



THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par l'université Toulouse III – Paul Sabatier
Discipline ou spécialité : Biologie Santé Biotechnologie

Présentée et soutenue par Alexis GUIONET
Le 30 septembre 2014

Titre : La décontamination bactérienne de l'eau par impulsions électriques ultracourtes

JURY

Justin TEISSIE, Directeur de Recherches Emérite CNRS, Université Paul Sabatier
Bruno LE PIOUFLE, Professeur des universités, ENS Cachan
Marie-Noëlle PONS, Directeur de Recherches CNRS, Université de Nancy
Laurent PAQUEREAU, Professeur des Universités, Université Paul Sabatier
Vincent BLANCKAERT, Maître de Conférences, Université du Maine
Denis PACKAN, Directeur de Recherche, ONERA-Palaiseau

INVITEE

M^{me} Fabienne DAVID, Véolia Environnement

Ecole doctorale : Biologie – Santé – Biotechnologies de Toulouse
Unité / centre de recherche : UMR 5089 / IPBS / VERI
Directeur de thèse : P^r Justin TEISSIÉ
Codirecteur de thèse : D^r Vincent BLANCKAERT
Encadrant entreprise : M^{me} Fabienne DAVID

« On n'a jamais gagné une partie en abandonnant »

Xavier Tartakover



Remerciements :

Je remercie Justin Teissié de m'avoir transmis une partie de son immense savoir. Merci d'avoir veillé à la rigueur scientifique tout en participant à l'avancée des objectifs industriels. Merci pour sa grande disponibilité malgré ses responsabilités.

Je remercie Fabienne David pour son soutien dans les moments critiques et pour avoir piloté les travaux de recherches du côté industriel, en portant également une grande importance à la compréhension des phénomènes fondamentaux.

Merci à Vincent Blanckaert d'avoir encadré cette thèse tout en me laissant la latitude nécessaire à mon épanouissement et pour son aide conséquente dans les parties rédactionnelles.

Merci à Clément Zaepffel et Denis Packan pour avoir confectionné les différents générateurs que j'ai mis à rude épreuve. Les explications limpides de leurs fonctionnements et de leurs constructions m'ont permis de comprendre leurs mécanismes pourtant complexes. Merci pour la souplesse dont a fait preuve l'ONERA notamment lors des prêts de matériel. Merci également pour la note réalisée sur l'« Etude de décontamination électrique d'une TAR » que j'ai introduit dans ma thèse.

Je remercie Marie-Pierre Jaffrezic pour son implication en tant que chef de pôle, et Stéphane Thomas en tant que directeur de département.

Je remercie Aurélien Sale de m'avoir enseigné les protocoles de bases des expériences de décontamination en batch.

Merci au pôle RMR et à mes collègues de bureau Marc Jovic, Régis Gagneux et Sylvain Chastrus pour leurs conseils précieux et leur bonne humeur.

Je dois également remercier Jean-Pierre Garnier pour m'avoir accueilli quelques mois au CERPEM.

Merci à Franck Renaud et à mes parents pour leurs indispensables relectures.

Merci à mes parents, mon frère et ma sœur de m'avoir soutenu pendant ces 3 années.

Merci à mes amis Dijonnais, pour la plupart également exilés hors de Bourgogne, mais qui sont néanmoins restés très proches.

Mille excuses pour les milliers de milliards de bactéries que j'ai dû sacrifier sur l'autel de la science.



SOMMAIRE

PARTIE I - INTRODUCTION GENERALE	24
PARTIE II - AVANT PROPOS : PRESENTATION DU PROJET DEBACIEM	28
PARTIE III - BIBLIOGRAPHIE : LES DIFFERENTS PROCEDES DE DECONTAMINATION BACTERIENNE DANS L'EAU	32
I. GENERALITES	33
II. PROCEDES CHIMIQUES	33
II.1. Cadre réglementaire	33
II.2. Biocides oxydants	34
II.2.1. Chlore	34
• L'hypochlorite de sodium : NaOCl	37
• Le dichlore : Cl ₂	37
• Le dioxyde de chlore : ClO ₂	37
• Les chloramines	37
• Autres effets du chlore	38
II.2.2. Brome	38
II.2.3. Forme active de l'oxygène (Ozone, H ₂ O ₂)	39
II.3. Biocides de synthèse ou « non oxydants » en TAR	41
II.3.1. Isothiazolinone	41
II.3.2. Ammonium quaternaire	42
II.3.3. 2-bromo-2-nitro-1,3-propanediol (Bronopol)	42
II.3.4. 2,2-dibromo-3-nitrilopropionamide (DBNPA)	43
II.3.5. Polyhexaméthylène biguanide (PHMB)	43
II.3.6. Glutaraldehydes	44
II.4. Traitement potentiel	44
II.4.1. Métaux (cuivre et argent)	44
II.4.2. Iode	45
II.5. Conclusion sur les techniques chimiques	45
III. TRAITEMENTS BIOLOGIQUES EMERGENTS	46
III.1. Peptides antimicrobiens	46
III.2. Bactériophages	46
III.3. Amibes	47
III.4. Conclusion sur les techniques biologiques	48
IV. PROCEDES PHYSIQUES	48
IV.1. Coagulation/Décantation/Filtration	49
IV.2. Haute température	50



IV.2.1. Stérilisation/pasteurisation	50
IV.2.2. Chauffage ohmique	50
IV.2.3. Rayonnement infrarouge et microonde	50
IV.2.4. Autres dispositifs.....	51
IV.3. Haute pression/Onde de choc	51
IV.3.1. Haute pression.....	51
IV.3.2. Onde de choc.....	53
IV.4. Sonication	53
IV.5. Les photons	54
IV.5.1. Les ultraviolets	54
IV.5.2. La lumière pulsée	55
IV.6. Ionisation	55
IV.6.1. Rayon gamma	55
IV.6.2. Les streamers.....	56
IV.7. Champs magnétiques	58
IV.8. Champs électriques	58
IV.8.1. Généralités	58
IV.8.2. Approche théorique.....	61
IV.8.3. msCEP.....	62
IV.8.4. µsCEP	63
IV.8.5. nsCEP.....	66
IV.8.6. psCEP.....	73
IV.9. Conclusion sur les procédés physiques.....	73
V. CONCLUSION	73
PARTIE IV - ETAT DES LIEUX – ETUDES PRELIMINAIRES	75
I. LES LEGIONELLES	76
II. TOURS AERO-REFRIGERANTES.....	77
II.1. Définitions et généralités	77
II.2. Principe de fonctionnement	78
II.2.1. Tour aéro-réfrigérante fermée humide	78
II.2.2. Tour aéro-réfrigérante ouverte humide	79
II.3. Règlementation française applicable aux tours aéro-réfrigérantes	79
III. MODELISATION DE L'INCIDENCE DE L'EVAPORATION DANS UNE TAR HUMIDE	81
IV. LA TOUR AERO-REFRIGERANTE PILOTE (VERI, SITE DE LIMAY)	82
IV.1. Descriptif du pilote	82
IV.2. Observation de la croissance des légionelles en TAR	84
IV.2.1. Données brutes	85
IV.2.2. Interprétation.....	88
IV.2.3. Conclusion	91



V. LE CONCEPT DE DERIVATION.....	91
V.1. Modèle mathématique A.....	91
V.2. Modélisation mathématique B (ONERA).....	95
V.2.1. Description d'une TAR.....	95
V.2.2. TAR avec dispositif de décontamination : bilan d'énergie.....	98
V.2.3. Bilan biologique : état stationnaire et organismes en suspension.....	99
V.2.4. Contraintes du générateur et de l'applicateur	104
V.2.5. Application à une « mini-TAR » :	111
V.2.6. Application et impulsions :	112
V.3. Comparaison des deux modèles.....	113
PARTIE V - EXPERIMENTATIONS EN LABORATOIRES – MATERIEL ET METHODE	118
I. MATERIEL ELECTRIQUE.....	119
I.1. Développement des prototypes	119
I.1.1. Générateur G0.....	120
I.1.2. Générateur G1	122
I.1.3. Générateur G2	122
I.1.4. Générateur préindustriel G3.....	129
I.1.5. Conclusion	136
I.2. Appicateurs	136
I.2.1. Principe	136
I.2.2. Appicateurs réalisés	138
I.3. Mise en place du matériel électrique	139
I.4. Grandeurs caractéristiques	142
I.4.1. Temps de charge de la membrane	142
I.4.2. Différence de potentiel au niveau de la membrane.....	143
I.4.3. Cinétique de la charge.....	144
I.4.4. Prise en compte du front de montée.....	145
I.4.5. Conclusion	146
II. DESCRIPTION DES BANCS D'ESSAIS	146
III. MILIEU ET MATERIEL BIOLOGIQUE	148
III.1. Souches bactériennes	148
III.1.1. Souche modèle : <i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>).....	148
III.1.2. Souche de validation : <i>Legionella pneumophila</i>	150
III.1.3. Préparation des suspensions « d'eau contaminée » à partir des cultures	151
III.2. Eau recomposée	153
III.2.1. Données réelles (eau pilote TAR).....	153
III.2.2. Composition des solutions tampons.....	154
III.2.3. Conclusion	158
PARTIE VI - EXPERIMENTATIONS EN LABORATOIRE - RESULTATS	160
I. ETUDE D'OPTIMISATION DE L'ABATTEMENT PAR NSCEP – GENERATEUR G0.....	161



I.1.	Etude préliminaire avec <i>E. coli</i>	161
I.2.	Effet des nsCEP sur la viabilité bactérienne.....	163
I.2.1.	Résultats initiaux en batch.....	163
I.2.2.	Résultats en dynamique - Passage en flux.....	164
I.3.	Optimisation des paramètres de fonctionnement de la technologie nsCEP.....	170
I.3.1.	Augmentation de la fréquence.....	170
I.3.2.	Augmentation du volume à traiter.....	172
I.3.3.	Etude de reproductibilité des expériences entre les 2 laboratoires (CERPEM et VERI) 173	
I.3.4.	Conclusion.....	175
I.4.	Concept de dérivation – études expérimentales.....	175
I.4.1.	Modèle expérimental UV-C.....	175
I.4.2.	Modèle expérimental « traitement nsCEP ».....	183
I.4.3.	Conclusion.....	184
II.	ESSAIS D’OPTIMISATION DE L’ABATTEMENT PAR NSCEP – GENERATEUR G2.....	185
II.1.	Comparaison avec le générateur G0.....	185
II.2.	Effet de l’augmentation de la fréquence.....	186
II.3.	Effet de l’augmentation du débit.....	187
II.4.	Essai de l’augmentation de la vitesse d’abattement.....	188
II.5.	Impact de la concentration initiale.....	189
II.6.	Etude de l’effet de rémanence.....	191
II.7.	Etude du phénomène de « tailing ».....	192
III.	ETUDE D’ABATTEMENT PAR NSCEP - GENERATEUR G3.....	193
IV.	ETUDE AVEC LEGIONELLA PNEUMOPHILA.....	195
IV.1.1.	Essais avec le générateur G0.....	196
IV.1.2.	Essais avec G2.....	196
IV.2.	Test d’abattement avec le générateur G3.....	200
IV.3.	Effet des nsCEP sur <i>L. pneumophila</i> serogroupe 1 suite à une conservation de la culture pendant plus d’un mois et demi à 4°C.....	201
IV.4.	Récapitulation des tests d’abattelements.....	202
V.	ETUDE PAR CYTOMETRIE EN FLUX DE L’EFFET DES NSCEP SUR LES BACTERIES.....	205
V.1.	Principe.....	205
V.2.	Protocole.....	206
V.3.	Résultats sur <i>E. coli</i>	206
V.3.1.	Résultats obtenus en boîtes de Petri.....	206
V.3.2.	Résultats obtenus en cytométrie en flux.....	207
V.4.	Résultats sur <i>Legionella pneumophila</i>	208
V.4.1.	Résultats obtenus en boîtes de Petri.....	208
V.4.2.	Résultats obtenus en cytométrie en flux.....	208



PARTIE VII -	PUBLICATIONS	214
PARTIE VIII -	CONCLUSION GENERALE	234
PARTIE IX -	REFERENCES	238





LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Schéma du principe de fonctionnement du système de décontamination.	31
Figure 2 : Les différents états du chlore.	35
Figure 3 : Modification des activités cellulaires en présence d'acide hypochloreux.	36
Figure 4 : Courbe de dissociation de l'acide hypochloreux (HOCl) et acide hypobromeux (HOBr) en fonction du pH.	39
Figure 5: Formule développée des isothiazolinones.	42
Figure 6: Formule développée des ammoniums quaternaires.	42
Figure 7: Formule développée du Bronopol.	43
Figure 8: Formule développée du DBNPA.	43
Figure 9: Formule développée du PHMB.	43
Figure 10: Formule développée du Glutaraldehyde.	44
Figure 11: Cycle d'infection d'une bactérie par un bactériophage (Labrie et al., 2010).	47
Figure 12 : Représentation des différentes couches d'une spore.	52
Figure 13 : Schéma d'applicateur de streamer.	57
Figure 14 : Photographie d'un applicateur de streamer au moment d'une décharge.	57
Figure 15 : Déclenchement de plusieurs streamers grâce au dépôt de plusieurs points d'araldite le long de la tige. L'araldite étant diélectrique, elle crée une perturbation du champ qui permet le déclenchement d'un streamer à l'interface tige de tungstène / araldite.	58
Figure 16 : Courbe d'abattement en fonction du nombre d'impulsions utilisées dans différentes conditions de température : (a) à 10 °C, (b) à 20 °C et (c) à 30 °C. Impulsion utilisée : durée 2 µs, Tension 30 kV, nombre 60, champ : 30 kV/cm, milieu : blanc d'œuf. (Δ) traité à 20 kV/cm-VRBA ; (◇) traité à 30 kV/cm-VRBA ; (▲) traité à 20 kV/cm-TSA ; (◆) traité à 30 kV-TSA. tiré de : (Amiali et al., 2006).	64
Figure 17 : Effet de la conductivité du milieu de suspension. (a) 0,3 mS/cm (correspondant à 18 ms et une solution tampon de 3 mM). (b) 2 mS/cm (correspondant à 3,6 ms et une solution tampon de 20 mM) dans l'inactivation de <i>S.cerevisiae</i> traité par une unique impulsion et avec les conditions : E = 9 kV/cm, WT = 20 J/mL ; HPCD1 : 8,0 MPa, 5 min ; HPCD2 : 8,0 MPa, 10 min ; HPCD3 : 11,0 MPa, 5 min ; HPCD4 : 11,0 MPa, 10 min. Tiré de (Pataro et al., 2010).	65
Figure 18 : Inactivation indirecte de cellules non traitées de différentes bactéries dans de l'eau distillée traitée par CEP dans les conditions suivantes : 300 impulsions de 2 µs à 26,7 kV/cm et 5 Hz. Après 1,5 h (■) et 24 h (□) d'incubation. 'a' indique que la survie après 24 h est significativement différente (p<0,05) de la survie après 1,5 h. * : non déterminé. tiré de (Reyns et al., 2004).	66
Figure 19 : Observation selon plusieurs grossissements du cytosquelette et de la membrane plasmique avant traitement et 10 minutes après traitement. tiré de (Hohenberger et al., 2011).	68
Figure 20 : Mesure de la perméabilisation induite par 5 impulsions nanosecondes de 33 kV/cm, par la quantification de l'intégration du fluorochrome pour des cellules de tabac présentant plus ou moins de domaines ABD (Hohenberger et al., 2011).	68
Figure 21 : Evolution du nombre de cas et du taux annuel d'incidence de la légionellose en France. Tiré du rapport : Bilan des cas de légionellose survenus en France en 2011 (InVS, 2012).	77
Figure 22 : Schéma d'une tour humide fermée.	78
Figure 23 : Schéma d'une tour humide ouverte.	79
Figure 24 : Impact des différents modes de purge.	82



Figure 25 : Schéma de la tour aéro-réfrigérante pilote.	83
Figure 26 : Concentration en <i>Legionella</i> spp et <i>Legionella pneumophila</i> dans la TAR pilote.	85
Figure 27 : Evolution « lissée » de la concentration en <i>Legionella</i> spp et en <i>Legionella pneumophilla</i>	86
Figure 28: Système de prélèvement de coupons biofilm (A), Coupon (B) robinet de prélèvement d'eau (C).	87
Figure 29: Photo de coupon recouvert de biofilm (Photos de Thierry DORMOY).	87
Figure 30 : Quantité de <i>Legionella</i> spp et <i>Legionella pneumophilla</i> par centimètre carré de canalisation.	87
Figure 31 : Quantité de <i>Legionella</i> spp et <i>Legionella pneumophilla</i> par centimètre carré de canalisation moyennée sur 1 mois.	88
Figure 32 : Schéma des surfaces considérées dans le calcul de la concentration des légionelles. ..	89
Figure 33 : Répartition des légionelles présentes dans l'eau ou dans le biofilm. La concentration représentée par chaque histogramme correspond à la concentration totale en légionelles présentes dans une portion de canalisation contenant 1 L. Ils sont obtenus en réalisant la somme des concentrations des légionelles dans le biofilm (en bleu) et des légionelles dans l'eau (en rouge).	89
Figure 34 : Visualisation de la période où la croissance en légionelles est la plus forte.	91
Figure 35: Représentation de la mise en place du dispositif de décontamination sur la TAR.	92
Figure 36 : Relations impliquées dans l'efficacité du dispositif sur la TAR pilote.	93
Figure 37 : Algorithme déterminant l'évolution de la concentration.	95
Figure 38 : Bilan de masse (haut) et d'énergie (bas) dans la TAR. La couleur représente la température de l'eau.	96
Figure 39 : Schéma du bilan d'énergie de la TAR avec dispositif de décontamination.	98
Figure 40 : Bilan biologique de la TAR avec dispositif de décontamination. Les couleurs représentent les températures.	100
Figure 41 : Schéma simplifié du bilan biologique de la TAR avec décontamination.	101
Figure 42 : Propriété d'une courbe exponentielle.	103
Figure 43 : Débit de bypass en fonction du facteur d'abattement, pour plusieurs temps caractéristiques de croissance.	104
Figure 44 : Puissance électrique en fonction du facteur d'abattement du bypass.	106
Figure 45 : Débit de bypass en fonction de la puissance électrique pour le générateur G0 sur <i>E. coli</i> , paramétré par le temps de multiplication dans la TAR. Le débit de la TAR $dm_0dt = 3 \frac{L}{s}$ est indiqué, ainsi que les points limites pour 1 impulsion/volume.	108
Figure 46 : Débit de bypass en fonction de la puissance électrique pour le générateur G0 sur <i>E. coli</i> , paramétré par le temps de multiplication dans la TAR. Le débit de la TAR $dm_0dt = 3$ L/s est indiqué, ainsi que les droites correspondant à un nombre d'impulsions k , un facteur de décontamination f et un échauffement $\Delta T1$ donnés.	109
Figure 47 : Débit de la mini-TAR en fonction de la puissance pour un volume total de 20 mL, le générateur G0 et plusieurs temps de croissance. Le trait vertical montre les points accessibles au générateur à 1 Hz (0,3 W).	112
Figure 48: Courbes tracées par le calculateur avec un temps de doublement de 24 h, une efficacité intrinsèque de 37% et un débit de 0,84 L/min.	114
Figure 49: Courbes tracées par le calculateur avec un temps de doublement de 24h une efficacité intrinsèque de 37% et un débit de 1,689 L/min. Les courbes bleu foncé et bleu clair sont superposées.	115
Figure 50: Tracés des courbes par le calculateur avec $[bactérie]_{initiale}$ réduite (100 fois plus faible).	115



Figure 51: Courbes tracées par le calculateur avec les valeurs utilisées dans les calculs de l'ONERA.	116
Figure 52: Courbes tracées par le calculateur avec les valeurs utilisées dans les calculs de l'ONERA à l'exception du débit de traitement qui est choisi de façon à annuler la croissance.....	116
Figure 53: Courbes tracées par le calculateur avec les valeurs utilisées dans les calculs de l'ONERA pour une concentration initiale divisée par 100.	117
Figure 54 : Schéma simplifié du générateur G0.	120
Figure 55 : Enregistrement de la tension et du courant générés par G0 à 1 Hz.	121
Figure 56 : Enregistrement de la tension et du courant générés par G0 à 2 Hz.	121
Figure 57: Enregistrement de la tension et du courant générés par G0 à 3 Hz.	121
Figure 58 : Enregistrement de la tension et du courant générés par G0 à 4 Hz.	121
Figure 59 : Zone du pic de tension à 4 Hz pour différentes durées de fonctionnement, lissée sur 10 points.	122
Figure 60 : Schéma de principe du générateur G2.	124
Figure 61 : Circuit de charge (switch doubleur de tension).	124
Figure 62 : Efficacité de transfert d'énergie et tension maximale théorique sur la capacité de sortie.	125
Figure 63 : Circuit du transformateur haute tension et du module éclateur à gaz.	125
Figure 64 : Impulsion positive délivrée sur un applicateur 100 Ω	126
Figure 65 : Valeurs de la tension maximum des impulsions positives au cours du temps.	127
Figure 66 : Dispersion de la tension maximale des impulsions avec un pas de 0,2 kV pour une expérience de 5 h.	127
Figure 67 : Dispersion de la tension maximale sur les premières heures uniquement.	128
Figure 68 : Valeurs de la tension maximale des impulsions au cours du temps.	128
Figure 69 : Dispersion de la tension maximale des impulsions avec un pas de 0,2 kV.	129
Figure 70 : Schéma simplifié du générateur G3 avec l'applicateur.	130
Figure 71 : Schéma électronique de la partie haute tension du générateur G3.	130
Figure 72 : Chronogramme du générateur G3.	132
Figure 73 : Comparaison des impulsions positives et négatives.	133
Figure 74 : Mesure de tension (a, b) et courant (c, d) des impulsions positives et négatives sur l'applicateur.	133
Figure 75 : Photographies de la baie du générateur G3 (A) et de l'applicateur flux 4 (B) avec sondes de tension et courant (D) et de la platine fluidique (C).	134
Figure 76: Partie fluidique (canalisation) du pilote REI.	134
Figure 77 : Valeurs de la tension maximale des impulsions au cours du temps.	135
Figure 78 : Dispersion de la tension maximale des impulsions avec un pas de 0,2 kV.	136
Figure 79 : Applicateur batch 1.	139
Figure 80 : Applicateur batch 2.	139
Figure 81 : Applicateur batch 3.	139
Figure 82 : Applicateur flux 1.	139
Figure 83 : Applicateur flux 2.	139
Figure 84 : Applicateur flux 3.	139
Figure 85 : Applicateur flux 4.	139
Figure 86: Panoramique du laboratoire lors d'une expérience.	141
Figure 87: Schéma des valeurs caractéristiques utilisées dans la formule.	144
Figure 88 : Répartition des charges électriques due au potentiel de membrane et au champ électrique généré dans l'applicateur.	146
Figure 89: Représentation des parois et membranes des bactéries Gram positif (à gauche) et Gram négatif (à droite).	149



Figure 90: Courbe de croissance de <i>E. coli</i> BL21(DE3), basée sur la mesure de la densité optique à la longueur d'onde de 600 nm (à λ_{600}).	152
Figure 91 : Mesure de la qualité de l'eau de TAR au niveau ionique sur la période de novembre 2007 à février 2010.	153
Figure 92 : pH et conductivité ($\mu\text{S}/\text{cm}$) de l'eau de TAR et des eaux recomposées avec ou sans <i>E. coli</i> BL21(DE3) à une $\text{DO}_{\lambda=600\text{nm}}$ de 1 après sonication.	157
Figure 93 : Effet de la température sur la viabilité des bactéries <i>E. coli</i> BL21(DE3) au cours du temps dans l'eau de TAR et les eaux recomposées ($N=2$ en triplicata).	158
Figure 94 : Effet de l'état physiologique des bactéries.	161
Figure 95 : Effet des nsCEP en fonction de la conductivité ($E = 100 \text{ kV}/\text{cm}$, $T = 60 \text{ ns}$, $F = 1 \text{ Hz}$. Nombre d'expériences indépendantes = 3, nombre de réplicas par expérience = 3. Les statistiques sont obtenues par le logiciel KyPlot® en réalisant une ANOVA suivie d'un test de Dunnett. ** : $P \leq 0,001$.	162
Figure 96 : Effet des nsCEP en fonction du nombre d'impulsions ($E = 100 \text{ kV}/\text{cm}$, $T = 60 \text{ ns}$, $F = 1 \text{ Hz}$, $\sigma = 200 \mu\text{S}/\text{cm}$). Nombre d'expériences indépendantes = 6, nombre de réplicas par expérience = 3. Les statistiques sont obtenues par le logiciel KyPlot® en réalisant une ANOVA suivie d'un test de Dunnett. * : $P \leq 0,05$; ** : $P \leq 0,001$.	163
Figure 97 : Résultats d'abattement en flux ouvert. Moyenne de 2 expériences contrôles (mauve) et 2 expériences essais (bleu). Pour chaque expérience, deux étalements par point sont réalisés. Les statistiques sont obtenues par des tests de Student réalisés entre la série de valeur du point à T_0 et la série de valeur du point considéré : ** : $P \leq 0,01$, *** : $P \leq 0,005$.	165
Figure 98 : Répartition du nombre de cycles reçus par le volume traité pour plusieurs durées de traitements.	167
Figure 99: Cinétique d'abattement pour un volume traité de 5 mL avec G0 à 1 Hz et $1 \mu\text{L}/\text{s}$. Moyenne de 2 expériences. Pour chaque expérience, deux étalements par point sont réalisés. Les statistiques sont obtenues par des tests de Student réalisés entre la série de valeur du point à T_0 et la série de valeur du point considéré : ** : $P \leq 0,01$, *** : $P \leq 0,005$.	168
Figure 100 : Cinétique d'abattement pour un volume traité de 5 mL avec G0 à 1 Hz et $10 \mu\text{L}/\text{s}$. Moyenne de 2 expériences. Pour chaque expérience, deux étalements par point sont réalisés. Les statistiques sont obtenues par des tests de Student réalisés entre la série de valeur du point à T_0 et la série de valeur du point considéré : ** : $P \leq 0,01$ et *** : $P \leq 0,005$.	169
Figure 101 : Cinétique d'abattement pour un volume traité de 5 mL avec G0 à 2 Hz et $2 \mu\text{L}/\text{s}$. Moyenne de 2 expériences. Pour chaque expérience, deux étalements par point sont réalisés. Les statistiques sont obtenues par des tests de Student réalisés entre la série de valeur du point à T_0 et la série de valeur du point considéré : ** : $P \leq 0,01$, *** : $P \leq 0,005$.	170
Figure 102 : Cinétique d'abattement pour un volume traité de 5 mL avec G0 à 2 Hz et $10 \mu\text{L}/\text{s}$. Moyenne de 2 expériences. Pour chaque expérience, deux étalements par point sont réalisés. Les statistiques sont obtenues par des tests de Student réalisés entre la série de valeur du point à T_0 et la série de valeur du point considéré : *** : $P \leq 0,005$.	171
Figure 103: Evolution de la concentration au cours des 4 jours d'expériences, pour un volume traité de 100 mL avec G0 à 2 Hz et $10 \mu\text{L}/\text{s}$, avec des phases d'arrêt du générateur (rouge). Moyenne de 2 expériences contrôles et 2 expériences essais. Pour chaque expérience, deux étalements par point sont réalisés. Les statistiques sont obtenues par des tests de Student réalisés entre la série de valeur du point à T_0 et la série de valeur du point considéré : ** : $P \leq 0,01$, *** : $P \leq 0,005$.	173



Figure 104 : Cinétique d'abattement pour un volume traité de 5 mL avec G0 à 2 Hz et 10 μ L/s réalisé au centre de recherche de VERI. Moyenne de 3 expériences. Pour chaque expérience, trois étalements par point sont réalisés. Les statistiques sont obtenues par des tests de Student réalisés entre la série de valeur du point à T0 et la série de valeur du point considéré : *** : $P \leq 0,005$	174
Figure 105 : (A) Appareillage UV-C en flux ouvert ; (B) Appareillage UV-C en flux fermé.....	176
Figure 106: Mise en place du dispositif en batch.	177
Figure 107: Graphique représentant la courbure du miroir calculé.	179
Figure 108: Schéma de la construction.	179
Figure 109: Photo d'expérience en flux, côté réservoir.....	180
Figure 110 : Photo d'expérience en flux, côté dérivation.	180
Figure 111 : Vue globale du montage en flux.....	180
Figure 112 : Evolution de la concentration des bactéries <i>E. coli</i> BL21 (DE3) au cours du temps suite à l'exposition aux UV-C. Concentration initiale : 10^9 bactéries/mL, débit : 0,8 mL/s, volume total traité : 400 mL, abattement de 60% par passage dans la chambre de traitement. N = 2 expériences indépendantes. Pour chaque point de chaque expérience, 2 dénombrements des UFC sont réalisés.....	181
Figure 113 : Evolution de la concentration des bactéries <i>E. coli</i> BL21 (DE3) au cours du temps suite à l'exposition aux UV-C. Concentration initiale : 10^7 bactéries/mL, débit : 0,8 mL/s, abattement de 60% par passage dans la chambre de traitement. N = 2 expériences indépendantes. Pour chaque point de chaque expérience deux dénombrements des UFC sont réalisés.....	182
Figure 114 : Evolution de la concentration en bactéries <i>E. coli</i> BL21 (DE3) au cours du temps, après exposition aux UV-C et simulation de relargage de biofilm. Concentration initiale : 10^9 bact/mL, débit : 0,8 mL/s, volume totale traité : 400 mL, ajouts de 5 mL de bactéries à la concentration initiale, représentés par les flèches. N = 2 expériences indépendantes. Pour chaque point de chaque expérience, deux dénombrements des UFC sont réalisés.....	182
Figure 115: Expériences en flux ouvert permettant de déterminer le pourcentage de bactéries inactivées lors du passage dans l'applicateur.	184
Figure 116 : Evolution de la concentration des bactéries <i>E. coli</i> BL21 (DE3) au cours du temps suite à l'exposition aux nsCEP. Concentration initiale : 10^9 bactéries/mL, débit : 0,001 mL/s, volume total traité : 5 mL, abattement de 66% par passage dans la chambre de traitement. N = 2 expériences indépendantes. Pour chaque point de chaque expérience, 2 dénombrements des UFC sont réalisés.....	184
Figure 117 : Cinétique d'abattement pour un volume traité de 5 mL avec G2 à 2 Hz et 10 μ L/s. Moyenne de 2 expériences. Pour chaque expérience, deux étalements par point sont réalisés. Les statistiques sont obtenues par des tests de Student réalisés entre la série de valeur du point à T0 et la série de valeur du point considéré : *** : $P \leq 0,005$. ..	185
Figure 118 : Cinétique d'abattement pour un volume traité de 50 mL avec G2 à 20 Hz et 100 μ L/s. Moyenne de 3 expériences. Pour chaque expérience, trois étalements par point sont réalisés. Les statistiques sont obtenues par des tests de Student réalisés entre la série de valeur du point à T0 et la série de valeur du point considéré : *** : $P \leq 0,005$. ..	186
Figure 119 : Cinétique d'abattement pour un volume traité de 50 mL avec G2 à 20 Hz et 3 200 μ L/s. Moyenne de 3 expériences. Pour chaque expérience, trois étalements par point sont réalisés. Les statistiques sont obtenues par des tests de Student réalisés entre la série de valeur du point à T0 et la série de valeur du point considéré : *** : $P \leq 0,005$	187
Figure 120 : Cinétique d'abattement pour un volume traité de 5 mL avec G2 à 20 Hz et 40 μ L/s. Moyenne de 3 expériences. Pour chaque expérience, trois étalements par point sont	



réalisés. Les statistiques sont obtenues par des tests de Student réalisés entre la série de valeur du point à T0 et la série de valeur du point considéré : *** : $P \leq 0,005$. ..189

- Figure 121 : Cinétique d'abattement pour un volume traité de 5 mL avec G2 à 20 Hz et 40 $\mu\text{L/s}$. Moyenne de 3 expériences. Pour chaque expérience, trois étalements par point sont réalisés. Les statistiques sont obtenues par des tests de Student réalisés entre la série de valeur du point à T0 et la série de valeur du point considéré : *** : $P \leq 0,005$. ..190
- Figure 122 : Cinétique d'abattement pour un volume traité de 50 mL pendant 1 h (vert) avec G2 à 20 Hz et 3200 $\mu\text{L/s}$. Moyenne de 3 expériences. Pour chaque expérience, trois étalements par point sont réalisés. Les statistiques sont obtenues par des tests de Student réalisés entre la série de valeur du point à T0 et la série de valeur du point considéré : *** : $P \leq 0,005$ 191
- Figure 123 : Cinétique d'abattement pour un volume traité de 5 mL avec G2 à 20 Hz et 40 $\mu\text{L/s}$ traités en 2 périodes de 2 h (vert) avec une homogénéisation entre les 2 périodes (rouge). Moyenne de 3 expériences. Pour chaque expérience, trois étalements par point sont réalisés. Les statistiques sont obtenues par des tests de Student réalisés entre la série de valeur du point à T0 et la série de valeur du point considéré : *** : $P \leq 0,001$ 193
- Figure 124: Cinétique d'abattement pour un volume traité de 500 mL avec le G3 à une fréquence de 100 Hz et un débit de 8 mL/s. Moyenne de 3 expériences. Pour chaque expérience, trois étalements par point sont réalisés. Les statistiques sont obtenues par des tests de Student réalisés entre la série de valeur du point à T0 et la série de valeur du point considéré : *** : $P \leq 0,001$ 194
- Figure 125: Gestion des risques électriques et biologiques lors des expériences réalisées sur *Legionella pneumophila* serogroupe 1. 195
- Figure 126 : Cinétique d'abattement pour un volume traité de 5 mL avec le générateur G0 à 2 Hz et 10 $\mu\text{L/s}$. Moyenne de 3 expériences. Pour chaque expérience, trois étalements par point sont réalisés. Les statistiques sont obtenues par des tests de Student réalisés entre la série de valeur du point à T0 et la série de valeur du point considéré : tous les tests ont donné des résultats non significatifs par rapport au contrôle où $P > 0,05$. 196
- Figure 127 : Cinétique d'abattement pour un volume traité de 50 mL avec G2 à 20 Hz et 100 $\mu\text{L/s}$. Moyenne de 3 expériences. Pour chaque expérience, trois étalements par point sont réalisés. Les statistiques sont obtenues par des tests de Student réalisés entre la série de valeur du point à T0 et la série de valeur du point considéré : * : $P \leq 0,05$, *** : $P \leq 0,005$ 197
- Figure 128: Cinétique d'abattement pour un volume traité de 50 mL avec G2 à 20 Hz et 3200 $\mu\text{L/s}$. Moyenne de 3 expériences. Pour chaque expérience, trois étalements par point sont réalisés. Les statistiques sont obtenues par des tests de Student réalisés entre la série de valeur du point à T0 et la série de valeur du point considéré : *** : $P \leq 0,005$. ..198
- Figure 129 : Cinétique d'abattement pour un volume traité de 5 mL avec G2 à 20 Hz et 40 $\mu\text{L/s}$. Moyenne de 3 expériences. Pour chaque expérience, trois étalements par point sont réalisés. Les statistiques sont obtenues par des tests de Student réalisés entre la série de valeur du point à T0 et la série de valeur du point considéré : * : $P \leq 0,05$, *** : $P \leq 0,005$ 199
- Figure 130 : Cinétique d'abattement pour un volume traité de 500 mL de suspension de légionelles avec G3 à 100 Hz et 8 mL/s. Moyenne de 3 expériences. Pour chaque expérience, trois étalements par point sont réalisés. Les statistiques sont obtenues par des tests de Student réalisés entre la série de valeur du point à T0 et la série de valeur du point considéré : * : $P \leq 0,05$ 200
- Figure 131 : Cinétique d'abattement de *L. pneumophila* séro groupe 1 conservées pendant 1,5 mois à 4°C pour un volume traité de 5 mL avec G2 à 20 Hz et 40 $\mu\text{L/s}$. Moyenne de 3 expériences. Pour chaque expérience, trois étalements par point sont réalisés. Les



statistiques sont obtenues par des tests de Student réalisés entre la série de valeur du point à T0 et la série de valeur du point considéré : *** : $P \leq 0,001$ 201

Figure 132 : Energie nécessaire à l'obtention de 1 \log_{10} d'abattement pour différents taux d'abattement par passage dans l'applicateur (en pourcentage de bactéries détruites). 204

Figure 133: Energie nécessaire à l'obtention de 1 \log_{10} d'abattement pour différents nombres d'impulsions par passage dans l'applicateur. 204

Figure 134 : Observation à la loupe binoculaire des électrodes. 205

Figure 135: Cinétique d'abattement pour un volume traité de 5 mL de suspension de *E. coli* avec G2 à 20 Hz et un débit de 40 $\mu\text{L/s}$ obtenue sur une unique expérience. Trois étalements par point sont réalisés. 206

Figure 136: Nombres de bactéries *E. coli* mortes, endommagées, toujours en bon état et nombre de bactéries actives pour des échantillons non traités, traités 5 min, 10 min et 15 min. 207

Figure 137 : Représentation au cours du traitement de la proportion entre bactéries mortes, endommagées et en bon état. 207

Figure 138: Cinétique d'abattement pour un volume traité de 5 mL de suspension de *Legionella pneumophila* serogroupe 1 avec G2 à 20 Hz et un débit de 40 $\mu\text{L/s}$ obtenu sur une unique expérience. Trois étalements par point sont réalisés. 208

Figure 139: Nombre de *Legionella pneumophila* mortes ou toujours en bon état et nombre de bactéries actives pour les échantillons non traités, traités 30 min et 60 min. 209

Figure 140: Evolution de l'abattement des bactéries viables en fonction du temps de traitement (5 mL traité avec G2 à 20 Hz et 40 $\mu\text{L/s}$) Cytométrie en flux – (N = 1 expérience). 210

Figure 141 : Observation au fort grossissement (x100) de *E. coli* BL21(DE3) à l'état frais. 211

Figure 142: Observation au fort grossissement (x100) de *L. pneumophila* serogroupe 1 à l'état frais. 211

Figure 143: Répartition de taille des particules observées par le cytomètre sur un échantillon de *E. coli* et de *L. pneumophila* serogroupe 1. 212





LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Contributions de chaque partenaire pour ce projet.	30
Tableau 2: Livrables et jalons.	30
Tableau 3 : Tableaux des valeurs expérimentales et des résultats nsCEP et de données μ sCEP (Amiali et al., 2006; Chalise et al., 2006; Frey et al., 2013; Katsuki et al., 2002; Kirawanich et al., 2011; MacGregor et al., 2000; Perni et al., 2007; Reyns et al., 2004; Saldaña et al., 2010; Žgalin et al., 2012).	70
Tableau 4 : Tableau récapitulatif des volumes d'eau mis en jeu dans les différentes parties de la tour pilote.	84
Tableau 5 : Paramètres d'entrée de la TAR.	97
Tableau 6 : Caractéristiques calculées de la TAR.	97
Tableau 7 : Valeurs du débit minimum de traitement en fonction du temps de doublement des organismes.	103
Tableau 8 : Valeurs minimum de la puissance électrique et maximum du débit de bypass (toutes les deux obtenues pour 1 impulsion par volume dans le bypass) pour le générateur G0 sur E. coli et pour différents temps de multiplication dans la TAR.	108
Tableau 9 : Liste des générateurs.	119
Tableau 10 : Ensemble des applicateurs réalisés par l'ONERA dans le cadre du projet DEBACIEM.	138
Tableau 11 : Calcul du temps de charge.	143
Tableau 12: Valeurs remarquables de $\Delta V_c(t)$	144
Tableau 13 : Valeur de tension au niveau de la membrane sous une charge progressive en 20 ns jusqu'à 100 kV/cm.	145
Tableau 14: Schéma des expériences en flux ouvert et fermé.	147
Tableau 15: Concentration des principaux ions dans l'eau du pilote TAR.	153
Tableau 16 : Tableau permettant de déterminer la concentration des différents sels à introduire, de façon à obtenir la quantité désirée d'espèces ioniques dans l'eau recomposée.	155
Tableau 17 : Conductivité théorique de l'eau en fonction des espèces ioniques présentes.	155
Tableau 18 : Conditions de traitement en flux ouvert.	165
Tableau 19 : Valeurs caractéristiques sur un volume de 5 mL avec G0 à 1 Hz et 1 μ L/s.	167
Tableau 20 : Valeurs caractéristiques de l'expérience sur 5 mL avec G0 à 1 Hz et 10 μ L/s.	169
Tableau 21 : Valeurs caractéristiques de l'expérience sur 5 mL avec G0 à 2 Hz et 2 μ L/s.	170
Tableau 22 : Valeurs caractéristiques de l'expérience sur 5 mL avec G0 à 2 Hz et 10 μ L/s.	171
Tableau 23 : Valeurs caractéristiques de l'expérience sur 100 mL avec G0 à 2 Hz et 10 μ L/s.	172
Tableau 24: Valeurs caractéristiques de l'expérience sur 5 mL avec G0 à 2 Hz et 10 μ L/s réalisée au centre de recherche de VERI.	174
Tableau 25: Valeurs caractéristiques de l'expérience sur 5 mL avec G0 à 1 Hz et 1 μ L/s.	183
Tableau 26: Valeurs caractéristiques de l'expérience sur 5 mL avec G2 à 2 Hz et 10 μ L/s.	185
Tableau 27 : Valeurs caractéristiques de l'expérience sur 50 mL avec G2 à 20 Hz et 100 μ L/s.	186
Tableau 28 : Valeurs caractéristiques de l'expérience sur 50 mL avec G2 à 20 Hz et 3 200 μ L/s.	187
Tableau 29 : Valeurs caractéristiques de l'expérience sur 5 mL avec G2 à 20 Hz et 40 μ L/s.	188
Tableau 30 : Valeurs caractéristiques de l'expérience sur 5 mL avec G2 à 20 Hz et 40 μ L/s.	190
Tableau 31 : Valeurs caractéristiques de l'expérience sur 50 mL avec G2 à 20 Hz et 3 200 μ L/s.	191
Tableau 32 : Valeurs caractéristiques de l'expérience sur 5 mL avec G2 à 20 Hz et 40 μ L/s.	192
Tableau 33 : Valeurs caractéristiques de l'expérience sur 500 mL avec G3 à 100 Hz et 8 mL/s.	194
Tableau 34 : Valeurs caractéristiques de l'expérience sur 5 mL avec G0 à 2 Hz et 10 μ L/s.	196
Tableau 35 : Valeurs caractéristiques de l'expérience sur 50 mL avec G2 à 20 Hz et 100 μ L/s.	197



<i>Tableau 36 : Valeurs caractéristiques de l'expérience sur 50 mL avec G2 à 20 Hz et 3,2 mL/s. ...</i>	198
<i>Tableau 37 : Valeurs caractéristiques de l'expérience sur 5 mL avec G2 à 20 Hz et 40 µL/s.</i>	199
<i>Tableau 38 : Valeurs caractéristiques de l'expérience sur 500 mL avec G3 à 100 Hz et 8 mL/s. ..</i>	200
<i>Tableau 39 : Valeurs caractéristiques de l'expérience sur 5 mL avec G2 à 20 Hz et 40 µL/s avec des légionnelles conservées plus d'un mois et demi à 4°C.</i>	201
<i>Tableau 40 : Tableau récapitulatif de toutes les expériences réalisées en flux.....</i>	203
<i>Tableau 41 : Représentation au cours du traitement de la proportion entre bactéries mortes et en bon état.....</i>	209



LISTE DES EQUATIONS

Équation 1 : Champ électrique généré entre 2 électrodes concentriques	56
Équation 2 : Temps de charge de la membrane plasmique	61
Équation 3 : Différence de potentiel transmembranaire au niveau de la membrane	61
Équation 4 : Concentration en solutés.....	81
Équation 5 : Augmentation de la concentration bactérienne due à la croissance	94
Équation 6 : Diminution de la concentration bactérienne due au traitement	94
Équation 7 : Relation de récurrence de l'évolution de la concentration en bactéries.....	94
Équation 8 : Résolution de la récurrence	94
Équation 9 : Formule dans les cas où μ peut être considéré comme nul	94
Équation 10: Formule permettant de calculer la valeur de τ	94
Équation 11 : Somme des volumes chauds (partie haute du schéma) et froids (partie basse du schéma)	98
Équation 12 : Expression du débit du bypass nécessaire en fonction du facteur d'abattement obtenu avec le dispositif.....	104
Équation 13 : Puissance électrique liée à α	105
Équation 14 : Impédance de l'applicateur.	137
Équation 15 : Equation simplifiée du temps de charge.	143
Équation 16 : Energie consommée en batch pour 1 \log_{10} d'abattement rapporté à 1 L.	164
Équation 17 : Dose reçue selon l'intensité et le temps.	176
Équation 18 : Intensité d'irradiation de la lampe.	176
Équation 19 : Surface de projection de la lampe.....	177
Équation 20 : Dose UV de la lampe selon la distance utilisée lors de l'expérience.	177
Équation 21 : Formule de calcul de la zone traitée.....	178





GLOSSAIRE, SIGLES ET ABBREVIATIONS

$|\vec{E}|$ = Valeur du champ électrique (en V/m ou kV/cm).

[b] : Concentration en bactéries.

$\Delta V_c(t)$: Variation de la tension sur la membrane à l'instant t.

μ : Taux de croissance d'une population bactérienne.

σ : Conductivité de l'eau en siemens par mètre (S/m) ou en microsiemens par centimètre ($\mu\text{S/cm}$).

τ : Taux d'abattement généré par le dispositif de décontamination. Il est obtenu par la détermination de la différence de concentration en bactéries avant et après le passage dans l'applicateur.

τ_b : Temps de charge de la membrane bactérienne.

Apoptose : Aussi appelée « mort cellulaire programmée », c'est le mécanisme par lequel une cellule déclenche son autodestruction.

Applicateur : Cellule permettant l'exposition d'un volume de liquide aux champs électriques. Certains applicateurs permettent un traitement en batch, d'autres en flux.

Biofilm : Un biofilm est un groupement de micro-organismes dans une matrice protectrice qu'ils sécrètent, fixée à une surface solide.

CEP : Champ électrique pulsé, il s'agit d'une impulsion de champ électrique généré par des électrodes et un générateur de tension. Elles sont notamment caractérisées par leurs durées et leurs amplitudes.

C_p : Capacité calorifique de l'eau.

C_m : Capacitance de la membrane.

Escherichia coli (*E.coli*) : Bactérie ubiquiste très utilisée comme modèle en microbiologie.

Electrochimie : Réactions chimiques induites par un phénomène électrique.

Front de montée : Le front de montée est le temps que met une impulsion électrique pour atteindre sa tension maximale.

IAA : Industrie agroalimentaire.

Impédance : Découle de la généralisation de la loi d'ohm et permet d'exprimer l'opposition d'un élément au passage du courant. Exprimé en ohm (Ω).



Legionella pneumophila : Bactérie pathogène pouvant i) provoquer des pneumonies et ii) se développer dans les climatiseurs, les réseaux d'eaux chaudes et les réseaux d'eaux de refroidissement.

MES : Matière en suspension.

nsCEP : Champs électriques pulsés nanosecondes.

TAR : Tour aéro-réfrigérante. Elle est utilisée pour refroidir des processus industriels. Leur principe consiste à refroidir le point chaud par échange thermique avec un flux d'eau. L'eau ainsi réchauffée est dirigée dans un flux d'air pour qu'elle redescende à la température ambiante. Elle peut ensuite retourner refroidir le point chaud.

TMP : Potentiel transmembranaire. Il s'agit de la différence de potentiel entre le milieu extracellulaire et intracellulaire, au niveau de la membrane.

UFC : Unité formant colonie, terme désignant une unique bactérie s'étant multipliée en milieu solide jusqu'à former un amas visible à l'œil nu.

VBNC : « Viable but non-culturable ». Caractérise les bactéries vivantes mais qui ont perdu la capacité à se reproduire. Elles ne peuvent donc pas être dénombrées par la technique de culture des UFC.

V_{tot} : Volume total.

$V_{\text{traité}}$: Volume sortant de l'applicateur au cours du temps.



Partie I -

INTRODUCTION GENERALE



La pénurie d'eau est un problème grandissant. Dans les pays développés, elle en limite la consommation nécessaire à l'agriculture, l'industrie, et la population. Dans les pays en voie de développement, le manque d'eau potable cause des préjudices plus dramatiques.

En effet, les eaux insalubres restent la première cause de mortalité dans le monde, avec 3,6 millions de victimes par an dont une majorité d'enfants (Payen, 2012).

Il est à noter que les prévisions montrent qu'1,8 milliards de personnes devront survivre dans des régions confrontées à des situations de « rareté absolue de l'eau » et ce dès 2025 (Unesco, 2006). Pourtant, la quantité de molécules d'eau sur Terre reste constante depuis le début de la création de la Terre il y a 4,6 milliards d'années. C'est la disponibilité en eau potable qui n'est pas homogène dans le temps et dans l'espace. Les villes se heurtent à une croissance démographique trop importante comparée aux capacités de développement des réseaux d'eau et de traitement des eaux usées. Ainsi, même dans des villes où l'eau est abondante, la population peut se retrouver en contact avec une eau souillée par ses propres déchets.

Le développement démographique et l'urbanisation font de la problématique de la gestion de la ressource en eau un enjeu essentiel. La gestion industrielle de l'eau potable est aujourd'hui très impactante sur la ressource, et modifie artificiellement le cycle de l'eau. Ce cycle artificiel doit désormais être pris en compte pour préserver les ressources naturelles tant en termes de quantité, que de qualité. En effet, si une quantité trop importante d'eau est prélevée en amont, la ressource peut se tarir et si l'eau est mal retraitée en aval, son retour dans le milieu naturel risque de polluer la ressource.

L'obligation du respect des normes de qualité d'eau dans les pays développés pousse à l'amélioration des techniques permettant un usage de l'eau sans danger pour la santé, tant sur le plan chimique que biologique. L'aspect « qualité microbiologique » de l'eau est ainsi devenu un point clé dans les processus de traitement de l'eau.

Pour de nombreux usages, les normes limitent de plus en plus la quantité de produits chimiques de traitement, tout en exigeant une eau exempte de microorganisme.

L'eau utilisée dans les procédés industriels n'a généralement pas besoin d'être potable. Les normes sont donc moins rigoureuses. La modification de la qualité de l'eau dans les procédés industriels dépend fortement de son usage, mais bien souvent, l'eau utilisée dans ces procédés est propice au développement microbien.

Les tours aéro-réfrigérantes (TAR) sont des installations utilisées pour la climatisation de bâtiments ou pour le refroidissement de processus industriels. Elles rassemblent trois composantes propices au développement de microorganismes, en particulier de la bactérie pathogène *Legionella pneumophila* : l'eau y est peu renouvelée, tiède, et riche en solutés.

Les légionelles sont des bactéries ubiquistes responsables de la légionellose, une infection pulmonaire pouvant conduire à une pneumopathie sévère et mortelle. En 2010, la létalité était de 11,7% en France (BEH n°29-30/2011).

Les TAR sont une des sources principales de transmission des légionelles compte tenu du principe de fonctionnement entraînant la dispersion de microgouttelettes d'eau potentiellement contaminées dans l'atmosphère et inhalables par l'homme. Pour lutter contre la prolifération bactérienne au sein de l'eau des TAR, des traitements de désinfection sont régulièrement utilisés conformément à la réglementation actuelle (*Décret n° 2004-1331 du 1er décembre 2004 modifiant la nomenclature des installations classées*, 2004, *Décret n° 2013-1205 du 14 décembre 2013 modifiant la nomenclature des installations classées*, 2013).



Les traitements les plus répandus en TAR sont chimiques. Cependant, une utilisation intensive de ces substances biocides peut se révéler néfaste pour l'environnement. D'une manière générale, les biocides et leurs sous-produits de dégradation ont des effets toxiques, génotoxiques, cancérigènes ou présentent une toxicité fœtale (Richardson et al., 2007). Il y a également des « scandales sanitaires » relatifs aux déversements dans les milieux naturels de grosses quantités de produits chimiques. C'est le cas récemment, d'un rejet de chlore en grandes quantités et forte concentration dans l'environnement dû à la mauvaise gestion d'une station d'épuration (InfoNormandie, 2014). Consciente de ces dangers, l'Union européenne a mis en application un système d'évaluation des produits chimiques et des biocides visant à en limiter l'usage et ainsi préserver la santé publique (REACH, ("EUR-Lex - 32006R1907," 2006) ; BIOCIDES ("EUR-Lex - 31998L0008 - FR," 1998)).

Afin de pallier l'impact des produits chimiques au niveau environnemental, de nombreuses techniques de décontamination physique, mécanique voire biologique pourraient être envisagées. Il reste néanmoins à en évaluer l'efficacité en tenant compte des contraintes opérationnelles et technico-économiques.

L'objectif du projet DEBACIEM est de disposer à moyen terme d'un équipement de décontamination bactérienne, basé sur un principe physique d'application d'impulsions électriques ultracourtes et utilisable sur une TAR. Cet équipement doit répondre à un cahier des charges précis ainsi qu'aux réglementations en vigueur.





Partie II -

**AVANT PROPOS : PRESENTATION DU
PROJET DEBACIEM**



DEBACIEM est l'acronyme de DEcontamination BACTérienne par Impulsions ElectroMagnétique. Il convient d'insister sur l'aspect purement physique du procédé et sur sa possible substitution aux produits chimiques au regard des réglementations en vigueur.

En effet, les aspects d'impacts environnementaux liés aux rejets sont à prendre en compte et obligent à limiter sélectivement l'utilisation des traitements chimiques.

La nouveauté technique de ce projet est liée au développement d'un prototype de décontamination bactérienne par impulsions de champ électrique ultra-rapides (générateur permettant d'appliquer des impulsions nanosecondes) utilisable en tours aéro-réfrigérantes humides. En effet, il s'agit d'un nouveau mode d'élimination des microorganismes, permettant une consommation énergétique nettement plus faible que la technologie microseconde.

L'objectif du projet vise à élaborer et évaluer les performances d'un prototype de décontamination bactérienne d'eau dans le but de maintenir la concentration en légionelles (*Legionella sp*) inférieure au seuil critique de 1000 unités formant colonies par litre (UFC/L). Il s'agit en effet du seuil au-delà duquel des actions doivent être mises en œuvre par l'opérateur de l'installation de refroidissement (nettoyage, désinfection... : ceci en fonction de la réglementation en vigueur).

La stratégie de réalisation du projet DEBACIEM est décomposée en plusieurs parties :

- 1) Une étude bibliographique sur les procédés de décontaminations physiques existants
- 2) Une étude plus approfondie sur les champs électriques pulsés (CEP)
- 3) Le développement de générateurs prototypes
- 4) L'évaluation du concept en laboratoire (essais biologiques)
- 5) L'optimisation des performances de décontamination sur la cible *Escherichia coli*
- 6) Une étude de performance comparative avec la cible *Legionella pneumophilla*
- 7) Le développement et la mise en œuvre en pilote d'un démonstrateur pré-industriel

DEBACIEM est un projet collaboratif financé par un programme PRECODD de l'Agence Nationale de la Recherche (ANR) et qui fait notamment intervenir plusieurs grands organismes de recherches (Numéro ANR : ANR-08-ECOT-019-005, Numéro ADEME : 0894C0268, 24 février 2009) :

- P1) Veolia Environnement, Recherche et Innovation (VERI)
- P2) IPBS , Université Paul Sabatier (UPS), Toulouse III et le CNRS
- P3) L'Office national d'études et de recherches aérospatiales (ONERA) est le centre français de la recherche aéronautique, spatiale et de défense
- P4) Le Centre d'études et de recherches en procédés et protections électromagnétiques (CERPEM)
- P5) Le laboratoire Mer Molécule Santé (MMS)



Tableau 1: Contributions de chaque partenaire pour ce projet.

