hiver puisque la température de l'eau est d'environ 4°C.

De plus, l'intensité de la lumière solaire et la période d'ensoleillement journalière en saison hivernale sont plus faibles qu'en période estivale.

4.4 Effet des radiations solaires

Tel que présenté à la figure 8, le dénombrement d'*E. coli*, provenant d'une eau désinfectée exposée à la lumière solaire pour une période de 6 heures, a augmenté jusqu'à un facteur de 5 fois. Cette augmentation est moins importante que celle observée lors des essais de photoréactivation en laboratoire avec les lampes fluorescentes (figure 4). Cette différence est probablement causée par le fait que certaines radiations solaires sont nocives pour *E. coli*. En effet, lorsque des rayons de longueurs d'onde entre 320 et 400 nm sont émis, il est possible qu'il y ait une excitation des molécules photosensibles à l'intérieur des cellules. Les molécules photosensibles regroupent des riboflavines, des porphyrines, des stéroïdes, les vitamines A et des caroténoïdes (Kalisvaart, 2002). Ces biomolécules produisent des composés actifs (O_2 , H_2O_2 et OH) qui endommagent directement le génome et d'autres molécules (Oguma, Katayama et Ohgaki, 2002). Donc, une exposition à des radiations solaires engendre une diminution du niveau de photoréactivation chez *E. coli*. Il est à noter que l'eau désinfectée peut être soit rejetée immédiatement après le traitement (comme aux stations de Fabreville et St-Eustache) ou parcourir une grande distance dans des tuyaux avant d'être rejetée dans la rivière. Cette situation se produit à Montréal et a été étudiée par Ronald Gehr. Ses résultats montrent que le passage de l'eau désinfectée dans un tunnel pendant 2h30 avant d'être rejetée dans la rivière n'a pas d'incidence sur le niveau de photoréactivation (Gehr, Comair, Cairns, 1993).

4.5 Effet de la dose UV

Selon les résultats présentés à la figure 10, le niveau de photoréactivation d'*E. coli* provenant d'une eau désinfectée en laboratoire augmente jusqu'à un facteur de 22 fois sur une période de 6 heures d'exposition à la lumière. Ce facteur est nettement supérieur à

celui obtenu lors des essais de photoréactivation effectués à partir d'*E. coli* provenant d'eau désinfecté à la station de Fabreville. Lors de ces essais, le niveau de photoréactivation avait atteint un facteur maximal de 8 fois (figure 4). Cette divergence est probablement causée par le fait que les lampes au mercure utilisées à la station de Fabreville et celles utilisées en laboratoire n'ont pas les mêmes propriétés. Les lampes à la station de Fabreville sont à moyenne pression alors que celles utilisées en laboratoire sont à basse pression. Les lampes UV à moyenne pression émettent un large spectre de longueurs d'onde incluant la bande la plus germicide pour les microorganismes, celle à 254 nm. D'autres longueurs d'onde comprises dans le spectre de rayons UV émises par les lampes à moyenne pression peuvent altérer d'autres biomolécules chez *E. coli*, dont la photolyase elle-même et rendre ainsi la photoréactivation plus difficile (Kalisvaart, 2002, Zimmer et Slawson, 2001). C'est pour cette raison que le niveau de photoréactivation d'*E. coli* est moins important suite à une désinfection par les lampes UV à moyenne pression que par les lampes UV à basse pression.

La figure 11 illustre la photoréactivation d'*E. coli* provenant d'une eau désinfectée en laboratoire par différentes doses UV. Le niveau de photoréactivation d'*E. coli* diminue lorsque la dose UV appliquée augmente. Lorsque la dose UV augmente, la formation de dimères de thymines chez le microorganisme augmente rendant ainsi la photoréactivation plus difficile (Kashimada *et al.*, 1996, Lindenauer et Darby, 1994). De plus, la figure 11 montre une cassure dans la courbe à une dose UV de 12 mJ/cm². En effet, à cette dose, la pente de la courbe devient moins importante ce qui signifie que le niveau de photoréactivation diminue de façon moins drastique à partir de ce moment. Cette courbe suit le modèle régulier de la courbe d'inactivation par les UV d'*E. coli*. Généralement, la courbe d'inactivation d'*E. coli* par les UV comprend cette cassure puisqu'une certaine fraction de la population est constituée d'agrégats d'*E. coli* qui rendent l'inactivation des unités à l'intérieur de ces amas plus difficile (Brown et Gehr, 1998, Gehr et Nicell, 1996, Otaki *et al.*, 2003). La courbe de photoréactivation de la figure 11 comprend donc cette cassure puisque les bactéries qui n'ont pas été inactivées ne font pas de photoréactivation ce qui en diminue le niveau à ce stade.