	Partenaires*/Partners					Chronogramme / chemin critique																										
	P1	P2	P3	P4	P5	Année 1						Année 2						Année 3														
						2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24	26	28	30	32	34	36									
WP 0																																
WP 1																																
WP 2																																
WP 3																																
WP 4																																
WP 5																																
WP 6																																
	Livrables / Jalons																															
	Rapports d'avancement / états des dépenses																															
	Accord de consortium/rapport final																															

	Pilote de WP
	Participant au WP

- : Rapport d'avancement semestriel / 6 month-progress report
- : Rapport d'avancement semestriel + état des dépenses / Progress report + expenses
- : Accord de consortium / Consortium agreement
- : Rapport de synthèse + récapitulatif des dépenses / Final report + expenses summary

Tableau 2: Livrables et jalons.

Tâche	Intitulé et nature des livrables et des jalons	Date de fourniture nombre de mois à compter de T0/	Partenaire responsable du livrable/jalon
1. Validation des acquis liés aux effets des PEF sur les bactéries			
	Essais en laboratoire avec impulsions microsecondes	5	IPBS
	Essais en laboratoire avec impulsions nanosecondes	5	MMS
	Définition d'un système de décontamination	6	IPBS
2. Réalisation d'un dispositif de décontamination expérimental			
	Conception et construction du générateur optimisé	11	ONERA
	Conception et construction des applicateurs	11	ONERA
	Construction d'un dispositif de décontamination	12	ONERA
3. Etude de l'effet des PEF ultracourts sur 4 cibles microbiologiques			
	Intégration du dispositif expérimental	14	CERPEM
	Préparation des échantillons biologiques et essais	17	MMS
	Rapport d'essais	18	MMS
4. Conception, construction et test en laboratoire d'un système complet préindustriel de décontamination,			
	Réalisation d'un générateur et des applicateurs	21	ONERA
	Intégration du système préindustriel	24	CERPEM
	Tests préliminaires de fonctionnement	27	CERPEM
5. Etude de l'effet des PEF ultracourts sur les bactéries sur pilote industriel,			
	Intégration du dispositif sur la TAR pilote	28	AR
	Essais fonctionnels	32	AR
	Analyse et résultats	33	AR
6. Synthèse et valorisation des résultats			
	Valorisation scientifique	35	CERPEM
	Valorisation technico-commerciale	35	CERPEM
	Rapport final	36	CERPEM

Suite à l'étude bibliographique réalisée conjointement par le CERPEM et IPBS, le principe de base retenu pour le projet DEBACIEM consiste en l'application d'impulsions électriques ultracourtes, à l'échelle de la nanoseconde. Au vu de la force du champ électrique nécessaire et du volume total à traiter important, le champ électrique ne sera pas généré dans l'intégralité du volume, mais dans un 'applicateur' dans lequel l'eau à traiter circulera par dérivation. Pour s'assurer d'un champ homogène, la géométrie de l'applicateur choisi est de type électrode plaque/plaque parallèle.

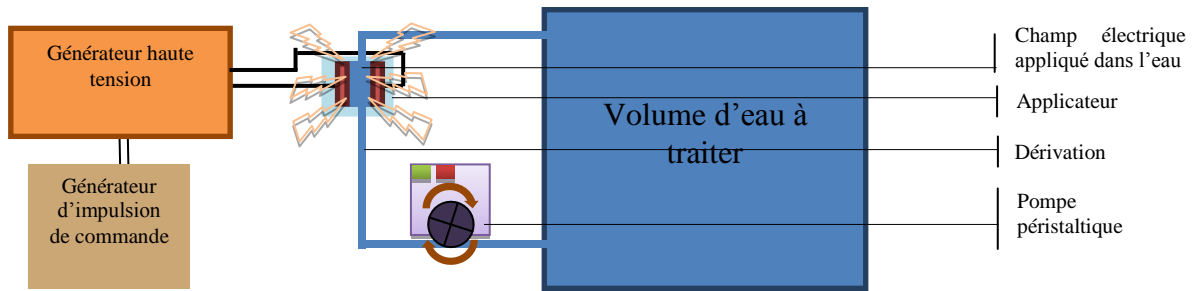


Figure 1 : Schéma du principe de fonctionnement du système de décontamination.

Consécutivement à la fixation de cet objectif, l'ONERA est en charge de réaliser les dispositifs électriques (générateurs et applicateurs).

En parallèle, des validations des calculs permettant de dimensionner un dispositif en flux sont réalisées au CERPEM et au MMS.

Les premiers essais de ces générateurs sur *E. coli* sont réalisés en batch puis en flux au CERPEM en liaison avec MMS.

L'optimisation du procédé se fait conjointement entre l'ONERA et VERI qui modifie les dispositifs électriques en fonction des résultats obtenus.

La validation de l'efficacité du dispositif avec la souche bactérienne « légionelles » en laboratoire et la mise en place du démonstrateur sur un pilote sont réalisées par VERI.

La coordination du travail est assurée par l'IPBS.



Partie III - **BIBLIOGRAPHIE : LES DIFFERENTS
PROCEDES DE DECONTAMINATION BACTERIENNE
DANS L'EAU**



I. GENERALITES

Les bactéries sont des organismes ubiquistes. Certaines souches sont capables de se développer dans des milieux aussi inhospitaliers que les fumeurs noirs¹ des abysses, la haute atmosphère, les cœurs de centrale nucléaire, le froid polaire, etc. S'il existe bon nombre de bactéries adaptées à des environnements extrêmes (extrémophiles), il ne faut pas les confondre avec d'autres organismes à l'origine même du terme extrémophiles, les Archées².

L'étude de la colonisation de néo-milieu (comme une île émergente, un flanc de carrière, par exemple) nous montre aussi que les espèces pionnières sont bien souvent des bactéries. Les bactéries autotrophes participent à la formation d'un biofilm uniquement à partir d'eau, de CO₂, de sels minéraux et de lumière. En se développant, les êtres vivants composant le biofilm produisent des acides aminés, des glucides, des lipides et des polysaccharides. Une nécromasse se forme ainsi au fil du temps. Elle est par la suite recyclée par des détritivores. C'est seulement après ces étapes que les champignons et les végétaux (autres que les algues / mousses / lichens) auront un substrat suffisant pour s'implanter.

Le caractère ubiquiste, la capacité à coloniser des néo-milieux et le fait qu'elles peuvent parfois vivre dans des milieux extrêmes font qu'il est très difficile de supprimer les bactéries d'un environnement, qu'il soit naturel ou fabriqué par l'homme. A tel point que les projets de terraformations³ de Mars envisagent l'utilisation de cyanobactéries en tant que premiers organismes colonisateurs (Banerjee and Debkumari Sharma, 2005; Friedmann and Ocampo-Friedmann, 1995; Thomas et al., 2008).

Il existe pourtant une multitude de procédés susceptibles d'impacter négativement la flore bactérienne qu'ils soient chimiques, physiques ou biologiques.

II. PROCEDES CHIMIQUES

II.1. CADRE REGLEMENTAIRE

Les procédés chimiques sont les plus utilisés dans la décontamination bactérienne, car très efficaces et peu coûteux. Du fait de la nocivité de certains composés, ils sont souvent responsables de problèmes au niveau écologique lorsqu'ils sont rejetés dans l'environnement (Vos et al., 2000). Le cadre réglementaire sur le domaine des produits biocides a été initialement posé en 1998 avec la directive 98 / 8 / CE ("EUR-Lex - 31998L0008 - FR," 1998), transposée en France aux articles

¹ Les fumeurs noirs sont des sources hydrothermales des dorsales océaniques qui expulsent de l'eau à pH acide et à haute température.

² Les archées sont des microorganismes unicellulaires. Ils ont été initialement isolés d'environnements extrêmes et étaient considérées comme des bactéries primitives (d'où le terme d'« archéobactéries », ensuite raccourci en « archées ») Aujourd'hui, ces organismes ont été sortis du domaine des bactéries. Un domaine entier a été créé pour eux, celui des Archaea. Ainsi, il existe trois grands domaines : Les eucaryotes (comprenant les règnes : animal, végétal, champignons, myxomycètes et protistes), les bactéries et les Archaea (qui ne contient qu'un règne, celui des Archaea).

³ La terraformation est la modification d'une planète en cherchant à rapprocher ses conditions environnementales de celles présentes sur Terre de façon à permettre à l'homme d'y vivre. Si ce sujet a été abondamment abordé dans le domaine de la science-fiction, il reste un sujet d'étude sérieux avec des scénarii crédibles pour bon nombre de scientifiques de renom.



L521-1 et suivants du code de l'environnement. Cette directive vise à améliorer le fonctionnement du marché des produits biocides dans l'Union européenne, tout en garantissant un niveau élevé de protection de la santé humaine et de l'environnement. Ainsi, sauf exception, tous les produits biocides destinés à être mis sur le marché requièrent une autorisation, et les substances actives contenues dans ces produits biocides doivent être préalablement approuvées.

Afin de garantir une effectivité maximale pour les autorités et pour les opérateurs économiques, cette directive a été améliorée et par la suite adoptée le 22 mai 2012 (règlement UE n° 528/2012).

Et le système « Registration, Evaluation and Autorisation of CHemicals » (REACH) adopté par le parlement européen le 18 décembre 2006 (« EUR-Lex - 32006R1907, » 2006) est un règlement de l'Union européenne sur les substances chimiques. Le principal enjeu de REACH est de combler le déficit de connaissances des risques environnementaux et sanitaires qui peuvent résulter de la production et de l'utilisation des substances chimiques. REACH introduit ainsi l'enregistrement, l'évaluation, l'autorisation et les restrictions des substances chimiques visant là aussi à préserver la santé publique et l'environnement.

II.2. BIOCIDES OXYDANTS

Les biocides oxydants sont communément utilisés en désinfection de l'eau et notamment en tours aéro-réfrigérantes. Ce sont des biocides non sélectifs dans leur action. Ils peuvent être appliqués de manière préventive : injection en continu à faible dose, ou de manière curative : injection en choc de grande quantité de biocide sur de courtes périodes. Il existe différents agents oxydants dont le chlore, le brome mais aussi le peroxyde d'hydrogène et l'ozone.

II.2.1. Chlore

II.2.1.1 Généralités

Le dichlore a été découvert par Scheele (Scheele, 1781) en faisant réagir de l'acide chlorhydrique à de l'oxyde de manganèse⁴. Il a tout d'abord été utilisé dans l'industrie du papier pour ses propriétés blanchissantes mise en évidence par Berthollet (Berthollet, 1804, 1791). Ses recherches le conduisent à découvrir l'« eau de Javel »⁵ en mélangeant des ions chlorures à de l'hypochlorite de potassium. Il obtient ainsi de l'hypochlorite de sodium, qui est le principe actif de l'eau de Javel. L'effet décontaminant d'un dégagement d'acide chlorhydrique a été montré dès la fin du 18^{ème} siècle par Guyton de Morveau dans « *Nouveau moyen de purifier absolument et en très-peu de temps une masse d'air infectée*, Dijon, 1773 ». Il poursuit ses travaux et publia en 1805 un « *Traité des moyens de désinfecter l'air, de prévenir la contagion et d'en arrêter les progrès* ». Dans cet ouvrage, l'auteur fait aussi mention des « vertus éminemment antiseptiques de l'acide muriatique oxygéné » qui n'est autre que le dichlore (Guyton de Morveau, 1805).

Plusieurs produits à base d'ions Cl⁻ sont utilisés dans la décontamination. Parmi les différentes réactions impliquées dans les systèmes de décontamination par le chlore, c'est souvent l'acide hypochloreux (HOCl) qui est l'agent le plus efficace, les autres étant des précurseurs plus stables,

⁴ L'acide chlorhydrique était alors appelé acide muriatique, ou acide marin, et l'oxyde de manganèse était appelé magnésie

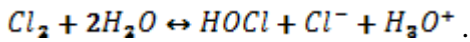
⁵ Le nom fait référence au quartier parisien dans lequel Berthollet la produisait



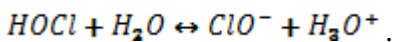
ou des sous-produits de réaction. Son effet décontaminant vient de son fort pouvoir oxydant. Lors de son introduction dans l'eau, le chlore se trouve sous différentes formes.

L'acide hypochloreux (HOCl) correspond au « chlore libre actif », par opposition à l'ion hypochlorite (ClO⁻) ou « chlore libre potentiel » et au « chlore combiné ».

Selon l'équilibre acido-basique, des protons H⁺ peuvent se dissocier de l'acide hypochloreux :
Le dichlore gazeux se dissout dans l'eau et forme l'acide hypochloreux :



L'acide hypochloreux est un acide qui réagit avec l'eau :



Le chlore est très réactif chimiquement et va oxyder bon nombre de matières organiques et de substances présentes dans l'eau. Il peut réagir dans l'eau avec l'ammoniac pour former du « chlore combiné » : les chloramines, ayant également un pouvoir oxydant.

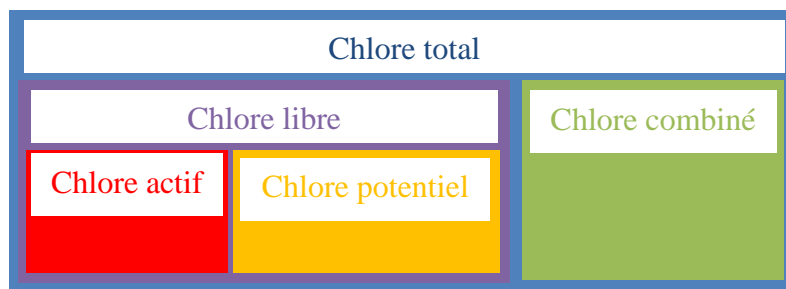


Figure 2 : Les différents états du chlore.

Impact sur les microorganismes

Face à une cellule, l'atome de chlore peut réagir avec les protéines de la membrane plasmique et les protéines intracellulaires en leur faisant perdre leurs fonctions par dénaturation (Camper and McFeters, 1979; Selvaraj et al., 1974). En particulier les enzymes nécessaires au bon fonctionnement de la cellule sont détériorées. En perdant ainsi ses fonctions vitales, la cellule meurt. *A contrario*, la résistance accrue des spores aux désinfectants chimiques vient de leur enrobage par une tunique composée de couches protéiques qui leur est infranchissable (Prescott et al., 2003). Les protéines soumises à un stress oxydatif se lient entre elles en formant des agrégats (VanBogelen et al., 1987). Une fois liée entre elles, les protéines perdent leur utilité pour la cellule. Il a également été montré que des protéines de choc thermique ou « heat shock protein » (HSP) peuvent limiter l'effet du chlore. Ainsi la HSP33 est très efficace dans l'inhibition de la formation de ces agrégats (Jakob et al., 1999).

L'acide hypochloreux réagit sur les acides aminés⁶ en les modifiant assez pour les rendre inutilisables (Pereira et al., 1973) et sur les nucléotides⁷ (Shih and Lederberg, 1976). En détériorant

⁶ Les acides aminés sont les briques élémentaires de toutes les protéines. Ils ont tous un groupement amine et un groupement carboxyle. La réaction de polymérisation capable de former les peptides est catalysée par les ribosomes qui permettent au groupement amine d'un acide aminé de réagir avec le groupement carboxyle d'un autre acide aminé (COOH+NH₂ → CONH+ H₂O).



l'adénine, un des nucléotides, le chlore diminue le pool d'AMP, d'ADP et d'ATP indispensable au stockage de l'énergie fournie par les processus de métabolisation des sucres comme la respiration ou la fermentation. Il a été montré que la phosphorylation oxydative⁸ est inhibée rapidement avec de faibles concentrations en chlore (Venkobachar et al., 1977). Une concentration en chlore légèrement plus forte induit une fuite vers le milieu extérieur d'ARN et de protéines intracellulaires. En augmentant encore la concentration, une fuite d'ADN a pu être observée. Il apparaît que l'inhibition de la chaîne respiratoire est due à l'oxydation du centre fer-soufre directement par le HOCl ou par l'intermédiaire d'une chloramine après que le HOCl ait réagi avec le nitrate (NO_3^-) (Albrich et al., 1981).

La capacité du chlore à réagir avec les liaisons soufre-hydrogène constitue aussi une action décontaminante (Thomas, 1979). Al-Quadiri *et al* ont montré que le chlore a aussi un effet délétère sur la paroi (Al-Quadiri et al., 2008).

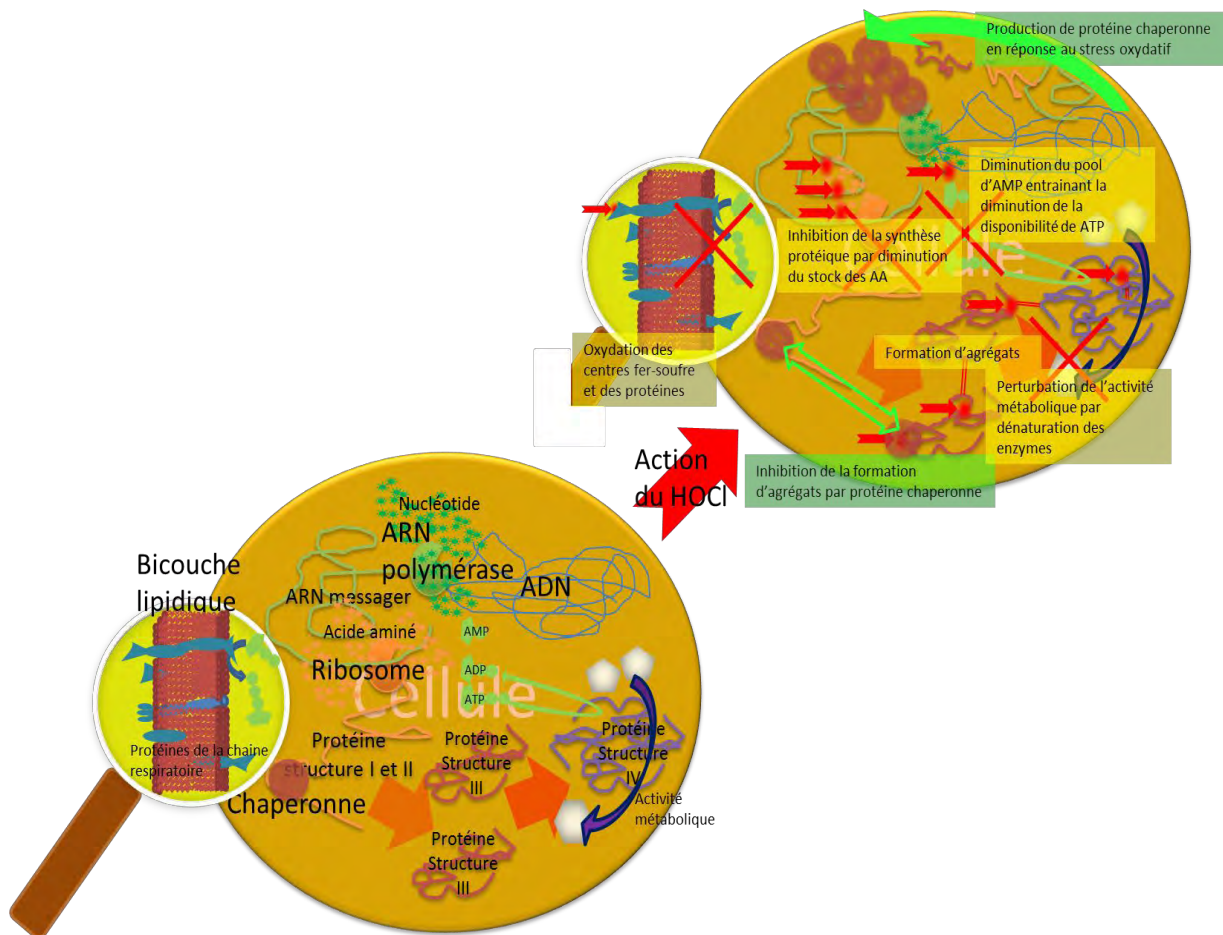


Figure 3 : Modification des activités cellulaires en présence d'acide hypochloreux.

⁷ Les nucléotides peuvent polymériser en formant des liaisons phosphodiester. Ils sont les briques élémentaires de l'ADN quand leur polymérisation est gérée par une ADN polymérase, et de l'ARN quand leur polymérisation est gérée par l'ARN polymérase.

⁸ La phosphorylation oxydative est la voie métabolique qui récupère l'énergie des nutriments (glucides, lipides et protéines). Il permet aux organismes aérobies de régénérer leur ATP à partir d'ADP+Pi.

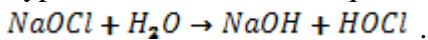


II.2.1.2 Différentes formes de chlore

Les différentes stratégies d'utilisation du chlore dans la décontamination sont énumérées dans les paragraphes suivants. La variété des techniques permet à l'utilisateur/l'exploitant, de choisir la mieux adaptée à son contexte.

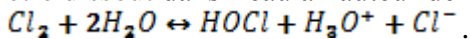
- **L'hypochlorite de sodium : NaOCl**

L'hypochlorite de sodium : NaOCl, plus communément appelé eau de Javel, est un produit chloré très efficace dans l'inactivation des bactéries. L'hypochlorite de sodium est un précurseur de l'acide hypochloreux en milieu aqueux :



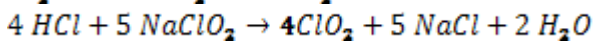
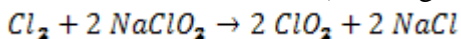
- **Le dichlore : Cl₂**

Le dichlore est un gaz très réactif dans les conditions normales de température et de pression. Il peut être dissout dans l'eau à hauteur de 1 à 2 g/L en réagissant de la manière suivante :



- **Le dioxyde de chlore : ClO₂**

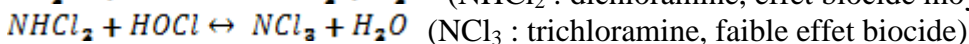
Il s'agit d'un produit instable qui doit être formé peu avant son utilisation. Si sa concentration dans l'air dépasse 10%, il est en effet explosif. Il peut être fabriqué en faisant réagir le chlorite de sodium avec le dichlore (chlore gazeux) ou l'acide chlorhydrique :



Plusieurs publications montrent l'effet décontaminant du dioxyde de chlore sur différentes souches bactériennes et dans différentes conditions physicochimiques. Parmi ces conditions, il est fait référence de l'influence du pH et du temps de contact (Junli et al., 1997) sur l'efficacité de la désinfection (Dernat et al., 1997; Huang et al., 1985; Parrella, 1976).

- **Les chloramines**

Les chloramines, sont des sous-produits de chloration. Trois types de chloramines peuvent ainsi être formés. Il apparaît que leurs proportions dépendent du pH. Les monochloramines (NH₂Cl) apparaissent majoritairement lorsque le pH est supérieur à 7, les dichloramines (NHCl₂) sont générées principalement lorsque ce dernier est compris entre 3 et 7, enfin, les trichloramines (NCl₃) sont fortement présentes à des pH inférieurs à 3.





Les chloramines, et en particulier les monochloramines peuvent être utilisées directement en tant que biocide. Elles réagissent plus lentement que les autres biocides chlorés, mais peuvent néanmoins être utilisées pour la décontamination des circuits de refroidissements des TAR, en particulier car elles sont capables d'agir contre le biofilm (Türetgen, 2004).

- **Autres effets du chlore**

La chloration génère des sous-produits halogénés et notamment des trihalométhanes⁹ (THM) (Hassen et al., 2000; Pourmoghaddas and Stevens, 1995; Racaud and Rawsy, 1994) qui sont potentiellement nuisibles pour l'environnement (Bessix, 2000). Des études épidémiologiques ont pu mettre en évidence des relations entre la quantité de THM absorbée et les cancers de la vessie dans la population générale de l'Ontario (King and Marrett, 1996). Cette corrélation a pu être confirmée uniquement chez certaines populations de l'Iowa : le groupes des hommes et celui des fumeurs (Cantor et al., 1998).

Il a aussi été montré que les sous-produits non volatils sont mutagènes. Des essais sur des bactéries et sur des cellules de mammifères sont regroupés dans les revues de Bull et de Meyer (Bull, 1985; Meier, 1988) et une étude épidémiologique a été menée sur la population du Massachusetts (Wright et al., 2002).

L'efficacité du chlore dépend par ailleurs de la matrice¹⁰ : les molécules organiques réagissent avec le chlore actif. De fait, une relation entre la turbidité¹¹ de l'eau usée et l'efficacité de décontamination a été montrée (LeChevallier et al., 1981).

II.2.2. Brome

Le brome a été découvert indépendamment par deux chimistes différents. Carl Jacob Löwig le découvre en 1825, ses travaux ne sont publiés qu'en 1827 puis répertoriés par Geiger *et al* (Geiger et al., 1828). Antoine Jérôme Balard décrit sa découverte également faite en 1825 dès 1826 par l'intermédiaire de Gay Lussac (Morveau et al., 1826) et illustre le concept de sérendipité¹² : cherchant à approfondir les travaux ayant conduit Bernard Courtois à la découverte de l'iode, 15 ans plus tôt, il mélangea du chlore à de la lessive de cendre de fucus¹³. Après ajout d'une solution d'amidon, il observe la coloration bleue attendue de par la présence d'iode, mais aussi une nuance jaune orangée. Il réussit à extraire et à concentrer cette substance en utilisant une technique novatrice pour l'époque : l'extraction liquide – liquide avec une phase aqueuse et une phase éther. Pensant d'abord que cette substance venait de l'association de l'iode avec le chlore, il chercha en vain à les dissocier pour finir par conclure qu'il s'agit d'un corps simple. Compte tenu de son odeur¹⁴, le nom de brome lui est attribué. Son utilisation dans la décontamination de l'eau ne se produit qu'à partir de 1930.

⁹ Leurs formule est CHX_3 où X est un allotrope tel que le brome ou le chlore.

¹⁰ Tout milieu dans lequel se développent des bactéries peut être appelé matrice. Quand le milieu a une influence sur le phénomène étudié, l'expression consacrée est l'« effet matrice » (terme industriel).

¹¹ La turbidité définit la quantité de matière en suspension qui opacifie l'eau

¹² La sérendipité est le fait de réaliser une découverte sur un sujet donné, sans chercher à la faire, car travaillant initialement sur un autre sujet. Elle n'enlève rien au mérite des bénéficiaires car il faut généralement beaucoup de sagacité pour comprendre l'intérêt d'un événement imprévu ou d'un résultat d'expérience inattendu, et d'en tirer les enseignements permettant la découverte en question.

¹³ Le fucus est une algue cosmopolite des littoraux. L'utilisation de cendres d'algues a permis à B. Courtois de découvrir l'iode.

¹⁴ Le mot « odeur » se dit bromos en grec



Sous forme de corps pur, le dibrome est liquide dans les conditions normales de température et de pression (CNTP). Sous cette forme, il provoque des brûlures de la peau et des muqueuses. Tout comme le chlore, le brome est classé dans les halogènes dans le tableau périodique de Mendeleïev.

Dans la décontamination de l'eau, il est utilisé sous forme d'acide hypobromeux (HOBr). La décontamination par le brome repose sur le même principe que celui du chlore en utilisant son pouvoir oxydant. A concentration égale, le brome a généralement un effet décontaminant plus faible que le chlore. Mais plus le pH de l'eau est basique, plus l'efficacité du chlore diminue, alors que celle du brome reste constante sur une gamme de pH plus grande. L'utilisation du brome est très pratiquée dans l'industrie et dans le maintien de la qualité de l'eau des piscines car les bromamines formées lors des réactions du brome avec les composés organiques sont moins irritantes que les chloramines formées par le chlore. Par contre, il réagit plus rapidement que le chlore permettant moins de rémanence. Il n'est donc pas utilisé dans le maintien de la qualité bactériologique de l'eau dans les réseaux d'eau potable (Lei et al., 2004; Richardson et al., 1999; Ta et al., 1966). En tours aéro-réfrigérantes, le brome peut être privilégié au chlore compte tenu des pH observés pour des tours à pH libre (pH>8). Il est utilisé soit par injection d'une solution stabilisée de brome, soit par la production de brome in situ (électrolyse, mélange de formulation).

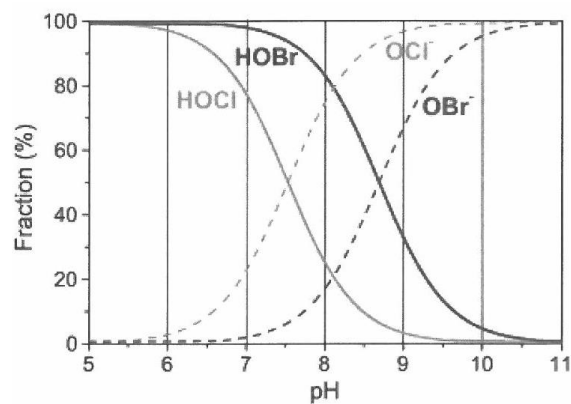
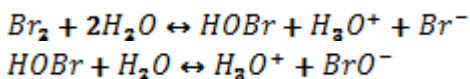


Figure 4 : Courbe de dissociation de l'acide hypochloreux (HOCl) et acide hypobromeux (HOBr) en fonction du pH.

II.2.3. Forme active de l'oxygène (Ozone, H₂O₂)

II.2.3.1 Peroxyde d'hydrogène (H₂O₂)

Le peroxyde d'hydrogène est communément appelé eau oxygénée car il a la même composition qu'une molécule d'eau, avec un atome d'oxygène supplémentaire (H₂O₂). Il est bien connu pour ses propriétés blanchissantes abondamment utilisées en cosmétique. Le peroxyde d'hydrogène se dissocie en libérant des radicaux d'oxygène réactif (radicaux libres °OOH, °OH).

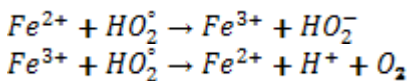
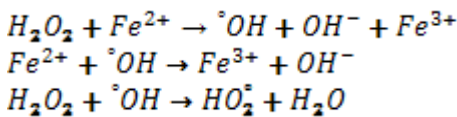


Le pouvoir oxydant du peroxyde d'hydrogène est plus grand que celui du dichlore et du dioxyde de chlore. C'est ce pouvoir oxydant qui lui confère son effet biocide.

Il est capable d'oxyder un grand nombre de composés organiques et minéraux. H_2O_2 agit principalement par l'oxydation des composants cellulaires des bactéries. La formation d'espèces réactives d'oxygène et plus particulièrement les radicaux hydroxyles ($^{\circ}OH$) ont une grande capacité à produire des dommages cellulaires (Labas et al., 2008). Ces radicaux peuvent en effet endommager les acides nucléiques, les enzymes et les constituants membranaires des cellules bactériennes. L'ADN est une cible potentielle de ces radicaux qui attaquent à la fois les bases et les sucres. Cette réaction aboutit à l'inhibition de la réplication de l'ADN (Cabiscol et al., 2000).

Si nécessaire, l'oxydation peut être catalysée par l'ajout de métaux (fer, manganèse ou métalloïdes).

Exemple pour le Fer :

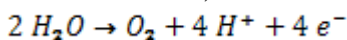


L'ion fer est successivement oxydé ou réduit selon le stade de la décomposition du peroxyde d'hydrogène. C'est la raison de la grande efficacité de la catalyse par les métaux (De Laat and Gallard, 1999). Les UV ou l'ozone peuvent également être utilisés comme catalyseurs. Il s'agit des procédés d'oxydation avancés (Glaze et al., 1987).

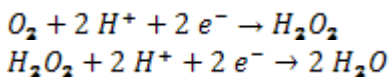
Les réactions de décomposition du peroxyde d'hydrogène ne forment pas de sous-produits, ce qui est un avantage comparé aux produits chlorés ou bromés.

Il est possible de produire du peroxyde d'hydrogène directement dans un circuit d'eau à traiter : en appliquant un courant électrique dans le flux d'eau. Ce traitement entraîne une électrolyse qui génère du peroxyde d'hydrogène.

Ainsi à l'anode, la réaction suivante est observée :



Et au niveau de la cathode :



Il y a ainsi une réduction bactérienne générée par l'effet d'une part du peroxyde d'hydrogène et de l'autre par les champs électriques eux-mêmes (Drogui et al., 2001). Il est parfois utilisé dans le maintien de la qualité biologique des eaux de TAR ou dans les réseaux d'eau destinée à la consommation humaine, mais il est généralement combiné avec d'autres techniques de décontamination comme l'ozone ou les UV.

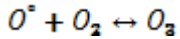
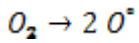
De nombreux facteurs agissent sur l'efficacité du peroxyde d'hydrogène tels que le pH, la température, les métaux, la lumière, tous favorisant sa décomposition. L'exposition au peroxyde d'hydrogène doit être limitée car il présente une toxicité, causée par trois propriétés : il est corrosif, il génère de l'oxygène et il oxyde les lipides. Il peut causer des irritations de la peau, et du tractus



intestinal s'il est ingéré. Le relargage d'oxygène dans l'estomac peut par ailleurs induire des embolies (Watt et al., 2004). Comparativement à d'autres biocides oxydants, l'utilisation du peroxyde d'hydrogène ne semble pas aisée en tours aéro-réfrigérantes compte tenu des coûts associés.

II.2.3.2 Ozone (O₃)

L'ozone est un gaz soluble dans l'eau. Son pouvoir oxydant est encore plus grand que celui du peroxyde d'hydrogène. Il a une demi-vie très courte (quelques minutes au maximum), il doit donc être produit sur le lieu de son utilisation. Les ozoneurs peuvent le produire à partir de l'air ou de l'oxygène comprimé, de deux façons différentes : soit en utilisant une lumière UV-C (lampe à vapeur de mercure), soit par décharges électriques. Il s'agit d'une technique de décontamination chimique mais produite par une technique physique. En fractionnant certaines molécules de dioxygène de l'air, les arcs électriques ou les UV-C forcent les atomes d'oxygène à s'associer avec les autres molécules de dioxygène :



Il est également possible de produire l'ozone directement dans l'eau, par électrolyse de l'eau.

Comme pour le peroxyde d'hydrogène, il n'y a pas de formation de sous-produits car il se dissocie en oxygène.

A partir de quelques ppm dans l'air, il devient toxique, il est irritant pour les yeux et les poumons, et néfaste pour les reins et le cerveau. Pour éviter les risques d'intoxication, un détecteur d'ozone doit systématiquement être mis en place pour surveiller la concentration en ozone de l'air ambiant à proximité de l'ozoneur.

Les mécanismes conférant ses propriétés biocides ne sont pas connus de façon précise. L'ozone oxyde un très grand nombre de composants, il est donc difficile de mettre en évidence son effet sur un élément en particulier. Globalement, il est admis qu'il peut oxyder les éléments de la paroi des bactéries, puis de la membrane, ce qui induit la perforation de la cellule, et donc sa lyse (Mahfoudh, 2010; Mahfoudh et al., 2010). C'est un désinfectant à large spectre, actif sur les bactéries, les champignons, les virus, les protozoaires et les spores de bactéries.

La courte demi-vie de l'ozone en fait un produit chimique peu impactant sur l'environnement. Il n'est en effet pas rémanent et ne conduit pas à de sous-produits de réaction. Son utilisation se démocratise, mais il reste un procédé onéreux à mettre en place et à utiliser.

II.3. BIOCIDES DE SYNTHÈSE OU « NON OXYDANTS » EN TAR

II.3.1. Isothiazolinone

Les Isothiazolinones sont des composés organiques constitués d'isothiazoles, hétérocycles avec trois carbones, un azote et un soufre.

Il existe cinq types d'isothiazolinone capables de tuer toutes sortes d'organismes unicellulaires (procaryote ou eucaryote). Le principal produit commercial est un mélange de deux isothiazolinones : la méthylchloroisothiazolinone (75 %) et la méthylisothiazolinone (25 %) (Kathon CGi de la société Rohm et Haas) qui a montré son pouvoir biocide sur plusieurs souches bactériennes (Nicoletti et al., 1993).



Ce sont leurs propriétés électrophiles (c'est à dire qu'ils sont capables de se lier à un autre composé en acceptant un doublet d'électrons) qui leur confèrent leurs pouvoirs biocides, principalement en réagissant avec les enzymes impliquées dans la croissance des bactéries et en inhibant l'ATP synthétase¹⁵ (Williams, 2006).

Ils sont parfois utilisés dans le traitement du bois comme antifongique, dans les cosmétiques comme agent conservateur ou dans les eaux de « process » (eau de refroidissement) en tant qu'agent luttant contre le développement de la flore bactérienne. Ils peuvent poser des problèmes de santé car ils deviennent allergènes lorsque la concentration utilisée est trop forte et de ce fait en limite leur utilisation à 15 ppm dans les cosmétiques européens. Dans les eaux de TAR, ils sont largement utilisés, et combinés à d'autres techniques de décontamination.

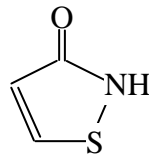


Figure 5: Formule développée des isothiazolinones.

II.3.2. Ammonium quaternaire

Les ions ammoniums dont chacun des quatre radicaux sont des alkyles ou des aryles, sont appelés les ammoniums quaternaires. Tout comme les saponines, ce sont des tensioactifs. Le pouvoir décontaminant des ammoniums quaternaires a été montré sur *E. coli* par (Jia et al., 2001). Il est d'autant plus fort que les chaînes alkyles sont longues. Deux amines quaternaires (« 4, 4'-(1, 6-Hexamethylenedithio) bis (1-octylpyridinium iodide) » et « *N, N'*-1, 6-hexaméthylènebis (1-décyl-4-carbamoylpyridinium bromide) ») ont été testées et ont montré leur efficacité sur des légionelles, y compris sur des légionelles se développant dans des amibes (Shirai et al., 2000).

Ces composés endommagent les membranes cellulaires des bactéries, champignons et algues et augmentent ainsi la perméabilité de la paroi cellulaire.

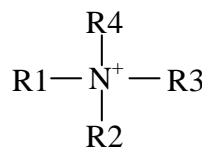


Figure 6: Formule développée des ammoniums quaternaires.

II.3.3. 2-bromo-2-nitro-1,3-propanediol (Bronopol)

Le bronopol est un biocide créé par une société pharmaceutique : « Boots Company Limited ». Il s'agit d'un glycol halogéné qui est un décontaminant particulièrement efficace sur les bactéries (moins sur les microorganismes eucaryotes) (Croschaw et al., 1964) mais qui a l'intérêt de ne pas être toxique pour les cellules de mammifères. Selon les auteurs, entre 12,5 et 50 µg/mL suffisent à inhiber *Pseudomonas aeruginosa*.

¹⁵ L'ATP synthétase est responsable de la production de l'ATP, molécule clé dans le transfert énergétique entre les différentes réactions biochimiques de la cellule



Initialement utilisé comme conservateur dans les cosmétiques, il a ensuite été adopté par l'industrie, et notamment dans la décontamination des TAR ("GESTIS Substance database," 2013).

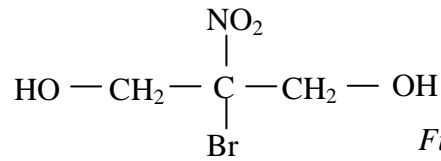


Figure 7: Formule développée du Bronopol.

II.3.4. 2,2-dibromo-3-nitrilopropionamide (DBNPA)

C'est un amide halogéné qui se dégrade rapidement dans l'eau. 3 log₁₀ d'abattement ont été observés à partir d'une concentration de 8 mg/L sur des légionelles dans un système de TAR modèle en laboratoire (W. M. Thomas, 1999). De nombreux brevets ont été déposés concernant cette substance, tant en ce qui concerne son utilisation directe (Feldman et al., 2012; Unhoch et al., 2008) que son conditionnement permettant d'éviter sa dégradation (Feldman and Lupin, 2010; Shapiro et al., 2012).

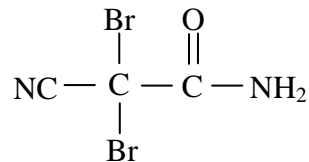


Figure 8: Formule développée du DBNPA.

II.3.5. Polyhexaméthylène biguanide (PHMB)

C'est un produit qui reste stable, il a donc une action rémanente. Il est commercialisé sous le nom de Ventocil par Blackley, Manchester, UK. A l'instar des isothiazolones, il est allergène à forte concentration. Les mécanismes impliqués dans la destruction des bactéries viennent de sa capacité à détruire la membrane plasmique, en s'associant aux phospholipides qui la composent, et pourraient également perturber les cellules en interférant avec les acides nucléiques (Allen et al., 2006). Les auteurs ont également montré que la croissance de *E. coli* en milieu de culture et en début de phase exponentielle est stoppée par l'ajout d'une concentration de PHMB supérieure ou égale à 10 mg/L. A 7,5 mg/L, la croissance est retardée de 7h.

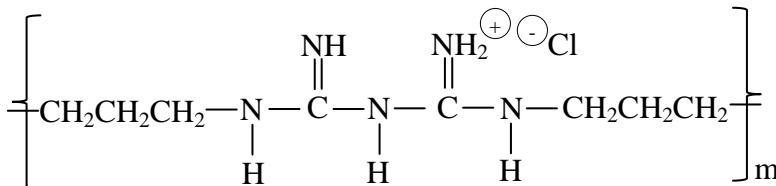


Figure 9: Formule développée du PHMB.



II.3.6. Glutaraldehydes

Le dialdéhyde glutaral (glutaraldehyde) a abondamment été utilisé dans la décontamination de l'eau en vertu de son large spectre d'action (il est notamment capable de détruire les formes sporulées (Dyas and Das, 1985)) et de son effet rapide (Gorman et al., 1980). Son activité biocide repose sur la réticulation des protéines. Sa réactivité est dépendante du pH et de la température. Egalement utilisé comme conservateur en cosmétique il a fait l'objet d'études toxicologiques. Il s'avère qu'il est irritant pour les yeux et les voies respiratoires, son dosage ne doit donc pas dépasser 0,5% et il ne doit pas être conditionné sous forme d'aérosol ("Final Report on the Safety Assessment of Glutaral," 1996). De plus, il pourrait provoquer de l'asthme (Quirce et al., 1999).

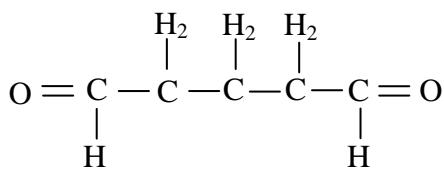


Figure 10: Formule développée du Glutaraldehyde.

II.4. TRAITEMENT POTENTIEL

Les traitements présentés ci-après ne sont pas utilisés en tours aéro-réfrigérantes.

II.4.1. Métaux (cuivre et argent)

Le cuivre est connu pour ses propriétés bactéricides. Son action a notamment été étudiée sur *E. coli* et *Salmonella* (Espariz et al., 2007). Des canalisations en cuivre sont utilisées dans les systèmes d'alimentation en eau et dans les hôpitaux pour limiter les problèmes microbiologiques, mais il reste à étudier certains aspects de son utilisation. Par exemple, la limitation du développement de la flore bactérienne par l'utilisation de canalisations en cuivre peut s'avérer de courte durée et son association avec des sous-produits de chloration peut poser problème (Kishida et al., 2013).

Plus généralement, les enzymes entrant en contact avec des ions métalliques sont susceptibles de perdre leur structure et leur fonction (Thurman et al., 1989). Les nanoparticules d'argent ont également montré leur efficacité sur *E. coli* (Sondi and Salopek-Sondi, 2004).

L'intérêt des nanoparticules, en plus de pouvoir traverser les membranes, est que leur très petite taille leur confère un très grand rapport surface/volume, donc en solution, l'interface liquide/solide est augmentée. Les réactions entre un liquide et un solide s'opèrent justement à l'interface.

L'ionisation cuivre/argent est une technique de désinfection répandue et utilisée dans certains hôpitaux, des piscines et même par la NASA pour la réalisation d'eau potable des missions Apollo. Elle est également souvent utilisée dans les maisons de repos dans le but de lutter contre les légionelles. L'ionisation est produite par électrolyse à partir de deux électrodes face à face entre lesquelles un courant est appliqué.



Les bactéries ont des mécanismes de protection vis-à-vis des métaux. Elles peuvent associer les ions métalliques entre eux par biométhylation¹⁶, ce qui les rend inactifs. Ces ions sont ensuite séquestrés dans un compartiment de la cellule, ou liés à la surface de la cellule (Thurman et al., 1989). La séquestration peut également intervenir sous forme de cristaux (biominéralisation). Ce mécanisme intervient quand le pH du cytoplasme augmente (résultant de l'activité cellulaire), le carbonate se retrouve ainsi au-dessus de son seuil de saturation et précipite avec les ions métalliques. Les cristaux ainsi formés peuvent s'adsorber à la paroi extracellulaire (Diels et al., 1995; Podda et al., 2000).

II.4.2. Iode

L'utilisation de l'iode dans la décontamination a d'abord été envisagée sous forme de teinture d'iode (diiode dissout dans l'éthanol), pour la désinfection des plaies lors de la première guerre mondiale (Lyon Smith, 1915). La teinture d'iode est toujours employée en milieu hospitalier en tant qu'antiseptique.

L'efficacité de l'iode dans l'inactivation des bactéries et des virus dans l'eau potable a été montrée par Chang et Morris (Chang and Morris, 1953). Son utilisation est également proposée dans le maintien de la qualité microbiologique des piscines. En effet, en utilisant un système de contrôle automatique et régulier avec un système de diffusion adapté, l'iodation peut être un procédé pouvant remplacer la chloration dans les piscines (Black et al., 1970). Cependant, l'iode a du mal à s'imposer dans l'éventail de solution de traitement d'eau. Des effets délétères de l'iode sur la santé ont été constatés, notamment concernant la thyroïde qui utilise l'iode pour synthétiser les hormones thyroïdiennes. A partir d'une consommation de 2 mg/jour, la fixation de l'iode au niveau de la thyroïde décroît (Wolff et al., 1949). L'iode reste une solution pour les populations n'ayant pas de problèmes thyroïdiens, et ayant un régime alimentaire assez pauvre en iode (Backer and Hollowell, 2000). L'utilisation de l'iode en tant que désinfectant de l'eau destinée à une utilisation aussi diverse que l'abreuvement pour les animaux d'élevage, l'agriculture, la pêche, l'industrie alimentaire, les fruits et les légumes, les systèmes de traitement des eaux industrielles et les industries pharmaceutiques est brevetée (Harvey et al., 1999). Elle n'est pourtant pas utilisée au sein des systèmes de traitement des TAR.

II.5. CONCLUSION SUR LES TECHNIQUES CHIMIQUES

Les techniques de décontaminations chimiques apparaissent plutôt efficaces et économiques. Leur mise en place est relativement simple. Les techniques basées sur la chimie restent actuellement les plus utilisées en industrie et dans la gestion de l'eau potable. Les désinfectants et les antiseptiques utilisés en hôpitaux font également une utilisation massive de produits chimiques biocides. A tel point qu'il semble que certaines bactéries ont développé des formes de résistance (McDonnell and Russell, 1999).

Les principaux problèmes sont liés à leur toxicité et à la pollution générée par les sous-produits de réaction et de dégradation ou par le composé lui-même.

¹⁶ La biométhylation est le processus biologique qui permet la fixation d'un groupement méthyle (-CH₃) à une molécule.



III. TRAITEMENTS BIOLOGIQUES EMERGENTS

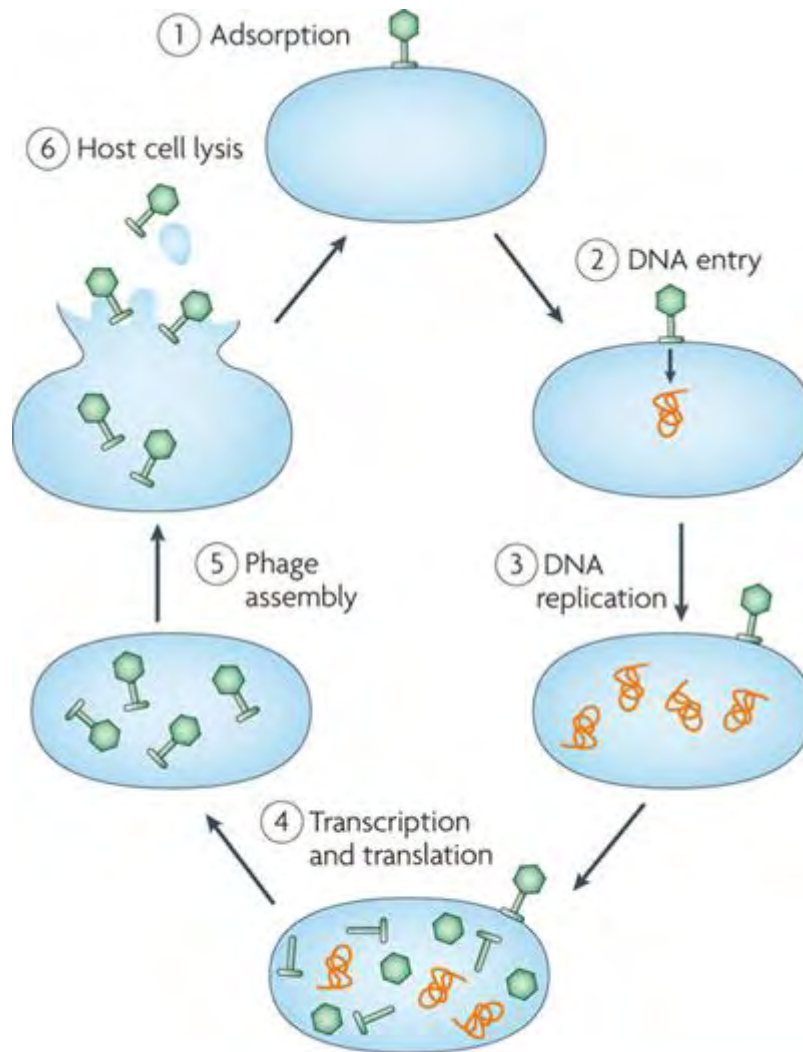
III.1. PEPTIDES ANTIMICROBIENS

Les peptides antimicrobiens sont ubiquistes du vivant et très variés dans leurs structures et leur façon d'agir (Zaslhoff, 2002). En générale, ils créent des pores dans la membrane plasmique, ou inhibent la formation de la paroi (Hassan et al., 2012; Toke, 2005). Le premier peptide antimicrobiens a été découvert en 1925 par Gratia (Gratia A., 1925). Comme les observations de son efficacité ont été réalisées sur *E. coli*, il nomma ce peptide colicine (qui « tue les coli »). Ce peptide est produit par *E. coli* V (Cascales et al., 2007). Par la suite, de nombreux autres peptides antimicrobiens ont été découverts, ceux produits par des insectes : cécropine (Steiner et al., 1981), des amphibiens (Zaslhoff, 1987), et même des mammifères (Ganz et al., 1985). Leur utilisation est envisagée pour lutter contre les résistances aux antibiotiques (Hassan et al., 2012).

Des travaux de recherches ont été menés sur le développement de solutions de destruction de légionelles par des peptides antimicrobiens (Verdon et al., 2008) notamment pour des applications en réseau d'eau de refroidissement.

III.2. BACTERIOPHAGES

Les bactériophages sont des virus s'attaquant aux bactéries. Ils sont très étudiés, car peuvent être une alternative aux antibiotiques. Il a été montré que les bactéries ont des mécanismes de résistance face aux bactériophages tout comme elles en ont face aux antibiotiques. Il y a néanmoins une énorme différence entre les antibiotiques et les bactériophages. Les bactériophages se multiplient plus ou moins bien en fonction de leurs capacités d'infection. Les bactériophages les plus efficaces sont ceux qui se multiplient le plus. Ainsi, bien que leur reproduction ne soit pas autonome, ils évoluent en contrecarrant continuellement les stratégies de résistance que développent les bactéries (Dublanche, 2009). Une telle coévolution n'existe pas avec les antibiotiques. L'infection des bactéries par les bactériophages se fait à partir de sites de liaison d'antigènes spécifiques. Ce récepteur varie d'un phage à l'autre et dépend de l'espèce bactérienne ciblée. Une fois le bactériophage fixé sur la bactérie, son ADN est injecté dans le cytoplasme pour être lu (transcription + traduction) par la bactérie qui produira ainsi les protéines constituant les phages. Toutes ces protéines s'auto-assembleront pour former de nouveaux phages. Quand un assez grand nombre de phages est produit, la bactérie se lyse et libère les phages dans le milieu extérieur.



Nature Reviews | Microbiology

Figure 11: Cycle d'infection d'une bactérie par un bactériophage (Labrie et al., 2010).

Il existe un brevet sur l'utilisation de phages dans la lutte contre la listeria dans les produits alimentaires (Carlton and Loessner, 2004). La société Intralytix (www.intralytix.com) propose un cocktail de six bactériophages pour traiter la viande ou les produits laitiers : ListShield™.

Les bactériophages sont particulièrement virulents dans les biofilms, à tel point que leur utilisation peut être envisagée pour la destruction des biofilms (Sutherland et al., 2004). Plusieurs brevets ont été déposés à ce sujet (Curtin and Donlan, 2006; Donlan and Curtin, 2006; Donlan, 2009).

III.3. AMIBES

Les légionelles sont rarement en libre circulation dans les eaux de réseaux. La grande majorité vit et se développe dans le biofilm collé aux parois (Declerck, 2010). En effet, à l'interface eau/paroi, la flore bactérienne sécrète des polysaccharides qui s'accrochent aux parois et constituent une matrice dans laquelle les bactéries et autres unicellulaires peuvent se développer à l'abri des turbulences et des produits répandus dans l'eau. Il a notamment été montré que le biofilm joue un rôle dans la



survie des légionelles des canalisations d'eaux (Murga et al., 2001). Les amibes phagocytent les bactéries qui circulent à proximité. Les légionelles résistent à la digestion permettant ainsi leur développement (Barker and Brown, 1994; Declerck, 2010).

Leur capacité à proliférer au sein des amibes les protège des traitements chimiques de l'eau (Thomas et al., 2004). Les légionelles sont auxotrophes pour la cystéine et doivent trouver cet acide aminé dans le milieu environnant. Elles ne peuvent donc se développer qu'en présence d'autres microorganismes, ou grâce à un substrat riche en cystéine.

Il existe une espèce d'amibe capable d'internaliser et de dégrader les légionelles : *Amoebae Willaeria magna* (Dey et al., 2009). Grâce à cette caractéristique, un brevet proposant d'ensemencer cette amibe dans les zones où la contamination en légionelles pose problème a été déposé (Bodennec et al., 2007). Cela dit, il est montré expérimentalement que l'ensemencement et le maintien de cette amibe au sein des réseaux de TAR ne sont pas encore maîtrisés, et le risque que ces amibes se répandent dans l'environnement, en impactant d'autres souches bactériennes pourrait déséquilibrer le biotope. Il est à noter que les légionelles ont également la capacité de résister à la digestion par les macrophages de l'homme. Elles peuvent ainsi se développer dans les poumons. C'est cette caractéristique qui les rend pathogènes et potentiellement mortelles chez les personnes ayant une faiblesse respiratoire ou immunodéprimée (Breiman and Butler, 1998; Fields et al., 2002; Stout and Yu, 1997).

III.4. CONCLUSION SUR LES TECHNIQUES BIOLOGIQUES

Ces techniques consistent à adapter à l'industrie des mécanismes de défense sélectionnés par l'environnement au cours des milliards d'années de l'évolution des espèces. Si elles sont indispensables aux organismes qui les utilisent pour se défendre contre les bactéries, l'adaptation industrielle peut se révéler compliquée, diminuer son efficacité, voire la rendre totalement inefficace.

Il existe une certaine réticence à utiliser des amibes ou des bactériophages. Répandre des organismes vivants pour contrecarrer le développement d'autres organismes vivants semble en effet risqué. L'amibe et/ou le bactériophage sont susceptibles de se répandre dans l'environnement (rejet d'effluents, panache d'eau ...) en affectant d'autres organismes que ceux ciblés initialement.

Les saponines sont des molécules certes naturelles, mais se rapprochant des produits chimiques. Leur utilisation massive pourrait également poser des problèmes de pollution de l'environnement.

IV. PROCÉDES PHYSIQUES

L'intérêt des procédés physiques par rapport aux procédés chimiques ou biologiques est que leur utilisation est plus facilement contrôlable. En effet, il suffit généralement d'un bouton « on /off » pour mettre en marche ou interrompre le procédé.

Ce n'est pas le cas des produits chimiques qui impactent les milieux traités après leur utilisation.



IV.1. COAGULATION/DECANTATION/FILTRATION

Les techniques combinées de coagulation et décantation consistent à amplifier artificiellement le phénomène de décantation naturelle. A l'instar de la filtration, il ne s'agit pas à proprement parler d'une technique de décontamination dans le sens où les microorganismes ne sont pas détruits, mais séparés de l'eau.

La coagulation consiste à supprimer les répulsions intercolloïdales. L'ajout dans l'eau de fer ou d'aluminium sous la forme de chlorure ferrique ou de sulfate d'aluminium par exemple, permet la neutralisation des charges négatives des éléments tels que les bactéries, la matière organique ou la matière inorganique en suspension. Ces éléments n'étant plus chargés électriquement ne se repoussent plus, et peuvent se lier entre eux. Leurs masses accrues permettent une sédimentation rapide ou une filtration plus facile. L'utilisation de sulfate d'alumine a créé une certaine polémique car il pourrait y avoir un lien avec l'augmentation de la fréquence de la maladie d'Alzheimer (Ramaroson et al., 2003).

Dans le cadre de la potabilisation de l'eau, la coagulation à elle seule, ne permet pas une élimination bactérienne suffisante. Pour limiter la consommation de chlore et la formation de sous-produits, les filières de traitement de l'eau intègrent généralement des étapes préalables de coagulation/floculation (regroupement des éléments en suspension) suivies de décantation et filtration (élimination des éléments).

A l'échelle laboratoire, des petits filtres en nitrocellulose d'une porosité de 0.22 μm sont fréquemment utilisés pour éliminer d'un liquide toutes les bactéries potentiellement présentes. Cette technique garantit l'asepsie de l'échantillon sans autoclavage permettant ainsi de préserver des échantillons thermosensibles. Il est impossible d'utiliser ce genre de dispositif pour le traitement d'eau dans le domaine industriel.

Il existe d'autres types de filtres dont les applications sont industrielles. Les filtres à sable (Hozalski and Bouwer, 1998) et les filtres à charbon actifs en grains (CAG) (Clark, 1987) permettent une bonne rétention des bactéries pour un débit compatible avec des contraintes industrielles.

Les membranes sont de plus en plus utilisées dans le traitement de l'eau sur une échelle plus importante. L'évolution de la technique permet d'avoir un grand éventail de solutions selon l'application. La micro-, l'ultra- et la nano-filtration sont choisies selon la taille des éléments à filtrer. La microfiltration est généralement suffisante pour la rétention des microorganismes. L'ultrafiltration est capable de retenir les macromolécules. La nano-filtration, proche de l'osmose inverse, permet la rétention des ions divalents, elle est utilisée pour le dessalement. Elle peut être frontale pour filtrer l'intégralité de l'échantillon ou tangentielle pour limiter l'encrassement (Schäfer et al., 2004). La filtration dérivée (de la circulation principale) peut être utilisée dans les TAR pour éliminer les matières en suspension (MES).

Il existe plusieurs brevets proposant l'utilisation conjointe de floculation et de sédimentation pour la purification des eaux usées : (Arai et al., 1996; Holub and Lamensdorf, 1995; Salzer and Schwering, 1980). C'est une étape de traitement quasi systématique au sein des usines de traitement d'eau potable. Dans les TAR, la coagulation/décantation/filtration peut être utilisée en amont pour traiter l'eau d'alimentation quand celle-ci ne provient pas du réseau d'eau potable. Dans ce cas, le but est principalement de diminuer la turbidité et les MES.



IV.2. HAUTE TEMPERATURE

Le chauffage a été l'une des premières techniques de décontamination, notamment grâce à Pasteur qui mit à mal la théorie de la génération spontanée en montrant qu'un liquide suffisamment chauffé puis protégé de l'extérieur (en utilisant une « bouteille à col de cygne ») permet sa conservation, c'est-à-dire qu'il empêche le développement bactérien.

IV.2.1. Stérilisation/pasteurisation

La stérilisation se fait en chauffant sous pression atmosphérique à des températures supérieures à 100°C ce qui permet de détruire tous les microorganismes, y compris les formes sporulées quand elle est conjointe à une augmentation de pression (voir Partie III -IV.3). La pasteurisation ne se fait qu'à une température de 70°C et permet uniquement la destruction des formes bactériennes végétatives (Pelczar, 1998). Une température de 65°C permet une destruction totale et rapide (quelques minutes) des légionelles (Sanden et al., 1989).

IV.2.2. Chauffage ohmique

Le chauffage ohmique est une technique permettant de chauffer par effet joule directement le liquide à traiter en appliquant un courant électrique entre deux électrodes. Le liquide se comporte alors exactement comme une résistance, l'échauffement a ainsi l'avantage d'être très homogène. La limite de cette technologie est l'électrochimie. En effet, lors de l'application du courant électrique les constituants des électrodes sont relargués dans le produit traité (Bansal and Chen, 2006). Agro process et GEA (GEA, 2013) proposent des solutions « clé en main » pour le secteur agroalimentaire et en particulier les produits laitiers.

Une technique similaire est développée par ACTI-FLASH[®]. Elle consiste au passage d'un courant électrique le long d'un tube. C'est l'interface eau/tube qui fait office de résistance ohmique. Elle est destinée à pasteuriser les liquides très fluides (eau, vin, lait, jus de fruit).

IV.2.3. Rayonnement infrarouge et microonde

Outre les techniques de chauffage par conduction thermique et le chauffage ohmique, le chauffage peut aussi faire appel aux rayonnements infrarouges et aux microondes.

Le rayonnement infrarouge est une onde électromagnétique dont la longueur d'onde est supérieure à 700 nm, c'est-à-dire trop grande pour qu'elle soit visible par l'œil humain. Il permet un « chauffage par rayonnement » sur les surfaces cibles. Il n'est efficace que sur une faible épaisseur. Il génère donc un fort gradient thermique dans l'échantillon traité (voir lumière pulsée, partie IV.5.2) ce qui est généralement problématique pour une décontamination homogène. Ce procédé affecte la paroi, la membrane et provoque des fuites du cytoplasme sur les cellules végétatives (Krishnamurthy et



al., 2010). Il a également montré son efficacité contre des spores bactériennes (Hamanaka et al., 2006).

Les microondes sont aussi des ondes électromagnétiques, mais de plus grande longueur d'onde, de un millimètre à 1 mètre. A certaines fréquences (autour de 1 à 2 GHz), elles permettent l'excitation des molécules d'eau. Elles traversent mieux l'échantillon que les infrarouges permettant un chauffage plus homogène. A l'instar des infrarouges, les microondes peuvent inactiver les formes sporulées. Les formes végétatives sont inactivées en moins de cinq minutes avec des puissances appliquées comprises entre 325 et 1400 W alors que les formes sporulées nécessitent un traitement d'au moins 1400 W pendant dix à vingt minutes (Najdovski et al., 1991).

IV.2.4. Autres dispositifs

Le chauffage peut aussi se faire par transfert de vapeur. La société Mesa propose divers dispositifs pour des applications industrielles ("Mesa, la différence par l'excellence," 2013). Le principe est plutôt simple : la vapeur chaude et l'eau froide sont injectées à l'entrée d'une canalisation. L'eau en sortie de canalisation s'est mélangée à la vapeur, elle est donc chauffée par celle-ci avec un excellent rendement.

Il a été montré que l'exposition au soleil équatorial de bouteilles d'eau constitue une méthode simple et efficace de potabilisation. En effet, l'eau ainsi exposée atteint environ 55°C. Dans ces conditions, une concentration en *E. coli* de 20×10^5 UFC/mL est désinfectée en sept heures (Joyce et al., 1996).

Les méthodes de décontamination par chauffage sont très utilisées en industrie agroalimentaire (IAA). Elles présentent néanmoins l'inconvénient de dénaturer les protéines et les vitamines. Le chauffage modifiant les propriétés organoleptiques, elles ne peuvent être utilisées que pour les aliments dont l'intérêt nutritionnel n'a pas besoin d'être préservé, ou qui supporte le traitement.

Les chocs thermiques ont très longtemps été utilisés comme traitement curatif des réseaux d'eau chaude sanitaire pour des cas de prolifération de *Legionella* ou de *Pseudomonas*. Ils ne sont pas envisageables en traitement de tours aéro-réfrigérantes destinées à refroidir les eaux de « process » industriel.

IV.3. HAUTE PRESSION/ONDE DE CHOC

IV.3.1. Haute pression

L'utilisation des hautes pressions est en général associée avec les hautes températures : l'autoclavage est la technique la plus répandue dans les laboratoires afin d'assurer la stérilité des échantillons utilisés. Elle est difficilement applicable au traitement industriel de l'eau à cause de son coût énergétique élevé. Son utilisation nécessite, en outre, des dispositifs de sécurité importants et



une habilitation de l'utilisateur à l'utilisation des autoclaves. En effet, le volume eau/air sous pression mis en jeu est très grand et peut provoquer une explosion très puissante en cas de rupture mécanique.

Dans les autoclaves, la surpression permet à l'eau de monter jusqu'à 120°C tout en restant liquide. Dans ces conditions, même les spores sont détruites en quelques dizaines de minutes (Prescott et al., 2003). La tunique, qui est la structure externe de la spore et qui est composée de couches de kératine, se brise. Elle laisse alors entrer l'eau au contact du « core » (partie centrale de la spore) qui *de facto* perd son intégrité. En effet, le « core » n'est composé que de cytoplasme déshydraté (contenant l'appareil nucléaire), d'une membrane cytoplasmique (membrane du corps central) interne et de la paroi sporale (paroi du corps central) (Meyer et al., 2004). Il n'est pas très résistant aux hautes pressions.

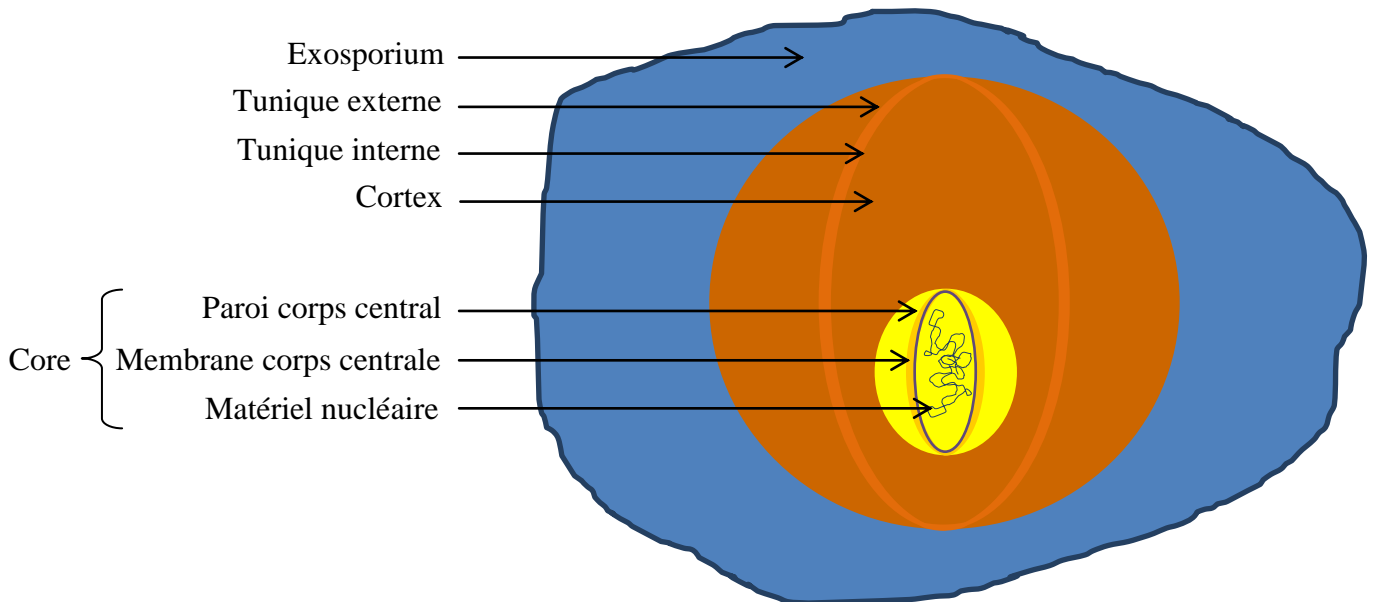


Figure 12 : Représentation des différentes couches d'une spore.

Une pression de 827 mégapascals (MPa) combinée à une température de 75°C maintenue pendant 20 minutes permet un abattement des spores de *Clostridium botulinum* de type A d'environ 3 log₁₀ (Reddy et al., 2003).

Les hautes pressions peuvent aussi être utilisées à des températures proches de la température ambiante (Reddy et al., 1999). L'avantage étant d'éviter la dénaturation par thermolyse du produit traité. L'intensité de pression est de plusieurs centaines de MPa (Smelt, 1998). Elle est appliquée par de l'eau sous pression dans une enceinte haute pression, la pression ainsi appliquée est isostatique, c'est-à-dire qu'elle est identique en tout point de l'enceinte. Les échantillons traités de la sorte sont en général des produits emballés. L'effet a notamment été montré sur *Lactobacillus*, intéressant ainsi l'industrie laitière (Lin et al., 2002). Notons que les spores sont capables de résister à de telles pressions. Néanmoins, Hayakawa *et al* ont montré qu'associées à un chauffage modéré elles peuvent être inactivées (Hayakawa et al., 1994).



IV.3.2. Onde de choc

Une autre technique utilise également l'effet destructeur des hautes pressions et consiste en l'émission d'ondes de choc dans l'eau qui augmentent brièvement et localement la pression. Une onde de choc est littéralement un champ généré par un choc. Il se caractérise par une surpression dynamique. Utilisées de façon répétée, ces « impulsions de pression » inactivent les microorganismes. Loske *et al* utilisent des impulsions électriques générant des arcs associés à un réflecteur ellipsoïdal pour générer des ondes de choc dans l'eau (Loske et al., 2002). Ces ondes de choc sont associées à l'émission d'un spectre lumineux (due à la décharge électrique) et des phénomènes de cavitations. Quand elles atteignent une taille critique, les bulles formées par cavitation implosent en générant localement de très grandes chaleurs et de hautes pressions.

Les auteurs montrent un effet spécifique de telles ondes de choc dans l'inactivation de *E. coli* ATCC 10536. Ils ont également observé les différents effets des ondes de chocs indépendamment les uns des autres. Il en ressort que, dans les cas étudiés, l'amplitude de pression de l'onde de choc appliquée n'est pas un facteur modifiant significativement l'abattement : l'amplitude des ondes de chocs est réglée par la tension de l'arc électrique, il a été testé soit à 18 kV soit à 25 kV. Or il n'y a pas de différence d'abattement observable entre les expériences à 18 kV et à 25 kV. Il n'est toutefois pas possible de conclure que l'amplitude n'a pas d'influence hors de l'intervalle étudié. Par contre, le spectre lumineux émis par l'arc électrique utilisé pour générer l'onde de choc semble intervenir dans l'abattement. Et le phénomène de cavitation joue également un rôle significatif. En utilisant le même dispositif, Alvarez *et al* montrent une inactivation sur *E. coli* O157:H7, *Salmonella*, *Typhimurium* et *Listeria monocytogenes* et cette inactivation varie en fonction de la souche (Alvarez et al., 2004).

L'effet décontaminant des ondes de choc semble donc multifactoriel. Les phénomènes de cavitation et de différences de pression sont à rapprocher du paragraphe précédent (haute pression / hautes températures), alors que l'étincelle produisant le spectre lumineux se rapproche des phénomènes de lumière pulsée (voir le chapitre sur les photons).

Des procédés de cavitation hydrodynamique sont commercialisés pour le traitement des TAR (VRTX Technologies, Schertz, Texas). Ils montrent les mêmes performances que les produits chimiques dans le maintien de la qualité microbiologique (Gaines et al., 2007).

IV.4. SONICATION

Les ondes sonores sont dénommées ultrasons quand leur fréquence est supérieure à 20 kHz. Elles peuvent être diffusées par des sonotrodes ou dans des bains à ultrasons qui utilisent généralement le principe des piézoélectriques pour convertir l'énergie électrique en énergie mécanique ultrasonore.

Dans l'eau, les ultrasons génèrent des bulles par cavitation. Comme précisé dans le paragraphe précédent, ces bulles implosent en générant une grande pression et chaleur locale. Dans ces conditions extrêmes, des réactions chimiques qui ne se forment pas avec des conditions normales de températures et de pressions (CNTP) peuvent se produire. Il s'agit là du champ de la sonochimie.

Le pouvoir décontaminant des ultrasons a été mis en évidence en 1929 (Harvey and Loomis, 1929). Le mécanisme est compris beaucoup plus tard : la cavitation générée par ultrasons crée des ondes de cisaillements¹⁷ sur les membranes cellulaires qui se disloquent et donc détruisent les microorganismes (Hughes and Nyborg, 1962).

¹⁷ Les ondes de cisaillement sont des ondes dont le déplacement des particules est perpendiculaire au déplacement de l'onde elle-même.



Des expériences sur *E. coli* et *E. faecalis* ont montré qu'une exposition de six à dix impulsions par seconde, pendant dix minutes, permettent un abattement de trois \log_{10} (Gholami et al., 2012). Les auteurs ont aussi montré que l'efficacité de décontamination ne dépend pas de la charge bactérienne. Par ailleurs, une spécificité de souche y a également été notée.

S'il est connu que les ultrasons peuvent générer des espèces chimiques oxydatives par sonochimie comme le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) (Hua and Hoffmann, 1997; Stricker and Lohse, 2014; Suslick and Price, 1999), l'effet de décontamination est principalement dû aux ultrasons eux-mêmes (Furuta et al., 2004).

Dans les applications industrielles, les ultrasons doivent être combinés à une autre technique utilisant directement soit des désinfectants chimiques, de l'ozone, des UV (Mason et al., 2003), ou encore des chocs thermiques associés ou non à de hautes pressions (Raso et al., 1998). Cela permet de bénéficier d'effet de synergie particulièrement fort, notamment avec le chlore (Mason et al., 2003).

La société Ashland (Covington, Kentucky, États-Unis) propose l'utilisation des ultrasons dans le traitement des réseaux d'eau et notamment des TAR, via un dispositif nommé Sonoxide.

IV.5. LES PHOTONS

IV.5.1. Les ultraviolets

Les ultraviolets (UV) sont des ondes électromagnétiques identiques à la lumière visible, mais l'œil humain ne peut les voir car leurs longueurs d'ondes sont trop courtes (inférieure ou égale à 400 nm). Ils sont divisés en trois groupes en fonction de leurs longueurs d'ondes : les plus proches du spectre visible (entre 315 nm et 400 nm) sont les UV-A, les UV intermédiaires (entre 280 nm et 315 nm) sont les UV-B, et les longueurs d'ondes les plus éloignées du spectre visible (entre 100 nm et 280 nm) sont les UV-C. La courte longueur d'onde des UV-C font qu'ils sont moins pénétrants mais les plus énergétiques que les autres gammes d'UV. Ils sont donc considérés comme étant les plus destructeurs. De plus, la longueur d'onde la plus absorbée par l'ADN est de 260 nm, c'est donc cette longueur d'onde qui est la plus létale (Prescott et al., 1995).

Les lampes à UV-C sont utilisées dans la décontamination de grands volumes d'eau. Elles sont utilisées en usine de traitement d'eau potable afin de favoriser la désinfection multi barrière ou encore en piscine pour limiter l'apport de chlore. L'efficacité dépend de l'âge de la lampe, de la dose UV, et de la qualité de l'effluent traité (turbidité). De plus, le dépôt de biofilm sur la lampe amenuise son efficacité au cours du temps. Malgré cela, ce traitement présente une bonne efficacité et est bien connu depuis plusieurs dizaines d'années (Qualls et al., 1989). De plus, les légionelles sont particulièrement sensibles aux UV (Knudson, 1985). En particulier, 1 \log_{10} d'abattement est obtenu avec une dose de $920 \mu\text{Ws}/\text{cm}^2$ (Antopol and Ellner, 1979). L'un des principaux inconvénients des UV-C est leur propriété mutagène. Le spectre d'absorption de l'ADN est compris entre 190 et 300 nm. Par photochimie, les UV compris dans cette gamme induisent la formation de ponts disulfures entre certaines bases de l'ADN. La cellule fait alors intervenir des mécanismes de réparation. Ces réparations sont sources d'erreurs (Haas, 1966). Le fait d'augmenter les mutations de l'ADN au niveau des bactéries peut devenir problématique. En effet, certaines mutations peuvent les rendre plus pathogènes.



IV.5.2. La lumière pulsée

La lumière pulsée utilise des flashes de lumière brefs et intenses. Elle associe l'effet des UV avec ceux d'une lumière visible et des infrarouges (IR). Cette large répartition spectrale, ainsi que le mode d'émission impulsionnelle de la lumière semblent responsables de l'efficacité de ce procédé par rapport aux systèmes basés uniquement sur les UV. La lumière pulsée est produite par une lampe à xénon.

Les infrarouges induisent ponctuellement une très grande augmentation de la température à la surface de l'échantillon qui redescend à température ambiante sitôt la fin du flash. Les photons du domaine visible (dont la longueur d'onde est comprise entre 400 et 700 nm) participent aussi à l'échauffement, ils sont absorbés ou réfléchis en fonction de la couleur de la cible.

Les spores sont sensibles à la lumière pulsée. Les spores d'*Aspergillus niger* sont plus résistantes que les autres spores, et ce, probablement du fait de leur pigmentation qui protège l'ADN (Anderson et al., 2000). En règle générale, les formes végétatives sont plus sensibles que les formes sporulées, et les bactéries Gram négatives sont plus sensibles que les Gram positives (Jay, 2000; Rowan et al., 1999). Gomez-Lopez *et al* ont montré que plus la lampe est proche, plus le traitement est efficace. Ils ont aussi montré qu'il n'y a pas d'apparition de résistance après 13 traitements successifs à la lumière pulsée.

Les lumières pulsées riches en UV sont plus efficaces que les lumières pulsées pauvres en UV (Rowan et al., 1999).

L'avantage de la lumière pulsée est que ce procédé est globalement athermique (malgré les échauffements ponctuels dus aux IR). Elle agit sur tous les microorganismes et ne forme pas de résidus chimiques. Les lumières pulsées sont une solution crédible dans la décontamination des produits alimentaires (Gonzalez-Gomez et al., 2013). Utiliser la lumière pulsée pour traiter directement un volume d'eau est difficilement envisageable car son faible pouvoir pénétrant est mieux adapté aux traitements de surfaces qu'aux traitements des effluents.

Le premier brevet déposé concernant la décontamination par lumière pulsée date de 1984 (Hiramoto, 1984). La société Montena, qui est implantée à Rossens en Suisse, propose des machines à lumière pulsée. Elle a réalisé des tests d'abattement sur de nombreuses bactéries sous formes sporulées (*Aspergillus niger*, *Bacillus subtilis* var *niger*, *Geobacillus stearothermophilus*, *Bacillus pumilus*, *Alicyclobacillus acidoterrestris*). Pour toutes les souches, les résultats montrent une décontamination de 5 log₁₀ après 2 flashes de 2 J/cm². Pour ces tests, le procédé ne peut dépasser une fréquence d'impulsion de 1,4 Hz, nécessite une alimentation triphasée 400V / 50 Hz et un débit d'air de 200 m³/h pour refroidir la source lumineuse.

IV.6. IONISATION

IV.6.1. Rayon gamma

Les rayons gamma sont des rayonnements électromagnétiques ionisants produits par radioactivité. La source utilisée en général est le cobalt 60 et émet son rayonnement de manière spontanée sans consommation d'énergie autre que celle intrinsèque au radio-isotope. Pour la décontamination bactérienne de solides, l'utilisation pleine et entière de la puissance du rayonnement consiste à



déposer la source au centre d'une pièce aux murs épais¹⁸. Les échantillons à traiter (généralement des solides déjà emballés voire des palettes de transports) sont apportés dans la pièce via une machinerie. Toutes les opérations doivent être réalisées à distance afin de protéger l'opérateur. Ces rayons sont très pénétrants et l'échantillon est traité en profondeur, même au travers de l'emballage. Il faut une dose de 10 kGy¹⁹ pour assurer une élimination des microorganismes. Les sociétés Ionisos ("IONISOS-prestataire de services pour la stérilisation par rayonnements ionisants," 2013) et Steamatic ("Carpet Cleaning, Air Duct Cleaning, & Restoration | Residential & Commercial | Steamatic," 2013) proposent de tels traitements. Si les applications sont principalement réalisées sur des solides il est à noter que la décontamination de l'eau est possible (Hochanadel, 1952; Thompson and Blatchley III, 2000).

IV.6.2. Les streamers

Les plasmas représentent le quatrième état de la matière et désignent un ensemble de particules ayant un niveau d'excitation trop important pour que la matière soit à l'état fondamental²⁰.

Les streamers sont des plasmas froids produits par un champ électrique élevé, sous le seuil de passage à l'arc. Ils sont également appelés précurseurs d'arc, ou décharges couronnes. Ils apparaissent quand le champ électrique est tel qu'il arrache les électrons des atomes ; il y a alors ionisation du milieu. Les ions chargés positivement migrent vers l'anode, et les électrons vers la cathode. Les électrons migrant plus rapidement que les cations, un champ apparaît, qui se déplace entre les deux électrodes. Si ce champ est maintenu trop longtemps, les électrons ont le temps de passer d'une électrode à l'autre induisant la formation de l'arc (Lauque, 2009).

Ces systèmes sont généralement composés de deux électrodes asymétriques : la première sous forme d'une tige placée dans l'axe d'un cylindre conducteur qui constitue la seconde électrode. Les streamers sont alors déclenchés par ce système pointe-cylindre.

L'effet décontaminant de la décharge est inhomogène pour plusieurs raisons :

- Le champ électrique créé est très fort (suffisant pour inactiver les bactéries) à proximité de la tige (*Figure 13* zone B), mais beaucoup plus faible à proximité du cylindre (trop faible pour qu'il ait un effet direct sur la décontamination) (*Figure 13* zone A). Il dépend de sa distance à la pointe, selon la formule :

Équation 1 : Champ électrique généré entre 2 électrodes concentriques

$$\vec{E} = \frac{V}{r \ln\left(\frac{R1}{R2}\right)} \quad R_2 < r < R_1$$

Où :

- r est le rayon auquel le champ électrique est calculé (m).
- V est la tension (V).
- R1 et R2 sont respectivement le rayon externe et interne de l'applicateur (m).

¹⁸ Il faut une épaisseur de plusieurs centimètres de plomb pour arrêter le rayonnement gamma. Notons qu'il n'est jamais stoppé à 100%, l'absorption en fonction de l'épaisseur traversée ayant un comportement exponentiel.

¹⁹ Le gray est l'unité d'énergie absorbée par un milieu homogène de 1 kg quand il est soumis à un rayonnement ionisant de 1J.

²⁰ Sur terre, les plasmas ne se manifestent naturellement que lors d'aurores boréales ou d'éclairs, pourtant 99% de la matière de l'univers est sous cette forme.



- Le streamer lui-même ne se répand pas dans tout le volume, mais reste localisé au centre de l'applicateur, et dans le plan orthogonal à la pointe, et passant par celle-ci. Or, il a été montré que les streamers (*Figure 14*) produisent des ultra-violet (UV) (Gupta and Bluhm, 2008), des résidus oxydants (formes activées de l'oxygène), tel que l'ozone (O_3) ou le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ainsi que des ondes de choc. Le pouvoir décontaminant de ces phénomènes est aussi localisé vers la pointe.

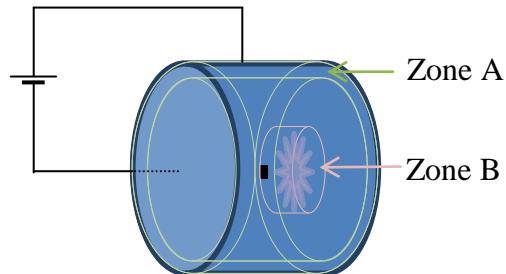


Figure 13 : Schéma d'applicateur de streamer.

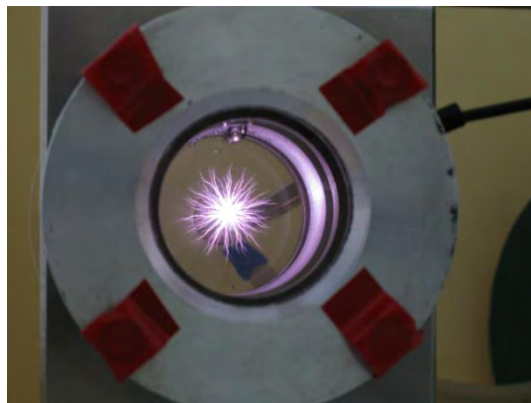


Figure 14 : Photographie d'un applicateur de streamer au moment d'une décharge.

Certaines techniques permettent néanmoins de générer plusieurs streamers à chaque décharge. Faire traverser l'électrode tige de part en part de l'électrode cylindre de façon à supprimer l'effet de pointe, ou ajouter des aspérités générant une perturbation électrique le long de la tige peuvent permettre de générer des streamers à plusieurs endroits lors d'une même décharge. Ceci pourrait améliorer l'homogénéité du traitement (*Figure 15*).

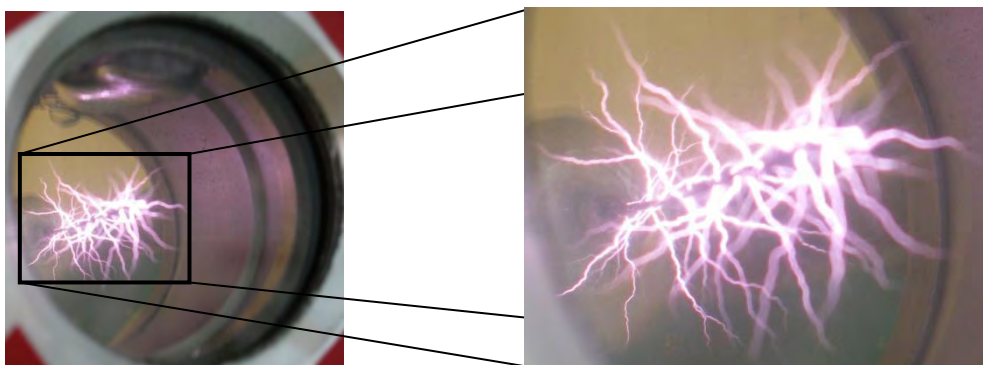


Figure 15 : Déclenchement de plusieurs streamers grâce au dépôt de plusieurs points d'araldite le long de la tige. L'araldite étant diélectrique, elle crée une perturbation du champ qui permet le déclenchement d'un streamer à l'interface tige de tungstène / araldite.



IV.7. CHAMPS MAGNETIQUES

Li *et al* ont montré une efficacité des champs magnétiques dans la destruction de *E. coli*. Ils ont montré qu'augmenter l'intensité du champ magnétique, la fréquence d'impulsion ou le temps d'exposition, augmente la décontamination. Avec un champ de 160 mT, une fréquence de 62 kHz, et un temps de traitement de 16 heures, ils ont obtenu un abattement de 4 log₁₀ dans un système en flux fermé (Li *et al.*, 2004). D'autres auteurs (Fojt *et al.*, 2004) ont montré un abattement de plusieurs log₁₀ avec un champ de 10 milli tesla à une fréquence de 50 Hz, appliqué en moins de 30 min. Ils ont mis en évidence une spécificité de souche : *Escherichia coli*, *Leclercia adecarboxylata* et *Staphylococcus aureus* ont été testés. Il apparaît que *E. coli* est la souche la plus sensible et *Staphylococcus aureus* la plus résistante. Le coût énergétique et la faible vitesse d'éradication semblent limiter les applications industrielles.

Un brevet a été déposé proposant l'utilisation de champ magnétique oscillant de forte intensité (entre 5 et 50 tesla) pour l'inactivation des microorganismes (Hofmann, 1985).

IV.8. CHAMPS ELECTRIQUES

IV.8.1. Généralités

Les premiers à avoir mis en évidence la possibilité de détruire des bactéries ou des levures avec des champs électriques pulsés (CEP) sont Sale et Hamilton (Sale and Hamilton, 1967). Ils sont également les premiers à avoir émis l'hypothèse que les champs électriques pouvaient induire la formation ou l'élargissement irréversible de pores dans les membranes cellulaires. Le terme de « structures transitoires de membrane » est aujourd'hui préféré par certains. En effet, le terme de « pore » implique la notion de « trou » dans la membrane, ce qui n'a jamais pu être démontré, et correspond plus difficilement au concept de la « mosaïque fluide » développé par Singer et Nicolson (Singer and Nicolson, 1972). Néanmoins, il est désormais certain qu'un champ électrique assez fort et d'assez longue durée autorise le passage au travers de la membrane de certaines molécules qu'elle stoppe en temps normal (Neumann *et al.*, 1982).

Le principe consiste à délivrer des champs électriques impulsionnels dans une cuve contenant une suspension bactérienne (ou d'autres organismes unicellulaires) via deux électrodes, l'ensemble étant appelé applicateur et branché à un générateur d'impulsions électriques.

Depuis, les progrès dans la conception des générateurs à haute tension et du design des applicateurs ont permis d'étudier des types d'impulsions très variés, tant au niveau de l'amplitude du champ électrique appliqué, que de la fréquence de répétition des impulsions ou de leurs formes et de leurs durées. L'utilisation des CEP dans le domaine de la décontamination est suffisamment variée pour avoir fait l'objet d'un livre (Barbosa-Cánovas, 1999). Il traite en particulier de la stérilisation à froid adaptée à l'industrie agroalimentaire. Les progrès observés ont aussi ouvert la voie à de nombreuses applications. Selon les impulsions utilisées, les effets biologiques peuvent varier. La possibilité des CEP à générer des « ruptures cellulaires », à induire des rejets métaboliques et à améliorer la conservation des aliments intéressent l'industrie agroalimentaire (IAA) (Knorr *et al.*, 1994). Par



ailleurs, les paramètres de durée et d'amplitude des champs électriques efficaces sont désormais bien connus (Barsotti et al., 1999). La liste des applications des CEP est vaste. Il est possible de :

- Dénombrer et trier des cellules par cytométrie en flux : « Dans ce but, la veine liquide²¹ est chargée électriquement, puis fractionnée en une succession de gouttelettes. La gouttelette contenant la cellule analysée est déviée en passant dans un champ électrostatique et récupérée dans un récipient collecteur. Si la cellule appartient à une sous-population non sélectionnée ou si la gouttelette formée ne contient pas de cellule, la veine liquide ne sera pas chargée et la gouttelette éliminée. » (“Cours de cytométrie,” 2013; Ibrahim and van den Engh, 2007).

- En associant à des cellules des nanoparticules de magnétites, elles peuvent être guidées directement par un champ électromagnétique. Cette technique a été utilisée par une équipe de chercheurs pour fabriquer des tissus en trois dimensions (Shimizu et al., 2007a, 2007b).

- Faire fusionner plusieurs cellules ensemble dans des microsystèmes fluidiques (Hu et al., 2013). Les lignées cellulaires fusionnées étaient des MIH-3T3 (issue de fibroblastes de souris) et des myoblastes.

- Modifier le cytosquelette : phénomène qui a été observé sur des cellules humaines en culture (Stacey et al., 2011). L'organisation du cytosquelette joue un rôle dans la variation de l'électroperméabilisation (Hohenberger et al., 2011; Rosazza et al., 2011; Teissié and Rols, 1994) et l'électrofusion (Blangero et al., 1989).

- Rendre les membranes plasmiques perméables à l'ADN pour réaliser de l'électrotransformation : (Neumann et al., 1982). Cette technique est désormais utilisée en routine dans de nombreux laboratoires (Dower et al., 1988).

- Lutter contre des tumeurs (Mir et al., 1991) : l'électrochimiothérapie utilise les champs électriques pour aider la molécule active du médicament à pénétrer dans le tissu à traiter (Mir and Orłowski, 1999). Des résultats concluants ont été observés sur des sarcoïdes qui sont des tumeurs développées chez le cheval (Rols et al., 2002). De même, l'effet anticancéreux de la mitomycine C sur le cancer de la vessie est amélioré par l'électroporation (Vásquez et al., 2012). Les CEP nanosecondes (nsCEP) ont aussi un effet direct sur les fibrosarcomes de souris (Beebe et al., 2002). L'effet sur des tumeurs cérébrales a aussi été montré (Agerholm-Larsen et al., 2011).

- Une étude montre un effet surprenant. Si dans la grande majorité des publications, les champs électriques montrent des effets délétères sur les cellules, les impulsions nanosecondes dont le champ électrique est inférieur à 10 kV/cm semblent pouvoir, *a contrario*, stimuler le développement de la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Takao et al., 2013).

- Extraire des protéines d'intérêt de levures ou de microalgues en grande quantité (Coustets et al., 2013). Grâce à l'utilisation de CEP judicieusement choisis il est possible d'induire un relargage du cytoplasme (et donc de la protéine d'intérêt) des levures dans le

²¹ Dans ce contexte, l'expression veine liquide désigne l'utilisation d'un solvant en tant que gaine chargée d'entraîner l'échantillon en son centre.



milieu extracellulaire tout en conservant un bon taux de viabilité. Ainsi la population est maintenue à une concentration suffisante pour maintenir un bon rendement de production.

- Augmenter l'extraction de polyphénols contenus dans les grains de raisin lors de leur macération, avant la mise en bouteille (López et al., 2008).

- Participer au développement de biocarburants de 3^{ème} génération (produit par les algues) par électroextraction²². Des recherches sur l'extraction de lipides contenus dans des microalgues montrent de bonnes performances (Zbinden et al., 2013).

- D'améliorer la qualité du sucre de betterave en utilisant une extraction par CEP (Loginova et al., 2011). Le sucre peut ensuite être utilisé pour produire des alcools.

- Inactiver des microorganismes vivants dans un prélèvement d'eau stagnante par nsCEP (Kirawanich et al., 2011).

- Inactiver des microorganismes dans des liquides destinés à l'Industrie agro-alimentaire (IAA).

 - ~ Amélioration de la conservation des aliments (Barsotti et al., 1999; Knorr et al., 1994; Laura Salvia-Trujillo et al., 2011; Mosqueda-Melgar et al., 2008; Wouters and Smelt, 1997).

 - ~ Prédiction de l'inactivation de *Salmonella senftenberg* par CEP (Javier Raso, 2000) et inactivation de *E. coli* O157:H7 et *Salmonella enteritidis* (Amiali et al., 2006). Les Salmonelles sont des bactéries dont un bon nombre de souches et sérovars²³ sont pathogènes. Elle est souvent la cause d'intoxication alimentaire.

 - ~ Inactivation de *E.coli*, *Listeria innocula*, *Leuconostoc mesenteroides* et *Saccharomyces cerevisiae* (Aronsson et al., 2001).

 - ~ Inactivation de *Lactobacillus* par CEP et ultra-haute pression pour améliorer le goût du fromage (Lin et al., 2002; Sheryl Briggs S., 2003).

 - ~ Inactivation des organismes sur les raisins (Marsellés-Fontanet et al., 2009).

 - ~ Inactivation d'amibes par CEP en flux pour le traitement de grands volumes d'eau (Vernhes et al., 2002).

Ces champs d'investigation ont participé à une meilleure compréhension des effets des CEP sur le vivant.

IV.8.2. Approche théorique

Pour comprendre les mécanismes impliqués dans l'application de champs électriques sur des cellules, des considérations théoriques ont été menées. Le postulat est que les sphères de diélectriques (ce que sont les cellules, au facteur de forme près) soumises à un champ électrique se comportent comme des condensateurs de géométrie sphérique. La membrane de la cellule constitue

²² L'électroextraction désigne deux techniques très différentes, celle qui nous concerne est l'électroextraction d'éléments intracellulaires. L'électroextraction désigne aussi une technique d'élimination d'un élément d'une solution. Ainsi, l'utilisation d'électrodes pour capturer des métaux lourds d'une eau usée ou d'une eau de procédé industriel est aussi dénommé électroextraction (Khalemsky et al., 2004)

²³ Les sérovars permettent de subdiviser en différents groupes les souches d'une même espèce grâce à certains de leurs antigènes.



l'isolant entre le milieu extérieur et le milieu intérieur. Il est alors possible de définir la charge de la membrane par la formule suivante :

Équation 2 : Temps de charge de la membrane plasmique

$$\tau_c = \left(\frac{1 + 2\nu}{1 - \nu} \cdot \frac{\rho_1}{2} + \rho_2 \right) \cdot C_m \cdot \left(\frac{D}{2} \right)$$

Et

Équation 3 : Différence de potentiel transmembranaire au niveau de la membrane

$$\Delta V_c(t) = f \cdot \vec{E} \cdot \frac{D}{2} \cdot \cos(\theta) \cdot \left(1 - e^{-\frac{t}{\tau}} \right)$$

- τ_c , le temps de charge d'une cellule (s).
- t , le temps (s).
- ν , la concentration volumique en bactéries (nombre de bactéries.L⁻¹).
- ρ_1 , la résistivité du milieu externe (Ωm).
- ρ_2 , la résistivité du cytoplasme des bactéries (Ωm).
- C_m , la capacitance surfacique de la membrane (F.m^{-2}).
- D , le diamètre de la bactérie (m).
- $\Delta V_c(t)$, la différence de potentiel calculée au point considéré sur la membrane (V).
- f , le facteur de forme et de propriétés diélectriques, sans unité.
- \vec{E} , le champ électrique dans la cellule de décontamination (V.m^{-1}).
- θ , l'angle formé par la direction du champ électrique appliqué et la normale au plan de la membrane cellulaire à l'endroit où la différence de potentiel de membrane est calculée, exprimé en degré (°) dans la suite des calculs.

Ces formules mathématiques sont issues des travaux de Cole, de Schwan, de Neumann *et al* et de Schoenbach *et al* (Cole, 1937; Neumann et al., 1989; Schoenbach et al., 2004; Schwan, 1963).

Le champ électrique \vec{E} du générateur est pondéré par trois facteurs : f , $D/2$, et $\cos(\theta)$. Une bactérie possède naturellement un potentiel de membrane (valant ≈ 100 mV). ΔV_{b0} est la variation de la différence de potentiel, à partir de cette valeur de base il est alors possible de déterminer la valeur réelle théorique :

$$\Delta V_c(t)\text{réel} = \Delta V_c(t) \pm 100 \text{ mV}$$

Il faut noter que pour les bacilles, qui sont des bactéries en formes de bâtonnets, l'approche ci-dessus est moins correcte que pour les coques (forme sphérique).

Dans un premier temps, Zimmerman *et al* observèrent que si une tension de 1V est appliquée à la membrane, l'intégrité membranaire est affectée et prédisent que ces impulsions longues durées induisent une rupture diélectrique d'origine électromécanique (Zimmermann et al., 1974). Ensuite, d'autres expériences (Teissié and Rols, 1993) et d'autres calculs (Grosse and Schwan, 1992) ont montré que ce phénomène intervient dès 200 mV environ.

Teissié et Tsong ont montré que les impulsions peuvent activer le système de transport actif de la membrane cellulaire (Teissié and Tsong, 1980; Teissié et al., 1981). Le déséquilibre ionique qui en découle peut provoquer leur mort. De plus, en fonction de la durée et de l'intensité du champ électrique appliqué, les cellules peuvent subir des effets plus ou moins importants allant d'aucun



effet visible à l'inactivation totale, en passant par la perméabilisation (réversible ou non) (Saulis, 2010).

Eu égard à ces informations théoriques, dans les parties suivantes, les CEP sont étudiés selon leurs durées d'impulsions. Une première partie (IV.8.3) concernera les impulsions de longue durée, supérieures à la milliseconde. La partie suivante (IV.8.4) traitera des impulsions comprises entre 1 et 999 microsecondes. Puis suivra une partie (IV.8.5) décrivant les impulsions nanosecondes. Il est en outre apparu récemment dans quelques publications, des expériences utilisant des impulsions picosecondes, ce type d'impulsion sera rapidement abordé (cf. partie IV.8.6).

IV.8.3. msCEP

Les impulsions millisecondes (ms) sont utilisées avec des amplitudes de champs électriques modérés pour l'électroporabilité.

L'une des premières publications sur le sujet a montré qu'il est possible d'obtenir une très grande efficacité de transformation bactérienne dès lors que la concentration en bactérie, la quantité de plasmide et la forme des impulsions sont bien choisies. Les expériences étaient menées sur *E. coli* LE392 et *E. coli* DH5 α avec les plasmides pUC18 et pBR329 (contenant tous deux un gène de résistance à l'Ampicilline). La quantité de bactérie transformée est déterminée par dénombrement des unités formant colonies (UFC) sur un milieu contenant de l'ampicilline. En effet, les bactéries ayant intégré un des plasmides sont capables de pousser en présence d'ampicilline. La fréquence de transformation est obtenue par le rapport suivant (Dower et al., 1988) :

bactéries transformées

bactéries survivantes au traitement

Les auteurs ont aussi montré qu'un champ électrique de 12,5 kV/cm pendant 5 ms présente la même efficacité que 7 kV/cm pendant 20 ms, c'est-à-dire que la diminution d'un des deux paramètres peut être compensée par l'augmentation de l'autre. Toutefois, il existe un seuil de champ électrique de 2 kV/cm sous lequel l'efficacité de transformation disparaît même en augmentant drastiquement la durée de l'impulsion jusqu'à 900 ms. D'autres auteurs ont également montré que l'utilisation de champs électriques ms permet la transformation bactérienne (Calvin and Hanawalt, 1988; Chassy and Flickinger, 1987; Miller et al., 1988).

Le même genre d'étude a aussi été menée sur les cellules de mammifères (Otsuka et al., 2013; Rols and Teissié, 1998, 1990; Wolf et al., 1994). Les mêmes observations relatives à l'électroporation et la viabilité ont été faites : plus le champ électrique ou le nombre d'impulsions augmente, plus l'effet étudié est important.

Des études poussées sur les paramètres électriques (durée, nombre et tension des impulsions électriques générant les msPEF) confèrent désormais une très bonne maîtrise de l'électrotransfection (bon taux de transfection et bon taux de survie des cellules aux champs) (Rols and Teissié, 1998, 1990; Wolf et al., 1994). De plus, le transfert de gène a pu être observé au microscope à fluorescence et en temps réel grâce à la fixation d'un fluorophore sur l'ADN (Golzio et al., 2002).

A l'échelle d'un tissu entier, des msCEP de très faibles amplitudes, (compris entre 10 et 100 mV/cm) peuvent induire un allongement des cellules qui le composent. Ce phénomène peut même se propager dans plusieurs tissus différents, s'ils sont connectés par des jonctions de type « gap »²⁴ (Cooper, 1995).

²⁴ Les jonctions gap sont un type de connections intercellulaires permettant aux cellules de communiquer entre elles.



IV.8.4. μsCEP

L'utilisation des CEP est consommatrice d'énergie, l'intérêt des impulsions μs par rapport aux impulsions ms est que l'échelle de temps est 1000 fois plus petite. L'énergie mise en jeu est donc beaucoup plus faible, toutes choses égales par ailleurs.

$$W = U.I.t$$

Où

- W est l'énergie
- U la tension
- I l'intensité
- t la durée de l'impulsion.

Raccourcir la durée de l'impulsion raccourcit d'autant la consommation d'énergie. Ces impulsions devraient avoir le double intérêt d'induire une consommation d'énergie moins grande et un échauffement plus faible par rapport aux impulsions millisecondes. Néanmoins pour obtenir des effets comparables à ceux obtenus par champ électrique pulsé milliseconde (msCEP), il faut généralement augmenter le champ électrique, la fréquence, ou le nombre d'impulsions.

Les impulsions microsecondes sont très étudiées pour les procédés industriels. L'électroperméabilisation induite par ces impulsions peut, par exemple, être utilisée en IAA pour l'optimisation de l'extraction du jus de betterave (Loginova et al., 2011). L'effet décontaminant peut être utilisé dans les procédés alimentaires (Barsotti et al., 1999; Sheryl Briggs S., 2003) notamment pour remplacer la pasteurisation du lait (Mosqueda-Melgar et al., 2008; Sobrino-López and Martín-Belloso, 2009) ou la réduction du nombre de bactéries présentes dans le blanc d'œuf (Amiali et al., 2006).

L'efficacité de décontamination ne dépend pas uniquement des paramètres électriques. Il existe aussi un effet de la température et de la matrice.

IV.8.4.1 Impact de la température sur l'efficacité des μsCEP

La fluidité de la membrane augmente avec la température (Callen and Perasso, 2005). L'étude de l'effet de la température sur les CEP, qui eux mêmes ont un effet sur la membrane est donc pertinente. Des travaux ont effectivement mis en évidence que la température a un effet sur l'efficacité des CEP, en particulier sur la membrane.

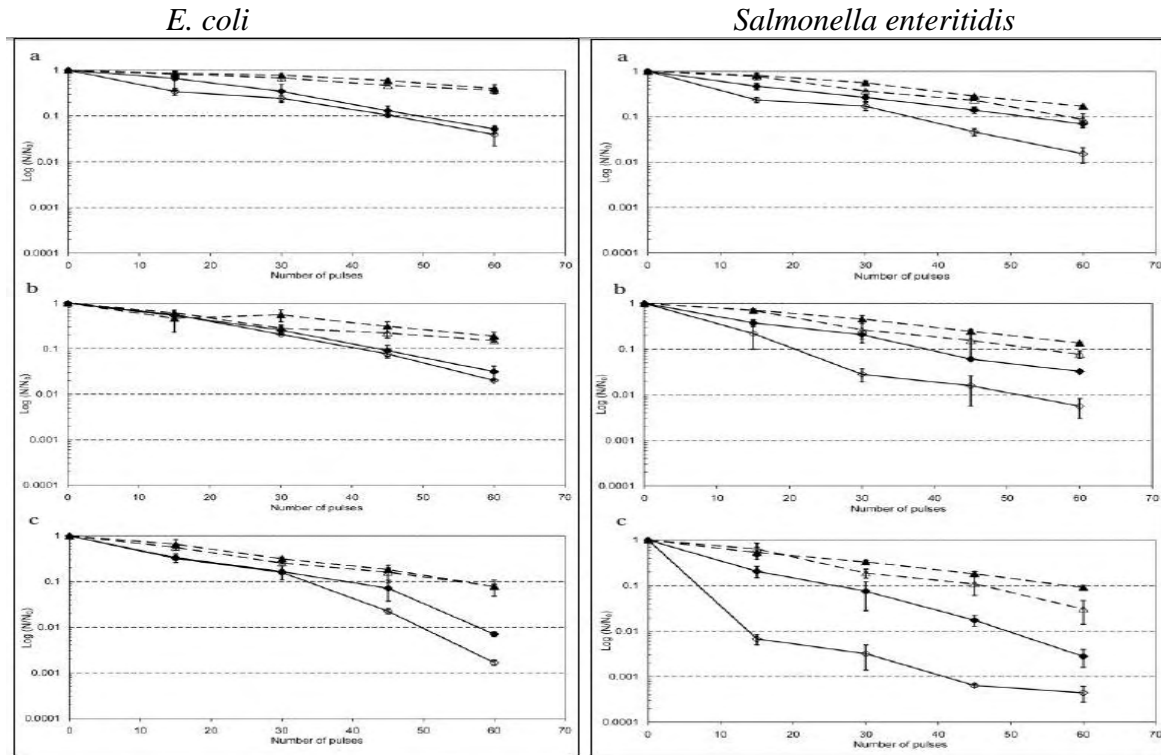


Figure 16 : Courbe d'abattement en fonction du nombre d'impulsions utilisées dans différentes conditions de température : (a) à 10 °C, (b) à 20 °C et (c) à 30 °C. Impulsion utilisée : durée 2 μ s, Tension 30 kV, nombre 60, champ : 30 kV/cm, milieu : blanc d'œuf. (Δ) traité à 20 kV/cm-VRBA ; (\diamond) traité à 30 kV/cm-VRBA ; (\blacktriangle) traité à 20 kV/cm-TSA ; (\blacklozenge) traité à 30 kV-TSA. tiré de : (Amiali et al., 2006).

Dans cette expérience (Figure 16), plusieurs milieux de culture sont utilisés. Ces milieux permettent de dénombrer les bactéries en fonction de leurs états :

- Le milieu VRBA « violet red bile agar » permet la croissance des bactéries intactes uniquement, c'est-à-dire les bactéries qui n'ont subies aucune perturbation par les champs électriques.
- Les bactéries perturbées par les champs électriques, mais pas au point d'être inactivées, quant à elles peuvent se réparer puis proliférer sur un milieu TSA « tryptic soy agar ».

A 30 kV/cm VRBA, l'abattement est d'un peu plus d'1 \log_{10} à 10°C, mais atteint presque 3 \log_{10} à 30°C. Les graphiques montrent que la température influence positivement l'efficacité de décontamination car elle augmente le nombre de bactéries perturbées par les impulsions.