4.6 Effet du type de lampe UV

Ces résultats appuient le fait que plus le spectre de longueurs d'onde émis par les lampes UV est large, plus les dommages infligés aux microorganismes sont importants et irréversibles (Hiroto et Kamiko, 2003, Oguma, Katamaya et Ohgaki, 2003). Lorsque les rayons émis par une lampe UV comprennent des longueurs d'ondes autres que 254 nm, telle 280 nm, les protéines, dont la photolyase peuvent être altérées les empêchant ainsi de remplir leur rôle souvent vital pour le microorganisme (Otaki *et al.*, 2003). Les résultats obtenus lors de cette dernière expérience portent à mettre en doute la validité du facteur de sécurité de 10 fois employé par le Ministère de l'Environnement dans le cas où l'eau usée a été désinfectée à l'aide d'une lampe UV à basse pression. D'autant plus que la majorité des stations d'épuration du Québec qui désinfectent l'eau usée sont munies de lampes au mercure à basse pression (Babineau *et al.*, 1999).

Conclusions

Les différents essais menés lors de la réalisation de ce projet de recherche ont permis d'atteindre les objectifs fixés. Comme ceux obtenus par d'autres auteurs, les résultats ont démontré qu'*E. coli* peut effectuer la photoréactivation jusqu'à un niveau de 8 fois contrairement aux entérocoques qui n'en font pas. Le niveau de photoréactivation d'*E. coli* augmente en fonction de la dose de lumière de photoréactivation reçue (Lindenauer et Darby, 1994, Oguma, Katamaya et Ohgaki, 2002), en fonction de la température de l'eau et lorsque la dose UV reçue diminue (Cairns *et al.*, 1993, Gehr, Comair et Cairns, 1993, Gehr et Nicell, 1996, Kashimada *et al.*, 1996). De plus, une exposition à des radiations solaires engendre une diminution du niveau de photoréactivation chez *E. coli* (Oguma, Katamaya et Ohgaki, 2002). Les derniers essais ont montré que le type de lampe UV utilisé lors de la désinfection de l'eau usée influence le niveau de photoréactivation chez *E. coli* (Otaki *et al.*, 2003, Hiroto et Kamiko, 2003, Oguma, Katamaya et Ohgaki, 2003). Le niveau de photoréactivation atteint par *E. coli* était de 22 fois lorsque l'eau avait été désinfectée à l'aide de lampes au mercure à basse pression et était de 8 fois lorsqu'elle avait été désinfectée à l'aide de lampes à moyenne pression.

Le facteur de sécurité de 10 fois utilisé par le MENV est donc réaliste dans le cas où l'eau usée a été désinfectée à l'aide de lampes à moyenne pression. Par contre, ce facteur est inadéquat lorsque appliqué pour l'eau désinfectée à l'aide de lampes à basse pression. Au Québec, la majorité des stations d'épuration qui comporte des installations de désinfection sont dotées de lampes au mercure à basse pression. Ces stations ne peuvent donc pas utiliser le facteur du MENV de 10 fois pour compenser à la photoréactivation puisqu'il est, dans ce cas, marginalement réaliste.

Puisque le niveau de photoréactivation d'*E. coli* varie constamment en fonction de plusieurs paramètres, qui parfois sont incontrôlables, l'utilisation d'une autre bactérie indicatrice serait plus appropriée. Les entérocoques seraient une alternative intéressante aux coliformes thermotolérants puisque aucune photoréactivation n'a été observée chez

ceux-ci. Ce groupe de bactéries a déjà été suggéré pour définir les exigences de rejet (Payment, 2003 :84) puisqu'il présente les caractéristiques essentielles d'un indicateur.