IV.8.4.2 Effet des hautes pressions sur l'efficacité des μ sCEP

Comme le montre la Figure 17, chez la levure *S. cerevisiae*, l'effet des champs électriques microsecondes associés à une augmentation de la pression induit une létalité beaucoup plus forte que celle due à la somme indépendante des deux procédés. Les expériences de synergies sont réalisées de façon séquentielle : le traitement par pression est réalisé après le traitement électrique (Pataro et al., 2010)

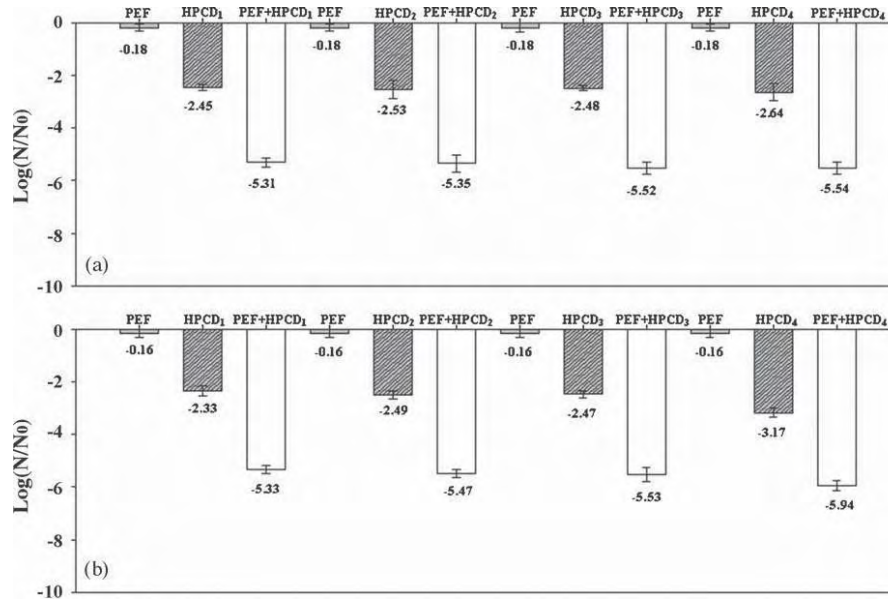


Figure 17 : Effet de la conductivité du milieu de suspension. (a) 0,3 mS/cm (correspondant à 18 ms et une solution tampon de 3 mM). (b) 2 mS/cm (correspondant à 3,6 ms et une solution tampon de 20 mM) dans l'inactivation de *S.cerevisiae* traitée par une unique impulsion et avec les conditions : $E = 9 \text{ kV/cm}$, $WT = 20 \text{ J/mL}$; HPCD1 : 8,0 MPa, 5 min ; HPCD2 : 8,0 MPa, 10 min ; HPCD3 : 11,0 MPa, 5 min ; HPCD4 : 11,0 MPa, 10 min. Tiré de (Pataro et al., 2010).

La synergie entre les μsCEP et les hautes pressions est évaluée sur *S. cerevisiae* en utilisant deux milieux de suspension différents :

Dans chaque cas (a et b), trois effets sont évalués : le traitement par CEP seul ($E = 9 \text{ kV/cm}$), le traitement par haute pression seul (8 ou 11 Mpa) ou le traitement par CEP et haute pression associés. Il apparaît que le traitement combiné donne un abattement d'environ 6 \log_{10} alors que la somme des abattements des deux traitements indépendants donne environ 0,1 \log_{10} (CEP) + 3 \log_{10} (Pression) soit 3,1 \log_{10} . Le fait d'associer les deux traitements provoque donc une majoration de l'abattement de 2,9 \log_{10} .

Notons que les champs électriques sont générés par une tension ayant une décharge exponentielle. L'effet de ces types d'impulsions est difficilement comparable à celui des impulsions de formes rectangulaires, ayant des fronts de montée et de descente nets et une tension constante entre les deux.

IV.8.4.3 Effet du milieu traité

Comme l'indique la Figure 18, il existe un effet indirect des CEP qui agissent sur le milieu de suspension en devenant lui-même toxique pour les bactéries (Reyns et al., 2004).

Les tests sont réalisés pour trois types de solution : de l'eau distillée, un tampon HEPES à 10 mM avec un $\text{pH} = 7$ et un tampon Tris à 10 mM à $\text{pH} = 7$.

L'effet des solutions traitées par μsCEP est évalué avec 300 impulsions de $2 \mu\text{s}$ à 26,7 kV/cm.

L'abattement est évalué après 1,5 h et 24 h de temps de contact.



Dans la plupart des cas un effet visible est observé. Les effets sont plus importants pour des temps de contact de 24 h. *E. coli* semble peu affectée, sauf après 24 h avec le traitement utilisant le tampon Tris. Il semble donc qu'il existe une spécificité de souche et un effet matrice.

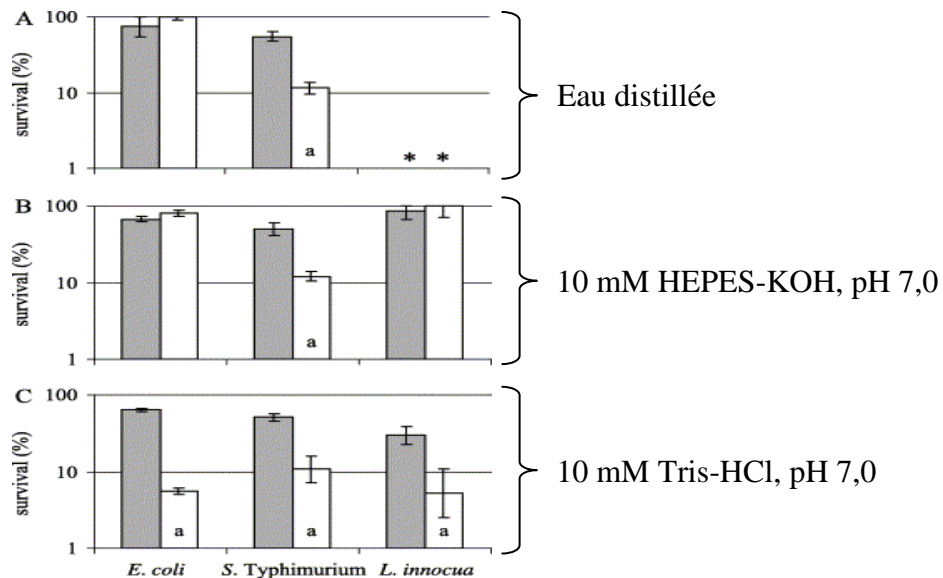


Figure 18 : Inactivation indirecte de cellules non traitées de différentes bactéries dans de l'eau distillée traitée par CEP dans les conditions suivantes : 300 impulsions de 2 μ s à 26,7 kV/cm et 5 Hz. Après 1,5 h (■) et 24 h (□) d'incubation. 'a' indique que la survie après 24 h est significativement différente ($p < 0,05$) de la survie après 1,5 h. * : non déterminé. tiré de (Reyns et al., 2004).

IV.8.5. nsCEP

Les impulsions nanosecondes constituent un nouveau champ de recherche (Schoenbach et al., 2004). D'un point de vue purement mathématique, il est possible de générer plus d'impulsions nsCEP que msCEP sur une même durée, il est donc théoriquement possible d'atteindre des fréquences de répétition plus grandes. Et dans le même ordre d'idée, comme le champ est maintenu sur une plus courte durée, à champ électrique égal, les impulsions nsCEP sont moins consommatrices d'énergie par comparaison avec les impulsions μ sCEP et à *fortiori* avec les impulsions msCEP.

IV.8.5.1 Impacts des nsCEP sur les cellules

D'un point de vue physicochimique, la courte durée des nsCEP limite les effets électrochimiques tels que l'oxydation des électrodes (Johan Morren, 2003). D'un point de vue biologique, les nsCEP semblent présenter de nouvelles capacités inexistantes chez les msCEP et μ sCEP. En reprenant les



formules permettant de déterminer le seuil d'électroperméabilisation exprimées dans la « Partie III - IV.8.1 », il peut être constaté que parfois, les impulsions nsCEP ne suffisent pas à générer une différence de potentiel de membrane suffisant à l'électroperméabilisation. Il a été montré expérimentalement qu'elles peuvent agir sur d'autres cibles que la membrane plasmique comme l'ADN, le cytosquelette et le noyau.

Les effets des nsCEP ont été étudiés sur les trois principaux règnes (animal, végétal et bactérien) :

- Etude sur des cellules animales :

Le fait que les impulsions nsCEP puissent agir et affecter d'autres cibles que la membrane plasmique tels que l'ADN, le cytosquelette et le noyau a été vérifié expérimentalement sur des lignées de lymphocytes T humains immortalisés « Jurkat cells » (Arnaud-Cormos et al., 2011; Kolb and Stacey, 2012; Stacey et al., 2011). Elles peuvent également conduire à l'apoptose par l'activation de la voie des MAP kinase (Mitogen Activated Protein kinase) (Morotomi-Yano et al., 2011).

Il a été montré sur des cellules cancéreuses hépatiques de souris (hepatoma MH-22A cells), que pour obtenir une efficacité de perméabilisation comparable à celles des μ sCEP en utilisant des impulsions nsCEP, il faut appliquer plus d'impulsions et un champ électrique bien supérieur (Saulis et al., 2010). L'augmentation de ces paramètres entraîne une augmentation de l'énergie dépensée par unité de temps et donc du coût du traitement.

- Etude sur des cellules végétales :

Il a été montré que la membrane des cellules de tabac devient perméable suite à un traitement nsCEP. Il semble que le cytosquelette est impliqué dans la réponse de la membrane aux nsCEP (Hohenberger et al., 2011). Dans ces travaux (*Figure 19*), deux marqueurs ont été utilisés, la GFP, capable de visualiser les filaments d'actine (en vert dans le montage) et le bleu de Trypan marqueur de la perméabilité (en rouge dans le montage) :

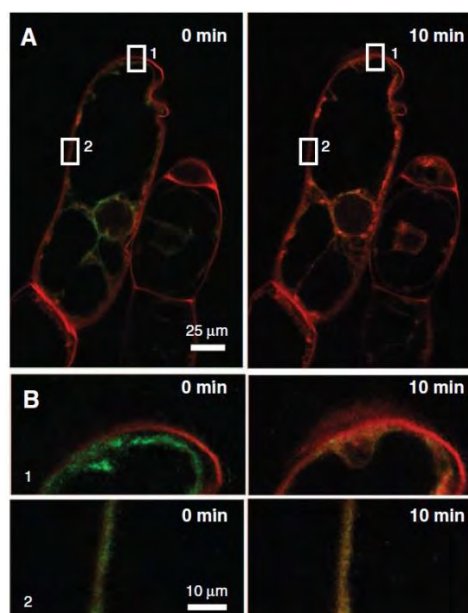


Figure 19 : Observation selon plusieurs grossissements du cytosquelette et de la membrane plasmique avant traitement et 10 minutes après traitement. tiré de (Hohenberger et al., 2011).



Des mutants sur-exprimant les domaines de liaison à l'actine (ABD pour Actin Binding Domain²⁵), permettant aux filaments d'actine de se lier entre eux, montrent une pénétration moins importante du fluorochrome après le traitement par nsPEF (*Figure 20*).

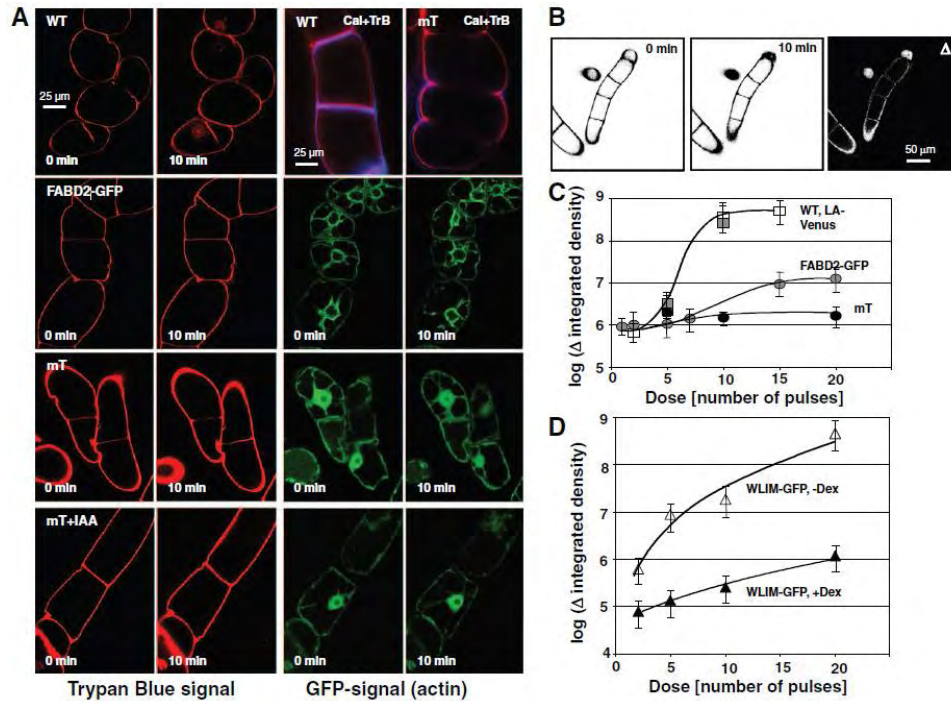


Figure 20 : Mesure de la perméabilisation induite par 5 impulsions nanosecondes de 33 kV/cm, par la quantification de l'intégration du fluorochrome pour des cellules de tabac présentant plus ou moins de domaines ABD (Hohenberger et al., 2011).

Le renforcement du maillage du cytosquelette semble donc améliorer la résistance des cellules végétales à l'électroporation par nsCEP.

- Etude sur des bactéries :

Un effet subléthal est montré par Perni *et al* sur *E. coli* K12 et *Salmonella typhimurium* (Perni et al., 2007). Selon cette publication, les bactéries ayant subi des impulsions nanosecondes montrent un abattement post-traitement plus ou moins grand selon la composition du milieu en culture, en l'occurrence la concentration en NaCl. Il s'agit là d'« effet matrice »²⁶. Les bactéries ayant reçu les nsCEP sont en état de stress important, elles sont plus « fragiles » et ne pourront pousser que sur les milieux les plus favorables à leur développement.

²⁵ L'Actin Binding Domaine est un domaine permettant aux filaments d'actine de se lier entre eux

²⁶ Le terme d'effet matrice est couramment utilisée dans l'industrie pour mentionner le fait qu'un milieu modifie l'amplitude d'un phénomène



IV.8.5.2 Décontamination bactérienne par nsCEP

Le matériel biologique utilisé n'est pas identique dans toutes les études. *E. coli* est souvent utilisé, mais la souche ne provient jamais de la même collection. Or, il peut y avoir d'importantes différences entre deux souches distinctes de *E. coli*. En effet, il existe une forte spécificité de souches aux CEP : certaines bactéries y sont plus sensibles que d'autres (Aronsson et al., 2001). De ce fait, il est difficile de déterminer si une différence entre deux abattements provient du type d'impulsion utilisée ou de la sensibilité de la souche utilisée.

De plus, les méthodologies expérimentales sont très variables, il y a toujours plusieurs paramètres qui changent. Il est donc difficile de déterminer lequel est responsable des modifications observées au niveau des résultats.

Les expériences présentées dans le tableau ci-dessous sont extraites de la dizaine de publications concernant la décontamination par nsCEP. Il n'est pas exhaustif car les auteurs ont généralement mené plusieurs expériences dans différentes conditions. Celles qui ont été sélectionnées sont comparables entre elles et permettent d'obtenir, par recoupement, des renseignements sur le comportement des nsCEP vis-à-vis des microorganismes. Quelques expériences μ sCEP, dont la durée des impulsions ne dépasse pas 3 μ s, viennent compléter le tableau. Les résultats de ces publications permettent la comparaison des différentes durées d'impulsions, sans nécessairement se borner à la valeur arbitraire de 999 nanosecondes. Notons qu'entre des impulsions de quelques centaines de nanosecondes et des impulsions de quelques microsecondes, il n'y a qu'un facteur 10.

Le contenu des publications donne, en soit, beaucoup d'informations. Mais il est possible d'en tirer encore d'avantage en les recoupant entre elles :

Les plus forts abattements sont observés pour les impulsions ayant les plus longues durées (Saldana *et al* 2010), ou les plus forts champs électriques (Katsuki *et al* 2002). Mais ces informations sont à prendre avec précaution, sachant que les conditions de traitement sont très différentes d'une expérience à l'autre (nombre d'impulsions, matrice (type de milieu, conductivité, souche, volume traité, fréquence, température, le front de montée de l'impulsion, *etc*)

Les quelques publications nsCEP mentionnées ci-dessous sont les seules traitant de la décontamination par nsCEP au niveau bactérien :

- ➔ points communs avec le projet DEBACIEM : décontamination bactérienne dans un milieu liquide conducteur. Système générateur/applicateur en flux.
- ➔ différences avec le projet DEBACIEM : expériences toujours réalisées sur de petits volumes où il n'est pas fait mention de possibles applications industrielles.



Tableau 3 : Tableaux des valeurs expérimentales et des résultats nsCEP et de données μ sCEP (Amiali et al., 2006; Chalise et al., 2006; Frey et al., 2013; Katsuki et al., 2002; Kirawanich et al., 2011; MacGregor et al., 2000; Perni et al., 2007; Reyns et al., 2004; Saldaña et al., 2010; Žgalin et al., 2012).

Publication	Impulsions				souche	Information sur la matrice	Particularité expérimentale	Efficacité
	Forme		Nombre	Fréquence (Hz)				
	Durée (ns)	E (kv/cm)						
Zgalin et al 2012	10	80	1000	10	<i>Escherichia coli</i> K12	Eau distillée	Dans les conditions étudiées, les impulsions ns seules n'ont aucun effet. Mais elles sont capables d'améliorer significativement l'efficacité d'impulsions μ s. Il peut y avoir un effet de synergie entre les 2 types d'impulsions.	aucune
Chalise et al 2006	700	30	600	30	<i>Escherichia coli</i> K12	non mentionnées	Après quelques impulsions de 700 ns, les bactéries transformées (par le plasmide pLysS, qui induit l'apoptose dès lors que la membrane plasmique est lésée) sont fortement inactivées, mais pas les wt. Les impulsions d'une telle durée ont donc un effet déstabilisant sur la membrane plasmique, mais cette déstabilisation est insuffisante pour induire une mortalité chez les bactéries « normales » dans ces conditions (tension moyenne : 10 kV, front de montée 8 ns, nombre d'impulsions 20).	Aucune
Chalise et al 2006	32	100	9000	30	<i>Escherichia coli</i> K12	non mentionnées	Pour des impulsions de 32 ns, aucune différence significative n'est observée entre les bactéries transformées et les wt, il n'y a donc pas d'effet de déstabilisation membranaire pour de telles durées, dans ces conditions (tension moyenne : 30 KV, front de montée 8 ns, nombre d'impulsions 300).	1,5 log ₁₀
Perni et al 2007	32	100	9000	30	<i>Salmonella typhimurium</i>	Milieu de culture TSB (Tryptone Soy Broth) dilué avec PBS (Phosphate Buffered Saline) (0,1 mL TSB dans 100 mL PBS)	Front de montée : 8 ns	1,5 log ₁₀
MacGregor et al 2000	500	30	1000	5 à 10	<i>Bacillus cereus</i>	0.1% solution d'eau peptonée		2,5 log ₁₀
Katsuki et al 2002 a)	45	130	12,5	0,5	<i>Bacillus subtilis</i> ATcc6051	180 ohm/cm	Front de montée : 2 ns	3,5 log ₁₀
Katsuki et al 2002 b)	45	130	12,5	0,5	<i>Bacillus subtilis</i> ATcc6052	180 ohm/cm	Front de montée : 20 ns	3 log ₁₀
Katsuki et al 2002 c)	45	130	12,5	0,5	<i>Bacillus subtilis</i> ATcc6053	330 ohm/cm	Front de montée : 2 ns ou 20 ns	2 log ₁₀
Amiali et al 2006	2000	30	60	2	<i>Escherichia coli</i> O157:H7	Blanc d'œuf 10°C		1,5 log ₁₀
Amiali et al 2006	2000	30	60	2	<i>Salmonella enteritidis</i>	Blanc d'œuf 10°C		1,9 log ₁₀
Amiali et al 2006	2000	30	60	2	<i>Escherichia coli</i> O157:H7	Blanc d'œuf 20°C		1,5 log ₁₀
Amiali et al 2006	2000	30	60	2	<i>Salmonella enteritidis</i>	Blanc d'œuf 20°C		2 log ₁₀
Amiali et al 2006	2000	30	60	2	<i>Escherichia coli</i> O157:H7	Blanc d'œuf 30°C		2,9 log ₁₀
Amiali et al 2006	2000	30	60	2	<i>Salmonella enteritidis</i>	Blanc d'œuf 30°C		3,5 log ₁₀
Reyns et al 2004	2000	26,7	300	5	<i>Escherichia coli</i> GC4468	Eau distillée	Résultats différents selon le milieu dans lesquels les bactéries subissent le traitement. Mise en évidence d'un « effet matrice ».	50%
Reyns et al 2004	2000	26,7	300	5	<i>S.typhimurium</i>	Eau distillée	Ce type d'impulsions confère à l'eau traitée un effet décontaminant en tant que tel (cf. partie : μ sPEF)	1,5 log ₁₀
Saldana et al 2010	3000	30	50	0,5	<i>S.typhimurium</i>	4°C	Les résultats différents selon la température de la matrice lors du traitement. A 4°C, l'abattement est 2 fois plus faible que pour des températures comprises entre 15 et 50°C.	2 log ₁₀
Saldana et al 2010	3000	30	50	0,5	<i>S.typhimurium</i>	15°C, 28°C, 38°C ou 50°C		4 log ₁₀
Kirawanich et al 2011	500	15	900	3	Cocktail environnemental	Eau stagnante supplémentée en lactose		5 log ₁₀
Frey et al 2013	600	100	10	-	<i>P.putida</i>			4 log ₁₀



IV.8.5.3 Brevets et procédés commerciaux mentionnant la décontamination par nsCEP

L'idée d'utiliser les nsPEF en tant que technique de décontamination de gros volumes d'eaux n'apparaissant pas dans les publications, l'opportunité de déposer un brevet a été envisagée dans le cadre de notre projet.

Une « étude d'antériorité brevet » a donc été réalisée par VERI.

Elle a fait ressortir deux brevets concernant la décontamination par nsCEP :

Inventeur	Date	Pays	Numéro	Titre	Point commun	Différences
Robbins	2004	US	US6787105 B2	Process and apparatus for reduction of microorganisms in a conductive medium using low voltage pulsed electrical energy	Décontamination bactérienne dans des milieux liquides conducteurs avec un système générateur/applicateur en flux. Utilisable pour de grand volume, entraînant une possible application industrielle.	Utilise un système à basse tension
Bridges	1994	US	US5326530	Energy-efficient electromagnetic elimination of noxious biological organisms	Décontamination bactérienne dans des milieux liquides conducteurs avec un système générateur/applicateur en flux. Lutte contre l'électrochimie par inversion de polarité symétrique et asymétrique ou par l'utilisation de diélectrique.	Fonctionne à basse tension avec une chambre de traitement coaxiale. Durée des impulsions supérieure à 200 ns. Fonctionnement en flux ouvert.
Yongguang Yin, Quinghua Howard Zhang, Sudhir Kartikeya Sastry	1996	US	US5690978 A	Device for the inactivation of bacterial spores	Utilisation d'un champ électrique très fort : entre « 15 kV/cm et 160 kV/cm »	Revendique la possibilité de détruire les spores. Destiné au traitement de nourritures liquide. Durée de l'impulsion : 1 à 20 µs
Pierre-Amdre Cabanes, Justin Teissié, Marie-Christine Vernhes	1999	US	US 20030165399 A1	Method for eliminating protozoa, in particular free living amoebas in a colonised aqueous flow, a method for treating an aqueous flow by electropulsing, and its application to eliminating protozoa	Destruction des microorganismes (protozoaires) dans l'eau par l'application de CEP perpendiculaire au flux d'eau.	Champs électrique compris entre 1,5 et 15 kV/cm Durée 1µS à 10 ms
Nathalie Eynard, Pierre-Amdre Cabanes, Justin Teissié	1999	US	US 20020172616 A1	Method for eliminating legionella from a colonised aqueous flow by electropulsing, a method for treating an aqueous flow by electropulsing, and its application to eliminating legionella	Destruction des Légionelles par CEP	Champs électrique d'amplitude inférieurs à 1 kV/cm et d'une durée comprise entre 1 et 20 ms.

Il existe des machines commercialisées qui permettraient une décontamination par l'utilisation de générateurs électriques, mais aucune n'utilise les nsCEP.

Nom	Société	Localisation	Pays	Caractéristique
PowerMod™	Diversified technology, Inc	Befdord, Massachusetts	États-Unis	Capacité de traitement : 500 L/h Consommation : 25 kW Tension : 25 kV
Balticare Dolphin series 3000G système™	Baltimore aircoil, Inc	Heist-op-den-Berg	Belgique	Champs électromagnétique haute fréquences pulsé. Effet bactéricide, antitartre et anticorrosion
Pulse-pure	Evapco, Inc	Taneytown, Maryland	États-Unis	Effet bactéricide, antitartre et anticorrosion
Triangular wave technologie	Triangular wave technologie, Inc	Closter, New Jersey	États-Unis	Champs magnétiques. Vendu en tant qu'antibactérien, antitartre et anticorrosion



Fréquemment utilisé dans le domaine de l'industrie agroalimentaire (IAA), le procédé des champs électriques pulsés consiste à soumettre les aliments (liquides ou solides, voire même les emballages) à des champs électriques de forte intensité (5 à 55 kV/cm), de manière répétée (pulsée), pendant des temps très courts (souvent de l'ordre de la microseconde), en vue de détruire les microorganismes qu'ils contiennent.

Dans notre cas, l'intensité est plutôt de l'ordre de 100 kV/cm et les pulsations de l'ordre de la dizaine de nanoseconde. Les brevets ne répondent pas à ces critères, la grande majorité fait état de temps de l'ordre de la microseconde. Par ailleurs, les CEP sont également utilisés pour traiter les surfaces (supports/contenants où le biofilm vient se déposer).

L'étude bibliographique et cette recherche de brevet, mettent en lumière les points innovants du dispositif envisagé dans le cadre du projet DEBACIEM.

Les objectifs d'innovation apportés par le système de décontamination de grands volumes d'eaux par champs électriques pulsés nanoseconde (DEBACIEM) sont les suivants :

- L'utilisation d'une dérivation permettant la décontamination de grands volumes (*mentionné dans Robbins & PowerModTM*) et une modification de la vitesse de décontamination globale par ajustement du débit et de la fréquence (*PowerModTM*). Il est possible de prévoir ainsi la vitesse de décontamination.
- L'utilisation des champs électriques nsCEP permettant la réduction de la consommation énergétique, l'inactivation bactérienne par effet intracellulaire plutôt que par électroporation irréversible (*mentionné dans Chalise et al 2006*) et de grandes fréquences de répétitions.
- La décontamination en tour aéro-réfrigérante / réseau d'eau limitant ainsi l'usage d'intrants chimiques comme par exemple les biocides.
- Le principe et le développement d'un applicateur permettant d'utiliser des champs électriques supérieurs au seuil de claquage dans l'air.
- Le développement de la technologie de générateur/démonstrateur utilisant des impulsions de quelques dizaines de ns, avec une grande fréquence et un grand nombre de répétitions.

IV.8.6. psCEP

De récentes publications concernent l'utilisation de CEP inférieur à la nanoseconde ouvrant ainsi le domaine des champs électriques impulsionnels subnanosecondes ou picosecondes.

La diminution de la durée des impulsions permet de générer des champs électriques localisés (de l'ordre du cm^3) et distant de « l'applicateur » en utilisant des antennes à larges bandes. Ce type d'impulsion a été observé sur des cellules de mélanomes de souris (B16). Une perméabilisation de la membrane cellulaire (partiellement réversible au bout d'une heure) apparaît pour des champs électriques très élevés de l'ordre de 500 kV/cm (Schoenbach et al., 2008). Ces champs peuvent induire la mort de ces cellules par apoptose.

Cette technologie n'a pas été développée sur des applications de décontamination d'écoulement de fluides.

IV.9. CONCLUSION SUR LES PROCÉDES PHYSIQUES

La plupart des procédés de décontamination physique montre des résultats d'abattement de plusieurs \log_{10} . Ils sont donc potentiellement de bonnes alternatives aux produits chimiques. La



difficulté réside généralement dans l'adaptation en flux du phénomène physique normalement généré en batch (la centrifugation et les hautes pressions se heurtent à ce problème). Il existe également d'autres verrous importants, notamment les problèmes de sécurité liés aux technologies utilisant des radiations ionisantes (nécessitant la mise en place de systèmes de protection et de surveillance efficaces), mais aussi le coût énergétique associé à la génération et au maintien du phénomène. Il serait intéressant mais difficile de comparer entre eux les coûts énergétiques des différentes techniques de décontamination physique. En effet, le coût énergétique dépend des objectifs fixés (nombre de \log_{10} à abattre, vitesse de traitement, cible, *etc*) et des conditions de traitements (nature de l'eau, température initiale, *etc*), ces objectifs et conditions sont rarement les mêmes dans les différentes publications étudiées. Qui plus est, le coût énergétique n'est pas toujours exprimé selon les mêmes dimensions (en énergie par volume traité, en énergie par surface traitée, valeurs données pour différentes durées de traitement, pour différents \log_{10} d'abattement, en pourcent ou pour une destruction totale, *etc*).

Sachant qu'il existe déjà une technologie développée en μ sCEP capable de décontaminer les liquides à grands débits, et que le raccourcissement des impulsions devrait permettre un gain énergétique, les nsCEP semblent être une bonne voie à approfondir.

V. CONCLUSION

Cette étude bibliographique a mis en évidence un paradoxe : bien que les bactéries fassent partie des organismes les plus résistants, les plus répandus, les plus variés et ayant une vitesse d'adaptation très rapide, il existe de nombreux phénomènes susceptibles d'entraîner leur inactivation.

La difficulté principale est de rendre ces phénomènes d'inactivation compatibles à une utilisation industrielle : applicable sur de grands volumes, sans impacter par exemple le substrat.

Parmi l'éventail de techniques disponible, le choix du processus de décontamination se fait en fonction du coût de mise en place et de fonctionnement, ainsi qu'en fonction des impératifs techniques comme le niveau de qualité et la quantité nécessaire d'eau traitée.

Le coût de l'impact environnemental des techniques de décontamination industrielle est aujourd'hui difficilement chiffrable de manière précise. Il ne semble pas aisé de le prendre en compte dans une démarche de qualité orientée rentabilité. Pourtant ce coût, bien qu'il soit difficilement chiffrable de façon précise, est énorme et est payé par l'humanité entière, d'où les réglementations mises en place par l'union européenne (cf. partie II.1).

Récemment, le coût d'un autre type de pollution chimique, celle de l'air intérieur en France a été évalué, par l'analyse des six polluants les plus connus. Cette pollution aurait coûté 19 milliards d'euros et serait responsable de 20 000 morts environ.



Partie IV - **ETAT DES LIEUX – ETUDES
PRELIMINAIRES**



I. LES LEGIONELLES

Tout comme *E. coli*, les légionelles sont des bacilles Gram négatifs. Elles sont aérobies strictes. Dans l'environnement, elles se trouvent dans les eaux de lacs et de rivières (Fliermans et al., 1981). Des milieux artificiels sont aussi propices à leur développement, voire même à leur dissémination (Borges et al., 2012). Les réseaux d'eaux chaudes sanitaires, les climatisations et les TAR, maintiennent de l'eau tiède et stagnante et sont susceptibles de les disséminer sous forme d'aérosol. Les légionelles peuvent se trouver à l'état libre, en suspension dans l'eau ou dans le biofilm (Declerck, 2010). Cependant elles vivent la plupart du temps associées, en tant qu'endosymbiotes ou parasites d'amibes.

Ces dernières sont des unicellulaires eucaryotes se développant notamment dans les biofilms. Elles se nourrissent de bactéries ou d'autres microorganismes par phagocytose. Il s'avère que, suite à l'internalisation, les légionelles peuvent résister à leur digestion, en s'entourant d'une vacuole qui interdit la fusion avec les lysosomes. A l'intérieur des amibes, les légionelles trouvent un milieu stable et propice à leur multiplication (Greub and Raoult, 2004), alors qu'elles sont incapables de se développer directement dans l'eau (Kwaik et al., 1998).

Elle a été identifiée pour la première fois en 1976, lorsque la bactérie contamina les membres d'une association d'anciens combattants dénommée « American Legion ». Sur les 4 400 membres réunis à l'occasion de leur congrès annuel, 182 déclarèrent les syndromes caractéristiques de la Légionellose (ils seront identifiés comme tels à posteriori), et 29 en sont décédés. La source de la contamination n'a pas pu être trouvée, mais l'étude épidémiologique réalisée à posteriori a montré que la contamination s'est faite dans l'un des hôtels réservés par l'association (Fraser et al., 1977). Les noms légionelles et Légionellose - la maladie qu'elle peut engendrer (aussi appelée la « maladie du légionnaire ») - tirent leur origine de cette épidémie.

Il existe plusieurs espèces de légionelles, si *Legionella pneumophila* est le plus souvent responsable de la légionellose, d'autres espèces comme *Legionella longbeachae* peuvent l'être aussi.

Il existe au moins 15 sérogroupes de *Legionella pneumophila*, dont le plus virulent est le séro groupe 1.

La contamination se fait par voie respiratoire. Les légionelles doivent être contenues dans une microgouttelette d'eau pour pénétrer dans les poumons - par inhalation du futur hôte - et devenir virulente après phagocytose par les macrophages alvéolaires. Les gènes qui permettent de résister à la digestion par les macrophages sont les mêmes que ceux permettant de résister dans les amibes (Segal and Shuman, 1999). Elles peuvent générer deux types de maladies : la fièvre de Pontiac, caractérisée par de simples syndromes grippaux pendant deux à cinq jours, et la légionellose, qui est une infection des poumons mortelle dans 11% des cas.

La légionellose est une maladie à déclaration obligatoire, ce qui permet à l'Institut de Veille Sanitaire (InVS) de surveiller son incidence.

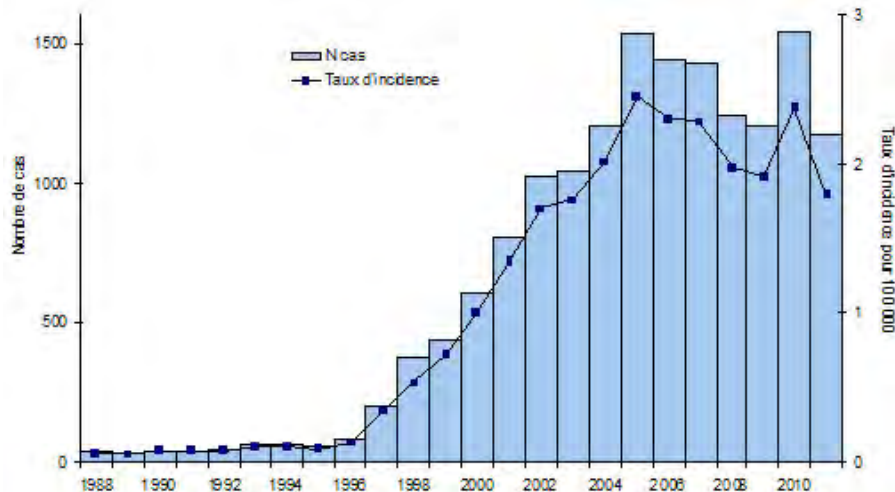


Figure 21 : Evolution du nombre de cas et du taux annuel d'incidence de la légionellose en France. Tiré du rapport : Bilan des cas de légionellose survenus en France en 2011 (InVS, 2012).

De 1996 à 2005, le nombre de cas de légionellose a continuellement augmenté (Figure 21), alors qu'il restait stable avant 1996. Depuis 2005, ce nombre s'est stabilisé. Il est corrélé à la mise en place, en 2004, d'un plan de prévention des légionelloses par les autorités gouvernementales (Ministère des Affaires sociales et de la Santé, 2004). Ce plan consiste notamment en une surveillance renforcée des TAR.

Les concentrations de *Legionella spp* et de *Legionella pneumophila* au sein de l'eau de TAR sont déterminées en laboratoire à partir de 500 mL prélevés dans le circuit. Le dénombrement de légionelles est réalisé conformément à la norme AFNOR. La limite de détection est de 10^2 UFC/L et la limite de quantification est de 5.10^2 UFC/L. L'espèce *L. pneumophila* est identifiée par un test au latex (Sedgwick and Tilton, 1983), la colonie de *Legionella* à reconnaître est suspendue dans un diluant, puis un sérum anti-*Legionella pneumophila* est ajouté. S'il y a coagulation, il s'agit de *Legionella pneumophila*.

II. TOURS AERO-REFRIGERANTES

II.1. DEFINITIONS ET GENERALITES

Les tours aéro-réfrigérantes (TAR) sont des systèmes de refroidissement de circuits d'eau chaude. Les processus industriels et les systèmes de climatisation de bâtiments du tertiaire rencontrent souvent la nécessité d'évacuer en certains points la chaleur qu'ils génèrent. Les TAR interviennent alors pour évacuer cette chaleur. Le refroidissement par une TAR se fait en deux étapes.

Dans un premier temps, le point chaud généré par le procédé industriel est refroidi *via* un échangeur thermique. Un flux d'eau froide circule dans un radiateur au niveau du point chaud, qui se refroidit ainsi, au fur et à mesure que l'eau se réchauffe.

Ensuite, l'eau réchauffée est acheminée dans un flux d'air pour y être refroidie. Dans le cas des TAR dites « sèches », le flux d'air refroidit la canalisation dans laquelle l'eau chaude s'écoule. Un tel refroidissement n'est pas très efficace, mais peut suffire dans certains cas. Elle a l'intérêt de ne pas poser de problèmes bactériologiques. Ce sont dans les TAR dites « humides » qu'apparaissent les problèmes de légionelles, car les conditions de températures entre l'échangeur thermique et la zone où l'eau est refroidie permettent leur croissance (entre 27°C et 35 °C).



II.2. PRINCIPE DE FONCTIONNEMENT

Il existe deux types de TAR humides. Les TAR dites « humides fermées » fonctionnent en projetant de l'eau sur la canalisation, en plus du flux d'air. Comparée aux tours sèches, l'efficacité de refroidissement est ainsi améliorée. Les TAR les plus efficaces sont les TAR dites « humides ouvertes », dans ce cas, l'eau sort de la canalisation pour être pulvérisée directement dans le flux d'air. L'air est ainsi saturé de vapeur. L'échange thermique entre l'air et l'eau est donc très efficace, faisant des TAR humides ouvertes les TAR les plus performantes.

La grande majorité de l'eau refroidie retourne au point chaud pour fermer la boucle, mais une partie de l'eau pulvérisée est entraînée par le flux d'air hors de la TAR sous forme de panache. Le panache est constitué de vapeur d'eau et de microgouttelettes. L'entraînement des gouttelettes d'eau de quelques μm à 1 mm est nommé « entraînement vésiculaire ». C'est dans ces vésicules que les légionnelles peuvent être véhiculées dans l'environnement et inhalées par un humain.

II.2.1. Tour aéro-réfrigérante fermée humide

Son efficacité est moyenne. Comme le montre la *Figure 22*, l'air refroidit la canalisation du circuit d'eau, conjointement avec une vaporisation d'eau. L'efficacité de refroidissement s'en trouve augmentée, car l'eau permet un meilleur transfert thermique que l'air. Il y a une évaporation qui doit être compensée par une arrivée d'eau d'appoint. Il s'agit du même principe que les réfrigérants de colonnes à distiller.

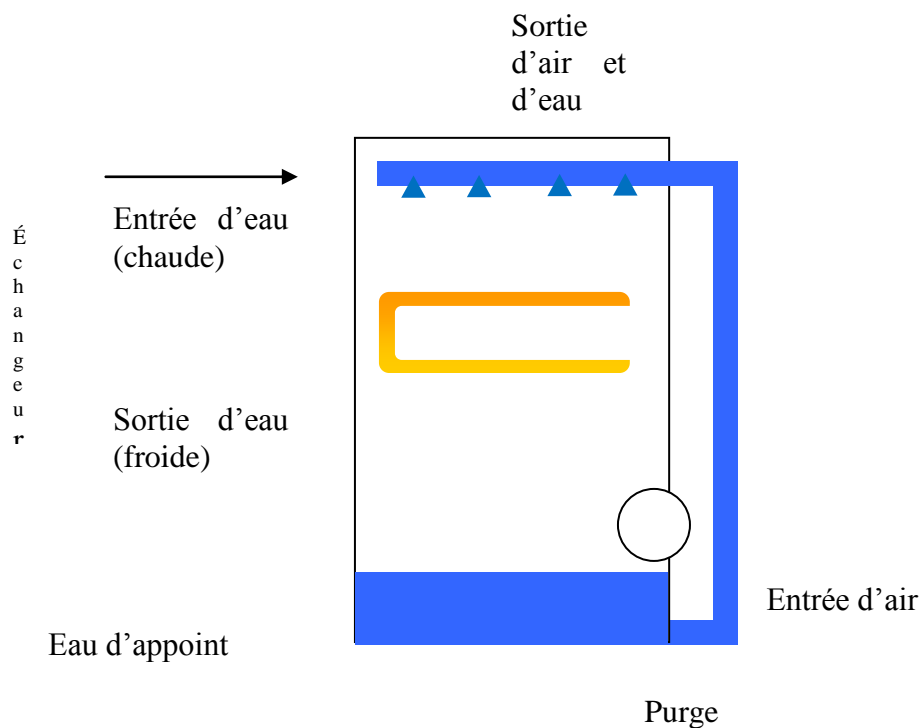


Figure 22 : Schéma d'une tour humide fermée.



II.2.2. Tour aéro-réfrigérante ouverte humide

L'eau à refroidir est directement pulvérisée en partie haute de la TAR et ruisselle sur un « packing » (corps d'échange thermique généralement en forme de nid d'abeille, destiné à augmenter la surface air/eau) traversé d'un flux d'air permettant son évaporation (*Figure 23*). Le « packing » est un corps d'échange favorisant le transfert thermique entre l'air et l'eau.

Le circuit d'eau à refroidir est donc ouvert, contrairement au circuit mentionné précédemment. L'évaporation permet d'obtenir une efficacité de refroidissement très grande. Associée à l'entraînement vésiculaire, elle provoque une perte d'eau de façon continue (limitée par un collecteur de gouttelettes qui récupère une partie de la condensation de l'eau du panache avant qu'il ne s'évacue par la cheminée).

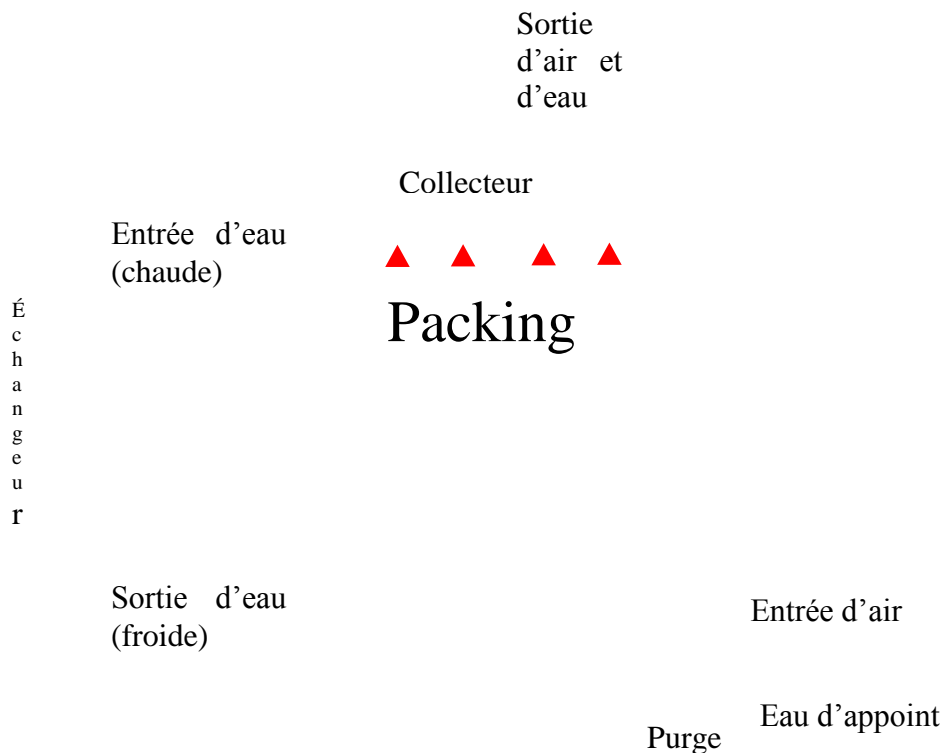


Figure 23 : Schéma d'une tour humide ouverte.

Pour les deux systèmes de tours humides, l'eau se concentre en solutés au fur et à mesure qu'une partie s'évapore. La purge régulière de l'eau ainsi concentrée est indispensable pour éviter la corrosion et l'entartrage des circuits induit par l'augmentation de la dureté de l'eau. L'eau d'appoint compense alors la perte de volume.

II.3. REGLEMENTATION FRANÇAISE APPLICABLE AUX TOURS AÉRO-REFRIGÉRANTES

La concentration en *Legionella species* dans l'eau des TAR en exploitation nécessite d'être mesurée régulièrement. Elles doivent être réalisées par un organisme accrédité et selon la norme NF T90-431. Cette norme définit un protocole précis :



- Etape 1 : Ensemencement direct sur milieu sélectif et préparation du concentrat
- Etape 2 : Décontamination du filtrat obtenu
- Etape 3 : Ensemencement du concentrat avant et après décontamination
- Etape 4 : Incubation à 36°C pendant 10 jours
- Etape 5 : Repiquages des colonies typiques
- Etape 6 : Essai immunologique des colonies de *Legionella*

La fréquence des prélèvements et analyses des *Legionella species* selon la norme NF T90-431 est au minimum mensuelle pendant la période de fonctionnement de l'installation. Si, pendant une période d'au moins 12 mois continus, les résultats des analyses mensuelles sont inférieurs à 1000 UFC/L, la fréquence des prélèvements et analyses pourra être au minimum trimestrielle.

Si un résultat d'une analyse en légionelles est supérieur ou égal à 1000 UFC/L d'eau, ou si la présence de flore interférente rend impossible la quantification de *Legionella species*, la fréquence des analyses devra être de nouveau au minimum mensuelle.

Si les résultats d'analyses montrent une concentration en *Legionella species* supérieure ou égale à 100 000 UFC/L, la TAR doit être arrêtée le plus rapidement possible, pour être vidangée, nettoyée et désinfectée.

Si les résultats sont compris entre 1000 et 100 000 UFC/L, la TAR n'a pas besoin d'être arrêtée, mais doit être nettoyée et désinfectée. Une nouvelle mesure doit être réalisée deux semaines après. A partir de trois mesures consécutives supérieures à 1000 UFC/L, l'analyse méthodique des risques de développement des légionelles dans l'installation doit être actualisée et permettre la réalisation d'un plan d'actions correctives.

En cas de flore interférente empêchant la détermination de la concentration en *Legionella species*, la TAR doit être nettoyée et désinfectée de façon à vérifier que cette concentration est inférieure à 1000 UFC/L.

A partir du 1^{er} Juillet 2014, le contrôle périodique des TAR passe de biennal à quinquennal. En cas de non-conformités, un contrôle supplémentaire est réalisé.

Les points suivants sont également renforcés :

- Analyse méthodique des risques (AMR) tous les deux ans.
- Formation des intervenants avec un recyclage inférieur à cinq ans
- Suivi des rejets d'eau, avec des périodicités variables selon le type de régimes et de mesures
- Mesures de nuisances sonores tous les trois ans

Références réglementaires :

- Décret n° 2013-1205 du 14 décembre 2013, modifiant la nomenclature des installations classées.
- Arrêté du 14 décembre 2013, relatif aux prescriptions générales applicables aux installations relevant du régime de la déclaration au titre de la rubrique n° 2921 de la nomenclature ICPE
=> **Applicable au 1er juillet 2014**
- Arrêté du 14 décembre 2013, relatif aux prescriptions générales applicables aux installations relevant du régime de l'enregistrement au titre de la rubrique n° 2921 de la nomenclature ICPE
=> **Applicable au 1er janvier 2014**



III. MODELISATION DE L'INCIDENCE DE L'EVAPORATION DANS UNE TAR HUMIDE

Le principe du refroidissement évaporatif utilisé en TAR permet de refroidir un débit d'eau déterminé pour obtenir l'écart thermique souhaité entre la température de l'eau chaude entrant dans la tour et la température de l'eau refroidie par la tour. Le phénomène d'évaporation de l'eau a pour conséquence une perte en eau et une concentration en sels dissous et en impuretés dans l'eau du circuit de la tour. Des purges de déconcentration sont donc mises en œuvre pour éviter l'augmentation de la salinité en forçant l'appoint en eau.

Le raisonnement suivant permet de modéliser l'impact de l'évaporation

Prédicat de base :

Considérons :

Une TAR d'un volume de 1500 L

Une alimentation en eau contenant 500 mg/L de solutés dissous (C_{sd})

Une évaporation (e_v) de 0,02 L/s, soit une même quantité d'eau d'appoint (débit identique à volume constant).

$$m_s = C_{sd} \times V_t$$

La masse totale de solutés (m_s) est donc de **750 g** de solutés totaux

Soit $f(t)$ la fonction « gramme de solutés » en fonction du temps (t en seconde), elle représente l'évolution de la masse de solutés dans la TAR :

$$f(t) = m_s + (C_{sd} \times e_v \times t) = 750 + (0,01 \times t)$$

(**droite de type $y = ax + b$, donc $f(t) \rightarrow +\infty$ quand $t \rightarrow +\infty$ (pour tout $a > 0$)**).

Il est donc possible de déduire la fonction $g(t)$ correspondant à la concentration en solutés dans la TAR en fonction du temps:

Équation 4 : Concentration en solutés

$$g(t) = \frac{f(t)}{V_t} = \frac{750 + (0,01 \times t)}{1500}$$

$g(t) \rightarrow +\infty$ quand $t \rightarrow +\infty$

Il est nécessaire de vider une partie de l'eau régulièrement pour éviter une trop grande concentration en solutés. Généralement, la purge est déclenchée de façon à assurer un « facteur de concentration » (RC) de l'ordre de 3. Cela signifie que la conductivité σ_{eau} du circuit doit atteindre $3 \times \sigma_{\text{eau}}$ d'appoint avant de déclencher la purge.

La conductivité est considérée proportionnelle à la concentration en solutés pour cette application numérique.

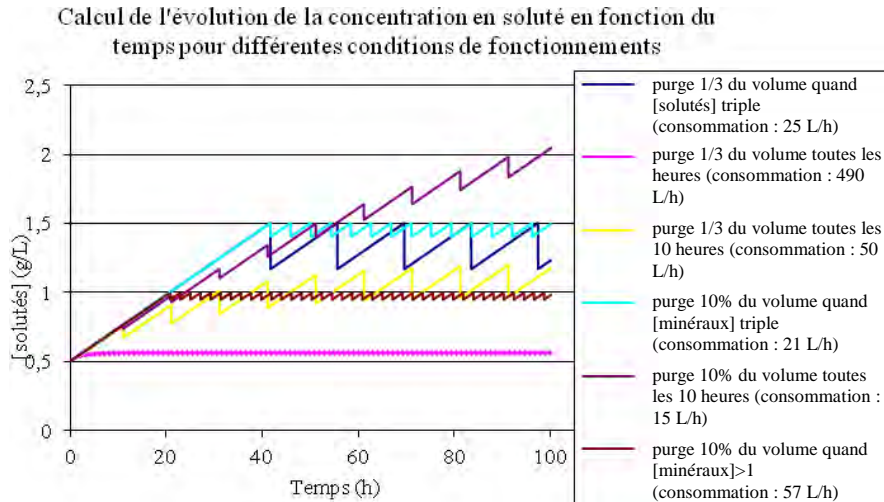


Figure 24 : Impact des différents modes de purge.

Plus le RC est grand, moins la consommation d'eau est importante car plus elle reste longtemps en circulation avant d'être purgée. Il s'agit donc de trouver un équilibre entre consommation d'eau et maintien de la concentration en solutés à un seuil acceptable en termes de corrosion et d'entartrage. Dans la *Figure 24* les deux courbes bleues correspondent à un RC de 3 car la purge est déclenchée lorsque la concentration atteint le triple de la concentration initiale. Le volume d'eau purgé ne change rien à la consommation : si de grandes quantités sont purgées, les purges sont moins fréquentes. La différence de 4 L provient du fait que les deux courbes ne s'arrêtent pas à la même concentration de solutés quand $t = 100$ h (soit en concentration, environ 1,25 g/L pour la courbe bleu foncée et 1,5 g/L pour la courbe bleu claire).

Les valeurs de « consommation » sont uniquement les volumes d'eau purgés et ne prennent pas en compte l'ajout d'eau nécessaire à la compensation de l'évaporation car celle-ci est identique pour toutes les courbes.

Nota Bene : Ces calculs ne sont présentés qu'à titre indicatif par rapport au principe de fonctionnement d'une TAR. En effet, les valeurs utilisées ne sont pas nécessairement représentatives des valeurs de la TAR pilote utilisée lors de l'étude.

IV. LA TOUR AERO-REFRIGERANTE PILOTE (VERI, SITE DE LIMAY)

IV.1. DESCRIPTIF DU PILOTE

La tour aéro-réfrigérante pilote (*Figure 25*) a été mise en œuvre pour permettre de réaliser diverses expérimentations en s'affranchissant des contraintes d'exploitation des TAR. Elle a permis l'évaluation de traitement de désinfection et notamment l'étude du remplacement du chlore par le brome afin de limiter la flore bactérienne présente en réseau d'eau de TAR (étude interne VERI, non publiée).

Elle possède plusieurs spécificités :

- Son volume d'eau circulant est de 1 500 L.

- L'eau d'alimentation du site de Limay est particulièrement dure. Sa conductivité est d'environ 850 $\mu\text{S}/\text{cm}$.
- Elle dispose d'un système d'absorption du panache d'eau qui s'échappe habituellement hors de la TAR.
- Le « point chaud » considéré normalement comme la conséquence d'un process industriel qu'il faut refroidir, est ici généré par un « groupe froid ». Il s'agit d'une sorte de « pompe à chaleur », La partie produisant la chaleur constitue le « point chaud », et la partie froide est utilisée pour récupérer l'eau du panache par condensation.

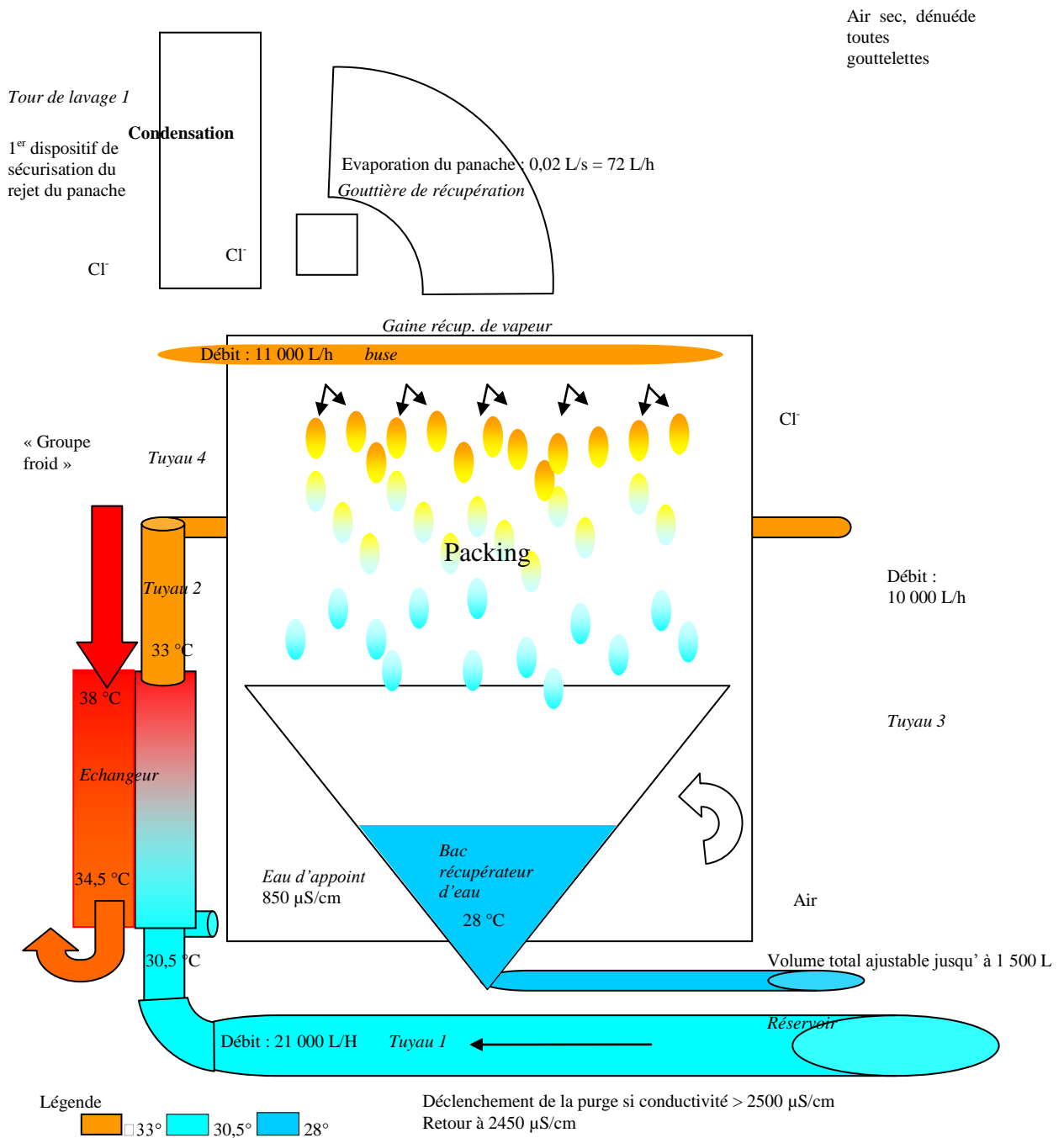


Figure 25 : Schéma de la tour aéro-réfrigérante pilote.



Tableau 4 : Tableau récapitulatif des volumes d'eau mis en jeu dans les différentes parties de la tour pilote.

Quantité d'eau totale: 1500L constant

	Débit		conductivité μS/cm	température °C
	L/h (eau)	m ³ /h (air)		
Eau d'appoint			850	
Réservoir			<250 0	
tuyau 1	21 000			30,5
Echangeur				
tuyau 2	21 000			33
tuyau 3	10 000			33
tuyau 4	11 000			33
Buse				
Bac récup d'eau				28
Gaine récup de vapeur	72	6 450		32
Gouttière de récupération				
tour de lavage 1				21
Bac tour de lavage 1				
tour de lavage 2				
Bac tour de lavage 2				
sortie				
eau usée				

Comme le montrent la *Figure 25* et le *Tableau 4*, la TAR pilote a la particularité d'intégrer deux tours de sécurisation du panache de vapeur et gouttelettes d'eau qui s'échappent après la traversée de la gaine récupératrice. Comme il est susceptible de transporter des légionelles dans les gouttelettes qui le compose, il est intégralement absorbé *via* deux tours de condensation. L'eau condensée est ensuite chlorée avant d'être purgée. Ainsi, l'air sortant de la tour est sec et ne peut en aucun cas disséminer de légionelles.

IV.2. OBSERVATION DE LA CROISSANCE DES LEGIONELLES EN TAR

Pour étayer les considérations théoriques sur l'évolution de la concentration des légionelles dans l'eau des TAR (nécessaire au dimensionnement du démonstrateur), la détermination de la vitesse d'augmentation de la concentration des légionelles dans la TAR pilote est indispensable. L'objectif



de cette partie est d'expliquer la méthode utilisée pour déterminer un ordre de grandeur pour cette variable.

La vitesse de croissance et le phénomène de relargage par le biofilm sont des paramètres intervenant dans la détermination de la concentration en légionelles dans la TAR. L'efficacité du démonstrateur dépendra de ces paramètres.

En 2007 et 2008, les concentrations en légionelles dans l'eau et le biofilm de la TAR pilote ont été suivies de façon régulière (norme AFNOR²⁷).

Ces données permettent d'estimer de manière approximative la vitesse d'augmentation de la concentration en légionelles dans la TAR en considérant le moment où elles présentent la plus grande vitesse de développement.

IV.2.1. Données brutes

Les concentrations dans l'eau et dans le biofilm ont été déterminées pour *Legionella spp* et pour *Legionella pneumophila*.

Les résultats sont présentés ci-dessous, sous forme d'histogrammes.

IV.2.1.1 Eau du circuit

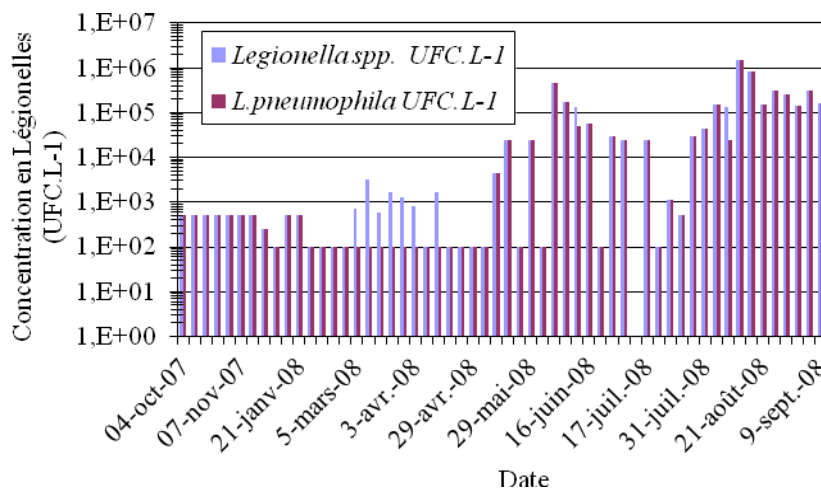


Figure 26 : Concentration en *Legionella spp* et *Legionella pneumophila* dans la TAR pilote.

Les nombreuses valeurs à 1×10^2 et 5×10^2 UFC/L observées dans la Figure 26 correspondent aux limites de détection et de quantification de la méthode analytique.

Une fluctuation globale de la concentration en légionelles apparaît à partir du 20 mai 2008. A partir de cette date la concentration en légionelles est supérieure à la limite de quantification (LQ). La limite de quantification est le seuil à partir duquel la concentration est assez grande pour être déterminée. Typiquement le nombre d'UFC sur les boîtes de Petri doit être supérieur à 30. Dans le

²⁷ AFNOR est une organisation chargée d'élaborer des normes françaises, européennes ou internationales. Pour la quantification en *Legionella pneumophila*, la norme NF-T90-431 est utilisée



cas contraire, l'estimation de la concentration par dénombrement des UFC n'offre pas une assez bonne précision. Dans ce cas, les légionelles sont détectables mais non quantifiables.

La TAR peut être considérée comme étant colonisée par les légionelles malgré quelques données ponctuelles postérieures qui se situent en dessous de la limite de détection (LD). La limite de détection est le seuil à partir duquel les légionelles sont détectables. Ceci traduit une forte variabilité de ce paramètre. Les points de mesures sont donc difficilement utilisables en l'état. Il est préférable de réaliser des moyennes sur plusieurs mesures. Pour obtenir un « lissage » modéré *Figure 27*, les données sont moyennées sur un mois, soit 4 points : Bien que lissées, les concentrations sont très variables dans le temps. Ce comportement erratique laisse présager que la croissance des légionelles dans le réseau d'eau n'est pas une simple croissance exponentielle comme observée dans un milieu nutritif. Le biofilm est suspecté d'intervenir dans ce comportement, la concentration des légionelles en son sein a donc été étudiée.

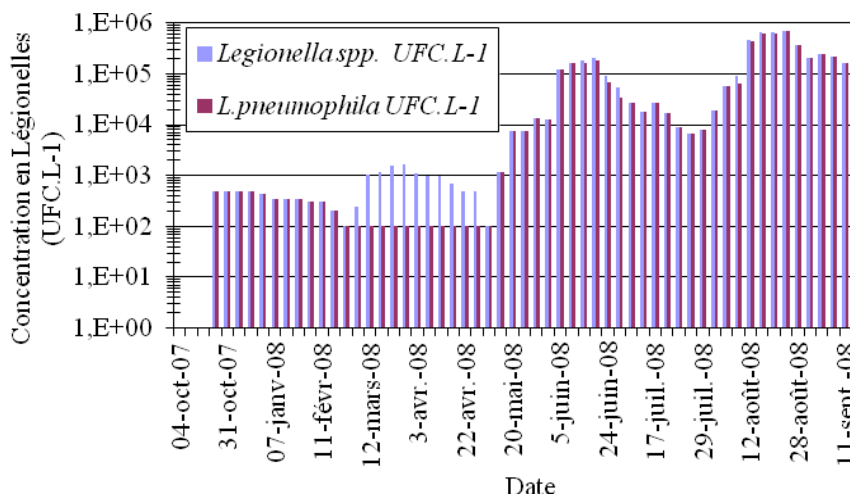


Figure 27 : Evolution « lissée » de la concentration en Legionella spp et en Legionella pneumophilla.

IV.2.1.2 Biofilm

Pour réaliser la mesure de concentration des légionelles dans le biofilm, des « coupons²⁸ » amovibles de canalisation sont utilisés (*Figure 28*). Les bactéries ayant colonisé la surface des coupons (*Figure 29*) peuvent être mises en solution puis dénombrées par étalement sur boîte de Petri.

Les résultats obtenus (*Figure 30*) sont rapportés par unité de surface de façon à obtenir des UFC/cm².

²⁸ Les coupons sont des pastilles d'environ 1,5 cm de diamètres de matériau identiques à la canalisation. Ils peuvent se fixer à un « porte coupon » de façon à affleurer la surface interne d'une canalisation et ainsi permettre au biofilm de se développer à sa surface. Le porte coupon permet d'extraire le coupon de la canalisation pour déterminer le biofilm qui s'y est développé.

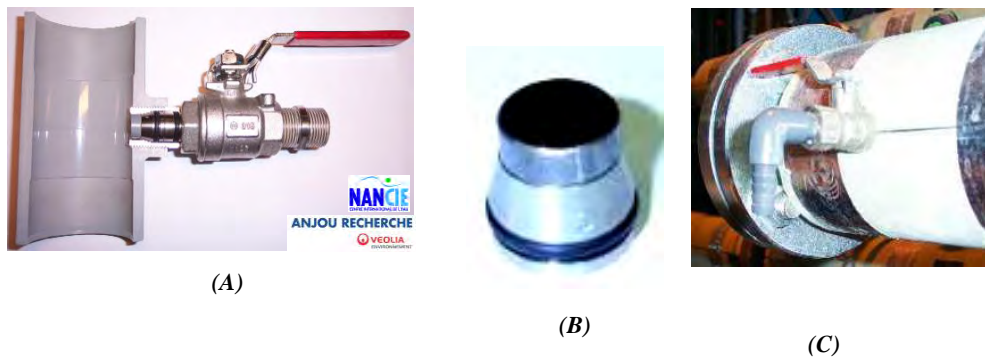


Figure 28: Système de prélèvement de coupons biofilm (A), Coupon (B) robinet de prélèvement d'eau (C).



Figure 29: Photo de coupon recouvert de biofilm (Photos de Thierry DORMOY).

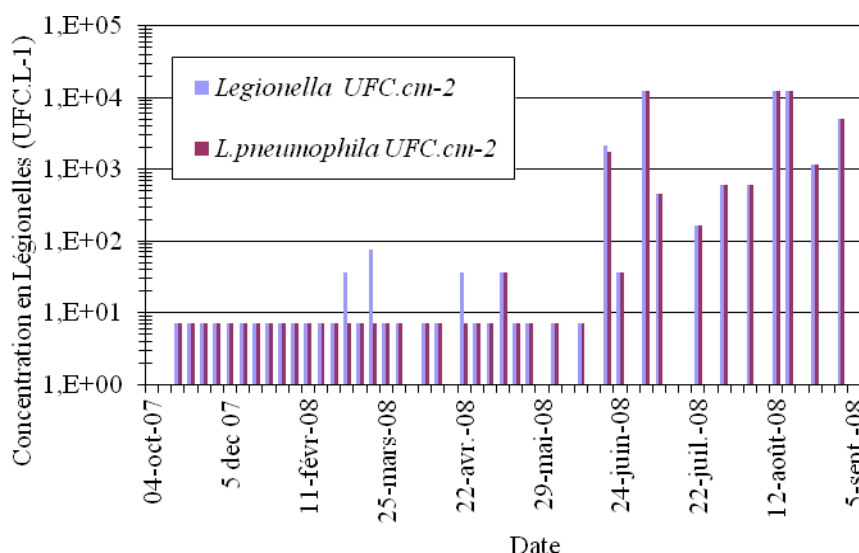


Figure 30 : Quantité de Legionella spp et Legionella pneumophilla par centimètre carré de canalisation.

Les mesures hebdomadaires moyennées par mois sont présentées dans la Figure 31 : Les nombreuses valeurs à 7,14 UFC.L⁻¹ (quasiment toutes les valeurs d'octobre à Juin) correspondent à



la limite de quantification (LQ). Ces histogrammes mettent en évidence un léger décalage entre la colonisation des légionelles dans l'eau et au niveau du biofilm. L'eau semble avoir été colonisée à partir du 20 mai. Les légionelles commencent à être détectées dans le biofilm à compter de cette date mais la colonisation n'est significative qu'à partir du 24 juin.

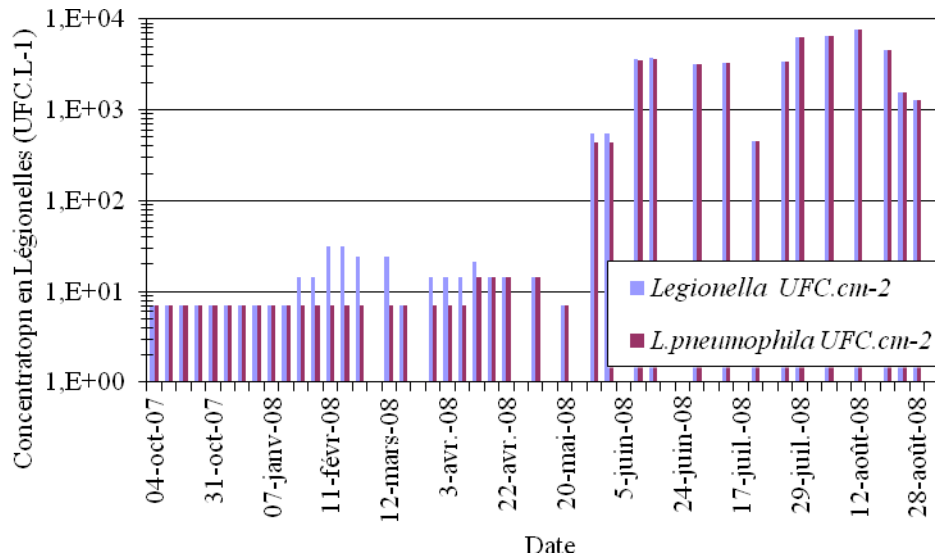


Figure 31 : Quantité de Legionella spp et Legionella pneumophilla par centimètre carré de canalisation moyennée sur 1 mois.

IV.2.2. Interprétation

IV.2.2.1 Biofilm et eau circulante

La concentration en légionelles dans l'eau est exprimée en UFC/L. Alors que la concentration dans le biofilm est exprimée en UFC/cm². Pour comparer la proportion de légionelles dans le biofilm avec celle dans l'eau, il faut considérer l'étendue de la surface étudiée dans le biofilm, par rapport au volume d'eau. Il s'agit donc de déterminer la surface de tuyaux permettant de contenir 1 L d'eau.

$$V = \pi \cdot R^2 \cdot h$$

$$S = 2 \cdot \pi \cdot R \cdot h$$

Avec :

- V le volume d'eau en cm³
- S la surface en cm²
- R le rayon de la section en cm
- h la longueur du tuyau en cm

Considérons une portion de canalisation de 10 cm de diamètre (R = 5 cm)

Pour un volume de



$$V = 1 \text{ L} = 1000 \text{ cm}^3$$

La longueur du tuyau est de 13 cm (h) et la surface de 410 cm².

Comme la concentration des légionelles dans l'eau est exprimée en UFC/L, il faut considérer la surface de la canalisation et la concentration en UFC/cm² pour déterminer la quantité de bactéries dans le biofilm fixé à la surface d'une portion de canalisation.

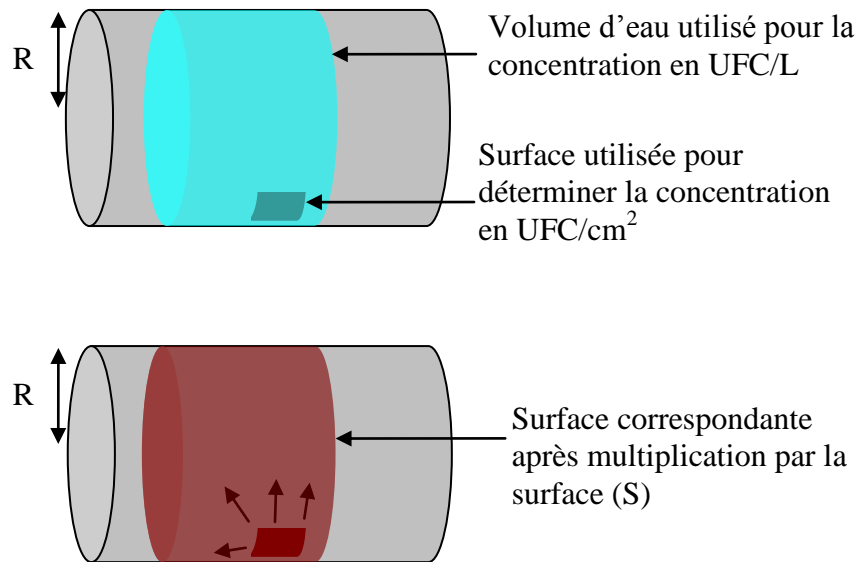


Figure 32 : Schéma des surfaces considérées dans le calcul de la concentration des légionelles.

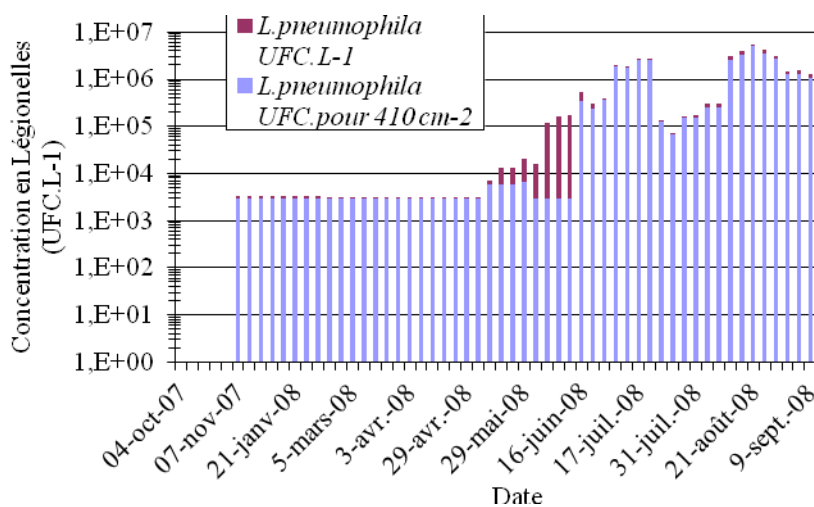


Figure 33 : Répartition des légionelles présentes dans l'eau ou dans le biofilm. La concentration représentée par chaque histogramme correspond à la concentration totale en légionelles présentes dans une portion de canalisation contenant 1 L. Ils sont obtenus en réalisant la somme des concentrations des légionelles dans le biofilm (en bleu) et des légionelles dans l'eau (en rouge).



Grâce aux calculs précédents qui prennent comme référence une portion de canalisation, il est possible de comparer directement des concentrations en UFC par unité de volume avec des concentrations en UFC par unité de surface (*Figure 33*). Par exemple, au 29 juillet, la concentration en *L. pneumophila* dans l'eau était de 10 000 UFC/L et la concentration sur les coupons était de 7 000 UFC/cm² soit pour une portion de canalisation de 1 L : $7\,000 \times 410 = 2\,870\,000$ UFC. A cette date, la proportion de bactéries dans le biofilm était donc de $2\,870\,000 / (10\,000 + 2\,870\,000) \approx 99,65\%$. Il apparaît qu'au niveau des canalisations, les légionelles sont majoritairement dans le biofilm.

Ces résultats sont en adéquation avec la littérature qui montre qu'environ 99 % des légionelles sont dans le biofilm (Vidal et al., 2005) mais restent spécifiques à la canalisation étudiée, il n'en va pas forcément de même dans les cuves de stockage, où le rapport « volume d'eau/surface de canalisation » est beaucoup plus grand.

IV.2.2.2 Détermination de la vitesse d'augmentation de la concentration des légionelles dans l'eau

Les éléments précédemment cités ont montré que la concentration en légionelles est variable, et subit de brusques augmentations ou diminutions.

Deux hypothèses peuvent être formulées pour expliquer ce phénomène :

- 1) « L'augmentation de la concentration vient du fait que les légionelles ont parfois un comportement de croissance exponentielle qui apparaît uniquement dans les conditions les plus favorables (indéterminées) »
- 2) « Les légionelles se fixent puis croissent dans le biofilm, (sont donc indétectables par le suivi de l'eau circulante), et des décrochages de biofilm à maturité induisent les brusques augmentations de légionelles dans l'eau »

Un faisceau d'indices pousse à envisager l'hypothèse 2 comme valide.

En effet, les coupons montrent que la grande majorité des légionelles sont dans le biofilm et l'impact du cycle du biofilm dans le développement des légionelles est scientifiquement prouvé (Declerck, 2010).

Quel que soit l'hypothèse, il s'agit de réaliser un système capable d'abattre au moins aussi rapidement que n'apparaissent des légionelles. Pour s'assurer de contrecarrer leur développement par les performances du générateur, cette vitesse d'apparition est calculée au moment où la plus grande vitesse est constatée.

Selon le graphique lissé (*Figure 27*), du 15 mai au 5 juin (soit 21 jours), la concentration évolue de 10^2 à 10^5 légionelles/L (*Figure 34*) dans la phase liquide :

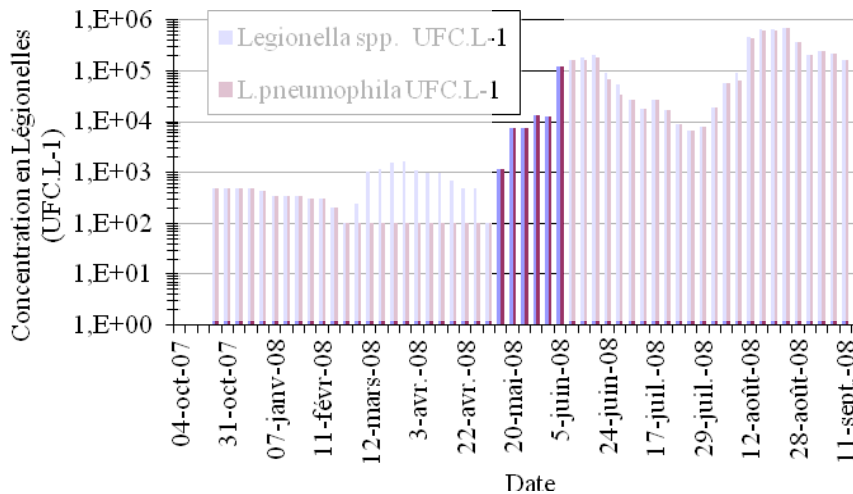


Figure 34 : Visualisation de la période où la croissance en légionelles est la plus forte.

Selon ces observations, lors d'un événement de décrochage de biofilm, la concentration en légionelles dans la phase liquide augmente d'environ $3 \log_{10}$ en 21 jours. Cela correspond à un taux de croissance horaire μ de 0.014 h^{-1} :

$$\mu = \frac{\ln \frac{N}{N_0}}{t} = 0.014 \text{ h}^{-1}$$

IV.2.3. Conclusion

Au moment du pic d'augmentation de la concentration des légionelles, le temps de doublement de population est d'environ 50 h. Cela correspond à un taux de croissance horaire de $0,014 \text{ h}^{-1}$.

Le système de décontamination à développer doit être capable de limiter le développement des légionelles en considérant cette vitesse d'augmentation de concentration, l'objectif du projet étant d'empêcher les légionelles d'atteindre la limite de 1000 UFC/L. Si le générateur est capable de décontaminer aussi vite que les légionelles n'augmentent, il est probable que cela pourra conduire à une stagnation de la population des légionelles. Cette dernière ne dépassera pas dans ce cas le seuil critique défini.

V. LE CONCEPT DE DERIVATION

V.1. MODELE MATHEMATIQUE A

Dans la perspective de dimensionner un système industriel viable, il est irréaliste d'envisager un système batch traitant tout le liquide ou un traitement sur une veine de liquide correspondante. Le



coût en termes de puissance serait énorme. A ce titre, il apparaît nécessaire de déterminer la cinétique d'abattement par le calcul, à partir des paramètres de volume total à traiter, de débit, et d'efficacité intrinsèque du module générateur/applicateur. L'objectif est de réaliser un traitement adapté à la contamination aléatoire dû au relargage du biofilm. Ce modèle sera par la suite examiné expérimentalement (cf. chapitres Partie VI -I.4.1.2.4 ; Partie VI -I.4.1.2.5 ; Partie VI -I.4.2).

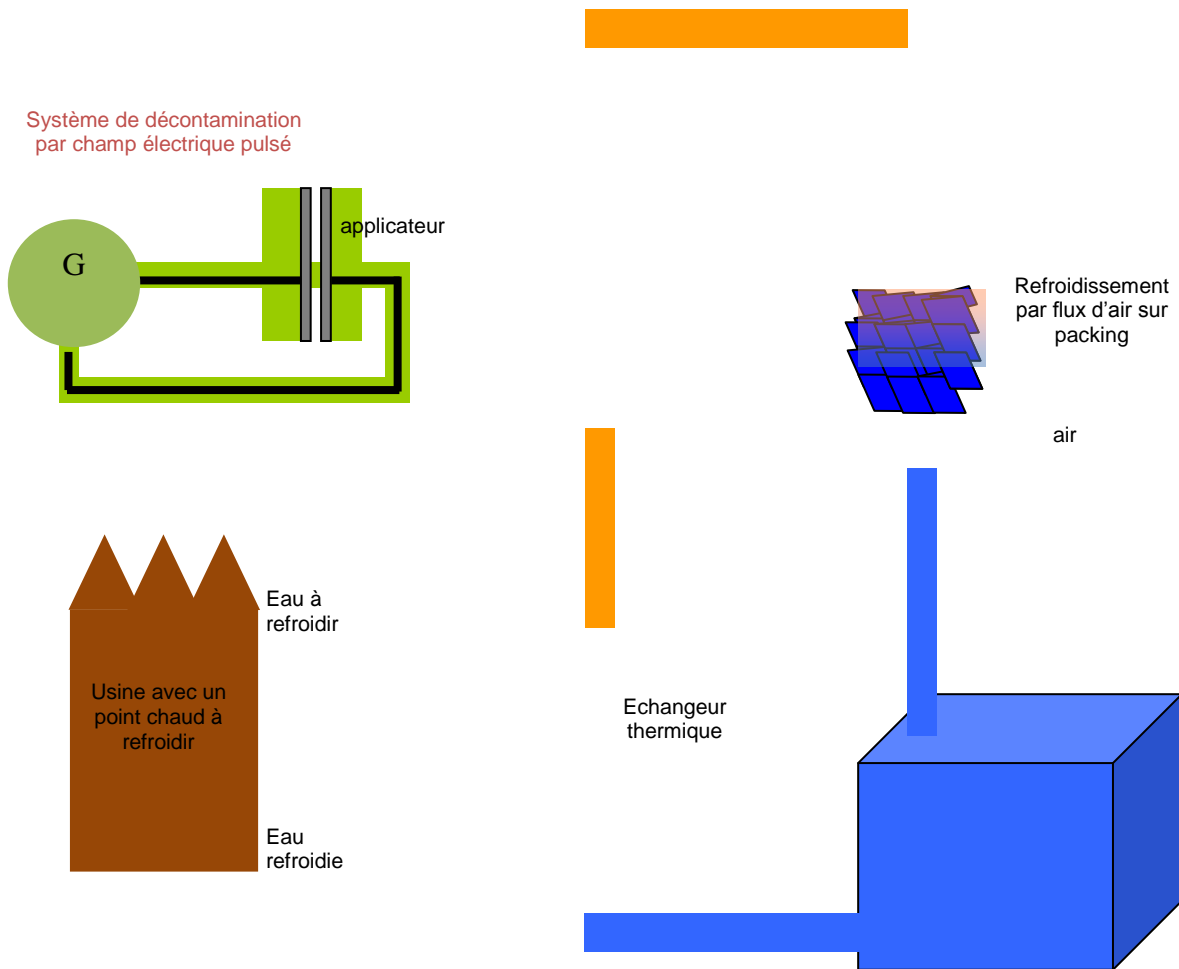


Figure 35: Représentation de la mise en place du dispositif de décontamination sur la TAR.

Le principe est de traiter le flux d'une dérivation à faible débit.

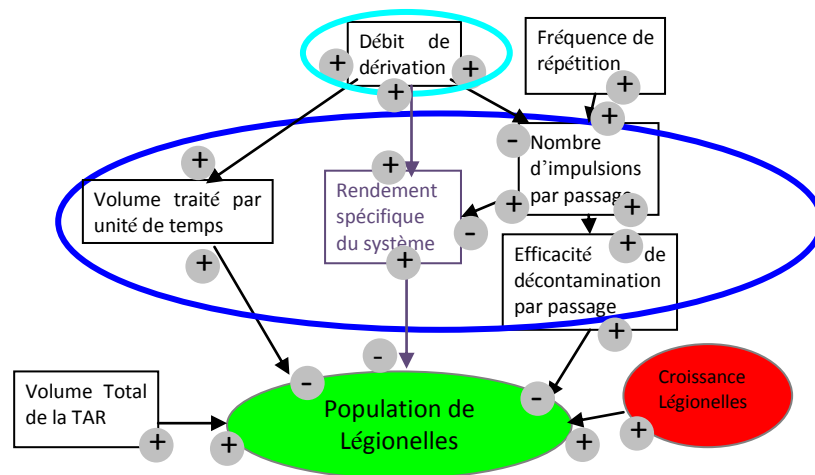


Figure 36 : Relations impliquées dans l'efficacité du dispositif sur la TAR pilote.

Comme le montre la Figure 36, il est possible de considérer pour chaque paramètre l'augmentation ou la diminution de sa valeur. Les signes « + » ou « - » au départ des flèches représentent respectivement une augmentation ou une diminution du paramètre. Les signes « + » ou « - » à l'arrivée des flèches représentent l'augmentation ou la diminution du paramètre ciblé par la flèche, en fonction de l'augmentation ou de la diminution du paramètre de départ. Les paramètres doivent être déterminés de façon à optimiser l'abatement.

Il y a trois paramètres intervenant directement sur la diminution de la population bactérienne :

- le volume traité par unité de temps
- le rendement spécifique du système
- l'efficacité de décontamination par passage dans l'applicateur.

Ces trois paramètres dépendent du débit. Le fait que le volume traité augmente et que le nombre d'impulsions diminue avec le débit est trivial. Le fait que l'augmentation du débit améliore le rendement énergétique n'est pas intuitif mais sera montré expérimentalement dans la Partie VI -II.3 (page 187).

Une suite géométrique est utilisée pour le calcul de la cinétique de décontamination en flux fermé d'une population bactérienne par un système de décontamination.

Soit $[b]_0$ la concentration initiale en bactéries.

et $[b]_{n+1}$, la concentration à l'instant $n+1$.

Soit :

- μ : le taux de croissance de la population bactérienne (nul en milieu pauvre)
- τ : la différence de concentration bactérienne avant et après le passage dans l'applicateur
- V_{tot} : le volume total
- $V_{\text{traité}}$: le volume sortant de l'applicateur au cours du temps.

Afin d'estimer $[b]_{n+1}$, il suffit :

- D'ajouter à $[b]_n$ le nombre de bactéries apparues entre le temps n et $n+1$ dû au taux de croissance des bactéries de la partie stockée dans le réservoir.



Équation 5 : Augmentation de la concentration bactérienne due à la croissance

$$\Delta_1 [b]_{n+1} = \frac{V_{tot} - V_{traité}}{V_{tot}} \cdot [b]_n \cdot \mu$$

- De soustraire à $[b]_n$ la quantité de bactéries détruites par l'applicateur entre le temps n et $n+1$. Pour se faire, le volume de suspension sortant de l'applicateur dans ce laps de temps est multiplié par la concentration à l'instant U_n pour déterminer le nombre de bactéries passant dans l'applicateur. A ce nombre est appliqué le pourcentage d'abatement.

Équation 6 : Diminution de la concentration bactérienne due au traitement

$$\Delta_2 [b]_{n+1} = \frac{V_{traité}}{V_{tot}} \cdot \frac{\tau}{100} \cdot [b]_n$$

Ainsi :

Équation 7 : Relation de récurrence de l'évolution de la concentration en bactéries

$$[b]_{n+1} = [b]_n + \left(\frac{V_{tot} - V_{traité}}{V_{tot}} \times [b]_n \times \mu \right) - \left(\left(\frac{V_{traité}}{V_{tot}} \right) \times \left(\frac{\tau}{100} \right) \times [b]_n \right)$$

Équation 8 : Résolution de la récurrence

$$[b]_n = [b]_0 \times \left(1 + \left(\frac{V_{tot} - V_{traité}}{V_{tot}} \times \mu \right) - \left(\left(\frac{V_{traité}}{V_{tot}} \right) \times \left(\frac{\tau}{100} \right) \right) \right)^n$$

Simplification dans les cas où la vitesse de croissance est négligeable :

Équation 9 : Formule dans les cas où μ peut être considéré comme nul

$$[b]_n = [b]_0 \times \left(1 - \left(\left(\frac{V_{traité}}{V_{tot}} \right) \times \left(\frac{\tau}{100} \right) \right) \right)^n$$

Il est également possible d'extraire τ , et ainsi de déterminer sa valeur à partir de résultats expérimentaux (quand $[b]_n$ a pu être déterminé expérimentalement) :

Équation 10: Formule permettant de calculer la valeur de τ

$$\tau = \frac{(100 \times V_{tot}) \left(\left(\frac{[b]_n}{[b]_0} \right)^{\frac{1}{n}} - 1 \right)}{-V_{traité}}$$

En choisissant un pas de 1s entre « n » et « $n+1$ », le volume traité $V_{traité}$ (en mL) correspond au débit (en mL/s). En effet le débit détermine le volume qui entre et sort de l'applicateur à chaque seconde.

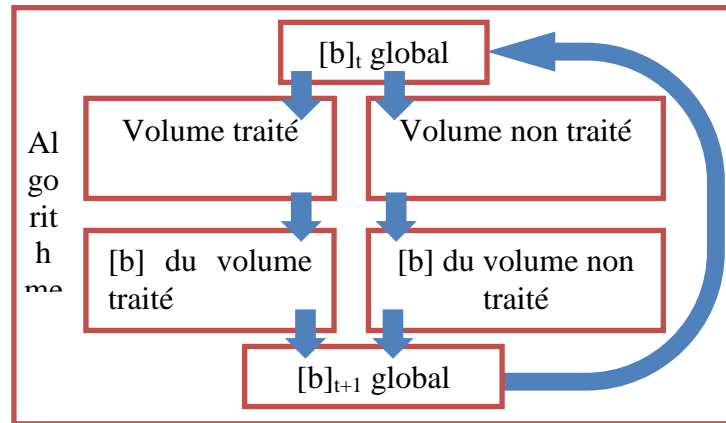


Figure 37 : Algorithme déterminant l'évolution de la concentration.

Les applications numériques de ces différents calculs permettront d'analyser en détail les résultats d'expériences et de dimensionner les performances des générateurs en fonction des objectifs d'abattements à atteindre. Dans la Partie VI -I.4, la validité des formules est vérifiée expérimentalement.

V.2. MODELISATION MATHÉMATIQUE B (ONERA)

Une seconde modélisation a été réalisée par l'ONERA en utilisant une stratégie différente. Cette étude a été réalisée par Denis Packan (2011). Les éléments ci-dessous reprennent la note rédigée par l'ONERA.

V.2.1. Description d'une TAR

La TAR est constituée par un circuit d'eau ouvert, avec un débit entrant (appoint d'eau) et sortant (pertes par évaporation et entrainement vésiculaire).

Dans tout ce qui suit :

- les quantités et les débits d'eau seront indifféremment décrits par la masse ou le volume, sachant que 1 litre d'eau pesé vaut 1 kg.

Pour simplifier le problème, les approximations suivantes sont faites :

Approximation 1- La température de l'eau sortante (vapeur et gouttelettes) et la température de l'eau d'appoint sont les mêmes. En effet, l'eau sort au niveau du flux d'air, zone où l'eau est proche de la température ambiante, à l'instar de l'eau d'appoint. Ainsi le débit d'enthalpie de l'eau d'appoint et de l'eau sortante (vapeur et gouttelettes) s'annulent car les flux sont à la même température, et seront donc ignorés dans le bilan global.

Approximation 2- La température de l'eau d'appoint et la température du bras froid de la TAR sont les mêmes, donc l'échauffement du bras froid par l'eau d'appoint est négligé.



Approximation 3- La pompe de circulation provoque une montée négligeable de température du bras froid, donc sa puissance sera négligée.

Approximation 4- Le débit massique de gouttelettes est négligeable devant celui de la vapeur, et sera donc négligé.

Approximation 5- La puissance thermique évacuée par convection dans l'évaporateur est négligeable (toute la puissance provient de l'évaporation de l'eau).

Approximation 6- les purges périodiques sont ignorées. Par conséquent, l'élimination des légionelles par l'eau de la purge n'est pas prise en compte. Ainsi, les conditions étudiées ci-dessous seront forcément moins favorables que les conditions réelles. Se placer dans les conditions les moins favorables permet de s'assurer de ne pas sous-dimensionner le système.

La TAR est schématisée dans la *Figure 38*.

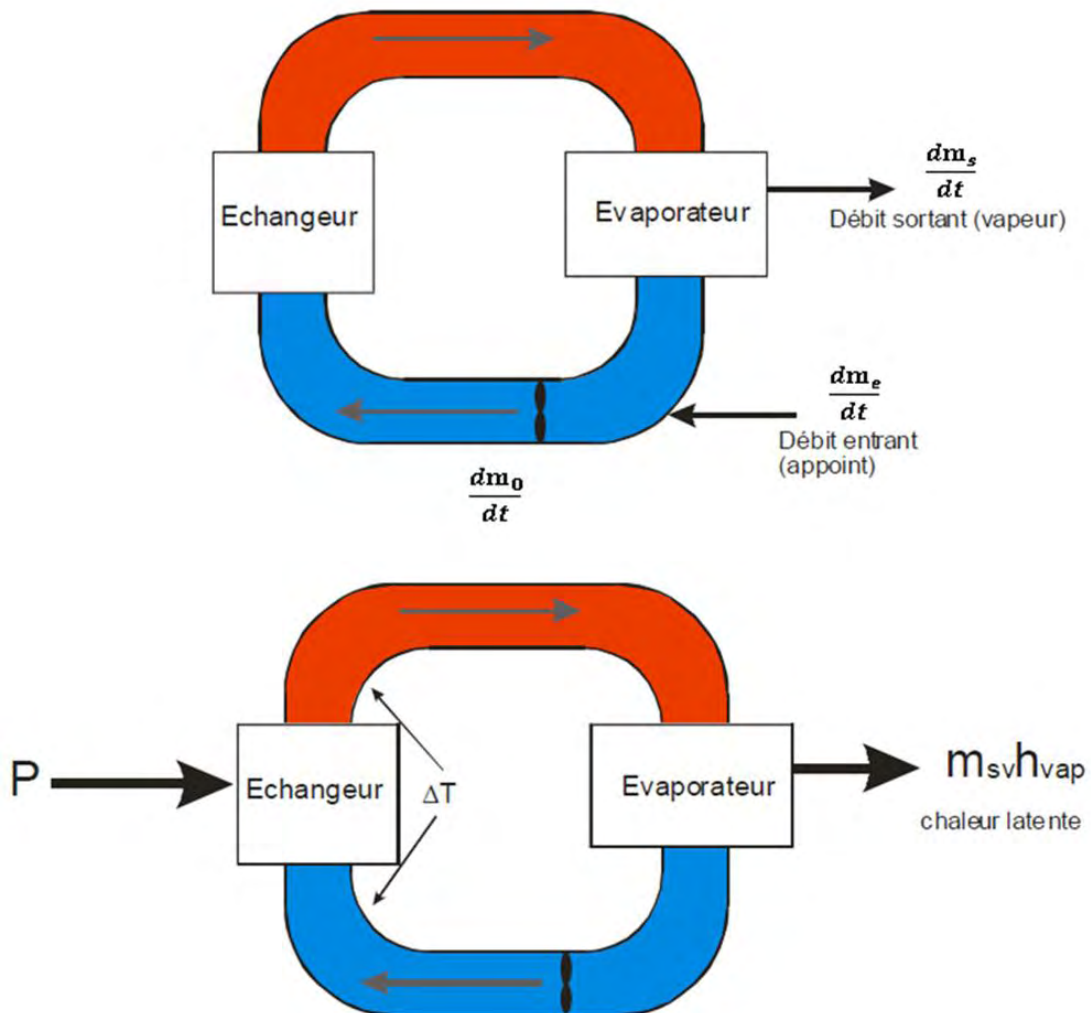


Figure 38 : Bilan de masse (haut) et d'énergie (bas) dans la TAR. La couleur représente la température de l'eau.

Deux bilans peuvent être fait : de débit de masse et de débit d'énergie (=puissance)



Bilan de masse : $\frac{dm_e}{dt} = \frac{dm_s}{dt}$

Bilan d'énergie : $P = \frac{dm_s}{dt} h_{vap}$

Quelques relations supplémentaires permettent de compléter l'approche et déterminer l'ensemble des paramètres :

1- L'eau de TAR est entièrement renouvelée en $t_0 = \frac{V}{\frac{dm_e}{dt}}$ où V est le volume de la TAR

2- Le temps que met l'eau à faire un tour de TAR est $t_1 = \frac{V}{\frac{dm_o}{dt}}$

3- La vitesse d'écoulement est $v = \frac{\frac{dm_e}{dt}}{\frac{\pi D^2}{4}}$ où D est le diamètre du tube de la TAR.

4- La puissance thermique P de la TAR est liée à la différence de température : $P = \frac{dm_o}{dt} c_p \Delta T$ où c_p est la capacité calorifique de l'eau et ΔT est la différence de température entre l'eau chaude et l'eau froide dans la TAR au niveau de l'échangeur.

Les valeurs typiques des paramètres d'entrée (référence : communication avec VEOLIA) sont données dans le tableau suivant :

Tableau 5 : Paramètres d'entrée de la TAR.

Paramètre	Valeur	Commentaire
C_p	4.186 kJ/kg/K	=4.186 MJ/m ³ /K
$\frac{dm_o}{dt}$	11 m ³ /h	=3 litres/s
P	65 kW	Puissance thermique
h_{vap}	2270 kJ/kg	Chaleur latente de vaporisation
D	65 mm	
V	1.3 m ³	

Il en découle :

Tableau 6 : Caractéristiques calculées de la TAR.

Paramètre	Valeur	Commentaire
$\frac{dm_e}{dt}$	29 ml/s	=103 litres/h
t_0	12h30min	Temps de renouvellement de l'eau
t_1	7 min	
v	0.92 m/s	
ΔT	5 °C	



Le temps de renouvellement permet d'évaluer la concentration de sels minéraux dans l'eau (la charge). Le phénomène de concentration permet de déduire cette charge : au bout de t_0 la charge est doublée, et au bout de nt_0 la charge est multipliée par $n+1$.

V.2.2. TAR avec dispositif de décontamination : bilan d'énergie

Le bilan est schématisé sur la *Figure 39*. Il est considéré que le volume de la TAR s'écrit :

Équation 11 : Somme des volumes chauds (partie haute du schéma) et froids (partie basse du schéma)

$$V = V_H + V_C$$

Le débit traité dans le dispositif de décontamination est $\frac{dm_1}{dt}$, appelé le débit de bypass. Comparé à la TAR seule, le bilan de masse reste inchangé contrairement au bilan d'énergie global.

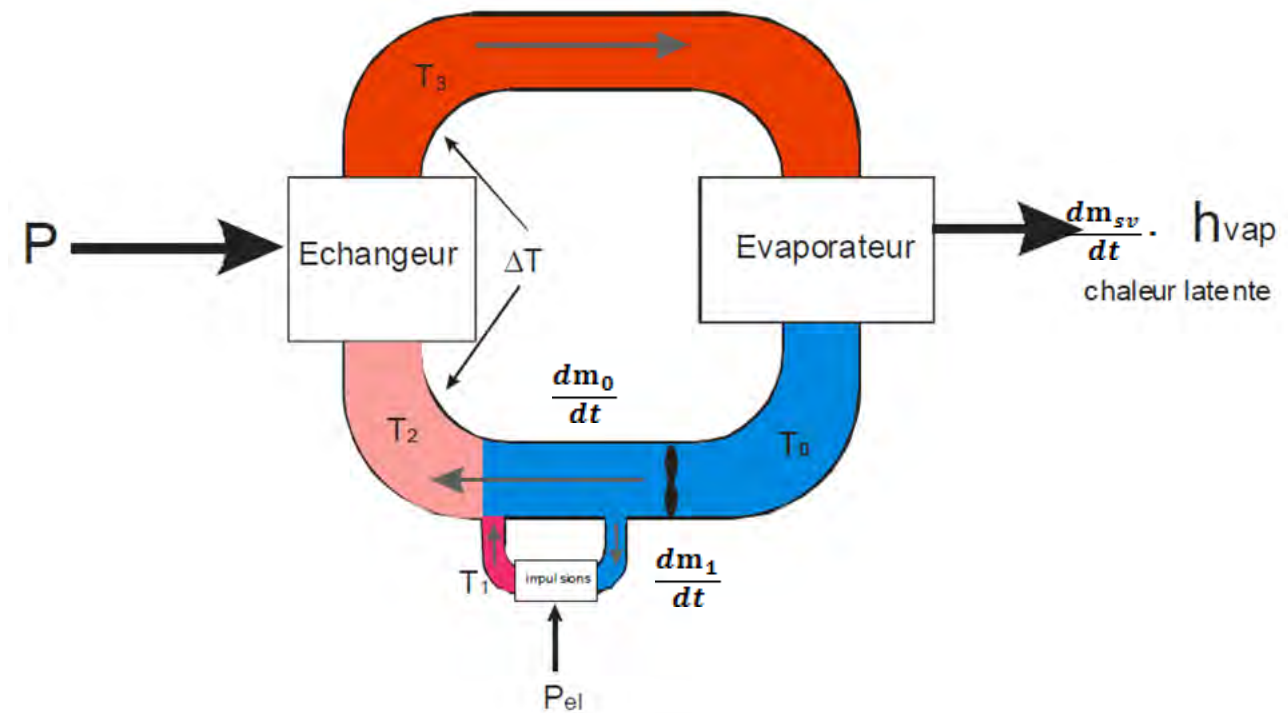


Figure 39 : Schéma du bilan d'énergie de la TAR avec dispositif de décontamination.

$$P + P_{el} = \frac{dm_s}{dt} h_{vap}$$

Cela signifie que le débit évaporé augmentera pour faire face à l'échauffement P_{el} lié à l'application d'un courant électrique dans l'eau.

Le but de l'étude est naturellement que P_{el} soit négligeable, car la technologie mise en place ne doit pas impacter l'efficacité de refroidissement de la TAR. Vu que les températures ne sont pas homogènes au sein de la TAR, un bilan d'énergie local est nécessaire, au niveau du dispositif de décontamination. Les relations énergétiques suivantes sont obtenues :

$$P_{el} = \frac{dm_1}{dt} c_p (T_1 - T_0)$$

$$T_2 = T_0 + \frac{\frac{dm_1}{dt}}{\frac{dm_0}{dt}} (T_1 - T_0)$$



$T_3 = T_2 + \Delta T$ avec ΔT calculé comme précédemment. Cependant, il est considéré que $T_2 \approx T_0$. En effet, dans le cas contraire, la puissance dépensée par le dispositif de décontamination le rend économiquement non viable.

V.2.3. Bilan biologique : état stationnaire et organismes en suspension

L'augmentation du nombre d'organismes provient de l'eau d'appoint et de la multiplication au sein de la TAR. La multiplication des organismes aura lieu a priori préférentiellement dans la partie chaude de la TAR.

Ainsi, il est évident qu'il y a un intérêt :

- à minimiser le volume chaud (V_H) de la TAR, en plaçant l'évaporateur au plus proche de l'échangeur

- à diminuer T_3 (par exemple en augmentant le débit $\frac{dm_0}{dt}$),

D'autres considérations, notamment le fonctionnement de l'évaporateur, doivent aussi être prises en compte.

Ces paramètres sont considérés comme déjà optimisés dans la TAR, donc T_3 et V_H sont considérés comme fixes.

La population des organismes dans un milieu à température T obéit à une loi exponentielle, liant le taux de croissance volumique à la densité actuelle:

$$\frac{dn_v(t)}{dt} = \frac{n(t)}{\tau} \text{ où } n \text{ est le nombre d'organisme par kg d'eau.}$$

Le temps caractéristique de croissance τ dépend de la température de l'eau. La population est multipliée par ~ 2.81 à chaque τ . Si ce seul processus de multiplication est considéré, alors

$$\frac{dn(t)}{dt} = \frac{dn_v(t)}{dt} \text{ et cette équation conduirait à une population continuellement croissante s'écrivant } n(t) = n_0 e^{\frac{t}{\tau}} .$$

Le phénomène de saturation qui survient à haute densité (c'est-à-dire la phase plateau de la croissance bactérienne) est ignoré, le but étant justement de se situer très largement en dessous de ce niveau de contamination.

L'effet du dispositif de décontamination est de diminuer d'un facteur α la densité d'organismes dans le débit d'eau $\frac{dm_1}{dt}$ qu'il voit passer (une diminution de 1 \log_{10} signifie $\alpha=10$). Ainsi la

$$\text{cinétique d'abattement des organismes est } \frac{n \frac{dm_1}{dt} - n \frac{dm_1}{dt}}{\alpha} = n \frac{dm_1}{dt} \left(1 - \frac{1}{\alpha} \right).$$

Si α est le facteur d'abattement, f est la fraction d'abattement et $f = 1 - \frac{1}{\alpha}$. Par exemple, pour un abattement de « 1 \log_{10} », $\alpha=10$ et $f = 90\%$ (90% des microorganismes ont été tués).

Approximation 7- Etant donné le ΔT faible (5°C) entre T_0 et T_3 , il est considéré que la multiplication s'effectue dans le volume total V de la TAR à la température T_0 .



Approximation 8- Par la même occasion l'effet du volume d'eau à T_1 , qui peut être élevé, est négligé car ce volume est considéré comme suffisamment faible.

L'apport d'organismes provient de l'eau d'appoint avec une densité d'organismes n_e et la multiplication volumique. Les pertes sont liées au dispositif de décontamination. Le bilan biologique est schématisé sur la *Figure 40*.

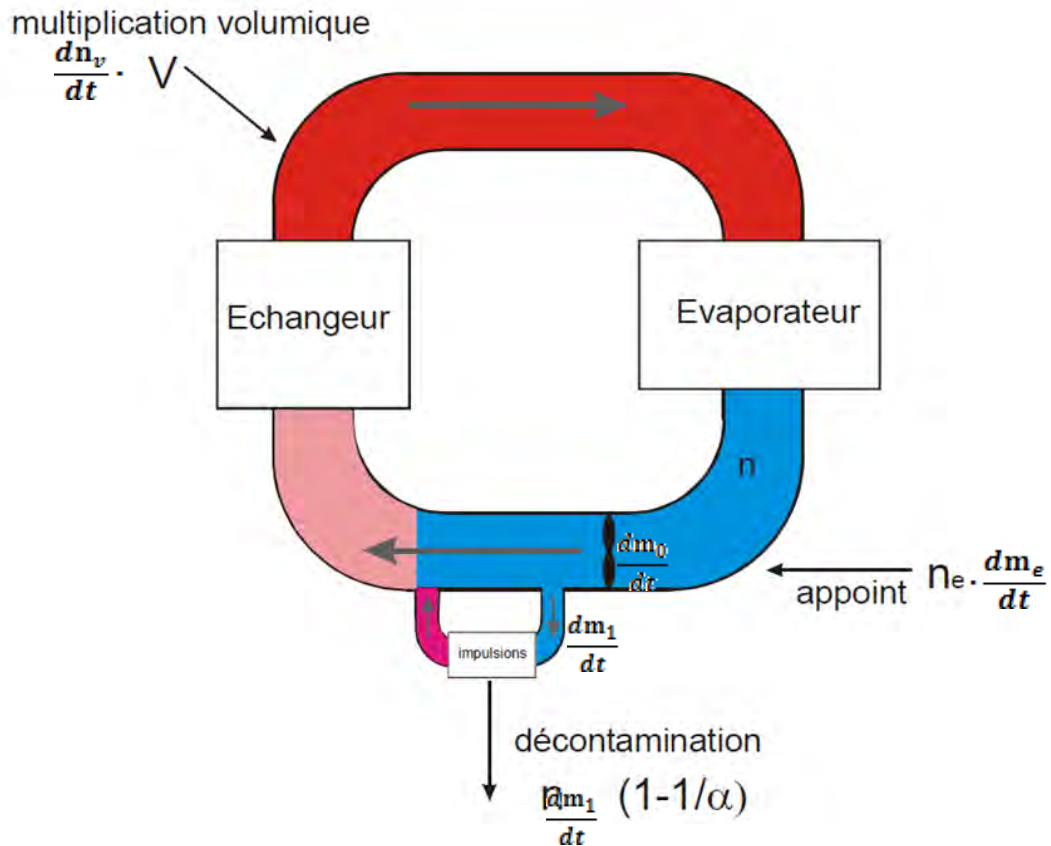


Figure 40 : Bilan biologique de la TAR avec dispositif de décontamination. Les couleurs représentent les températures.

Dans la *Figure 40*, les températures de la TAR sont représentées par des couleurs. Mais ces températures ne sont en fait pas pertinentes pour le bilan biologique. En effet, selon le *Tableau 6*, l'eau met 7 minutes pour réaliser un tour du circuit de TAR. Pour cette durée, la prolifération n'est pas significative, ce qui signifie que la densité d'organismes est homogène dans l'ensemble du réseau de la TAR (exception faite des régions d'entrée de l'appoint et de l'eau décontaminée).