Références

ASHBOLT, N.J., W.O.K. Grabow et M. Snozzi. 2001. Indicators of microbial water quality. In World Health Organization (WHO). Water quality; Guidelines, standards and health: Assessment of risk and risk management for water-related infectious disease. 2001.

APHA, AWWA, WEF. 2000. Standard methods for the analysis of water and wastewater. 20th edition. American Public Health Association, Washington, DC.

BABINEAU, D., P. Payment, D. Chartray, A. Laporte, A. Fournier-Martin. 1999. "Désinfection ultraviolet des eaux usées municipales: Essais pilotes d'un système basse pression sur l'inactivation des coliformes thermotolérants et des *Clostridium perfringens*". Vecteur Environnement; section scientifique, vol. 32, no. 6, p. 34-43.

BITTON, G. 1999. Wastewater microbiology. 2e édition. New York: Wiley-Liss, 578p.

BOLTON, J.R. et M.L. Stefan. 2001. "The importance of water absorbance/transmittance on the efficiency of ultraviolet disinfection reactors". In First international congress on ultraviolet technologies 2001: conference proceedings (June 14-16 2001 Washington DC) p. 1-8.

BROWN, H. et R. Gehr. 1998. "A novel approach for evaluation of UV dose requirements prior to upgrading wastewater treatment plants". In Disinfection '98, the latest trends in wastewater disinfection: chlorination vs. UV disinfection (April 19-22 1998 Baltimore, Maryland USA) p. 1-11.

BURGER, A., J. Raymer et R. Bockrath. 2002. "DNA damage-processing in *E. coli*: on-going protein synthesis is required for fixation of UV-induced lethality and mutation". DNA Repair, vol. 1, p. 821-831.

CAIRNS, W.L., G. Sakomoto, C.B. Comair et R. Gehr. 1993. "Assessing UV disinfection of a physico-chemical effluent by medium pressure lamp using a collimated beam and pilot plant". In Specialty conference series : Planning, desing and operations of effluent disinfection systems (May 23-25 1993 Whippany, New Jersey) p. 433-444.

CHANDRAKANTH, M., P. Colak, M. Laquidara, M. Prévost, J. Leparc. 2001. "Disinfecting treated municipal wastewater effluents of varying qualities using low-pressure high-intensity UV lamps". In First international congress on ultraviolet technologies 2001: conference proceedings (June 14-16 2001 Washington DC) p. 1-13.

CHRISTINE, K.S., A.W. Macfarlane IV, K. Yang et R.J. Stanley. 2002. "Cyclobutylpyrimidine dimer base flipping by DNA photolyase". J. Biol. Chem., vol. 277, no. 41, p. 38339-38344.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA). 1999. Wastewater technology fact sheet : ultraviolet disinfection. EPA 832-F-99-064. Washington D.C.

GEHR, R., C.B. Comair et W.L. Cairns. 1993. "UV disinfection of wastewater by medium-pressure lamps". In Joint CSCE-ASCE National Conference on Environmental Engineering (July 12-14 1993 Montréal) p. 1929-1936.

GEHR, R., J. Nicell. 1996. "Pilot studies and assessment of downstream effects of UV and ozone disinfection of a physicochemical wastewater". Water Qual. Res. J. Canada, vol. 31, no. 2, p. 263-281.

GOUVERNEMENT DU QUÉBEC. 2003. Évaluation de performance de 381 ouvrages municipaux d'assainissement des eaux pour l'année 2001. Direction des communications du Ministère des Affaires municipales et de la Métropole.

HAIDER, T., R. Sommer, S. Knasmüller, P. Eckl, W. Pribil, A. Cabaj et M. Kundi. 2001. "Application of a test combination of three different bioassays for the investigation of genotoxic effects induced by UV-irradiation in water". In First international congress on ultraviolet technologies 2001: conference proceedings (June 14-16 2001 Washington DC) p. 1-9.