Ainsi :

Approximation 9 : pour simplifier, la TAR sera modélisée comme un volume uniforme, comme sur la *Figure 41*.

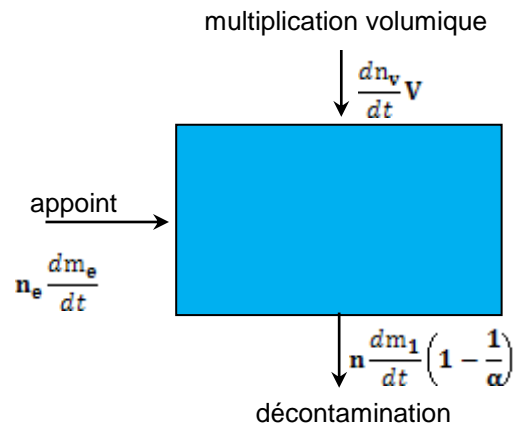


Figure 41 : Schéma simplifié du bilan biologique de la TAR avec décontamination.

Le bilan à l'état stationnaire s'écrit alors :

$$\frac{dn_v}{dt} V + n_e \frac{dm_e}{dt} = n \frac{dm_1}{dt} \left(1 - \frac{1}{\alpha}\right)$$

Soit

$$nV + n_e \frac{dm_e}{dt} = n \frac{dm_1}{dt} \left(1 - \frac{1}{\alpha}\right)$$

Il en est déduit :

$$n = \frac{n_e \frac{dm_e}{dt}}{\frac{dm_1}{dt} \left(1 - \frac{1}{\alpha}\right) - \frac{V}{\tau}}$$

n étant la population de microorganismes dans la TAR à l'état stationnaire. Si $\frac{dm_1}{dt} = 0$ (correspondant à une absence de décontamination), n est négatif. Cette solution non-physique provient en effet du fait que l'équation ci-dessous correspond à un état stationnaire induit par la décontamination.

Une autre manière de présenter le résultat est d'exprimer le facteur d'abattement α nécessaire pour avoir une densité d'organismes n donnée.

$$\alpha = \frac{1}{1 - \frac{V}{\tau} - \frac{n_e}{n} \frac{dm_e}{dt} \frac{dt}{dm_1}}$$

Il en est déduit que :

si la croissance volumique est nulle ($\tau = \infty$) et si l'appoint n'apporte pas de microorganismes ($n_e = 0$) alors la décontamination n'est pas nécessaire ($\alpha = 1$).



Le débit $\frac{dm_0}{dt}$ de la TAR n'intervient pas, seul son volume V est important.

Approximation 10 : afin de simplifier, il est maintenant supposé que le débit de microorganismes dans l'appoint est négligeable comparé à la multiplication volumique.

Il en est déduit :

$$\alpha = \frac{1}{1 - \frac{\tau}{\frac{dm_1}{dt}}}$$

Deux remarques importantes peuvent donc être soumises :

- α est indépendant de n , i.e. « le nombre de \log_{10} ne dépend pas de la densité souhaitée ». Il s'agit du cas où un taux « se bat » contre un autre taux et il n'y a pas de situation d'équilibre : soit le taux de décontamination est inférieur au taux de multiplication et il y a saturation en microorganismes, soit il est supérieur et il y a disparition totale des microorganismes. En relaxant les approximations, notamment les approximations 8, 9 et 10, un petit niveau d'équilibre serait atteint. La simulation complète de la TAR doit être effectuée pour aboutir au (faible) niveau d'équilibre final.

- Un débit minimum de bypass apparaît : $\frac{dm_{min}}{dt} = \frac{V}{\tau}$. En effet, si $\frac{dm_1}{dt} < \frac{dm_{min}}{dt}$, α est négatif, ce qui signifie que le problème n'a pas de solution (la croissance est constante).

L'équation s'écrit alors :

$$\alpha = \frac{1}{1 - \frac{\frac{dm_{min}}{dt}}{\frac{dm_1}{dt}}}$$

L'explication de ce débit minimum est la suivante :

Remarquons tout d'abord une propriété de l'exponentielle, illustrée sur la *Figure 42*. Si le temps caractéristique est τ , et si la croissance a lieu pendant ce temps τ la densité augmentera d'un facteur 2,81.

A l'origine, la vitesse de croissance était plus faible, et laissait croire (en prenant la tangente) que la densité allait seulement doubler en τ . C'est cette vitesse de croissance « initiale », ou instantanée, que le dispositif de décontamination doit contrer.

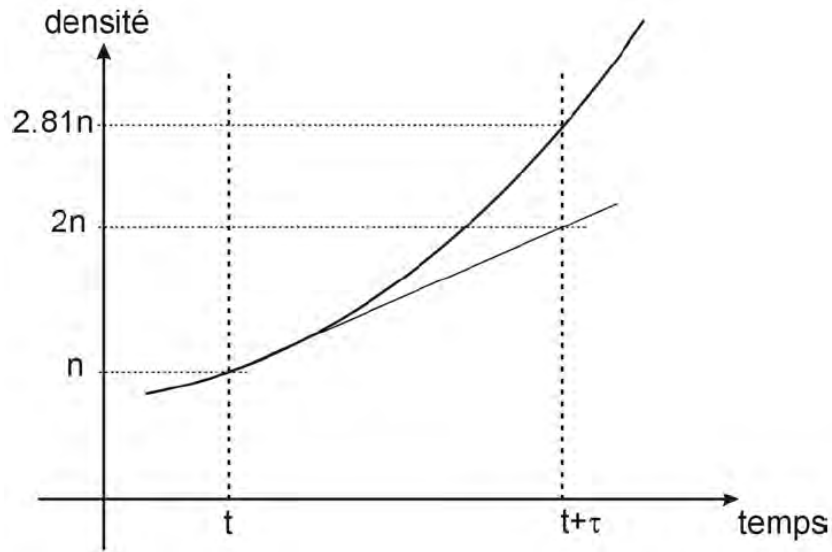


Figure 42 : Propriété d'une courbe exponentielle.

Reprenons maintenant le raisonnement : si le temps de multiplication par 2 de la densité de microorganismes dans la TAR est τ , cela signifie que l'équivalent en microorganismes du volume de la TAR à densité n est ajouté à la TAR dans le temps τ . Ceci veut dire que pour empêcher cette augmentation, il faut détruire l'équivalent en microorganismes d'un volume d'eau correspondant au volume total de TAR à densité n dans le temps τ .

Or, au mieux ($\alpha = \infty$), tous les microorganismes (densité n) du débit $\frac{dm_1}{dt}$ sont détruits, ainsi il faut traiter 1 volume d'eau de TAR en τ , soit un débit V/τ . Dans tous les autres cas où la décontamination du débit $\frac{dm_1}{dt}$ n'est pas complète ($\alpha \neq \infty$) alors il faudra traiter un débit supérieur à V/τ . D'où le débit minimum $\frac{dm_{min}}{dt} = \frac{V}{\tau}$.

Avec $V=1,3 \text{ m}^3$, suivant les valeurs de τ on a les valeurs de $\frac{dm_{min}}{dt}$ du Tableau 7.

Tableau 7 : Valeurs du débit minimum de traitement en fonction du temps de doublement des organismes.

τ	$\frac{dm_{min}}{dt}$
4h	90 ml/s
12h	30 ml/s
24h	15 ml/s
72h-3j	5 ml/s
6j	2.5 ml/s

Une autre manière de présenter le résultat, peut-être plus utile dans l'étude en cours, est d'exprimer le débit de by-pass nécessaire en fonction du facteur d'abattement obtenu avec le dispositif.



$$\frac{\frac{dm_1}{dt}}{\frac{dm_{min}}{dt}} = \frac{1}{1 - \frac{1}{\alpha}}$$

Équation 12 : Expression du débit du by-pass nécessaire en fonction du facteur d'abattement obtenu avec le dispositif.

$\frac{dm_1}{dt}(\alpha)$ peut être tracé pour les valeurs de τ du *Tableau 7*. La famille de courbes est présentée sur la *Figure 43*.

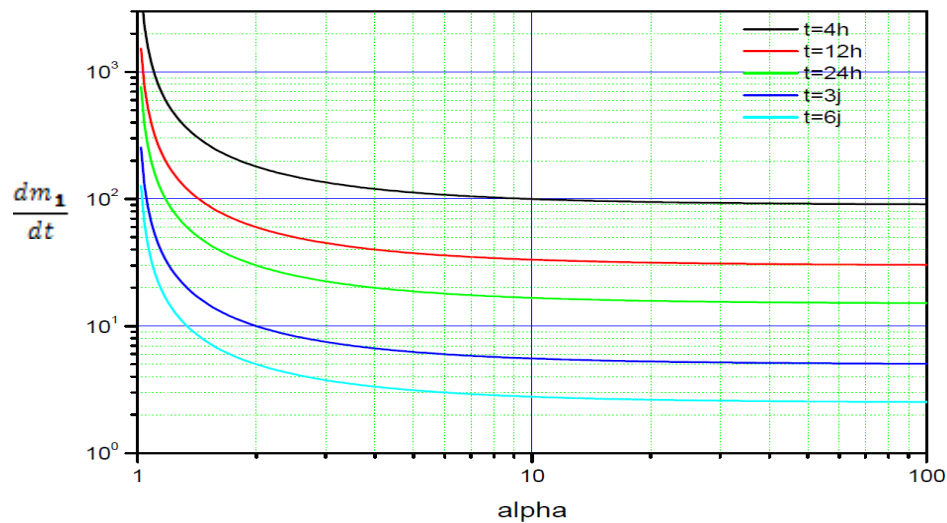


Figure 43 : Débit de by-pass en fonction du facteur d'abattement, pour plusieurs temps caractéristiques de croissance.

Il est constaté tout d'abord que la décontamination de la TAR peut s'effectuer à n'importe quel facteur d'abattement α , il suffit d'ajuster le débit de by-pass à la bonne valeur.

Ainsi, α n'a que peu d'influence sur le débit de by-pass à une valeur supérieure à 10.

Ainsi :

- augmenter α à une valeur supérieure à 2 ne permettra de gagner au maximum qu'un facteur 2 sur le débit de by-pass.
- augmenter α à une valeur supérieure à 10 ne permettra de gagner au maximum que 10% sur le débit de by-pass.

Il est donc fort probable qu'un facteur de décontamination inférieur à 1 \log_{10} sera utilisé dans le dispositif de décontamination final. Afin de déterminer le meilleur compromis, les contraintes du générateur et de l'applicateur doivent être prises en compte.

V.2.4. Contraintes du générateur et de l'applicateur

Le générateur et l'applicateur sont considérés comme fournissant des impulsions de champ électrique fixé, i.e. le champ est uniforme dans le temps et dans l'espace. Ce qui signifie que les électrodes utilisées sont planes, face à face et que les impulsions sont « carrées » (à champ constant).



Approximation 11 : une impulsion occasionne un facteur de décontamination défini, α_0 . Ainsi le facteur d'abattement obtenu dépend uniquement du nombre k d'impulsions appliquées à un volume donné (l'effet de la fréquence de répétition est ici ignoré, s'il existe) et $\alpha = \alpha_0^k$.

Il faut minimiser la puissance du générateur électrique. Pour une conductivité électrique σ et une largeur d'impulsion t_i l'énergie déposée par impulsion est $e = t_i \sigma E^2$. Cette énergie est fixe, donnée par les paramètres d'entrée.

L'énergie volumique déposée par k impulsions est ke . Pour le débit de by-pass $\frac{d\mathbf{m}_1}{dt}$ la puissance électrique dépensée obtenue est :

$$P_{el} = \frac{d\mathbf{m}_1}{dt} ke$$

V.2.4.1 Etude sur le facteur d'abattement α

Puisque $\alpha = \alpha_0^k$ on en déduit $k = \frac{\ln \alpha}{\ln \alpha_0}$ et

Équation 13 : Puissance électrique liée à α

$$P_{el} = \frac{d\mathbf{m}_1}{dt} \frac{\ln \alpha}{\ln \alpha_0} e$$

En utilisant l'équation 1 liant $\frac{d\mathbf{m}_1}{dt}$ à α , le problème se réduit à une optimisation de α .

$$P(\alpha) = \frac{e \frac{d\mathbf{m}_{min}}{dt} \ln \alpha}{\ln \alpha_0 \left(1 - \frac{1}{\alpha}\right)} \quad (\text{le premier terme est constant})$$

Cette fonction est tracée sur la *Figure 44*. C'est une fonction continuellement croissante : il faut donc minimiser α (et donc maximiser le débit du by-pass). Par exemple pour $\alpha=5$ deux fois plus de puissance que l'optimum est dépensée, et pour $\alpha=2$ encore 40% de puissance de plus que l'optimum est dépensée.

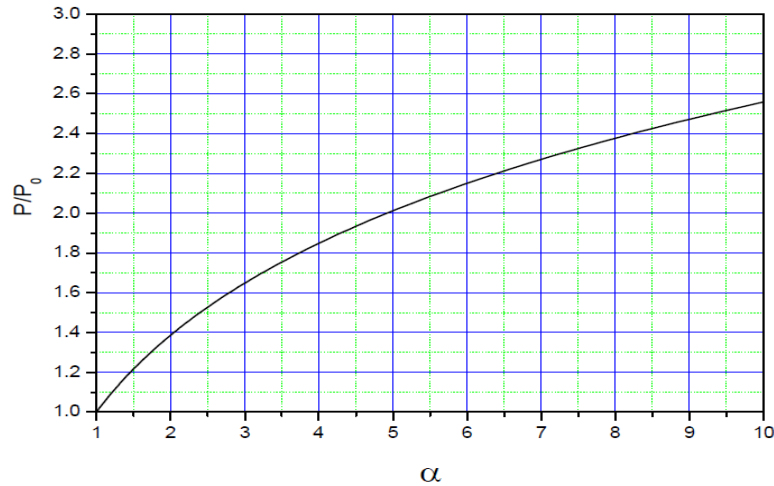


Figure 44 : Puissance électrique en fonction du facteur d'abattement du bypass.

Le minimum de α qu'il est possible d'obtenir est évidemment α_0 : une seule impulsion est appliquée au volume qui traverse le dispositif de décontamination.

Ce résultat surprenant (« α doit être le plus proche de 1 possible ») a une explication très simple. Dans la TAR à densité n , le but est d'obtenir un certain nombre de microorganismes tué par seconde afin de contrer la multiplication volumique. Chaque volume v_0 d'eau traitée passant dans le dispositif de décontamination reçoit un nombre k d'impulsions dans un train d'impulsions, chacune éliminant une fraction $(1-1/\alpha_0)$ de la population en microorganismes dans le volume, soit un nombre $(1-1/\alpha_0) v_0 n$. C'est la première impulsion du train d'impulsions qui tuera le plus d'organismes, car le nombre d'impulsions appliquées augmentant, le nombre de microorganismes n dans le volume diminuera, et à chaque impulsion $(1-1/\alpha_0) v_0 n$. De plus, chaque impulsion consomme la même énergie électrique, donc la première impulsion est la plus énergétiquement efficace. Par exemple, si la décontamination est de 1 \log_{10} en un seul train d'impulsions, la dernière impulsion sera 10 fois moins efficace énergétiquement que la première.

Lorsque n devient faible, le nombre $(1-1/\alpha_0) v_0 n$ de microorganismes tués par une impulsion peut être inférieur à 1. Cela pourrait signifier qu'aucun organisme ne sera tué dans le volume par l'impulsion. En réalité, il s'agit d'un phénomène probabiliste ; parfois aucun ne sera tué, et d'autres fois plusieurs seront tués, de sorte que la probabilité globale sera respectée et correspondra bien, en moyenne, à moins d'un microorganisme tué par impulsion.

Prenons un exemple numérique. Si $\alpha=10$ pour $k=500$ (résultats avec générateur G0 sur *E. coli*).

$\alpha_0 = \alpha^{\frac{1}{k}} = 1,00462$ et signifie qu'une impulsion tue une fraction $(1-1/\alpha_0)=4.6 \times 10^{-3}$ (0.46% de décontamination), soit $\sim 1/217$ du nombre $n v_0$ d'organismes dans le volume. Donc si ce nombre est inférieur à 217, alors le nombre moyen tué est inférieur à 1.

V.2.4.2 Etude sur le nombre d'impulsions k :

Une autre manière (peut-être plus claire) d'effectuer l'analyse de la puissance électrique est de raisonner sur k .



Afin d'avoir une expression explicite entre P_{el} et $\frac{d\mathbf{m}_1}{dt}$, nous allons utiliser le fait que $\alpha_0=1+\varepsilon$ avec $\varepsilon \ll 1$, ce qui conduira à l'approximation $\alpha = \alpha_0^k = (1 + \varepsilon)^k \approx 1 + k\varepsilon$ (notons que pour les très grands $k > 100$ cette approximation fait perdre en précision avec nos valeurs de ε).

$$\frac{d\mathbf{m}_1}{dt} = \frac{\frac{d\mathbf{m}_{min}}{dt}}{1 - \frac{1}{\alpha}} \approx \frac{\frac{d\mathbf{m}_{min}}{dt}}{1 - \frac{1}{1+k\varepsilon}}$$

$$\frac{d\mathbf{m}_1}{dt} \approx \frac{(1+k\varepsilon)\frac{d\mathbf{m}_{min}}{dt}}{k\varepsilon}$$

$$P_{el} = \frac{d\mathbf{m}_1}{dt} k\varepsilon$$

soit

$$P_{el} = (1+k\varepsilon) \frac{e \frac{d\mathbf{m}_{min}}{dt}}{\varepsilon} \approx \alpha \frac{e \frac{d\mathbf{m}_{min}}{dt}}{\varepsilon}$$

La puissance limite est $P_0 = \frac{e \frac{d\mathbf{m}_{min}}{dt}}{\varepsilon}$ et $P_{el} = (1+k\varepsilon)P_0$

Il en est déduit la relation, très utile, entre P_{el} et $\frac{d\mathbf{m}_1}{dt}$, en remplaçant k (ou plus exactement $1+k\varepsilon$) :

$$\frac{d\mathbf{m}_1}{dt} \approx \frac{\frac{d\mathbf{m}_{min}}{dt}}{1 - \frac{1}{1+k\varepsilon}} \approx \frac{\frac{d\mathbf{m}_{min}}{dt}}{1 - \frac{1}{P_{el} / \left(\frac{e \frac{d\mathbf{m}_{min}}{dt}}{\varepsilon} \right)}}$$

$$\frac{d\mathbf{m}_1}{dt} \approx \frac{\frac{d\mathbf{m}_{min}}{dt}}{1 - \frac{e \frac{d\mathbf{m}_{min}}{dt}}{\varepsilon P_{el}}} = \frac{\frac{d\mathbf{m}_{min}}{dt}}{1 - \frac{P_0}{P_{el}}}$$

(Attention : il y a $\frac{d\mathbf{m}_{min}}{dt}$ dans P_0).

Il faut noter ici que dans cette équation P_{el} ne peut pas prendre toutes les valeurs possibles, en particulier P_{el} ne peut pas valoir P_0 (ce qui évite une divergence). En effet $P_{el} = (1+k\varepsilon)P_0$ et comme au minimum il y a une impulsion ($k=1$), $P_{min} = (1+\varepsilon)P_0 \approx P_0$.

Cela limite la valeur de $\frac{d\mathbf{m}_1}{dt}$ et ainsi :

$$\frac{d\mathbf{m}_{max}}{dt} \approx \frac{\frac{d\mathbf{m}_{min}}{dt}}{\varepsilon} = \frac{P_0}{e}$$

Prenons les chiffres du générateur G0 sur *E. coli* (qui sera utilisé dans ce travail) :

$$\varepsilon = 4.6 \times 10^{-3}$$

$$e = t_i \sigma E^2$$



Le champ électrique est 100 kV/cm (20 kV sur 2 mm), la conductivité 2500 $\mu\text{S/cm}=0,25 \text{ S/m}$ (valeur max, qui donne une borne supérieure de puissance), et la durée d'impulsion $t_i=60 \text{ ns}$, il en est déduit l'énergie volumique par impulsion $e = t_i \sigma E^2 = 1,5 \text{ MJ/m}^3$.

Avec les valeurs de $\frac{dm_{min}}{dt}$ selon le *Tableau 7* on en déduit les valeurs de P_0 et $\max(\frac{dm_1}{dt})$ dans le *Tableau 8*.

Il s'avère que les débits max sont tous supérieurs au débit de la TAR (3 litre/s), ce qui est irréalisable, donc il ne sera pas possible de se trouver strictement à la puissance minimum. Un compromis puissance-débit doit être trouvé.

Tableau 8 : Valeurs minimum de la puissance électrique et maximum du débit de by-pass (toutes les deux obtenues pour 1 impulsion par volume dans le by-pass) pour le générateur G0 sur E. coli et pour différents temps de multiplication dans la TAR.

τ	$\frac{dm_{min}}{dt}$	$P_{min} \sim P_0$	$\frac{dm_{max}}{dt}$
4h	90 ml/s	29,3 kW	19,5 L/s
12h	30 ml/s	9,8 kW	6,5 L/s
24h	15 ml/s	4,9 kW	3,3 L/s
3j	5 ml/s	1,6 kW	1,1 L/s
6j	2,5 ml/s	815 W	0,5 L/s

Il est possible de tracer (*Figure 45*) la famille de courbes $\frac{dm_1}{dt}(P_{el})$ paramétrée par $\frac{dm_0}{dt}$ selon le *Tableau 7* et limitée par le point à 1 impulsion/volume.

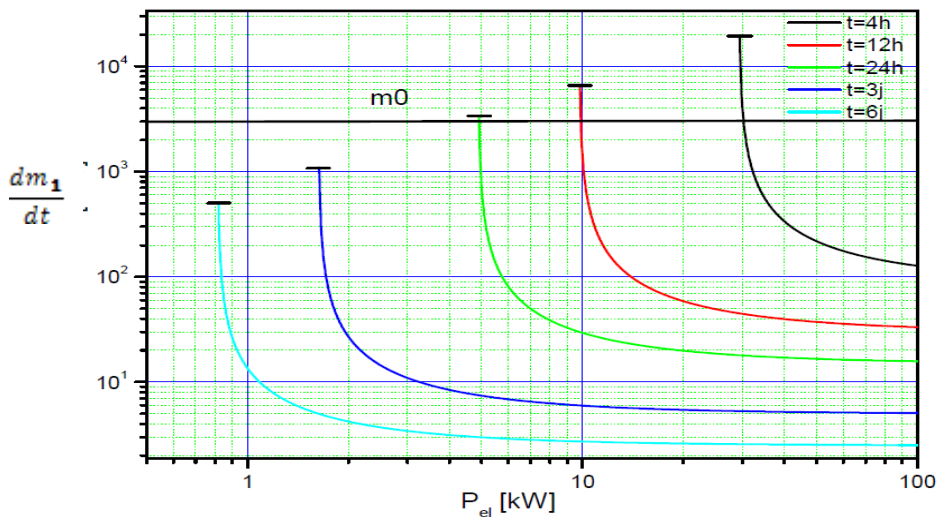


Figure 45 : Débit de by-pass en fonction de la puissance électrique pour le générateur G0 sur E. coli, paramétré par le temps de multiplication dans la TAR. Le débit de la TAR $\frac{dm_0}{dt} = 3 \frac{L}{s}$ est indiqué, ainsi que les points limites pour 1 impulsion/volume.

A partir du point d'optimum, une augmentation raisonnable de la puissance conduit à un débit faisable. Par exemple, pour $\tau=3$ jours, en passant de 1,6 kW à 2 kW le débit passe de 1 L/s à 26 mL/s.



Il semblerait intéressant de placer les courbes à iso-k sur ce graphique. Comme $P_{el} = \frac{dm_1}{dt} ke$, $\frac{dm_1}{dt} = \frac{P_{el}}{ke}$ qui est une famille de droites paramétrées par k. Chacune de ces droites correspond à un nombre d'impulsions k appliquées à un volume d'eau dans le by-pass, à un facteur de décontamination de $\alpha = \alpha_0^k$ et à une fraction de décontamination $f = 1 - \frac{1}{\alpha}$. Elles correspondent aussi à une température donnée T₁ de sortie du système de décontamination (Figure 2) puisqu'on écrit :

$$T_1 - T_0 = \Delta T_1 = \frac{P_{el}}{c_p \frac{dm_1}{dt}} = \frac{ke}{c_p}$$

La Figure 46 reproduit la Figure 45 avec ces droites iso-k.

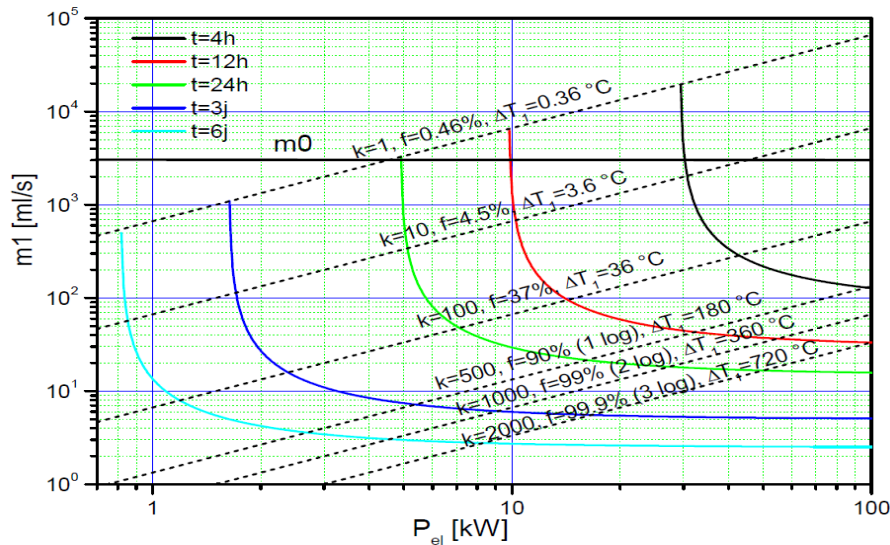


Figure 46 : Débit de by-pass en fonction de la puissance électrique pour le générateur G0 sur E. coli, paramétré par le temps de multiplication dans la TAR. Le débit de la TAR $\frac{dm_0}{dt} = 3$ L/s est indiqué, ainsi que les droites correspondant à un nombre d'impulsions k, un facteur de décontamination f et un échauffement ΔT_1 donnés.

Un abattement d'environ 1/3 pour environ 100 impulsions est un bon compromis débit/puissance dans tous les cas. Pour les faibles vitesses de multiplication ($\tau=12$ h ou 24 h), il serait même possible d'utiliser une fraction d'abattement de 4,5 % avec 10 impulsions.

Cependant, les puissances requises sont très (trop) importantes. Et pour les cas élevés, les températures sont impossibles à obtenir (>100 °C).

Notons que les courbes paramétrées par τ ont utilisé l'approximation $\alpha \approx 1 + k\epsilon$ qui n'est plus très précise au-delà de $k>100$. Sans cette approximation les expressions sont implicites, mais pourraient se résoudre numériquement pour obtenir un jeu exact de courbes.

Et bien évidemment, ces résultats sont intimement liés à toutes les approximations, notamment l'Approx11 : s'il existe un effet de rémanence (i.e. effet de la fréquence de répétition, ou effet cumulatif) alors ces résultats peuvent être caduques. Des sections ultérieures traiteront :

- de l'effet de $\frac{dm_1}{dt}$ et k sur la conception de l'applicateur et du générateur.
- de la cinétique de décontamination : temps pour décontaminer une TAR initialement contaminée, effet du biofilm.

En résumé (formulaire):



1 - Pour une TAR de volume V et de temps de croissance τ , dans laquelle un abattement α est obtenu dans un débit prélevé $\frac{d\mathbf{m}_1}{dt}$:

$$\frac{d\mathbf{m}_1}{dt} = \frac{V}{\tau}$$

$$f = 1 - \frac{1}{\alpha}$$

$$\frac{\frac{d\mathbf{m}_1}{dt}}{\frac{d\mathbf{m}_{min}}{dt}} = \frac{1}{f}$$

2 - Avec un générateur appliquant k impulsions dans une eau de conductivité σ , chaque impulsion étant de champ électrique E et largeur t_i :

$$e = t_i \sigma E^2$$

$$P_{el} = \frac{d\mathbf{m}_1}{dt} k e$$

$$\Delta T_1 = \frac{k e}{c_p}$$

3 - Si chaque impulsion a un facteur d'abattement α_0 :

$$\alpha = \alpha_0^k, \quad k = \frac{\ln \alpha}{\ln \alpha_0}$$

$$P_{el}(\alpha) = \frac{e \frac{d\mathbf{m}_{min}}{dt} \ln \alpha}{\ln \alpha_0 \left(1 - \frac{1}{\alpha}\right)}$$

4 - Et si on approxime $\alpha = \alpha_0^k = (1 + \varepsilon) \approx 1 + k\varepsilon$ ($k < 100$):

$$f \approx k\varepsilon$$

$$P_0 = \frac{e \frac{d\mathbf{m}_{min}}{dt}}{\varepsilon}$$

$$P_{min} = (1 + \varepsilon)P_0 \approx P_0$$

$$\frac{d\mathbf{m}_1}{dt} \approx \frac{\varepsilon}{e} \frac{P_0}{1 - \frac{P_0}{P_{el}}} = \frac{\frac{d\mathbf{m}_{min}}{dt}}{1 - \frac{P_0}{P_{el}}}$$

$$\frac{d\mathbf{m}_{max}}{dt} = \frac{d\mathbf{m}_1}{dt} (P_{min} \square) \approx \frac{P_0}{e}$$



V.2.5. Application à une « mini-TAR » :

Considérons ici une expérience de laboratoire sur *E. coli* à 2500 $\mu\text{S}/\text{cm}$. Soit un volume total circulant de 20 ml, et un générateur (G0) utilisé à 1 Hz sur un applicateur dont la taille est 1 cm x 1 cm x 2 mm = 0,2 ml, et la résistance est 80 ohm.

$e=1,5 \text{ MJ}/\text{m}^3$, $\varepsilon =4,6 \times 10^{-3}$ (1 \log_{10} en 500 impulsions)

Comme 1 impulsion est générée par seconde, la puissance déposée de 0,3 W.

Le débit ($\frac{dm_1}{dt}$) est variable.

Il est possible de recalculer le *Tableau 8* pour plusieurs temps de multiplication :

τ	$\frac{dm_{min}}{dt}$	$P_{min} \sim P_0$	$\frac{dm_{max}}{dt}$
1h	5,5 $\mu\text{L}/\text{s}$	1,80 W	1,2 mL/s
4h	1,4 $\mu\text{L}/\text{s}$	0,45 W	0,3 mL/s
12h	0,46 $\mu\text{L}/\text{s}$	0,15 W	0,1 mL/s

Du fait de la puissance limitée, l'expérience ne pourra fonctionner que pour des temps de multiplication supérieurs à 6 h.

La *Figure 46* montre le débit en fonction de la puissance. Les points accessibles à 1 Hz sont sur la droite verticale. Pour un temps de croissance donné, i.e. une courbe donnée, les points pour lesquels la TAR devient totalement décontaminée à l'état stationnaire se situent au-dessus de la courbe. Par exemple, en partant du point 0,3 W, 1 $\mu\text{L}/\text{s}$:

- Si la puissance augmente (augmentation de la fréquence du générateur), le point se déplace vers la droite au-dessus de la courbe, et effectivement la décontamination est plus grande.
- Si le débit augmente, le point se déplace au-dessus de la courbe, et là aussi la décontamination est plus grande. En effet, il y a moins d'impulsions par volume, et ces impulsions sont plus efficaces, donc à puissance constante la décontamination sera plus grande.

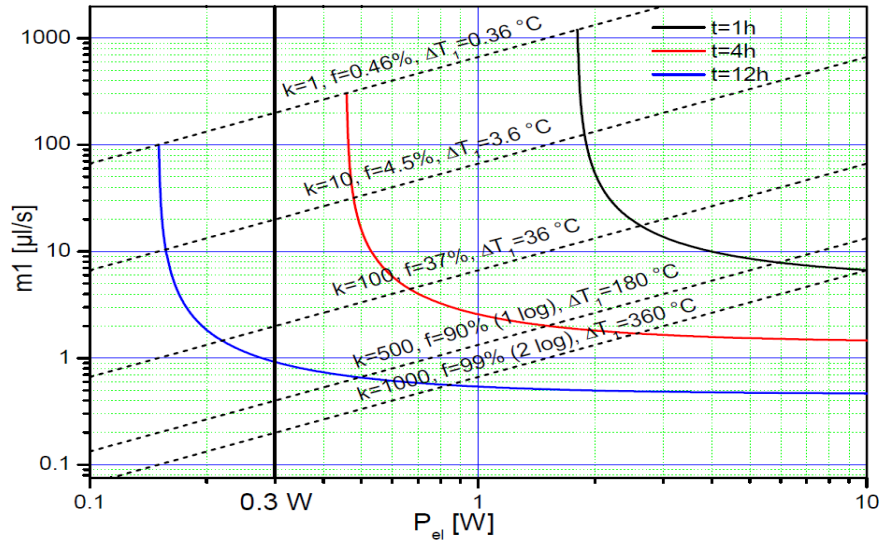


Figure 47 : Débit de la mini-TAR en fonction de la puissance pour un volume total de 20 mL, le générateur G0 et plusieurs temps de croissance. Le trait vertical montre les points accessibles au générateur à 1 Hz (0,3 W).

V.2.6. Application et impulsions :

Nous considérons que le générateur et l'applicateur fournissent des impulsions de champ électrique transverse fixées, i.e. le champ est uniforme dans le temps et dans l'espace. Ce qui signifie que des impulsions carrées et des électrodes planes en regard sont utilisées. Le débit dans la by-pass est $\frac{dm_1}{dt}$.

Soit une unité de décontamination constituée de deux électrodes, de largeur a, longueur b et gap c :
Soit les contraintes géométriques suivantes :

- le gap c vaut 2 mm. En effet il faut limiter les pertes de charge et le colmatage en augmentant c au maximum, mais les limitations de tension des générateurs imposent $c \leq 2mm$.
- La largeur a vaut 10 mm : c'est un ordre de grandeur. Il faut maximiser a pour diminuer les pertes de charge, mais cela doit rester en relation avec les diamètres de tuyauterie de la TAR.

Plusieurs paramètres pour n unités en parallèles sont calculés :

- la surface en regard est : $S=nab$
- la section de passage est $A=nac$
- la capacitance $C = 81\epsilon_0 \frac{S}{c}$ où ϵ_0 est la constante diélectrique du vide = 8.85×10^{-12} SI.
- La vitesse moyenne est $v = \frac{\frac{dm_1}{dt}}{A} = \frac{\frac{dm_1}{dt}}{nac}$
- La fréquence de résidence est $f = \frac{v}{b} = \frac{\frac{dm_1}{dt}}{nabc}$ (= 1/temps de résidence)



Les paramètres de contrainte du générateur :

- La fréquence des impulsions est $f_p = kf = \frac{k \frac{dm_1}{dt}}{nabc}$ où k est le nombre d'impulsions par volume.

- La résistance $R = \frac{C}{S\sigma} = \frac{C}{nab\sigma}$ où σ est la conductivité en S/m.

- Pour un générateur à impédance fixée égale à la résistance du système (technologie à ligne à transmission), le temps de montée du système est :

$$t_c = RC = \frac{c}{S\sigma} 81\epsilon_0 \frac{S}{c} = \frac{81\epsilon_0}{\sigma}$$

indépendant des unités, seulement de la conductivité de l'eau.

Les paramètres de contraintes globaux sont :

- La perte de charge (chute de pression)

$$\Delta P \propto \frac{bv^2}{c} = \frac{b}{c} \frac{dm_1^2}{dt} = \frac{b}{c^3(na)^2} \frac{dm_1^2}{dt}$$

(Equation de Darcy-Weisbach)

V.3. COMPARAISON DES DEUX MODELES

Le modèle mathématique B (ONERA) utilise une approche différente du modèle A basé sur l'Équation 8 et présenté dans la Partie IV -V.1. Son principe propose de fixer les performances du générateur de façon à détruire exactement autant de bactéries que n'en produisent leurs croissances. Ainsi, la concentration en bactéries reste constante et ne peut jamais dépasser les valeurs autorisées. Un programme dénommé « calculateur » est réalisé dans le but d'obtenir facilement et rapidement des résultats de l'évolution théorique de la concentration en bactérie dans différentes conditions, à partir de l'Équation 8. Il permet ainsi de tester la nouvelle approche proposée par l'ONERA avec cette équation.

Les variables de débit, d'efficacité d'abattement par passage dans la boucle de décontamination, de volume total et de taux de croissance sont intégrées en tant que données d'entrée dans le calculateur. Les courbes sont ainsi tracées :

- En rouge, la courbe de croissance exponentielle théorique sans modélisation de la phase plateau, et en conditions « sans traitement ».
- En vert, la courbe de croissance exponentielle théorique avec plateau, en conditions « sans traitement ».
- En bleu foncé, la courbe de croissance exponentielle théorique avec plateau et en traitement continu.
- En violet, la courbe de croissance exponentielle théorique avec plateau et avec un traitement en fonctionnement intermittent.



- La droite bleu clair représente la limite imposée par les normes de sécurité microbiologique dans les TAR.

Conversion des unités d'un modèle à l'autre :

Pour un doublement en T h, un accroissement par minute de $2 \cdot n_0 = n_0 e^{\mu T} \Leftrightarrow \mu = \frac{\ln 2}{T \times 60}$
 $1 \text{ cm}^3/\text{s} = 0,06 \text{ L}/\text{min}$

La notation [bactérie] doit se lire « concentration en bactéries ».

Pour toutes les modélisations, la [bactérie]_{initiale} est fixée à 1000 bactéries/L et le plateau est fixé à 10^7 bactéries/L de façon arbitraire, ces valeurs n'intervenant pas dans la variation de la décontamination du système. En effet, en échelle logarithmique, la pente de la courbe de décontamination reste identique quel que soit la concentration.

Le volume d'eau de la TAR est fixé à 1300 L dans les deux modèles.

Les temps de fonctionnement et d'arrêt en mode intermittent sont fixés à 600 min, soit 10 h.

1) Selon le modèle mathématique B (ONERA), pour un doublement de population en 24 h (soit $\mu = 0,00048135$), avec un débit de $14 \text{ cm}^3/\text{s}$ ($0,84 \text{ L}/\text{min}$), et une efficacité intrinsèque de 37%, la concentration bactérienne est à l'équilibre. Cela suppose une croissance régulière de la concentration en bactéries.

Le calculateur paramétré avec ces valeurs, donne les courbes présentées ci-dessous :

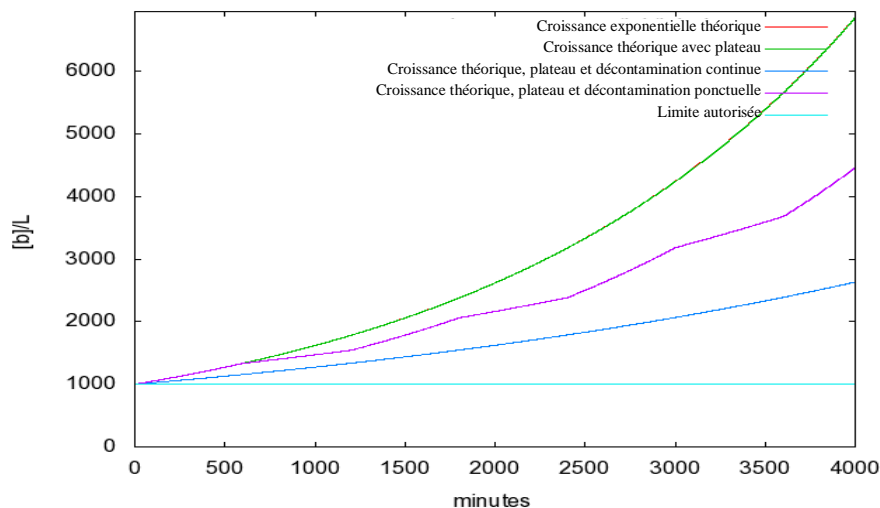


Figure 48: Courbes tracées par le calculateur avec un temps de doublement de 24 h, une efficacité intrinsèque de 37% et un débit de $0,84 \text{ L}/\text{min}$.

Les courbes de couleur rouge et verte sont superposées (car l'influence du plateau se fait sentir uniquement sur des temps beaucoup plus longs).

La courbe représentant l'évolution de la concentration pour un traitement en continu (courbe bleue) est croissante, mais très faiblement (temps de doublement en 3000 min soit 50 h). Cela signifie que



le débit de traitement est légèrement insuffisant pour maintenir la concentration constante (c'est-à-dire pour lutter contre la vitesse de croissance des bactéries).

Pour obtenir une croissance nulle dans ces conditions, il faudrait un débit de 1,689 L/min :

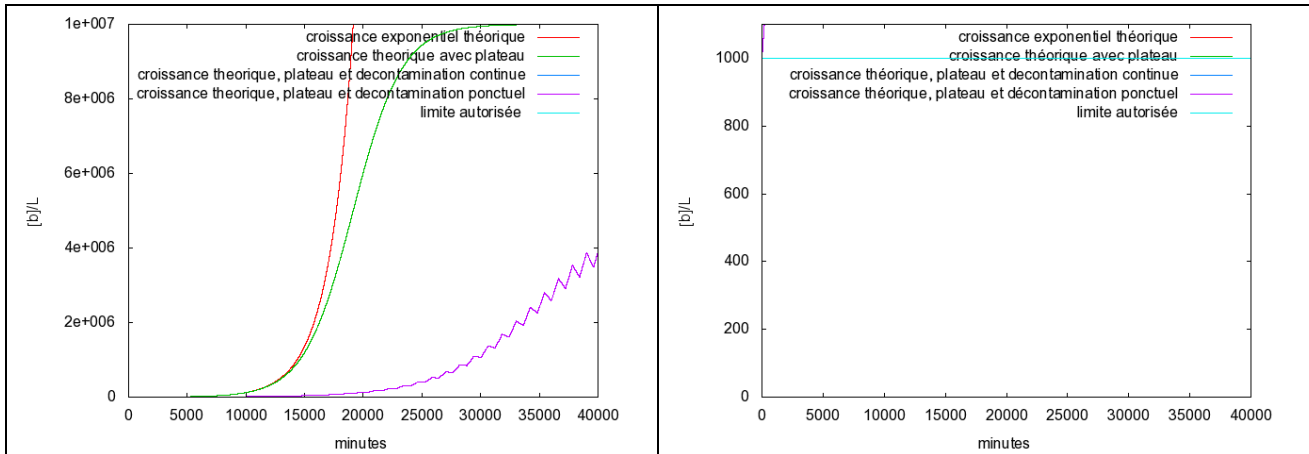


Figure 49: Courbes tracées par le calculateur avec un temps de doublement de 24h une efficacité intrinsèque de 37% et un débit de 1,689 L/min. Les courbes bleu foncé et bleu clair sont superposées.

Les courbes bleu foncé et bleu clair sont superposées. La courbe représentant la ‘décontamination continue’ (courbe bleu foncé) est confondue avec la courbe représentant la ‘limite autorisée’ (courbe bleu clair) (Figure 49) ; et ce, même après 40 000 min de fonctionnement. Les deux courbes sans décontamination croissent rapidement. Le fonctionnement en intermittence limite la croissance mais ne la stoppe pas.

En changeant la $[bactérie]_{initiale}$ Figure 50, le même comportement est observé par rapport à la Figure 49 et confirme que la concentration bactérienne initiale n’intervient pas dans l’évolution de la décontamination :

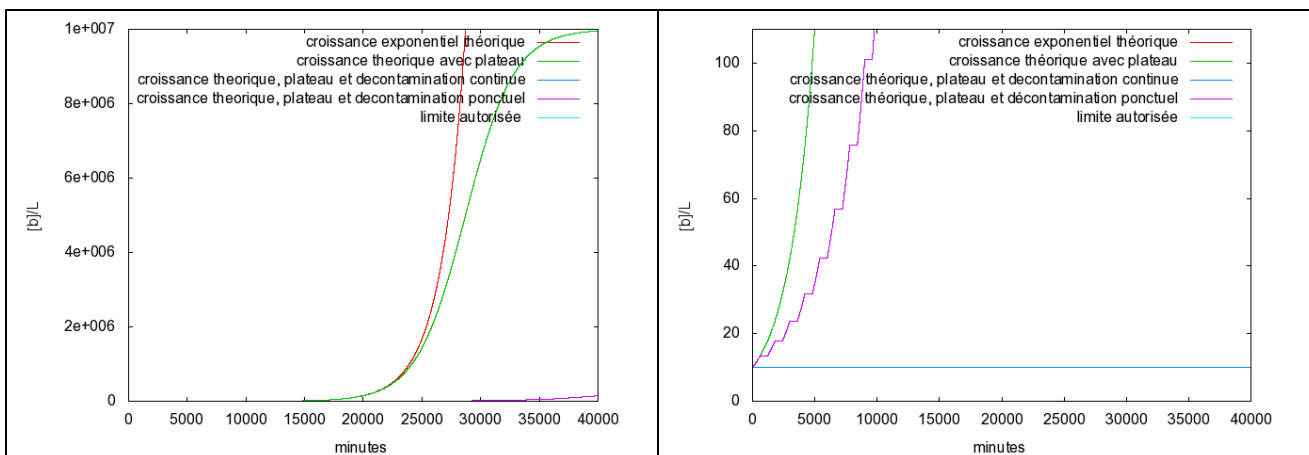


Figure 50: Tracés des courbes par le calculateur avec $[bactérie]_{initiale}$ réduite (100 fois plus faible).



2) Selon le modèle mathématique B (ONERA), pour un doublement de population en 24 h correspondant à $\mu = 0,00048135$, avec un débit de $11 \text{ cm}^3/\text{s}$ ($0,66 \text{ L}/\text{min}$), et une efficacité intrinsèque de 90%, un équilibre est obtenu.

Les courbes obtenues par le calculateur avec ces valeurs sont représentées au niveau des *Figure 51*.

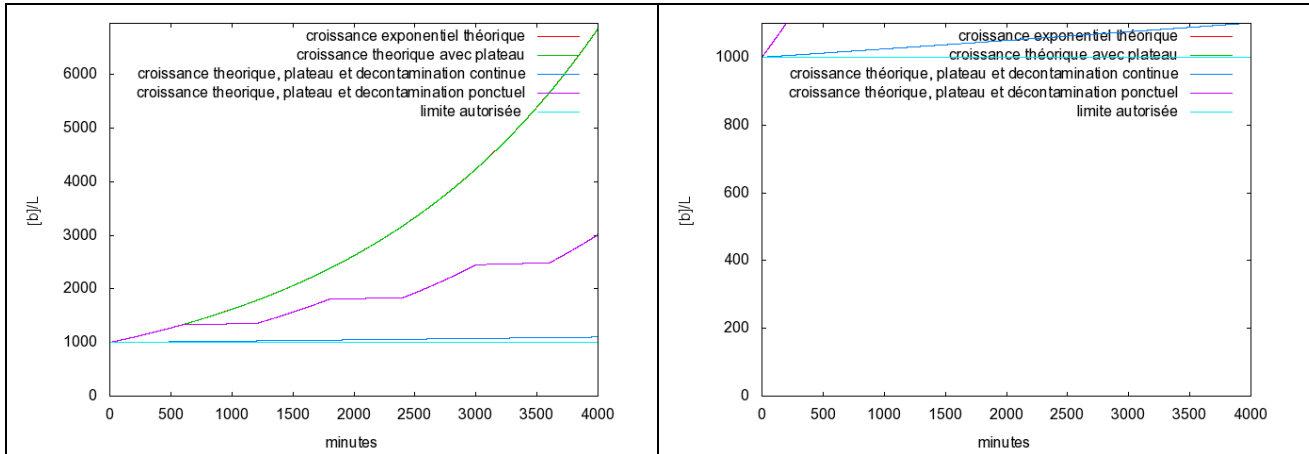


Figure 51: Courbes tracées par le calculateur avec les valeurs utilisées dans les calculs de l'ONERA.

La même observation que précédemment peut être faite, à savoir que l'augmentation de la concentration en bactérie est fortement diminuée par le traitement ; mais l'augmentation de la concentration due à la croissance bactérienne n'est pas totalement compensée par la destruction des bactéries due au traitement.

Pour être à l'équilibre, il faut atteindre un débit de $0,69485 \text{ L}/\text{min}$, comme le montre la *Figure 52*.

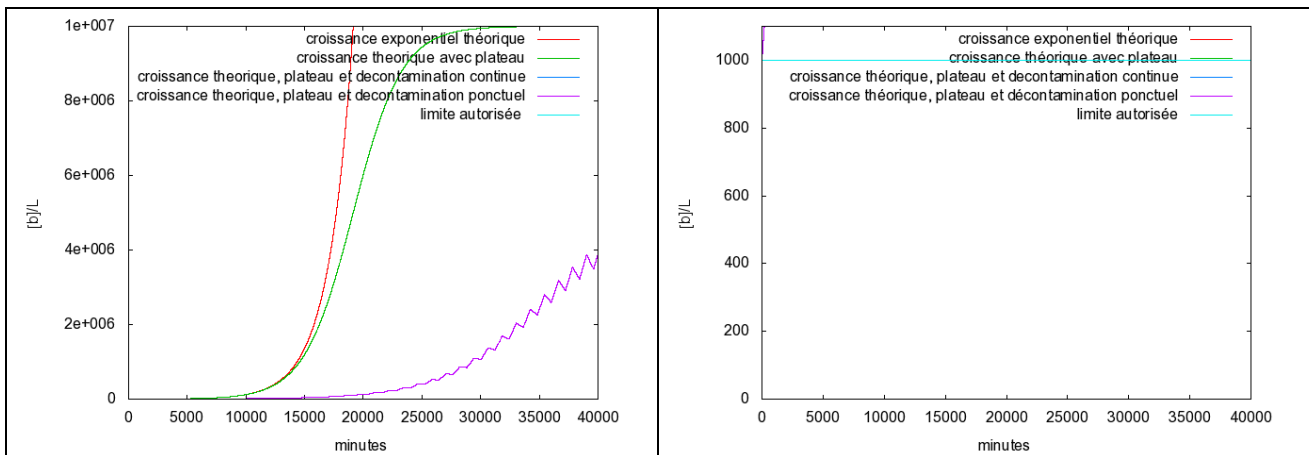


Figure 52: Courbes tracées par le calculateur avec les valeurs utilisées dans les calculs de l'ONERA à l'exception du débit de traitement qui est choisi de façon à annuler la croissance

Par ailleurs, les résultats sont identiques lorsque la concentration initiale est de 10 bactéries/L au lieu de 1000 bactéries/L (*Figure 53*).

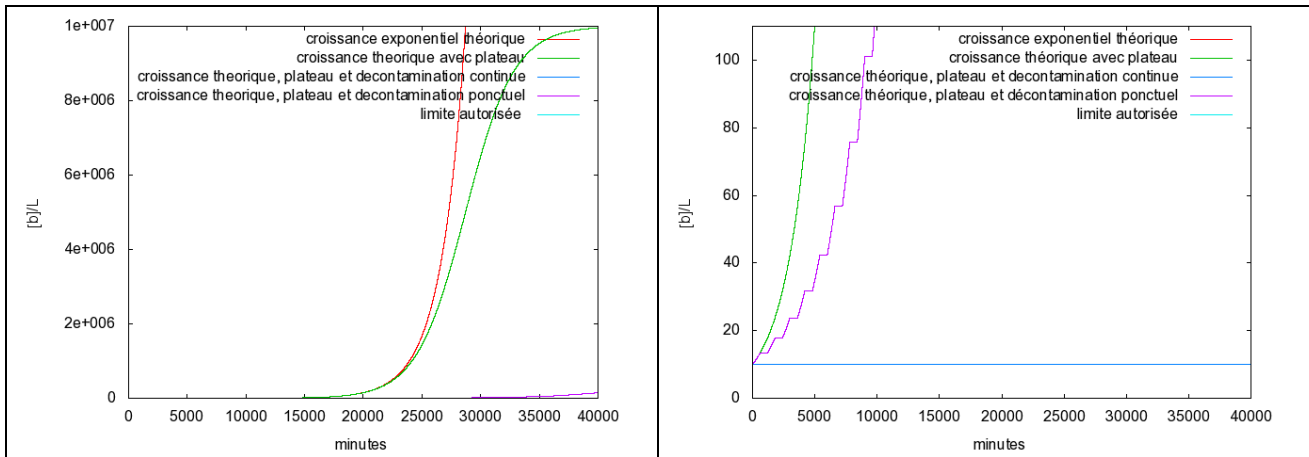


Figure 53: Courbes tracées par le calculateur avec les valeurs utilisées dans les calculs de l'ONERA pour une concentration initiale divisée par 100.

La différence entre les observations de l'ONERA et du calculateur vient probablement du fait que dans le modèle mathématique B (ONERA), chaque impulsion est considérée indépendamment de la façon dont elles sont appliquées. Ainsi dans un système où plusieurs impulsions sont appliquées par passage dans l'applicateur, l'impulsion « n » n'affecte que les bactéries restantes dans l'applicateur après que les « n-1 » impulsions aient agi. Si 10 impulsions donnent 1 \log_{10} d'abattement, la 11^{ème} impulsion n'aura un effet uniquement sur les 10% de bactéries restantes. Ce phénomène peut aussi en partie expliquer les observations expérimentales présentées en Partie VI -II.3 (page 187) qui montrent que le rendement est meilleur lorsque moins d'impulsions par passage sont appliquées.

Au regard de certaines expériences, ce phénomène ne serait pas complètement transposable d'un point de vue biologique. En effet, selon Perni et al., 2007, il existerait un effet dose impliquant qu'une bactérie est progressivement détériorée par chaque impulsion, jusqu'à un nombre seuil qui provoque sa mort. Appliquer seulement quelques impulsions n'aurait donc aucun effet. Cet aspect a également été approfondi dans la partie II.3 (page 187).



Partie V - **EXPERIMENTATIONS EN**
LABORATOIRES – MATERIEL ET METHODE



Plusieurs axes d'études ont été menés notamment en utilisant *E. coli* afin d'apprécier l'effet i) des paramètres fluidiques tels que le débit et le volume total, ii) de la fréquence, iii) de la souche bactérienne utilisée et iv) de l'état de la population bactérienne.

Les prédictions des simulations décrites en Partie IV - ont servi de guide pour la définition des protocoles.

I. MATERIEL ELECTRIQUE

Dans le cadre du projet DEBACIEM, l'ONERA a eu en charge la réalisation d'un système de décontamination de bactéries contenues dans un volume d'eau.

Pour décontaminer les bactéries, un champ électrique pulsé d'environ 70 ns et de 100 kV/cm est appliqué au volume d'eau à traiter. Le système se compose de deux parties : un générateur électrique et un applicateur. L'applicateur consiste en un appareil composé par deux électrodes planes parallèles encadrant un volume d'eau. Cette géométrie permet l'application de champs électriques uniformes sur le volume de travail. La conception de ce dernier est effectuée pour pouvoir réaliser des expériences avec écoulement (flux) ou sans écoulement (batch). Les applicateurs livrés par l'ONERA sont décrits dans la partie I.2 Applicateur.

I.1. DEVELOPPEMENT DES PROTOTYPES

Le générateur électrique doit fournir des impulsions nanosecondes haute tension. Un applicateur d'espace inter-électrodes 2 mm nécessite une tension de 20 kV pour obtenir un champ électrique de 100 kV/cm²⁹. Au cours du projet de nombreux développements ont été réalisés et livrés par l'ONERA selon leurs caractéristiques indiquées dans le *Tableau 9*.

Tableau 9 : Liste des générateurs.

	G0	G0.1	G0.2	G1	G2	G3	G3.1
Durée d'impulsion	60 ns	40 ns	70 ns	10 ns	70 ns	70 ns	70 ns
Temps de montée	20 ns	20 ns	20 ns	2 ns	20 ns	25 ns	25 ns
Tension (charge adaptée)	20 kV	20 kV	20 kV	20 kV	20 kV	20 kV	16 kV
Impédance de sortie	50 Ω	50 Ω	12.5 Ω	50 Ω	100 Ω	100 Ω	100 Ω
Fréquence de répétition	1 Hz ou 2 Hz	1 Hz ou 2 Hz	1 Hz ou 2 Hz	3000 Hz	2x10 Hz	2x100 Hz	100 Hz
Polarité	Monopolaire positive	Monopolaire positive	Monopolaire positive	Monopolaire positive	Bipolaire	Bipolaire	Monopolaire négative

Le générateur G0 a subi diverses modifications pour se décliner au cours du temps en générateurs G0.1 puis G0.2.

²⁹ La formule permettant de calculer le champ électrique généré par 2 électrodes planes, parallèles et face à face, en fonction de la tension et de la distance interélectrode est : $E = U / d$ où E est le champ électrique (en V/m), U la tension (en V), et d la distance inter électrode (en m).



Le générateur G1 est un générateur commercial de marque FID GmbH (Germany), tandis que les générateurs G2 et G3 ont par la suite été développés par l'ONERA. Ces derniers peuvent appliquer des alternances d'impulsions de polarité inversées. Le générateur G2 fournit des alternances d'impulsions positives et négatives avec un intervalle minimum entre les impulsions de 10 ms. Le générateur G3 permet des alternances d'impulsions avec un intervalle minimum de 2 ms.

La possibilité de pouvoir fonctionner en bipolaire est indispensable pour limiter les phénomènes d'électrochimie (Johan Morren, 2003; Kotnik et al., 2001; Qin et al., 1994) pouvant être responsable de la corrosion des électrodes et donc de la dégradation des applicateurs.

A l'amplitude des champs électriques utilisés (100 kV/cm), l'air n'est plus isolant et des arcs électriques ou des précurseurs d'arcs se forment. Il est donc indispensable de maintenir l'ensemble de l'espace inter-électrode de la cellule de décontamination rempli d'eau.

L'apparition de bulle de gaz due à de l'électrochimie en cours de traitement, entraîne des arcs électriques dans l'espace inter-électrode. L'un des gaz formé est l'hydrogène, limiter l'électrochimie permet donc d'éviter sa formation et les risques associés. La limitation de l'électrochimie revêt également l'intérêt d'obtenir des résultats d'abattement imputables uniquement au phénomène physique.

De par leur conception, les générateurs fournissent des impulsions qui ont tendance à présenter un « rebond », c'est-à-dire qu'à la fin de l'impulsion, la polarité de la tension s'inverse pour former une seconde impulsion de plus faible amplitude avant de retomber à 0. Ce phénomène a été minimisé autant que possible, mais reste présent dans les impulsions délivrées par le G0 et le G3. Il a été montré qu'une impulsion nanoseconde délivrée instantanément après une première impulsion nanoseconde de polarité inverse diminue l'efficacité d'abattement (Ibey et al., 2014).

Chacune des impulsions produites par ces générateurs délivre environ 0,3 J sur un applicateur 80 Ω.

En effet, $W=U.I.t$ et $I = \frac{U}{R}$ d'où $w = \frac{U^2 t}{R} = \frac{(20 \times 10^3)^2 \times 70 \times 10^{-9}}{80} = 0,35 \text{ J}$.

I.1.1. Générateur G0

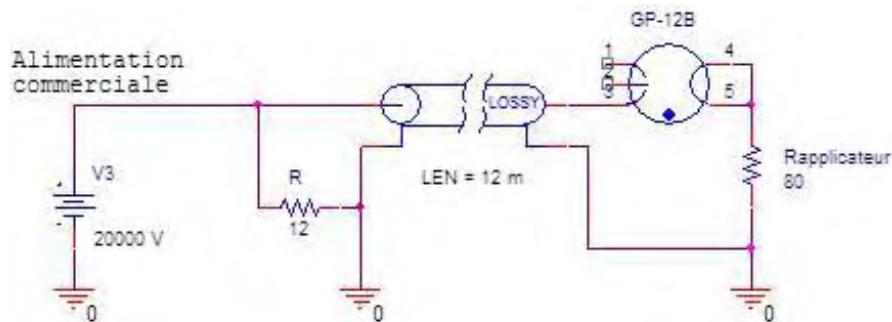


Figure 54 : Schéma simplifié du générateur G0.

La Figure 54 représente le schéma simplifié du générateur G0 (sans les circuits de commande). Une alimentation commerciale de 20 kV / 2 mA charge une ligne de transmission coaxiale de 12 mètres de long. L'impédance de la ligne est de 12 Ω. Un éclateur à gaz (Excelitas GP-12B) décharge cette ligne vers l'applicateur.

Pour une longueur de 12 m, la durée de l'impulsion sur l'applicateur est de 60 ns. Le temps de montée de l'impulsion est de 20 ns, durée limitée par les performances de l'éclateur.



Dans ce montage, la charge (l'applicateur) n'est pas adaptée à la ligne de transmission. En effet, l'impédance de la ligne du générateur est de 12Ω alors que celle de l'applicateur varie de 45Ω (batch 1 et 2) à 80Ω (flux 1). Cela entraîne une réflexion de l'impulsion vers le générateur à chaque fois que ce dernier en déclenche une. Afin de protéger le générateur de l'impulsion réfléchie, une résistance implantée entre l'alimentation commerciale et la ligne de transmission permet de l'absorber. Les performances de ce générateur sont définies dans le Tableau 9. La fréquence de répétition est limitée par l'alimentation commerciale.

Le générateur a été testé de 1 Hz à 4 Hz en batch au maximum de la tension qu'il peut délivrer (Figure 55, Figure 56, Figure 57, Figure 58). Les courbes de tensions sont mesurées aux bornes de l'applicateur.

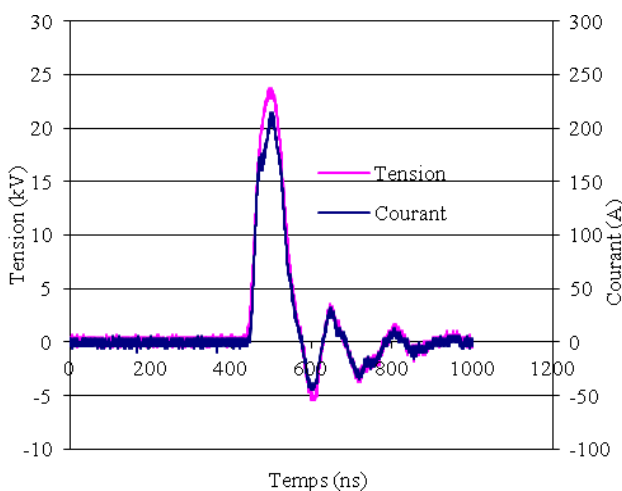


Figure 55 : Enregistrement de la tension et du courant générés par G0 à 1 Hz.

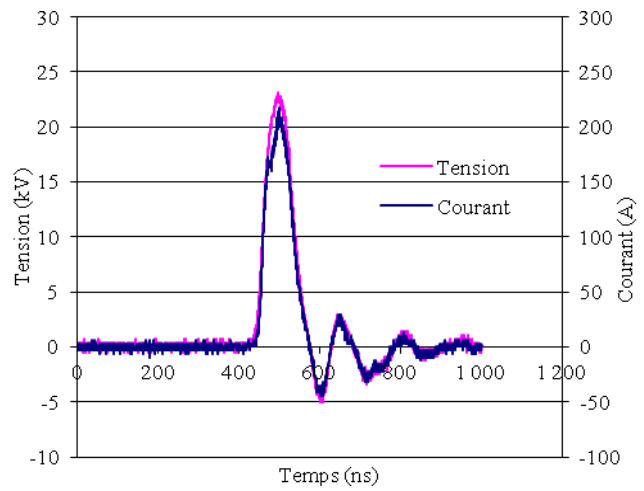


Figure 56 : Enregistrement de la tension et du courant générés par G0 à 2 Hz.

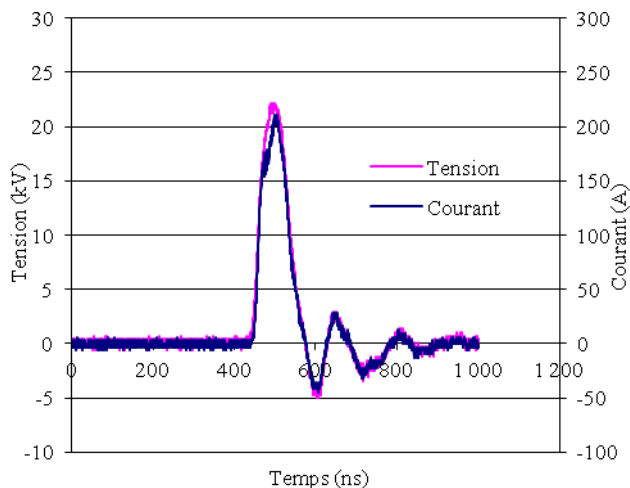


Figure 57: Enregistrement de la tension et du courant générés par G0 à 3 Hz.

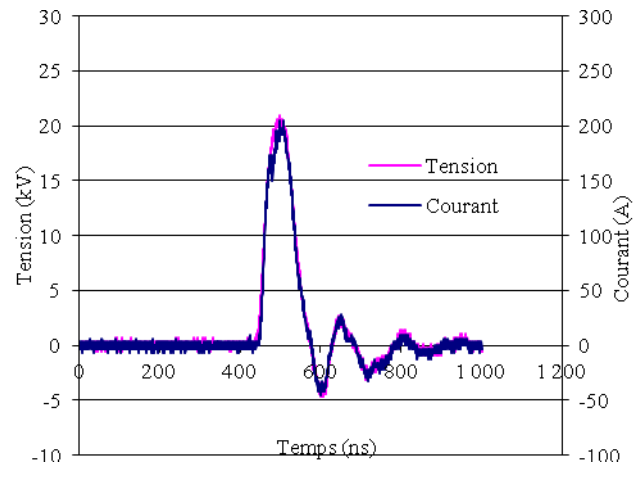


Figure 58 : Enregistrement de la tension et du courant générés par G0 à 4 Hz.

A 1 Hz et 2 Hz, le courant et la tension restent stables au cours du temps. La tension à 1 Hz est très légèrement supérieure à celle à 2 Hz. A 3 et 4 Hz, la tension maximale diminue plus fortement. A 4 Hz, il s'avère que la tension diminue régulièrement au cours du temps ; phénomène qui n'a pas été observé à 1 Hz et à 2 Hz (Figure 59).

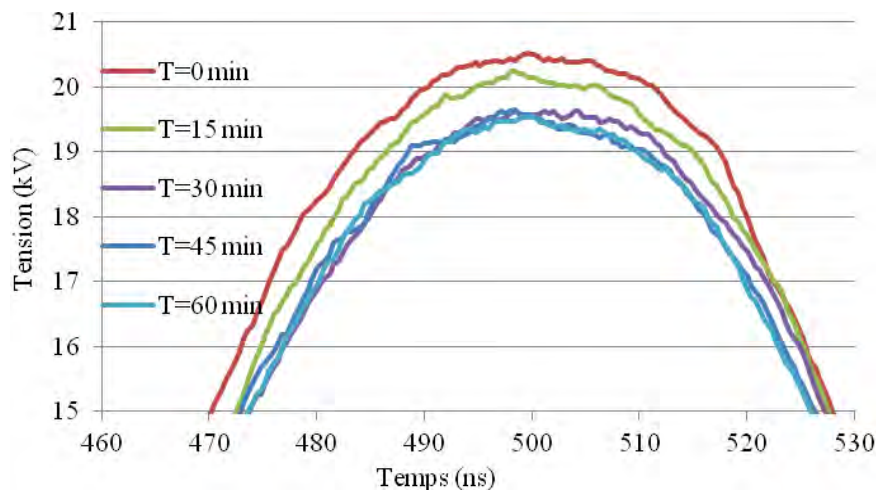


Figure 59 : Zone du pic de tension à 4 Hz pour différentes durées de fonctionnement, lissée sur 10 points.

Fort de ces résultats, il est décidé de réaliser les expériences (qui dureront 5 h) uniquement à 1 Hz et 2 Hz. L'objectif est de ne pas détériorer le générateur par une utilisation au-delà de ses capacités, et ainsi éviter de prendre le risque de descendre la tension maximale sous les 20 kV, car ceci constituerait un biais dans les résultats.

I.1.2. Générateur G1

Le générateur G1 est un générateur commercial (FPG 20-N), qui se commande avec des impulsions de 5 V générées par un TTL. Il génère des impulsions de 20 kV pendant 10 ns avec un front de montée de 2 ns. Le taux de répétition maximum est de 10 kHz.

I.1.3. Générateur G2

Cette partie présente le développement d'une alimentation haute tension servant à générer le champ électrique de 100 kV/cm aux bornes de l'applicateur dans le cadre de ce projet. Ce générateur haute tension est une avancée par rapport au générateur G0 utilisé auparavant. L'objectif est d'améliorer si possible la fréquence des impulsions, et de travailler avec des alternances positives et négatives. Ce générateur doit permettre des temps de traitement plus courts, et servira de prototype au générateur finalement installé sur le système industriel (TAR).

Comme l'indique le *Tableau 9*, les spécifications du générateur G2 sont les suivantes :

- Impulsion carrée de 70 ns de largeur (similaire au G0)
- Alternance d'impulsions positives et négatives pour éviter un effet d'électrolyse
- Fréquence réglable jusqu'à 50 Hz
- Tension de travail de 20 kV
- Sortie adaptée pour une impédance de 100 Ω

Le dernier point concerne l'adaptation d'impédance entre le générateur et l'applicateur. L'impédance de l'eau entre les électrodes de l'applicateur doit être de 100 Ω . Pour une conductivité de l'eau fixée,



cela impose des contraintes sur la géométrie des électrodes de l'applicateur. La conception des générateurs dépend donc des applicateurs sur lesquels ils seront utilisés. Les différents applicateurs sont décrits dans une partie suivante (voir Partie V -I.2.2, *Tableau 10*, page 138). L'applicateur 3 a une impédance de 80Ω mais peut être utilisé avec ce générateur, une légère chute de tension par rapport aux applicateurs 5, 6 et 7 est à prévoir.

Le générateur est formé de deux racks type 4U: un rack dit "de charge" contenant toute l'électronique de charge et de puissance, et un rack dit "d'impulsion" contenant l'agencement d'un câble coaxial formant le pulse final. Le rack de charge a pour fonction de charger, et éventuellement déclencher, le rack d'impulsion.

La largeur d'impulsion peut être changée, soit par modification du rack d'impulsion initial, soit par l'utilisation d'un autre rack d'impulsion.

I.1.3.1 Principe de fonctionnement

Le principe du générateur est présenté au niveau de la *Figure 60*. Un ensemble convertisseur alternatif/continu et circuit doubleur de tension chargent en $150 \mu\text{s}$ la capacité C_2 sous 600 V . Des thyristors déchargent ensuite en quelques μs la capacité C_2 au travers du primaire d'un transformateur. Durant cette décharge du primaire, une impulsion haute tension d'une durée de quelques μs est générée au niveau du secondaire.

Deux circuits en parallèle sont utilisés avec deux boucles primaires sur le transformateur. Une en sens direct pour les impulsions positives et l'autre en sens indirect pour les impulsions négatives.

Les thyristors ont été sélectionnés plutôt que d'autres composants de commutation plus rapides pour leur robustesse et leur coût raisonnable. Un seul thyristor est nécessaire par branche.

La commande des thyristors définit les durées caractéristiques du système. Un générateur commercial d'impulsions fournit les impulsions à envoyer aux thyristors. Ce générateur permet de régler une fréquence de fonctionnement ainsi qu'une durée entre impulsions positives et négatives.

En sortie du transformateur, l'impulsion haute tension positive ou négative de quelques μs générée vient charger une ligne de transmission de $7,5 \text{ m}$ de long. Cette distance permet de générer un pulse d'une durée de 75 ns si on décharge rapidement cette ligne de transmission. En effet une ligne de transmission se décharge de façon continue et non de façon abrupte comme un condensateur discret. Cette ligne de transmission sert à mettre en forme une impulsion pour une durée de 70 ns .

Un éclateur à gaz décharge cette ligne de transmission vers l'applicateur avec un temps de montée court (environ 20 ns). Une impulsion « carrée » est ainsi appliquée aux électrodes.

La ligne a une impédance de 25Ω , si elle se décharge dans un applicateur 25Ω , la tension aux bornes de l'applicateur ne sera que la moitié de la tension de charge de la ligne. Pour pouvoir récupérer la tension de charge, un transformateur à câble est ajouté entre la sortie de l'éclateur et l'applicateur. Il s'agit de 2 lignes de transmission branchées en parallèle d'un côté (l'entrée) et en série de l'autre (la sortie). Il présente une impédance de 25Ω en entrée et 100Ω en sortie. La tension de sortie s'en trouve doublée. Grâce à ce montage, la tension de charge de la ligne de transmission est la même que celle de l'applicateur.

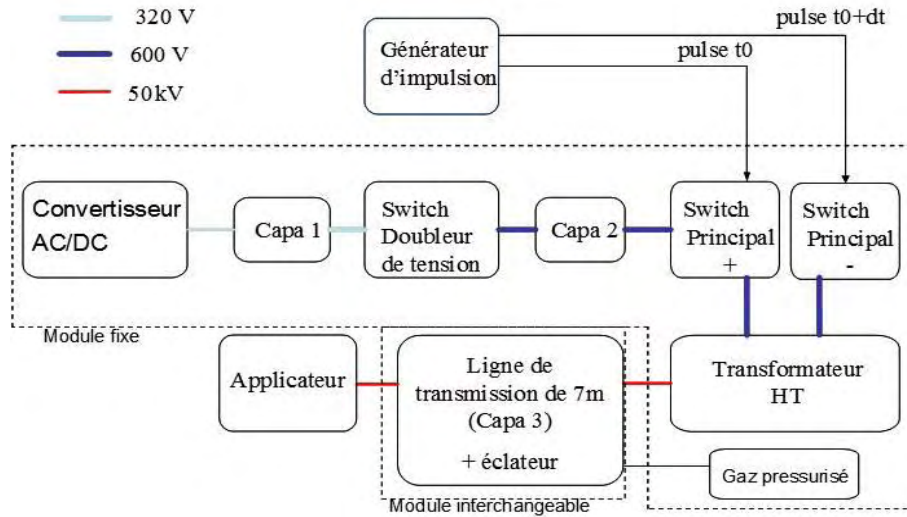


Figure 60 : Schéma de principe du générateur G2.

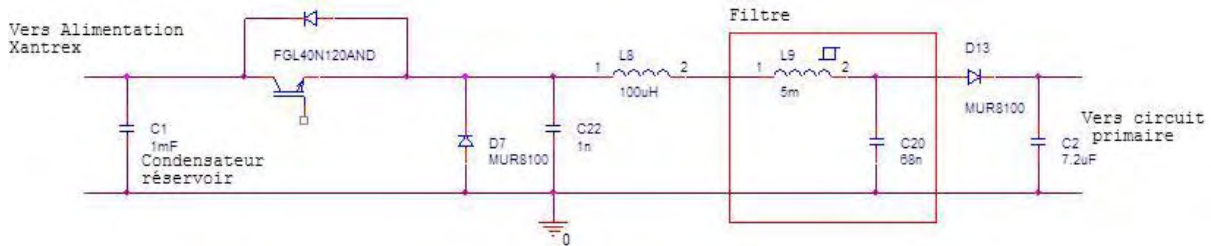


Figure 61 : Circuit de charge (switch doubleur de tension).

Le circuit du switch doubleur de tension est donné en détail sur la *Figure 61*. Il s'agit d'un circuit C-L-C. Le condensateur C1 est chargé par une alimentation continue commerciale ou par le secteur redressé. L'objectif est de charger le condensateur C2. Pour rendre plus efficace le circuit et doubler la tension, une inductance L8 est insérée entre C1 et C2 permettant de charger par résonance C2. Ce transfert d'énergie entre C1 et C2 se fait en théorie sans perte si L8 n'est pas résistive.

Le commutateur FGL40N120AND (IGBT) permet de laisser se charger C2 durant une durée contrôlée par l'utilisateur à l'aide d'un potentiomètre non représenté.

Si C1 est initialement chargé et C2 déchargé et que l'IGBT est fermé durant une durée suffisamment longue, les tensions entre C1 et C2 vont finir par s'équilibrer après un grand nombre d'oscillations, à conditions que le circuit soit peu résistif.

Le principe de ce doubleur est de bloquer l'IGBT au moment où la tension aux bornes de C2 oscille et atteint un maximum qui peut être le double de la tension initiale de C1. La *Figure 62* : représente les tensions que l'on peut atteindre avec ce circuit en fonction du rapport C2/C1. En effet cette tension maximale ne dépend que du rapport des condensateurs. L'inductance L8 n'influe que sur les périodes d'oscillations et donc sur la durée de la charge de C2.

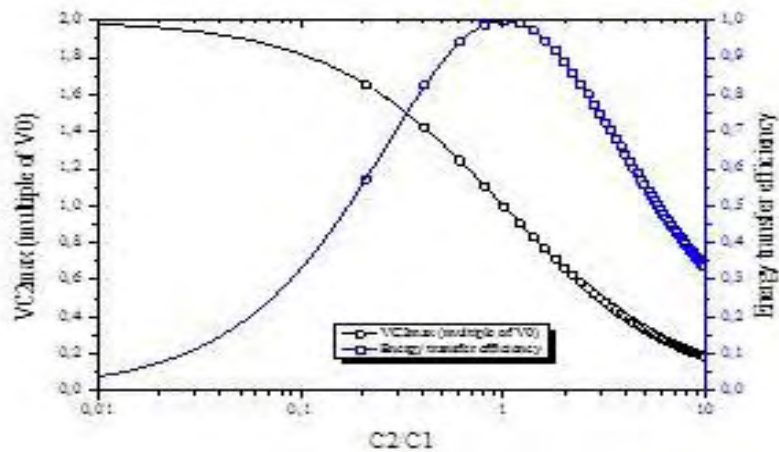


Figure 62 : Efficacité de transfert d'énergie et tension maximale théorique sur la capacité de sortie.

Ce montage permet un transfert d'énergie entre 2 points quasiment sans perte. La perte est nulle en théorie mais elle est liée aux résistances des câbles et aux pertes de commutations des IGBTs. Il permet également de régler la tension aux bornes de C2. C'est cette tension aux bornes de C2 qui définit la haute tension obtenue en sortie du transformateur haute tension.

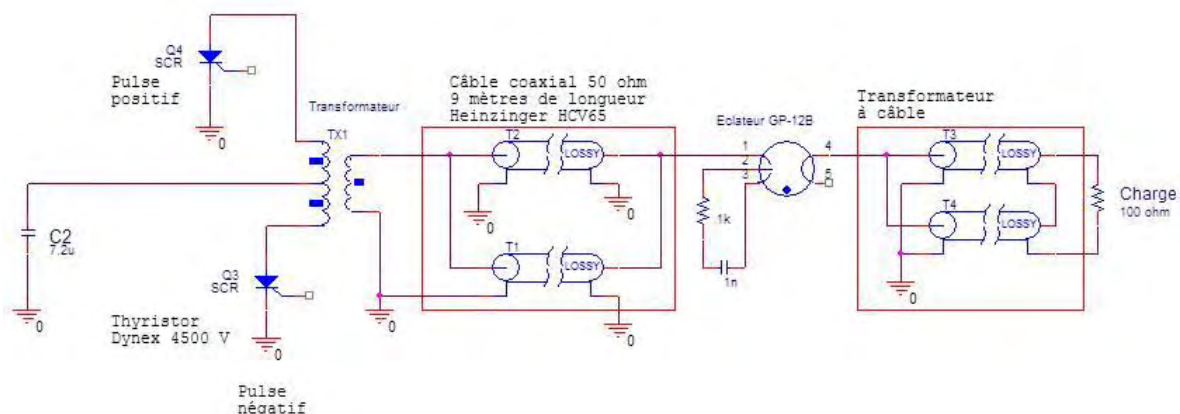


Figure 63 : Circuit du transformateur haute tension et du module éclateur à gaz.

Sur la Figure 63 la partie haute tension ainsi que la partie primaire du transformateur haute tension sont représentées. C2 est initialement chargé sous une tension allant jusqu'à 500 V. Un des thyristors est commandé et devient passant. Un courant de 800 A traverse le primaire correspondant et une tension induite apparaît aux bornes du secondaire. C2 associé au primaire et au thyristor forment un circuit RLC. Des oscillations vont donc apparaître. Toutefois, les thyristors se comportent comme des diodes et bloquent les courants qui les traversent en inverse. Les thyristors étant en effet surdimensionnés, ils peuvent bloquer le courant.

Le courant du primaire va osciller au moment de la décharge de C2. Après une demi-période d'oscillation de courant, la haute tension au secondaire atteint son maximum. La tension en sortie étant à son maximum, il n'est pas nécessaire que le circuit continu à osciller. Par conséquent, il faut que l'éclateur à gaz s'enclenche au même moment en étant synchronisé. De cette façon, le courant du primaire est presque nul et la haute tension est à son maximum. Le fait de laisser le régime osciller ne fait qu'augmenter les pertes. Ces dernières sont surtout dissipées par les thyristors et le câblage du transformateur. Il est à noter qu'une mauvaise synchronisation entre l'éclateur et les thyristors aurait pu entraîner leur détérioration prématurée.



I.1.3.2 Performance finale

Le générateur fonctionne à 20 impulsions/s en bipolaire soit 10 impulsions positives et 10 impulsions négatives par seconde. La tension de sortie est fixe variant de 20 à 22 kV. Les impulsions sont de 75 ns (largeur à mi-hauteur) en positif et négatif. Les impulsions positives sont en moyenne de 21 kV avec un écart type de 2,5 kV. Les impulsions négatives sont en moyenne de 22 kV avec un écart type de 200 V.

La *Figure 64* présente une courbe caractéristique sur un applicateur de 2 mm d'écartement inter-électrode et de 100 Ω d'impédance. Il s'agit ici de l'alternance positive. Il est possible de mesurer un temps de montée de 20 ns à partir de cette courbe. La durée de l'impulsion à mi-hauteur est de 70 ns. Le temps de montée réduit la largeur de l'impulsion.

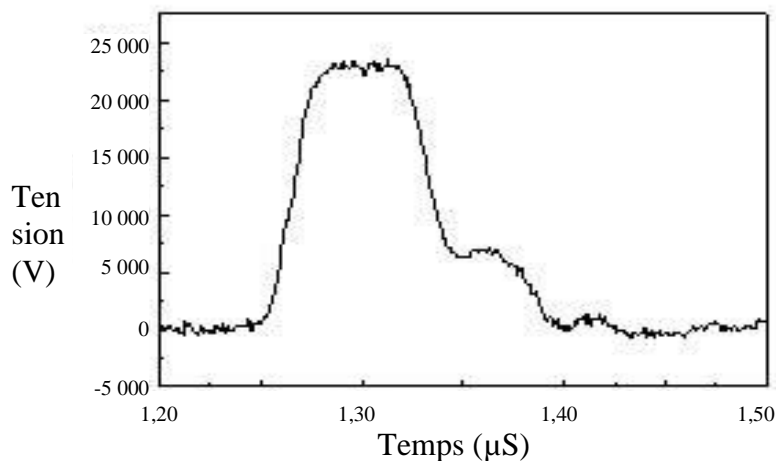


Figure 64 : Impulsion positive délivrée sur un applicateur 100 Ω .

Il convient de noter l'absence d'oscillations parasites de polarité négative après l'impulsion. Un épaulement allonge involontairement l'effet à 5 kV pendant quelques dizaines de ns.

Une analyse de la dispersion de la tension délivrée par le G2 est réalisée sur une longue période de fonctionnement et après son utilisation pour de nombreuses expériences d'abattement.

Ces mesures sont réalisées pour vérifier s'il n'y a pas de dérive dans la génération des impulsions suite à une utilisation prolongée du générateur. En effet, les composants comme les éclateurs ont des performances qui peuvent être modifiées par une utilisation trop prolongée.

Les valeurs enregistrées ne sont qu'un échantillon très réduit de toutes les impulsions délivrées par le générateur (cf. Partie V -I.3) compte tenu :

- du temps nécessaire à l'automate informatique pour récupérer les courbes affichées par le picoscope (environ 10 s)
- que les impulsions positives et négatives ne peuvent pas être enregistrées conjointement.

De fait, pendant une expérience de 5 h, le nombre d'enregistrement est d'environ $\frac{5 \times 3600}{10} = 1800$ impulsions.



I.1.3.2.1 Analyse et suivi des impulsions positives :

Lors de cette expérience, des claquages réguliers sont survenus, et lors de la dernière heure d'expérimentation, des problèmes de fuites et de blocages du flux sont apparus.

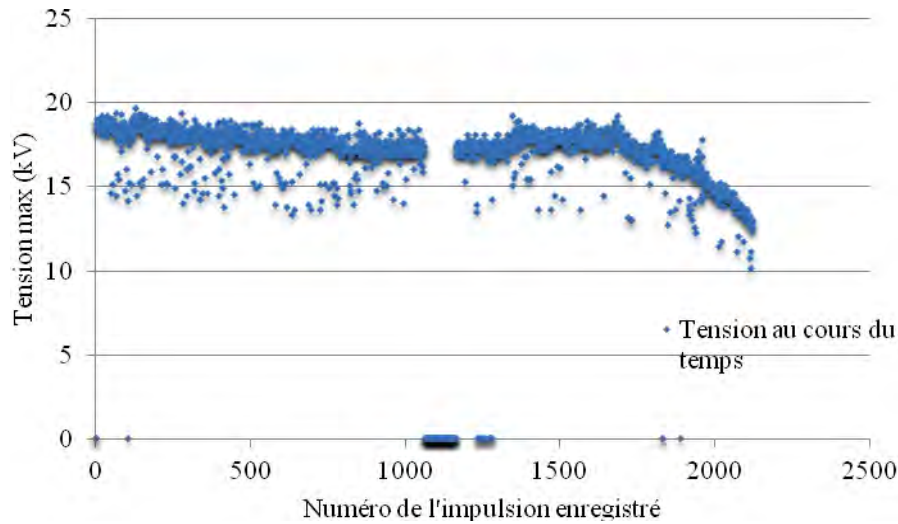


Figure 65 : Valeurs de la tension maximum des impulsions positives au cours du temps.

Il apparaît que la tension est plus proche de 18 kV que de 20 kV (Figure 65).

Une chute progressive de la tension max à partir de 1700 impulsions (correspondant au début de la 4^{ème} heure de traitement) est observée. Cette partie de la courbe ne doit pas être prise en compte, car lors de la dernière heure d'expérimentation, les paramètres de flux n'étaient plus maîtrisés, ni stables.

Les points à 0 correspondent à des bugs d'enregistrement, et non à des « tirs ratés ».

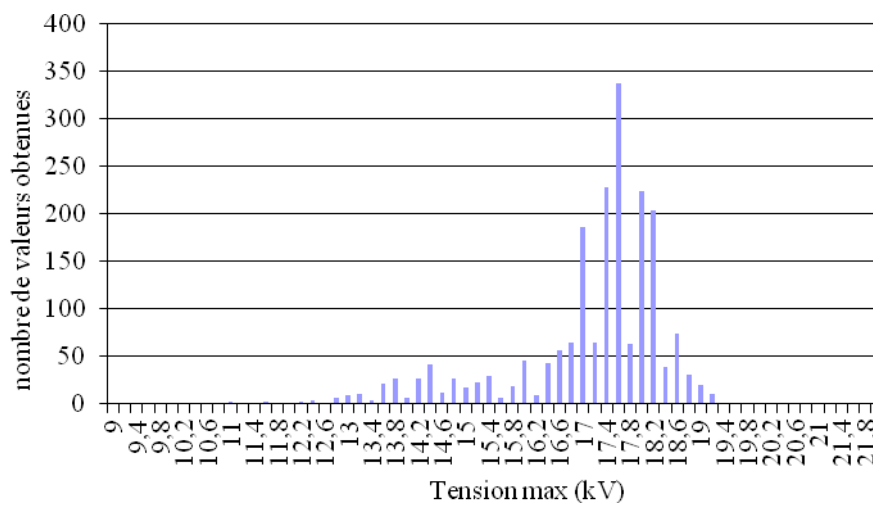


Figure 66 : Dispersion de la tension maximale des impulsions avec un pas de 0,2 kV pour une expérience de 5 h.



Une forte répartition autour de 17-18 kV est observée (Figure 66). La répartition est asymétrique. Ceci est dû notamment aux impulsions de la dernière heure qui ajoutent beaucoup d'impulsions de tension plus faible. Il faut donc les éliminer car elles ne rentrent pas dans l'échantillon représentatif.

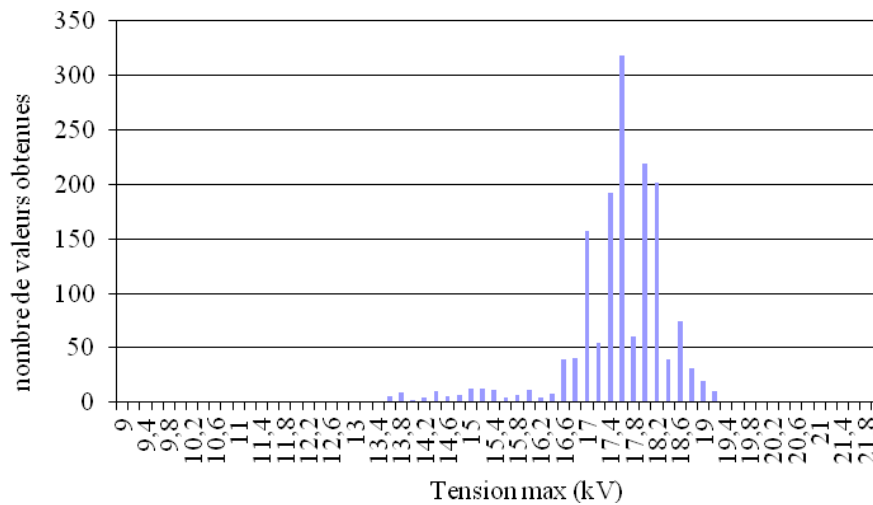


Figure 67 : Dispersion de la tension maximale sur les premières heures uniquement.

En supprimant les points enregistrés après l'enregistrement #1700 (c'est-à-dire pendant la dernière heure de traitement) une partie des impulsions sortant de la symétrie est éliminée. Cependant il en reste encore beaucoup entraînant une dispersion importante.

I.1.3.2.2 Analyse et suivi des impulsions négatives :

Comme pour l'expérience précédente, les valeurs enregistrées ne sont qu'un échantillon réduit de toutes les impulsions délivrées par le générateur.

Quelques « arcs électriques » ont pu être repérés, mais en moins grand nombre, et le flux n'a été perturbé qu'une seule fois en fin d'expérience.

Pour cette expérience, seules les impulsions négatives ont été enregistrées.

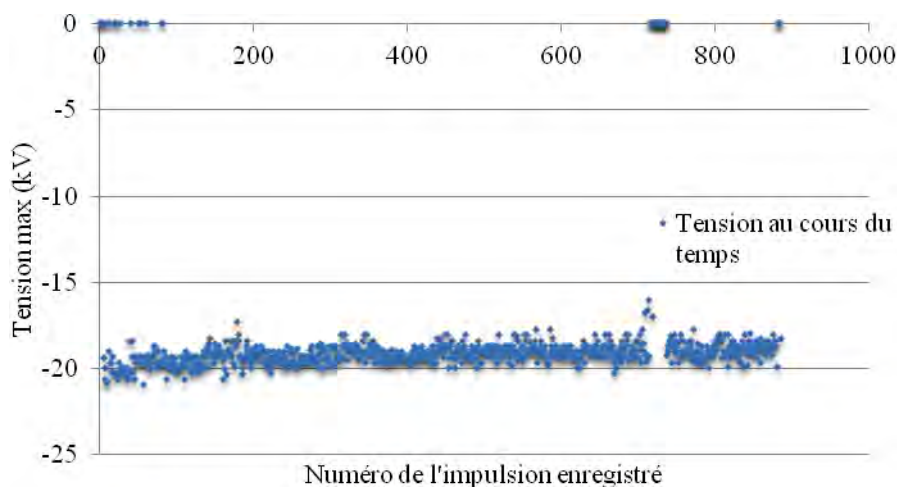


Figure 68 : Valeurs de la tension maximale des impulsions au cours du temps.



Il apparaît dans la *Figure 68* que la tension obtenue se situe bien autour de 20 kV au début de l'expérience, mais diminue légèrement au cours des 5 h d'expériences.

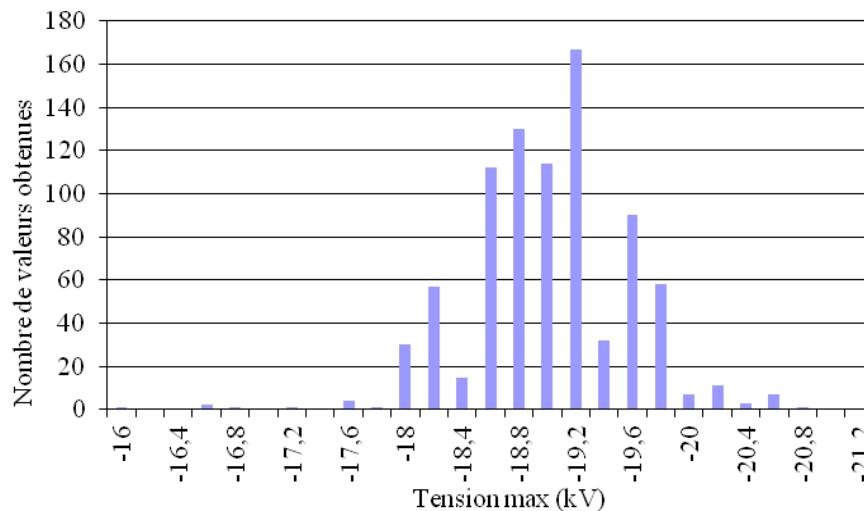


Figure 69 : Dispersion de la tension maximale des impulsions avec un pas de 0,2 kV.

La *Figure 69* montre que la majorité des impulsions est proche de 19 kV, la dispersion est faible et assez symétrique.

En conclusion, les impulsions négatives ont en moyenne une intensité plus élevée de 2 kV que les positives pour une même impédance d'applicateur.

I.1.4. Générateur préindustriel G3

Un cahier des charges a été dressé pour le générateur G3, avec les spécifications suivantes :

- Impulsion carrée de 70 ns de largeur (similaire au G0)
- Temps de montée inférieur à 20 ns
- Alternance d'impulsions positives et négatives (symétrique en durée et tension) pour éviter un effet d'électrolyse
- Fréquence réglable jusqu'à 200 Hz (100 Hz d'impulsions positives et 100 Hz d'impulsions négatives)
- Tension de travail la plus haute possible
- Sortie adaptée pour une impédance de 100 Ω
- Tension jusqu'à 40 kV pour un objectif à 200 kV/cm ou 100 kV/cm pour un espace inter-électrode de 4 mm

I.1.4.1 Principe

Le schéma des boîtiers constituant le générateur et l'applicateur est présenté *Figure 70*. Un générateur d'impulsion fournit un signal d'horloge au système. Le schéma électronique de la partie haute tension est présenté *Figure 71*.



Pour chaque impulsion de ce signal d'horloge, le boîtier chargeur haute tension délivre deux impulsions de forme et d'amplitude identique mais de polarité inversée.

Ces impulsions chargent un boîtier ligne de transmission à une tension pouvant aller jusqu'à 20 kV. La charge dure 4 μ s.

Un thyatron de marque Pulsedtech permet de court-circuiter la ligne de transmission.

Un thyatron est un interrupteur commandé (ou switch) haute tension, fort courant et rapide. La durée pour court-circuiter la ligne de transmission est de 25 ns.

- Si le thyatron est commandé, la ligne de transmission est court-circuitée et une impulsion de 20 kV maximum et de largeur à mi-hauteur de 70 ns est appliquée aux électrodes de l'applicateur.

- Si le thyatron n'est pas commandé, l'applicateur n'est pas soumis à une impulsion haute tension et l'énergie est déchargée vers le chargeur haute tension en 100 μ s.

Le boîtier contrôleur thyatron commande les signaux nécessaires au bon fonctionnement du switch thyatron.

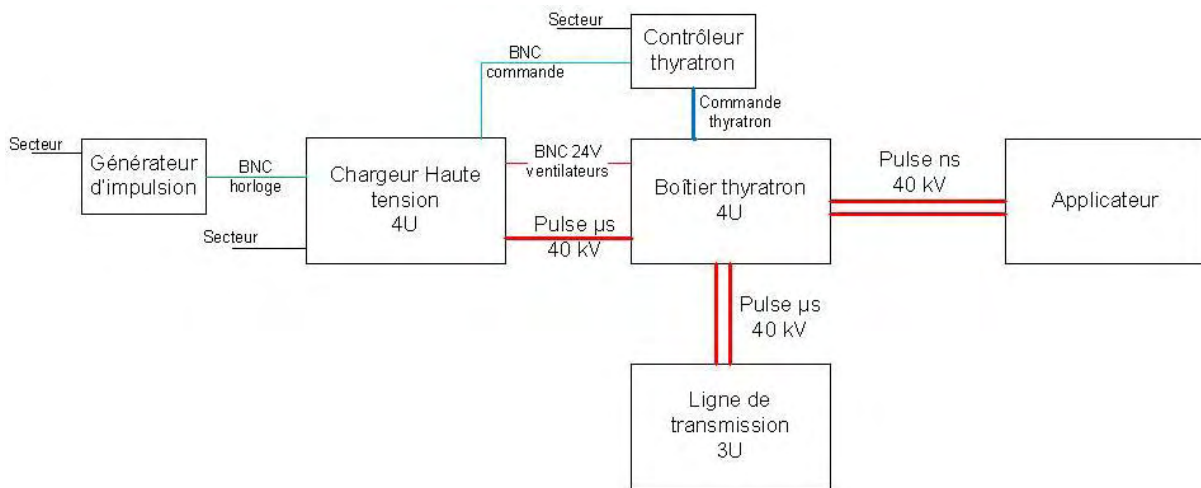


Figure 70 : Schéma simplifié du générateur G3 avec l'applicateur.

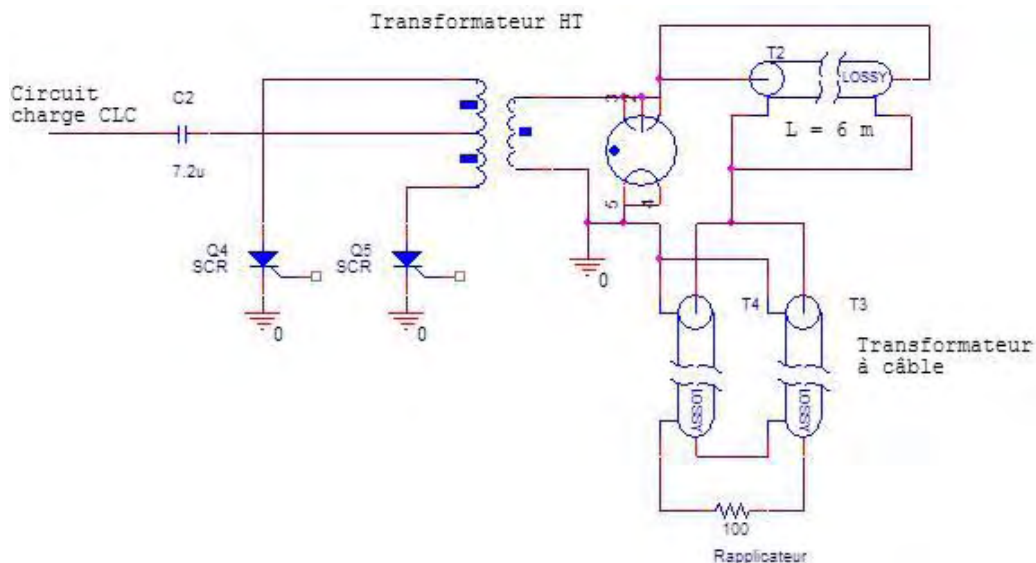


Figure 71 : Schéma électronique de la partie haute tension du générateur G3.



I.1.4.2 Caractéristiques générales

- Tension maximale de sortie : 20 kV
- Largeur des impulsions de sortie à mi-hauteur : 70 ns
- Mode des impulsions : alternance bipolaire, 2 ms séparent les impulsions positives et négatives.
- Le principe du générateur G3 est similaire à celui du G2 à quelques changements près : le circuit convertisseur alternatif/continu est réalisé en interne, l'alimentation Xantrex étant utilisée sur le G2.

Le commutateur à haute tension doit être modifié pour tenir une tension plus élevée.

La fréquence plus élevée demande une dissipation de puissance plus importante (dissipateur de volume plus important).

Le commutateur étant modifié, cela amène éventuellement à revoir la partie ligne de transmission et le transformateur à câble.

La *Figure 71* présente l'étage haute tension du générateur G3. La partie primaire du transformateur est similaire au générateur G2. La partie située au secondaire du transformateur a été modifiée.

En effet, pour un fonctionnement bipolaire avec une forte cadence, la cathode du switch doit être à la masse. Les autres parties du montage restent identiques. Une ligne de transmission est chargée, sa longueur définissant la durée de l'impulsion. Un transformateur à câble permet de doubler la tension aux bornes de l'applicateur

La *Figure 72* présente un chronogramme typique du générateur G3. Sur cette représentation, le générateur d'impulsion génère des impulsions de commande à une fréquence de 100 Hz.

En interne du chargeur haute tension, deux impulsions de charge sont générées par impulsion de commande. Le circuit de charge permet de charger des condensateurs au primaire d'un transformateur.

Des impulsions haute tension sont générées en sortie du boîtier haute tension en court-circuitant les condensateurs au primaire du transformateur. Pour chaque impulsion de commande, une impulsion positive et une impulsion négative sont générées. L'intervalle de ces deux impulsions est de 2 ms. 1 ms après chaque impulsion, le circuit recharge les condensateurs en 40 μ s.

Les impulsions haute tension chargent la ligne de transmission en 3 μ s. Une impulsion de commande envoyée au thyatron commute celui-ci ce qui court-circuite la ligne de transmission. Une tension de 20 kV durant 70 ns apparaît alors aux bornes de l'applicateur.

L'applicateur est soumis à la haute tension uniquement durant ces impulsions de 70 ns.

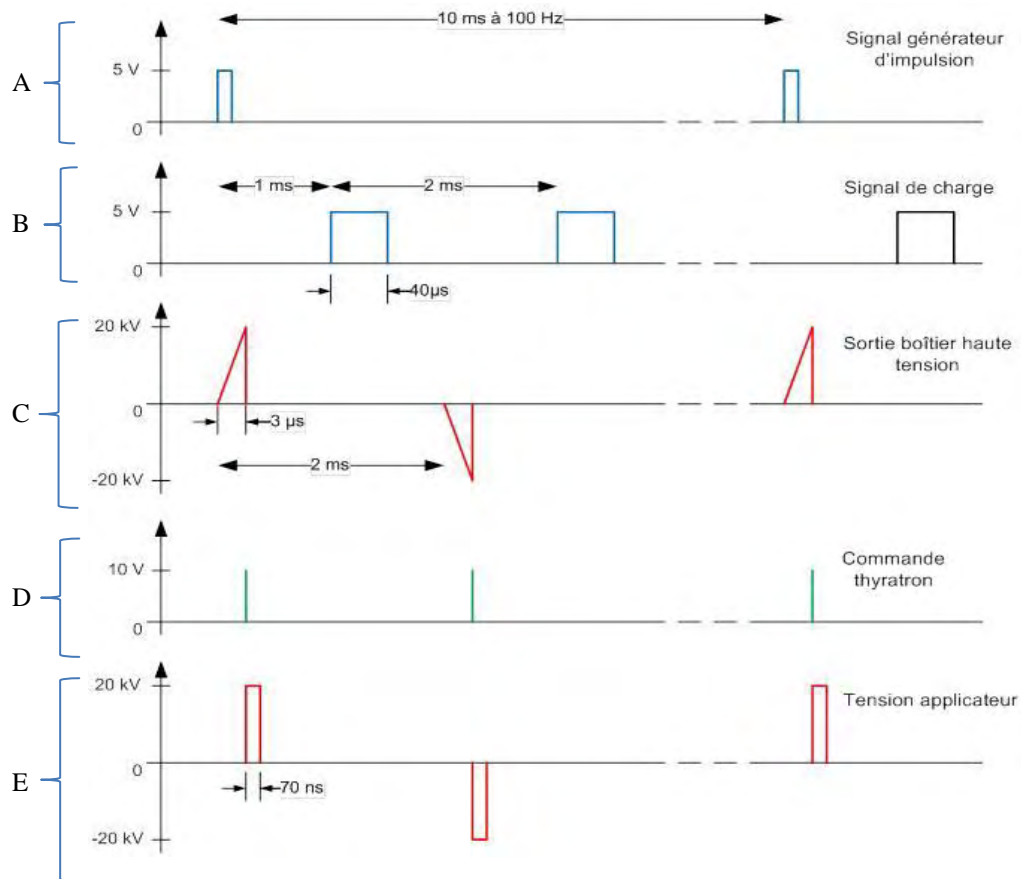


Figure 72 : Chronogramme du générateur G3.

La partie A schématise l'impulsion envoyée par le TTL. La partie B représente les deux signaux générés par le boîtier de commande lorsqu'il reçoit l'impulsion du TTL. La partie C représente la charge des condensateurs. La partie D correspond à l'impulsion permettant le déclenchement du thyatron et la partie E la tension aux bornes de l'applicateur.

I.1.4.3 Expérience effectués sur le site de VERI (VEOLIA) (pilote)

Des mesures de courant et de tension ont été réalisées sur le système pilote complet (Figure 73).

Conditions expérimentales :

- Générateur G3 branché sur un applicateur 2 mm d'impédance 100Ω
- Conductivité de l'eau = $2500 \mu\text{S}/\text{cm}$
- Débit de l'eau = $10 \text{ L}/\text{min}$
- Fréquence du générateur d'impulsion = 100 Hz (soit 2×100 impulsions/s sur l'applicateur)
- Sonde de tension : Tektronix P6015A (bande passante 75 MHz)
- Sonde de courant : Pearson 6595 (bande passante 150 MHz)

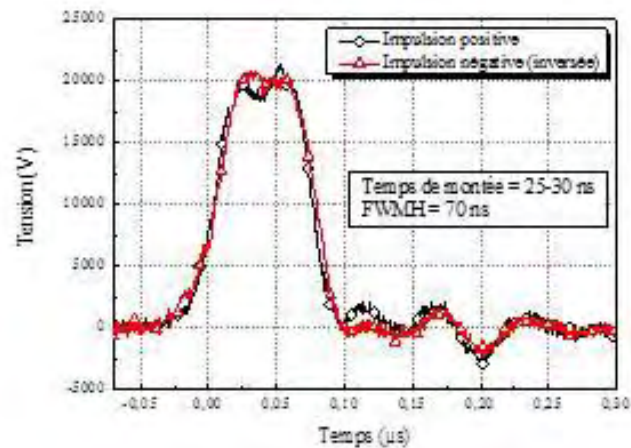


Figure 73 : Comparaison des impulsions positives et négatives.

Comme le montre la Figure 73 les amplitudes temporelles des deux impulsions de polarité différente se superposent bien. La durée de l'impulsion est celle attendue. Toutefois le temps de montée est lent (25 – 30 ns). Ceci est dû au thyatron Pulsedtech. En dépit d'essais et de contacts avec le fabricant, il n'a pas été possible d'améliorer ce temps de montée.

Le champ électrique n'est maximum que sur une durée de 45 ns.

La figure suivante présente les courbes de tension et de courant aux bornes de l'applicateur.

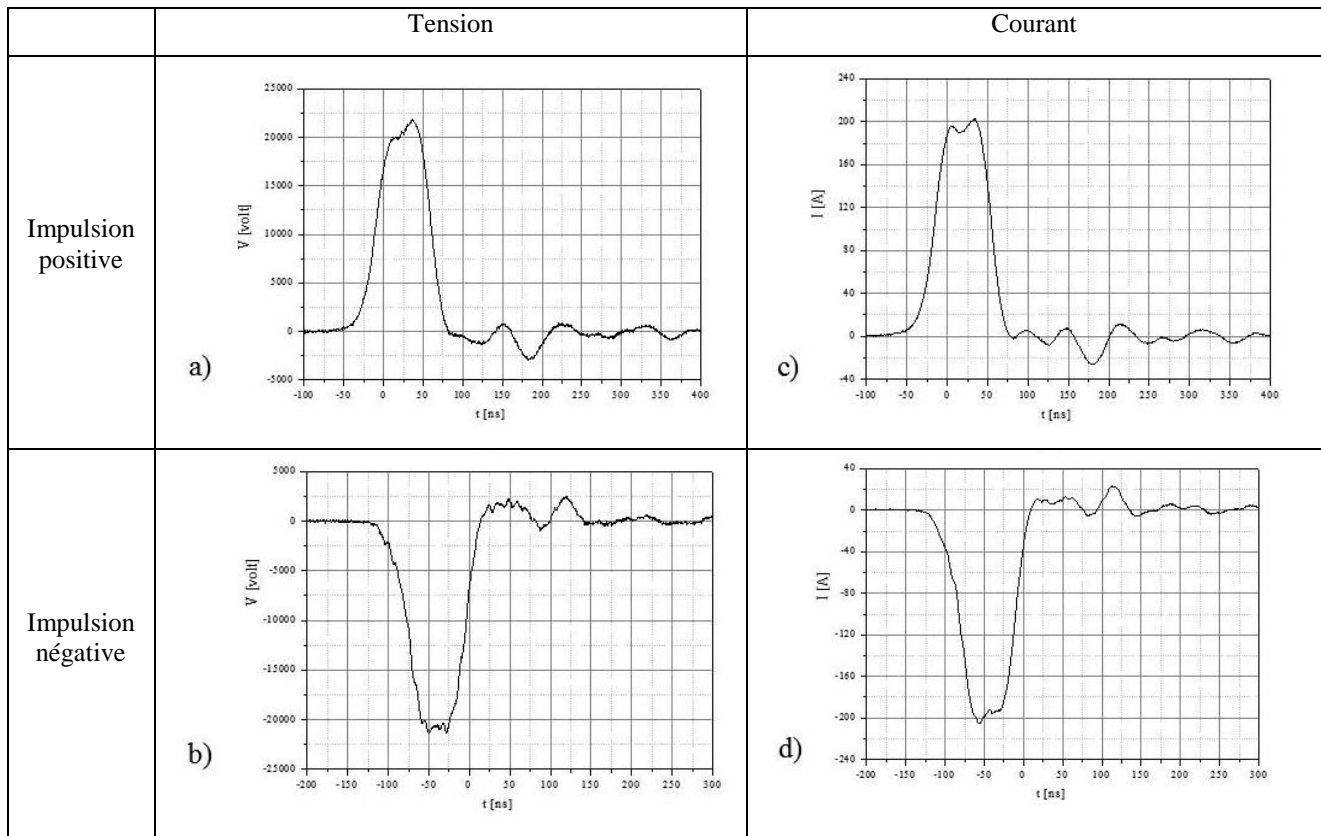


Figure 74 : Mesure de tension (a, b) et courant (c, d) des impulsions positives et négatives sur l'applicateur.