HANCOCK, G.G., E.M. Davis. 1999. "Regrowth potential of coliforms after UV disinfection of municipal wastewater". J. Environ. Sci. Health, vol. A34, no. 9, p. 1737-1743.

HARRIS, G.D., V.D. Adams, D.L. Sorensen et M.S. Curtis. 1987. "Ultraviolet inactivation of selected bacteria and viruses with photoreactivation of the bacteria". Wat. Res., vol. 21, no. 6, p. 687-692.

HIROTO, Y., N. Kamiko. 2003. "Photoreactivation of fecal indicator bacteria after disinfection by medium pressure UV lamp". In 2nd International congress on ultraviolet technologies (9-11 July 2003 Vienna Austria).

KALISVAART, B. F. 2001. "Photobiological effects of enhanced polychromatic medium pressure UV lamps". In First international congress on ultraviolet technologies 2001: conference proceedings (14-16 June 2001 Washington DC) p. 1-9.

KASHIMADA, K., N. Kamiko, K. Yamamoto et S. Ohgaki. 1996. "Assessment of photoreactivation following ultraviolet light disinfection". Wat. Sci. Tech., vol. 33, no. 10-11, p.261-269.

KONIG, R. 2001. "UV wastewater disinfection: the key to the future" Water, vol. 21, p. 30-32.

- LEHRER, A.J., V.J. Cabelli. 1993. "Comparison of ultraviolet and chlorine inactivation of F male-specific bacteriophage and fecal indicator bacteria in sewage effluents". In Conference of the Water Environment Federation: Proceeding of planning, design and operation of effluent disinfection systems, p.37-48.
- LINDENAUER, K.G., J.L. Darby. 1994. "Ultraviolet disinfection of wastewater: effect of dose on subsequent photoreactivation". Wat. Res., Vol. 28, no. 4, p. 805-817.
- LODISH, H., D. Baltimore, A. Berk, S.L. Zipursky, P. Matsudaira et J. Darnell. 1997. Biologie moléculaire de la cellule. DeBoeck Université. New York: W.H. Freeman and Company, 1344 p.
- MACKEY, E.D., R.S. Cushing et H.B. Wright. 2001. "Effect of water quality on UV disinfection of drinking water". In First international congress on ultraviolet technologies 2001: conference proceedings (June 14-16 2001 Washington DC) p. 1-9.
- MINISTÈRE DE L'ENVIRONNEMENT DU QUÉBEC (MENV). 2003. www.menv.gouv.qc.ca/eau/eaux-usees
- MOFIDI, A.A., H. Baribeau, P.A. Rochelle, R. De Leon, B.M. Coffey et J.F. Green. 2001. "Disinfection of *Cryptosporidium parvum* with polychromatic UV light". Journal AWWA, vol. 93, no. 6, p. 95-109.
- OGUMA, K., H. Katayama et S. Ohgaki. 2002. "Photoreactivation of *Escherichia coli* after low- or medium-pressure UV disinfection determined by an endonuclease sensitive site assay". Applied and environmental microbiology, vol. 68, no. 12, p. 6029-6035.
- OGUMA, K., H. Katayama et S. Ohgaki. 2003. "Effects of UV spectral sensitivity on inactivation and photoreactivation of *Escherichia coli*". In 2nd International congress on ultraviolet technologies (9-11 July 2003 Vienna Austria).
- OTAKI, M., A. Okuda, K. Tajima, T. Iwasaki, S. Kinoshita et S. Ohgaki. 2003. "Inactivation differences of microorganisms by low pressure UV and pulsed xenon lamps". Wat. Sci. Tech., vol. 47, no. 3, p. 185-190.
- PAYMENT, P. 2001. "Transmission of gastrointestinal diseases : hygiene as the final barrier". Am. J. Infect. Control, vol. 29, no. 4, p. 218-221.
- PAYMENT, P. 2003. "Enlèvement des microorganismes pathogènes et des bactéries indicatrices par les stations de traitement des eaux usées municipales situées sur la rivière des Mille Îles". Rapport présenté au Ministère de l'Environnement du Québec, Programme d'aide à la recherche et au développement en environnement (PARDE), Projet no : 3336.11.00.01 150 p.
- PAYMENT, P., A. Berte, M. Prévost, B. Ménard et B. Barbeau. 2000. "Occurrence of pathogenic microorganisms in the Saint Lawrence River (Canada) and comparison of

health risks for populations using it as their source of drinking water”. Can. J. Microbiol., vol. 46, p. 565-576.

PAYMENT, P., E. Franco. 1993. “*Clostridium perfringens* and somatic coliphages as indicators of the efficiency of drinking water treatment for viruses and protozoan cysts”. Appl. Environ. Microbiol., vol. 59, no. 8, p. 2418-2424.

PAYMENT, P., M. Waite et A. Dufour. 2003. Introducing parameters for the assessment of drinking water quality. In Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), World Health Organisation (WHO). Assessing microbial safety of drinking water. 2003.

PRESCOTT, HARLEY et KLEIN. 1995. Microbiologie. 1^{ère} édition. Bruxelles : DeBoeck Université, 1014 p.

PROGRAMME D’ASSAINISSEMENT DES EAUX (PAEQ). 1996. Rapport du Vérificateur Général à l’Assemblée nationale pour l’année 1995-1996. Étude conduite auprès du ministère des Affaires municipales.

SHABAN, A.M., G.E. El-Taweel et G.H. Ali. 1997. “UV ability to inactivate microorganisms combined with factors affecting radiation”. Wat. Sci. Tech., vol. 35, no. 11-12, p.107-112.

SOMMER, R., A. Cabaj, W. Pribil et T. Haider. 1997. “Influence of lamp intensity and water transmittance on the UV disinfection of water”. Wat. Sci. Tech., vol. 35, no. 11-12, p. 113-118.

SOMMER, R., M. Lhotsky, T. Haider et A. Cabaj. 2000. “UV inactivation, liquid-holding recovery, and photoreactivation of *Escherichia coli* O157 and other pathogenic *Escherichia coli* strains in water”. Journal of food protection, vol. 63, no. 8, p. 1015-1020.

SOMMER, R., M. Suchomel-Lhotsky, T. Haider et A. Cabaj. 2001. “Enterohemorrhagic (EHEC) and other pathogenic *Escherichia coli* strains in water : a challenge for UV disinfection?”. In First international congress on ultraviolet technologies 2001: conference proceedings (June 14-16 2001 Washington DC) p. 1-8.

THE DIFCO MANUAL. 2000. 11th edition. Difco laboratories.

TOPAS, K.D. 2001. “Ultraviolet disinfection application to a wastewater treatment plant”. Clean Prod. Processes, vol. 3, p. 69-80.

TOSA, K., T. Hirata. 1999. “Photoreactivation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* following UV disinfection”. Wat. Res., vol. 33, no. 2, p. 361-366.

U.S. Environmental Protection Agency, 2001, Method 1602 : Male-specific (F+) and somatic coliphage in water by single agar layer (SAL) procedure. Washington D.C., EPA 821-R-01-029, 38 p.

VOET, D., J.G. VOET. 1998. Biochimie. DeBoeck Université. Paris, 1361 p.

WHITBY, G.E. et G. Palmateer. 1993. "The effect of UV transmission, suspended solids, wastewater mixtures and photoreactivation on microorganisms in wastewater treated with UV light". *Wat. Sci. Technol.*, vol. 27 : 379-386.

WOJTENKO, I., M.K. Stinson et R. Field. 2001. "Challenge of combined sewer overflow disinfection by ultraviolet light irradiation". Critical reviews in environmental science and technology, vol. 31, no. 3, p. 223-239.

WOLFE, R.L. 1990. "Ultraviolet disinfection of potable water: current technology and research needs". *Environ. Sci. Technol.*, vol. 24, no. 6, p. 768-773.

ZIMMER, J.L., R.M. Slawson. 2001. "Potential repair of *Escherichia coli* DNA following exposure to UV radiation from both medium- and low-pressure UV sources used in drinking water treatment". Applied and environmental microbiology, vol. 68, no. 7, p. 3293-3299.