Les profils de l'impulsion positive et négative sont semblables, au niveau de la tension et du courant. Diviser U_{max} (20 kV) sur I_{max} (200 A) permet de retrouver la valeur de 100Ω . Une légère oscillation apparaît après l'impulsion pour les deux polarités.

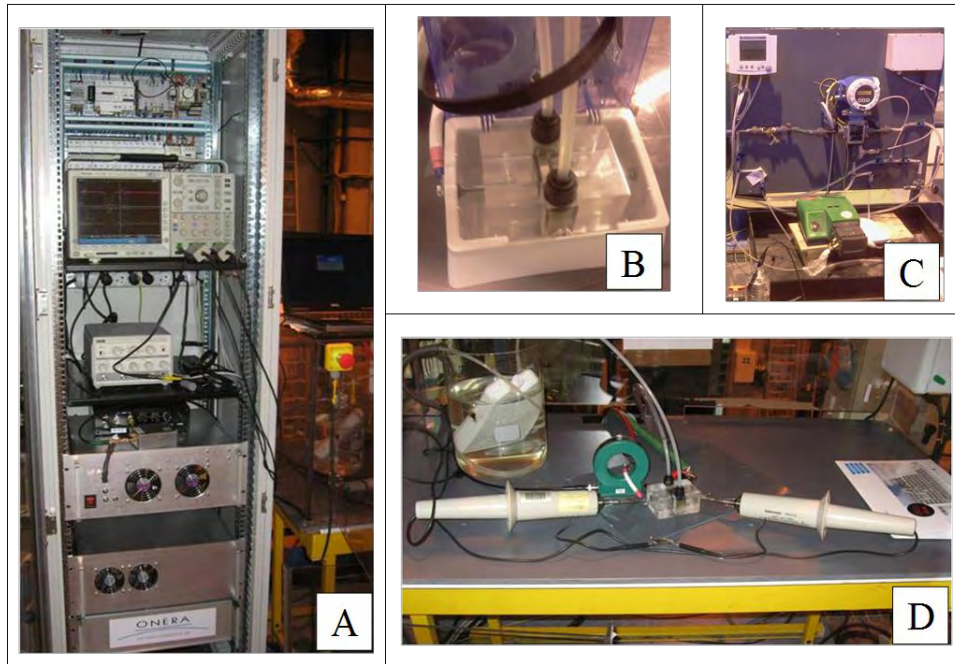


Figure 75 : Photographies de la baie du générateur G3 (A) et de l'applicateur flux 4 (B) avec sondes de tension et courant (D) et de la platine fluidique (C).



Figure 76: Partie fluidique (canalisation) du pilote REI.



I.1.4.4 Expériences effectuées sur le site de VERI (VEOLIA) (Laboratoire)

Après les essais pilotes, le générateur a été modifié pour être utilisé en laboratoire de la même façon que le G0 et le G2. Pour ces essais, des problèmes spécifiques au générateur ont fait que seules les impulsions négatives sont utilisées, et la tension maximale est diminuée. Le générateur a fonctionné sans problème pendant les quelques semaines d'essais en pilote. Ceci étant, son utilisation a été intensive pendant cette période.

Lors d'une des expériences, la tension minimum de chaque courbe de tensions (soit la valeur de tension au pic de l'impulsion négative) enregistrée régulièrement au cours des 5h d'expériences et aux bornes de l'applicateur est extraite puis reportée de façon à obtenir une courbe de dispersion comme avec le générateur G2 (*Figure 77* et *Figure 78*).

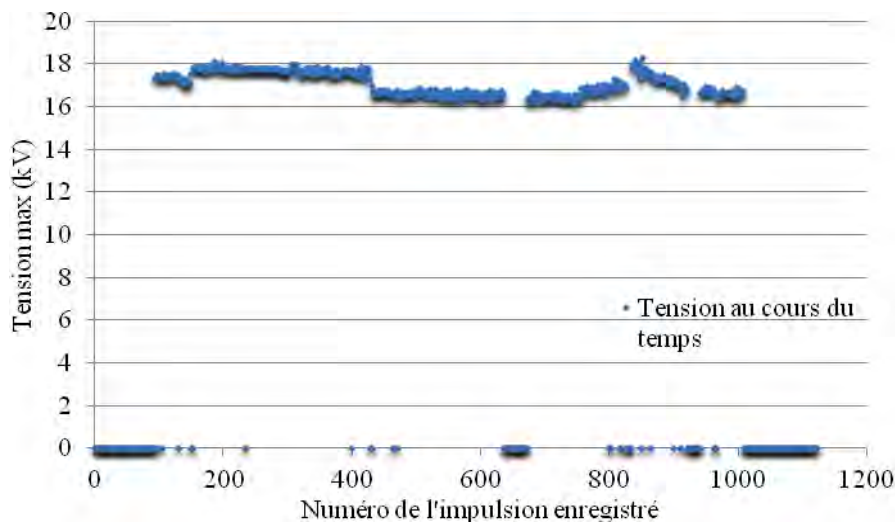


Figure 77 : Valeurs de la tension maximale des impulsions au cours du temps.

La tension varie entre 16 et 18 kV. Le champ électrique dans l'applicateur est donc compris entre $\frac{16}{0,2} = 80 \frac{kV}{cm}$ et $\frac{18}{0,2} = 90 \frac{kV}{cm}$.

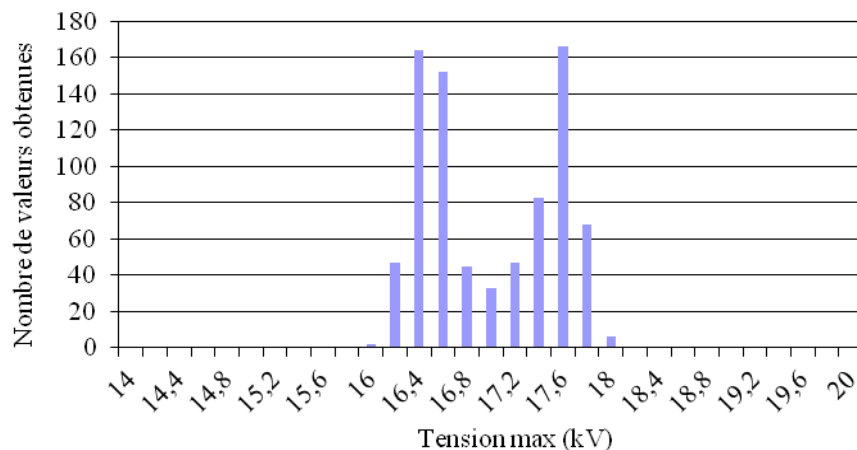


Figure 78 : Dispersion de la tension maximale des impulsions avec un pas de 0,2 kV.

Il apparait que la plupart des impulsions sont soit légèrement supérieures à 16 kV, soit légèrement inférieures à 18 kV. Etonnamment, il y a peu d'impulsions à 17 kV. Contrairement au générateur G2, il n'y a aucune impulsion inférieure 16 kV.

I.1.5. Conclusion

Dans cette section les générateurs livrés par l'ONERA aux partenaires de DEBACIEM ont été présentés. Les problèmes rencontrés ont permis de faire apparaître les forces et les faiblesses des générateurs développés. Ainsi, pour le générateur G2, le commutateur haute tension reste un des problèmes principaux (durée de vie limitée, et modification de la tension qu'il délivre au fur et à mesure de son utilisation). Tandis que pour le générateur G3, les problèmes d'isolation entraînent une baisse des performances à 20 kV. Une désynchronisation des impulsions négatives et positives a provoqué l'impossibilité de délivrer des impulsions bipolaires lors de l'adaptation du générateur en laboratoire. La monopolarité induit un risque d'une contamination électrochimique.

Ces difficultés techniques ne sont pas insurmontables, des considérations de temps et de budget ont orienté le choix de ces conceptions. D'un point de vue purement technique, il existe des technologies pour éviter ces problèmes.

I.2. APPLICATEURS

I.2.1. Principe

Les applicateurs sont constitués de deux plaques d'acier inoxydable faisant office d'électrodes. Les plaques peuvent prendre des formes diverses. Le fluide circule entre les électrodes. Plusieurs applicateurs ont été nécessaires pour résoudre des problèmes de volume mort et/ou d'isolation électrique qui sont apparus en cours de projet. Plusieurs espaces inter-électrodes ont également été testés pour modifier la valeur du champ électrique appliquée aux bactéries.

La géométrie d'électrodes plan-plan génère un champ électrique uniforme dans l'ensemble du volume contenu entre les électrodes. Cela permet de considérer que le volume d'eau est traité



uniformément. A l'inverse, une géométrie coaxiale aurait entraîné une non-uniformité du champ électrique entre les électrodes, rendant l'interprétation des expériences plus délicates.

L'impédance d'un applicateur est déterminée par la formule classique de calcul d'une résistance, la capacité de l'applicateur étant négligée :

Équation 14 : Impédance de l'applicateur.

$$R = \frac{L}{\sigma S}$$

Avec

- σ la conductivité électrique du fluide en S/m
- L la longueur en m
- S la section en m².

L'impédance de l'applicateur définit avec l'impédance de sortie du générateur, l'amplitude des impulsions. Une mauvaise adaptation d'impédance entre générateur et applicateur entraîne une baisse de l'amplitude des impulsions et une déformation de leur forme. De plus, des impulsions peuvent être réfléchies vers le générateur et occasionner la destruction de certains composants. Les dimensions des applicateurs sont donc liées aux générateurs utilisés.

L'espace inter-électrodes définit le volume pouvant être traité et impose l'amplitude des impulsions. Pour un champ électrique de 100 kV/cm, une tension de 20 kV est nécessaire sur 2 mm d'espace inter-électrodes.

Un applicateur se comporte comme une résistance avec une conductivité de 2500 μ S/cm (l'effet de capacitance peut être négligé). A chaque impulsion, un courant le traverse et la température de l'eau augmente sous l'effet de ce chauffage ohmique, ce qui a pour effet d'augmenter la conductivité de l'eau (qui dépend de la température), donc de diminuer la résistance de l'applicateur. A une température élevée, des bulles peuvent apparaître du fait de l'ébullition de l'eau. La présence de bulles va favoriser la formation d'arc électrique entre les électrodes. Pour le bon déroulement de l'étude, ces arcs doivent être évités. Il est également important d'éviter une trop grande variation de la conductivité de l'eau car en modifiant la résistance de l'applicateur, elle provoque une mauvaise adaptation de l'impédance avec le générateur. Cette mauvaise adaptation est susceptible de détériorer la forme de l'impulsion ou les composants du générateur. Ainsi les applicateurs en batch, dont l'eau ne circule pas, ne peuvent être soumis à un fort taux de répétition des impulsions, afin de permettre à l'eau de se refroidir suffisamment entre les impulsions. L'utilisation d'un flux d'eau permet d'utiliser des fréquences d'impulsion plus élevées car la chaleur est évacuée avec le liquide.



I.2.2. Appicateurs réalisés

Tableau 10 : Ensemble des applicateurs réalisés par l'ONERA dans le cadre du projet DEBACIEM.

Référence de l'applicateur	Dimensions des électrodes	Espace inter-électrodes en mm	\vec{E} (kV/cm)	Volume en μL	Impédance pour une conductivité de 2500 $\mu\text{S/cm}$	Générateur sur lequel l'applicateur est utilisé
batch 1	Diamètre 15 mm	2	100	350	45 Ω	G0
batch 2	Diamètre 15 mm	2	100	350	45 Ω	G0
batch 3	Demi-lune 10 mm	1	200	50	80 Ω sur 50 μL 100 Ω sur 40 μL	G0
flux 1	Carré 10 mm (angles arrondis)	2	100	200	80 Ω	G0, G1, G2, G3
flux 2	Rectangulaire 16x10 mm	4	50	640	100 Ω	-
flux 3	Rectangulaire 16x10 mm (angles arrondis)	4	50	588	109 Ω	-
flux 4	Rectangulaire 10x8	2	100	160	100 Ω	G3

Le premier applicateur construit pour les essais préliminaires (batch 0) a été confectionné par Vincent Blanckaert au CERPEM. Il était constitué d'une seringue modifiée de 10 mL où deux pastilles de métal étaient collées respectivement au poussoir et la tête de la seringue de telle sorte que l'espace inter-électrode soit de 2 mm.

Les figures ci-dessous présentent, sous forme CAO, les applicateurs suivants réalisés par l'ONERA. Les applicateurs de la *Figure 79* à la *Figure 82* ont été utilisés avec le générateur G0 dont le taux de répétition est faible et la durée de fonctionnement se limite à quelques heures par séquence. L'applicateur présenté en *Figure 82* a également été utilisé avec le G2, qui présente un taux de répétition plus grand que le G0 mais dont le fonctionnement se limite également à des séquences de quelques heures. Les applicateurs présentés en *Figure 84* et en *Figure 85* ont été plus spécifiquement réalisés pour le dispositif préindustriel. Ils sont plus robustes et la connexion des électrodes à la sortie du générateur se fait sans risque de claquage dans l'air. Ils permettent le passage d'un flux d'eau à une pression de travail maximum de 5 bars. Les connecteurs fluides sont de type « Legris » pour des tubes rigides dont le diamètre extérieur est de 6 mm.

Les applicateurs sont symétriques, le sens de branchement fluide ou électrique n'a pas d'influence sur le fonctionnement du système. Toutefois, l'ouverture d'évacuation de fluides de l'applicateur doit être dirigée vers le haut pour limiter l'apparition de bulles d'air dans le système. Pour les expériences en batch ou en flux les électrodes sont représentées respectivement avec une couleur rouge ou orange.

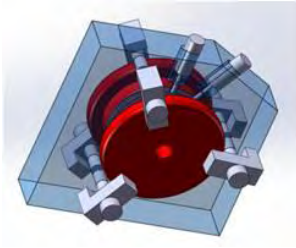


Figure 79 : Applicateur batch 1.

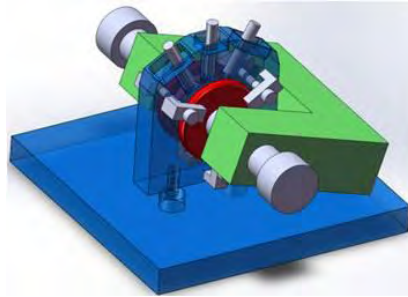


Figure 80 : Applicateur batch 2.

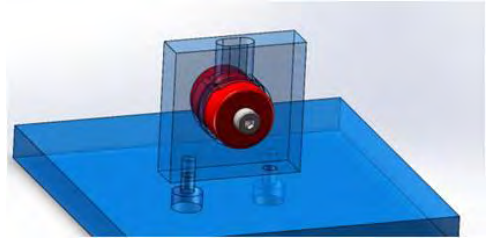


Figure 81 : Applicateur batch 3.

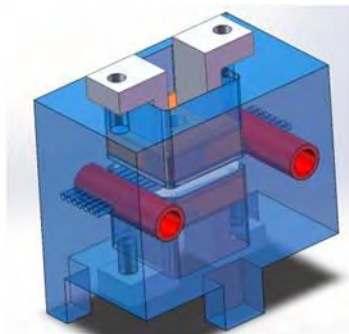


Figure 82 : Applicateur flux 1.

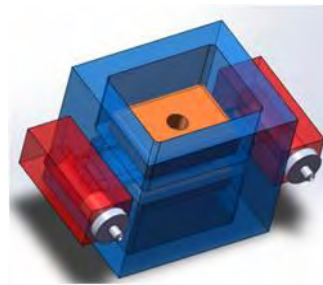


Figure 83 : Applicateur flux 2.

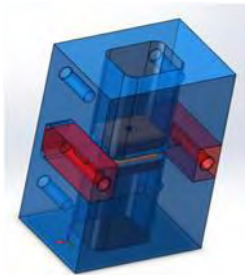


Figure 84 : Applicateur flux 3.

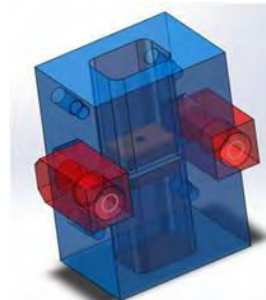


Figure 85 : Applicateur flux 4.

I.3. MISE EN PLACE DU MATERIEL ELECTRIQUE

Lors des expériences de décontamination, les impulsions sont enregistrées en début et en fin d'expérience. Ceci permet de vérifier régulièrement l'allure des impulsions (vérification : tension au pic des impulsions à 20 kV, rebonds faibles, front de montée conforme aux performances initiales). La conductivité, la température de l'eau et l'usure des composants peuvent en effet modifier l'allure des impulsions.

Afin de réaliser les enregistrements, une sonde diviseuse de tension (1 : 1000) connectée à un oscilloscope est branchée aux bornes des électrodes (masse de la sonde sur l'électrode branchée à la masse du générateur).

Le oscilloscope est connecté à un ordinateur *via* un port USB.



Un TTL est utilisé pour envoyer les impulsions de commande au générateur via un câble BNC. Chaque impulsion de 5 V du TTL déclenche une impulsion du générateur. La fréquence des impulsions du TTL permet donc de régler directement la fréquence des impulsions du générateur.

Pour réaliser les courbes de dispersion de la tension maximum au cours du temps, présentées dans les parties I.1.3.2.1, I.1.3.2.2 et I.1.4.4, un automate informatique a été réalisé.

L'automate informatique (créé avec « autoit »³⁰) permettant de récupérer les courbes affichées par « picoscope6 » (l'interface utilisateur fourni par le picoscope), met environ 10 s pour effectuer un enregistrement. En 10 s, il s'écoule 100 impulsions à 10 Hz, l'automate n'enregistre donc qu'une infime partie des impulsions délivrées. D'autre part, il ne peut enregistrer qu'une polarité, selon les paramètres fixés dans « picoscope6 ». En effet, pour que le picoscope enregistre une impulsion, il faut définir une valeur de déclenchement seuil. En choisissant une valeur de quelques kV positif, le picoscope affichera les quelques centaines de nanosecondes avant et après que la tension atteigne cette valeur. Ainsi, l'impulsion positive peut être enregistrée. Par le même principe, en choisissant un seuil de déclenchement de quelques kV négatifs, l'impulsion négative peut être enregistrée. Pour enregistrer les impulsions positives et négatives lors de la même expérimentation, il faudrait changer le signe de la valeur seuil après chaque enregistrement, ce qui compliquerait et ralentirait l'automate.

Les impulsions haute tension des générateurs sont dangereuses. Elles pourraient provoquer une électrocution des personnes s'y exposant. Pour éviter l'accessibilité aux parties nues sous tension, une cloche en plexiglass recouvre la partie applicateur, lorsqu'elle est ouverte, l'alimentation du générateur est interrompue. D'autre part, lorsqu'un des générateurs est en fonctionnement, l'accès au laboratoire est interdit à toutes personnes autres que le manipulateur. Enfin, les générateurs ne sont jamais laissés sans surveillance. Ce dernier point est important d'un point de vue sécurité, mais également dans le cas où il y a nécessité d'intervenir rapidement en cas de dysfonctionnement du système. Ces contraintes ont imposé un temps de traitement en continu d'une durée inférieure à dix heures.

³⁰ « autoit » est un langage de programmation de haut niveau (plus proche d'un langage naturel que les langages de bas niveau), permettant de simuler et d'automatiser des clics de souris ou l'appui sur des touches.

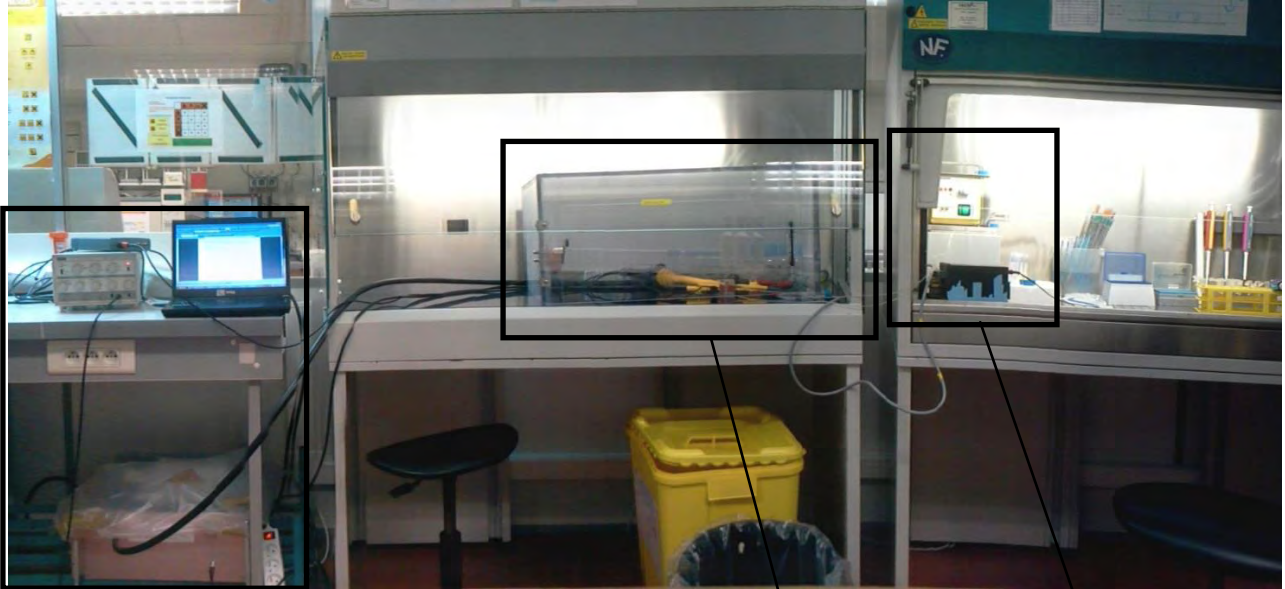
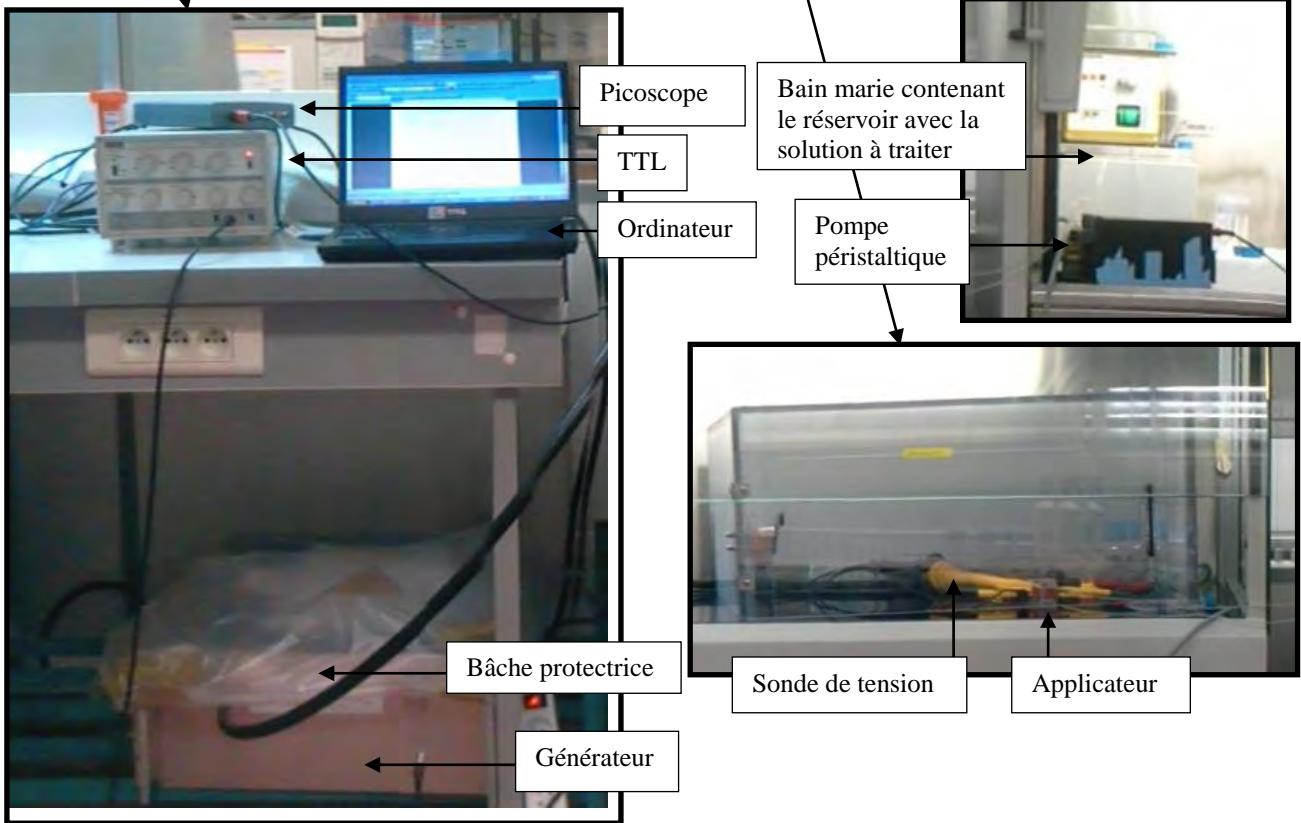


Figure 86: Panoramique du laboratoire lors d'une expérience.





I.4. GRANDEURS CARACTERISTIQUES

A partir des paramètres électriques et de la conductivité de l'eau, il est possible, par le calcul, de comprendre l'influence des impulsions sur les membranes des bactéries. Le calcul du temps de charge de la membrane τ permet d'évaluer $Vc(t)$, la cinétique d'induction de la différence de potentiel transmembranaire (TMP) en tout point de la cellule. Il est ainsi possible de déterminer si l'impulsion appliquée est suffisante à une perturbation membranaire.

I.4.1. Temps de charge de la membrane

Il a été montré dans la partie IV.8 que le temps de charge de la membrane (τ_b) se décrit selon la formule suivante :

$$\tau_b = \left(\frac{1 + 2v \cdot \rho_1}{1 - v} \cdot \frac{\rho_1}{2} + \rho_2 \right) \cdot Cm \cdot \left(\frac{D}{2} \right) \quad (\text{Équation 2})$$

- τ_b , le temps de charge d'une cellule (s).
- v la concentration volumique en bactéries (nombre de bactéries.L⁻¹).
- ρ_1 , la résistivité du milieu externe (Ωm).
- ρ_2 , la résistivité du cytoplasme des bactéries (Ωm).
- Cm , la capacitance surfacique de la membrane (F/m²).
- D , le diamètre de la bactérie (m).

Les bactéries mesurent généralement entre 0,5 et 10 μm . Leurs tailles peuvent varier en fonction du genre et de l'espèce, des conditions de culture (Schaechter et al., 1958), et du stade de croissance (Donachie, 1968). La taille de *E. coli* est comprise entre 0,5 et 3 μm (Cullum and Vicente, 1978). Les légionelles font 2 μm de long sur 0,3 à 0,9 de large, mais peuvent s'allonger jusqu'à devenir filamenteuse en cas de carence nutritionnelle.

Il existe deux grand types de morphologies bactériennes ; les coques sphériques et les bacilles (cas des *E. coli* et des légionelles) de forme plus oblongue. Les formules sont adaptées à la géométrie sphérique, mais offrent néanmoins une bonne approximation des valeurs pour des bactéries non sphériques.

Les calculs sont réalisés pour deux valeurs de diamètre différent : 1 μm et 5 μm . Ces valeurs encadrent les 2 possibilités extrêmes de présentation des bactéries dans l'applicateur : selon le plan horthogonal au champ (grand diamètre) ou parallèle au champ (petit diamètre).

On déduit du diamètre « d » le volume d'une bactérie M_b :

$$M_b = \frac{4}{3} \times \pi \times \left(\frac{d}{2} \right)^3$$

$$M_b = \frac{4}{3} \times \pi \times \left(\frac{1}{2} \times 10^{-6} \right)^3 = 5,2 \times 10^{-19} \text{ m}^3 = 5,2 \times 10^{-16} \text{ L.}$$

$$M_b = \frac{4}{3} \times \pi \times \left(\frac{5}{2} \times 10^{-6} \right)^3 = 6,5 \times 10^{-17} \text{ m}^3 = 6,5 \times 10^{-14} \text{ L.}$$



Donc pour un volume de 5 mL avec une concentration de 10^9 bactéries/mL, la part du volume cytoplasmique représente $5,2 \times 10^{-16} \times 5 \times 10^9 = 2,6 \times 10^{-6}$ mL avec $d=1 \mu\text{m}$ et $6,5 \times 10^{-14} \times 5 \times 10^9 = 3,3 \times 10^{-4}$ mL avec $d=5 \mu\text{m}$.

Ce volume est infime devant 1, v est donc négligé et $\frac{1+2v}{1-v} \approx 1$. La formule devient :

Équation 15 : Equation simplifiée du temps de charge.

$$\tau_b = \left(\frac{\rho_1}{2} + \rho_2\right) \cdot C_m \cdot \left(\frac{D}{2}\right) \quad (\text{Schoenbach et al., 2004})$$

Tableau 11 : Calcul du temps de charge.

Variables		Symbole	Valeur pour d = 1	Valeur pour d = 5	unité
Concentration volumique		v	Négligée	Négligée	Sans unités
Diamètre d'une cellule		D	1	5	μm
Milieu extérieur	Résistivité	ρ_1	4	4	$\Omega \cdot \text{m}$
	Conductivité	σ_1	2,5	2,5	mS/cm
Cytoplasme	Résistivité	ρ_2	1	1	$\Omega \cdot \text{m}$
	Conductivité	σ_2	10	10	mS/cm
Capacitance de la membrane plasmique		C_m	0,01	0,01	f/m ²
Constante de temps		τ_b	15	75	ns

La valeur de C_m est tirée de Schwan, 1963 et la valeur de σ_2 est tirée de Cole, 1937. Elles ont été utilisées dans Schoenbach et al., 2000.

Un condensateur est considéré comme complètement chargé quand le champ électrique est maintenu pendant un temps correspondant à $5 \times \tau_b$.

Les générateurs G0, G2 et G3 fournissent des impulsions d'environ 70 ns. Ainsi la charge est maintenue pendant seulement $4,5 \times \tau_b$ pour $d=1$ et $0,93 \times \tau_b$ pour $d=5$, la membrane n'atteint donc jamais le TMP stationnaire.

I.4.2. Différence de potentiel au niveau de la membrane

Grâce au calcul de τ_b et à la formule 3 mentionnée dans la partie IV.8, il est possible de déterminer la charge de la membrane pendant les 70 ns où le champ est maintenu.

Selon l'Équation 3,
$$\Delta V_c(t) = f \cdot |\vec{E}| \cdot \frac{D}{2} \cdot \cos(\theta) \cdot \left(1 - e^{-\frac{t}{\tau_c}}\right)$$

- τ_b , le temps de charge d'une cellule (s).
- t , le temps (s).
- D , le diamètre de la bactérie (m).
- $\Delta V_c(t)$, la variation de tension calculée au point considéré sur la membrane à l'instant t (V).
- f , le facteur de forme, sans unité.
- $|\vec{E}|$, l'intensité du champ électrique dans la cellule de décontamination (V/m).
- θ , l'angle formé par la direction du champ électrique appliqué et la normale à la membrane à l'endroit d'intérêt, exprimé en degré (°) dans la suite des calculs.



Notons qu'il est supposé que les propriétés diélectriques de l'enveloppe sont celles du milieu externe et qu'elles ne perturbent pas le champ au niveau de la membrane.

Concrètement, l'utilisation de $\cos(\theta)$ dans cette formule signifie que le TMP appliqué à la membrane varie en tout point de la surface de la cellule et dépend de l'angle formé entre la direction du champ électrique et le segment de droite passant par le centre de la cellule et par le point considéré sur la membrane (en assimilant la bactérie à une sphère).

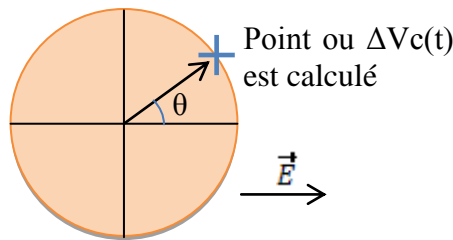


Figure 87: Schéma des valeurs caractéristiques utilisées dans la formule.

I.4.3. Cinétique de la charge

Les fronts de montée et de descente sont négligés dans la mesure où l'impulsion est considérée comme un rectangle parfait variant de 0 à 100 kV/cm.

Le facteur f choisit est 1,5, car les bactéries utilisées sont assimilées à une sphère.

La valeur de $\cos(\theta)$ choisie est 1 pour obtenir la valeur au point où \vec{E} exerce l'effet le plus important.

Grâce à l'Équation 3,

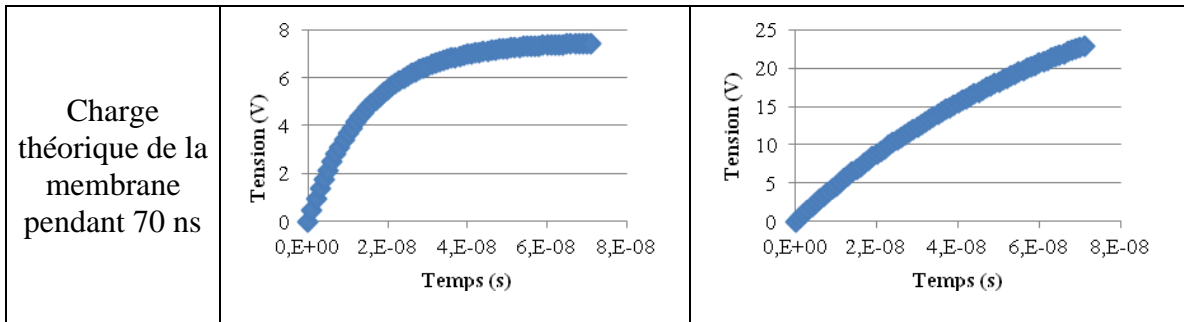
$$\Delta Vc(t) = 1,5 \cdot 10^7 \times \frac{1 \times 10^{-6}}{2} \times 1 \times \left(1 - e^{-\frac{t}{15 \times 10^{-9}}}\right) \text{ avec } D = 1 \mu\text{m}$$

$$\Delta Vc(t) = 1,5 \cdot 10^7 \times \frac{5 \times 10^{-6}}{2} \times 1 \times \left(1 - e^{-\frac{t}{75 \times 10^{-9}}}\right) \text{ avec } D = 5 \mu\text{m}$$

Valeurs remarquables :

Tableau 12: Valeurs remarquables de $\Delta Vc(t)$

	D = 1 μm	D = 5 μm
t = 1	0,48 V	0,50 V
t = 70	7,43 V	22,8 V
t $\rightarrow \infty$	7,50 V	37,5 V



Comme mentionné dans la partie IV.8, un TMP de 200 mV suffit à déstabiliser la membrane. Cette valeur critique est atteinte dès la première nanoseconde de fonctionnement pour les deux valeurs de D.

Après 70 ns, et si la membrane restait imperméable, le TMP serait d'environ 7,5 V avec $D = 1 \mu\text{m}$ et 23 V avec $D = 5 \mu\text{m}$. Et quand $t \rightarrow +\infty$, le TMP n'augmenterait quasiment plus avec $D = 1 \mu\text{m}$ (car la charge maximum est presque atteinte), alors qu'il atteindrait 37,5 V avec $D = 5 \mu\text{m}$.

Sachant que la membrane se perméabilise sous l'effet du champ électrique, $\Delta V_c(t)$ chute et reste en réalité stabilisé sous le seuil de 0,2 V (Frey et al., 2006).

I.4.4. Prise en compte du front de montée

Les calculs précédents ont permis de comprendre l'évolution de la charge de la membrane sous une impulsion théorique « parfaite » de 100 kV/cm (sans front de montée).

En réalité, le front de montée observé est de 20 ns. Cette caractéristique est prise en compte dans les calculs suivants afin de mieux correspondre aux valeurs expérimentales.

Les 100 kV/cm sont atteints progressivement en 20 ns, cela signifie que toutes les nanosecondes, le champ est augmenté de $100/20 = 5 \text{ kV/cm}$.

On obtient ainsi le tableau suivant :

Tableau 13 : Valeur de tension au niveau de la membrane sous une charge progressive en 20 ns jusqu'à 100 kV/cm.

Temps (ns)	0	1	2	3	4	19	20
Champs électrique (kV/cm)	0	5	10	15	20	95	100
$\Delta V_c(t)$ (V) pour $D = 1 \mu\text{m}$	0	0,024	0,094	0,20	0,35	5,1	5,5
$\Delta V_c(t)$ (V) pour $D = 5 \mu\text{m}$	0	0,025	0,099	0,22	0,39	7,97	8,78

La TMP critique n'est donc atteinte qu'au bout de 3-4 ns et sera maintenue pendant le reste de l'impulsion.



I.4.5. Conclusion

Ces calculs montrent que la perturbation membranaire affecte la membrane en quelques nanosecondes. Il n'est néanmoins pas possible de faire un lien entre perméabilisation de la membrane et perturbation membranaire. Ladite perturbation sous contrainte électrophorétique n'étant maintenue que 70 ns, elle laisse peu de temps à un passage d'éléments à travers elle.

La membrane des bactéries est naturellement chargée, ce phénomène est nommé «différence de potentiel de membrane ». Cette différence de potentiel est due à la répartition de part et d'autre de la membrane d'ions Na^+ , K^+ via des pompes et au maintien continu d'un gradient de protons H^+ . Ce gradient de proton est utilisé en tant que « force proton-motrice » pour renouveler l'ATP qui permet d'apporter de l'énergie par dissociation d'un phosphate dans un grand nombre de réactions biochimiques. Le potentiel peut atteindre -100 mV. Ainsi, la répartition des charges à l'hémisphère de la bactérie orientée du côté de l'électrode positive est légèrement différente de celle à l'hémisphère orientée du côté négatif. Cette différence n'a pas été prise en compte dans les calculs car elle est minime sachant que ΔV_c vaut déjà plus de 200 mV 3 ns après le début de l'impulsion.

Pour ces calculs, l'impulsion est considérée comme parfaitement « carrée » c'est à dire qu'elle passe instantanément de 0 à 20 kV. En pratique, le front de montée des impulsions délivrées par les générateurs atténue quelque peu le phénomène.

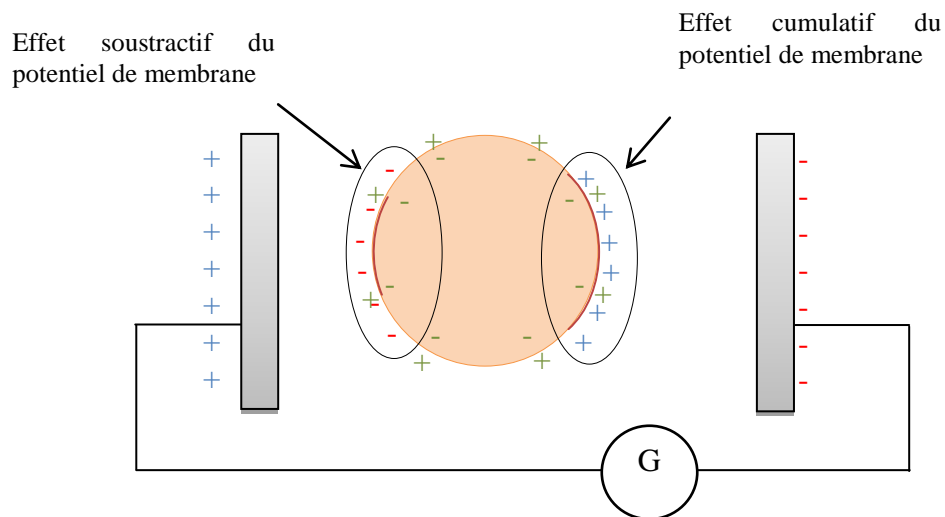


Figure 88 : Répartition des charges électriques due au potentiel de membrane et au champ électrique généré dans l'applicateur.

II. DESCRIPTION DES BANCS D'ESSAIS

Le principe des expériences en laboratoire est de reproduire à petite échelle les conditions réelles de fonctionnement prévues en pilote. Cette échelle est indispensable car par rapport à l'échelle pilote elle permet d'optimiser les conditions de fonctionnement de la technologie en réalisant des tests plus rapidement, plus facilement et à moindre coût.



La mise en place doit prendre en compte des aspects de sécurité. Une cloche de protection permet d'empêcher l'accès aux parties nues sous tension : si l'une des portes s'ouvre, l'alimentation du générateur est coupée, et les impulsions ne sont plus délivrées.

- Si le mode de traitement est le flux ouvert, deux tubes sont utilisés, l'un pour la solution à traiter, l'autre pour récupérer la solution après traitement.
- Si le mode de traitement est le flux fermé, un seul tube est utilisé, la solution avant traitement et après traitement est mélangée dans le même tube. Le graphique montre l'enregistrement du courant et de la tension délivrée par le générateur G0.

Pour toutes les courbes d'abattements des essais en flux, les courbes contrôles sont représentées en mauve, et les courbes essais sont représentées en bleu.

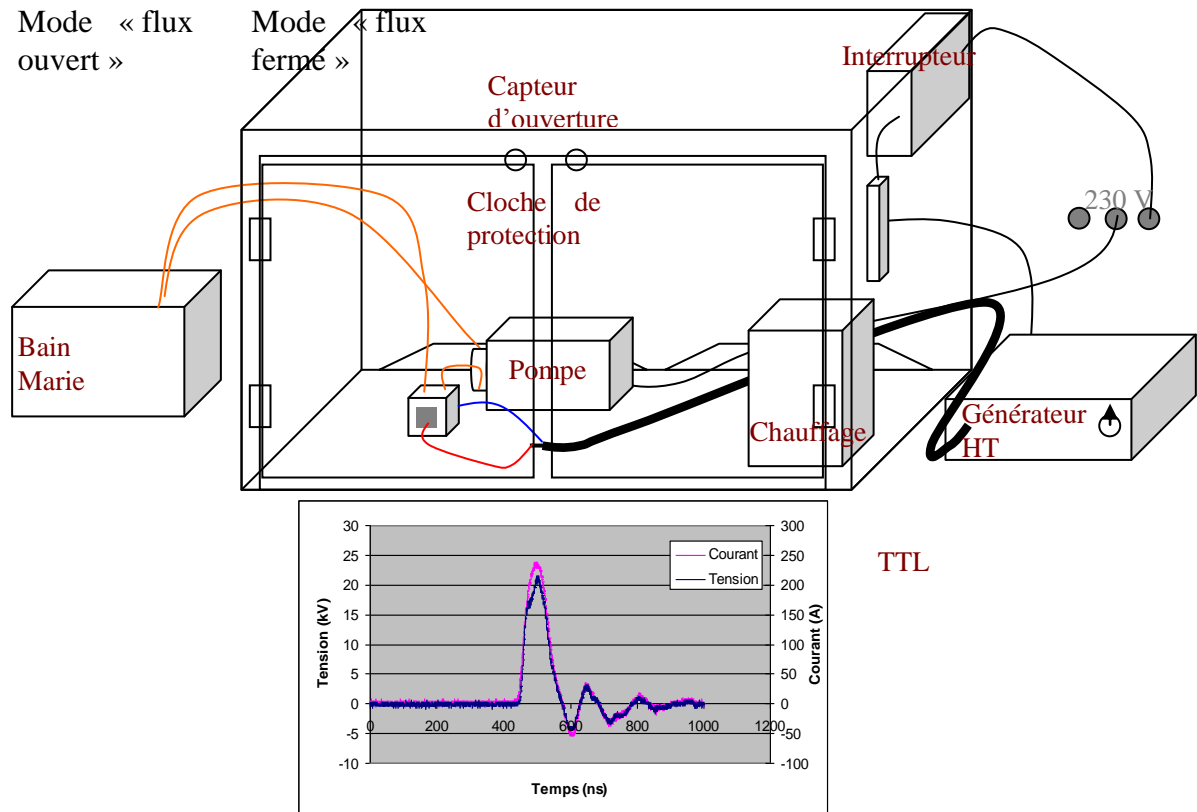


Tableau 14: Schéma des expériences en flux ouvert et fermé.

Au cours des différentes expériences en laboratoire, il a fallu adapter aux systèmes générateur / applicateur des conditions de fluidiques très diverses. En effet, des premières aux dernières expériences, le volume total traité est passé de 5 à 500 mL et le débit de $1 \mu\text{L/s}$ ($3,6 \times 10^{-6} \text{ L/h}$) à 30 L/h.

Différentes associations de tuyaux et de pompes péristaltiques ont été utilisées pour s'adapter à ces conditions.



Pour les expériences avec le G0, nécessitant de faibles débits, la pompe péristaltique utilisée permet l'entraînement du liquide au travers de tubes souples d'un diamètre interne de moins de 1 mm.

Pour les expériences avec le G2, la pompe péristaltique choisie permet l'utilisation de tuyau souple dont le diamètre interne est inférieur à 10 mm.

Avec le G3, la pompe choisie pour les expériences « pilote » est une pompe d'échelle semi-industrielle à double tête permettant de générer un flux rapide et homogène. Pour les expériences en laboratoire, la pompe choisie est moins massive mais accepte des tuyaux dont le grand diamètre est supérieur à 10 mm.

Dans le cadre de ces études en flux, il est nécessaire de considérer le débit en fonction du diamètre des tuyaux. Il est à noter que les galets de la tête de la pompe péristaltique entraînent d'autant plus d'eau que le volume dans le tuyau est grand à l'endroit où ils exercent leur pression. L'objectif étant de se placer dans des conditions où le volume d'eau de la dérivation est négligeable face au volume total d'eau à traiter. Le volume d'eau en circulation dans les tuyaux doit donc être minimisé. Il faut au minimum que le volume d'eau mis en jeu dans la dérivation et l'applicateur soit inférieur au volume total d'eau à traiter, ceci pour que la boucle soit toujours remplie d'eau. En effet, si tout le volume d'eau à traiter est aspiré dans la dérivation avant qu'il ne revienne remplir le récipient de stockage, de l'air sera aspiré dans la dérivation. Si de l'air s'immisce dans l'espace inter-électrode, le champ électrique créera un champ électrique dans l'air susceptible de détériorer les électrodes et de biaiser les résultats d'abattelements.

Les tuyaux utilisés pour les expériences G0 ont un très petit diamètre. Le volume d'eau dans la dérivation peut être négligé par rapport au volume total de traitement. Le volume d'eau dans la dérivation des expériences réalisées avec le G2 reste faible face aux expériences de 50 mL. Néanmoins, il est trop important pour les expériences G2 utilisant un volume total de 5 mL. Pour ces expériences, le diamètre du tuyau au niveau de la pompe reste inchangé, mais les tuyaux reliant le récipient de stockage, la pompe et l'applicateur sont changés pour des tuyaux de plus faibles diamètres. Pour les expériences avec le G3, la même technique est utilisée, mais le diamètre des tuyaux de liaison reste supérieur à ceux des expériences G2. Des tuyaux trop petits induiraient des pertes de charges trop importantes et freineraient ainsi le débit.

III. MILIEU ET MATERIEL BIOLOGIQUE

III.1. SOUCHES BACTERIENNES

En raison de la faible vitesse de croissance des légionelles et des contraintes dues à sa pathogénicité, le choix s'est imposé d'effectuer la majorité des expériences sur *E. coli*. En effet, pour apporter une compréhension de l'efficacité de tel ou tel pattern d'impulsion nsCEP, la souche importe peu, dès lors que ces patterns sont toujours comparés avec la même souche.

III.1.1. Souche modèle : *Escherichia coli* (*E. coli*)

E. coli appartient à la famille des entérobactéries, c'est à dire qu'elle vit généralement dans le tube digestif des vertébrés, bien qu'elle puisse se développer dans d'autres niches écologiques. C'est un bacille Gram négatif ; bacille car elle se présente sous la forme de bâtonnet, Gram négative car une membrane externe recouvre sa paroi comme le montre la *Figure 89*.



Elle se développe préférentiellement en utilisant l'oxygène pour réaliser la respiration, mais elle est capable de réaliser la fermentation pour produire son énergie en l'absence d'oxygène. De ce fait, elle est qualifiée d'aérobie facultative.

Il existe un très grand nombre de *E. coli* différentes. Elles sont généralement classées selon leurs sérotypes, qui permettent de les différencier selon l'étude de certains antigènes (antigène somatique, antigène flagellaire, antigène de surface).

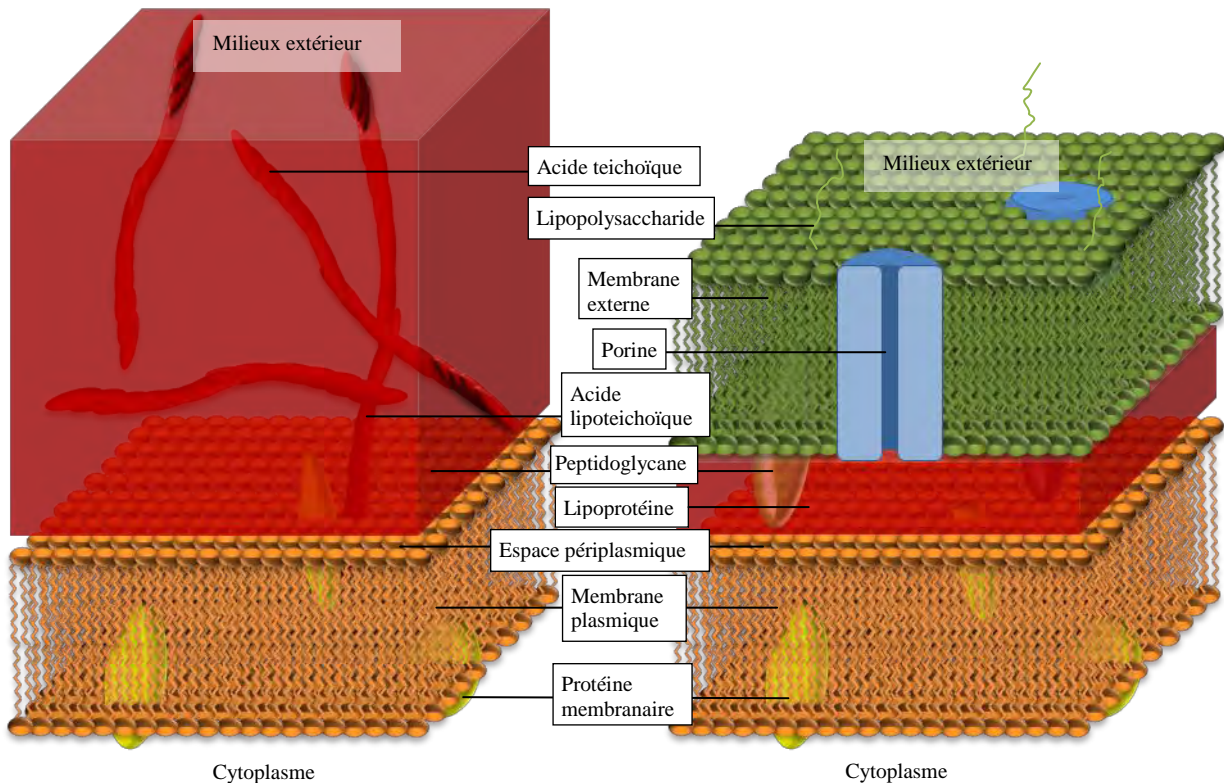


Figure 89: Représentation des parois et membranes des bactéries Gram positif (à gauche) et Gram négatif (à droite).

E. coli est une espèce modèle. C'est la plus utilisée en microbiologie car elle est le plus souvent non pathogène, facile à cultiver et présente une capacité de prolifération rapide. En effet, car elle est prototrophe, les milieux de cultures classiques suffisent à son bon développement. Rapide, car en conditions optimales elle a un temps de génération en phase exponentielle de croissance de 20 minutes seulement.

Elles peuvent être stockées plusieurs semaines à 4°C sous forme d'unités formant colonies (UFC) sur boîte de Petri, et plusieurs mois à -20°C dans son milieu de culture liquide congelé en présence de glycérol. Régulièrement, une UFC est repiquée pour maintenir la souche revivifiable.

Les milieux généralement utilisés pour leur culture sont les milieux « LB » pour Lysogeny Broth. Il est composé de triptone, d'extrait de levures et de NaCl.

Selon la concentration en NaCl, il est qualifié de « Miller », « Lennox » ou « Luria ». Environ 20 g de cette poudre est dissoute dans une bouteille de 1 L d'eau osmosée. Le bouillon ou milieu est alors stérilisé par autoclavage, puis conservé à 4°C.

La souche utilisée pour la plupart des expériences réalisées au cours de cette étude est *E. coli* BL21(DE3) provenant du laboratoire de l'IPBS.



Cette souche est très utile en biotechnologie pour synthétiser des protéines *in vitro*³¹. Dans le cas qui nous concerne, *E.coli* BL21(DE3) a été choisie car elle est non pathogène et semble répondre aux champs électriques microsecondes de façon proche à celle de *Legionella pneumophila* (*L. pneumophila*) (travaux antérieurs de l'IPBS).

III.1.2. Souche de validation : *Legionella pneumophila*

Les quelques expériences sur *Legionella pneumophila* ont été réalisées pour mesurer les différences avec *E.coli*BL21(DE3), afin d'apprécier la spécificité de souche et conclure quant à la possibilité de l'application industrielle de cette technologie dans la décontamination des TAR.

La souche utilisée est une *Legionella pneumophila* séro groupe 1 (Lps1) issue d'une souche isolée de l'environnement suite à des analyses de qualité d'eau dans un réseau d'eau chaude. Elle a été identifiée en tant que Lps1 par un « test au latex ». Les repiquages permettant de maintenir la souche revivifiable à l'infini se font soit directement avec de la culture « fraîche » soit en faisant repartir des aliquotes congelés à -20°C avec 30% de glycérol.

III.1.2.1 Culture en milieu solide

La norme AFNOR (NF T 90-431) préconise l'utilisation de deux géloses pour le dénombrement des légionelles dans un échantillon : le milieu de base « Buffered Charcoal Yeast Extract with α -ketoglutarate » (BCYE α) et le milieu complet « Gélose Vancomycine Polymyxine Cycloheximide » (GVPC).

Pour les cultures sur boîtes de Pétri réalisées dans le cadre de ce projet, le milieu utilisé est le milieu GVPC. Il est acheté chez bioMérieux© directement coulé dans des boîtes de Petri. C'est un milieu spécifique mais aussi sélectif. En effet, il contient des antibiotiques limitant le développement d'autres souches que les légionelles. La plupart des expériences sont réalisées en laboratoire, avec des suspensions ne contenant que des légionelles. Dans ces cas précis, l'intérêt de la sélectivité se limite à diminuer l'influence d'éventuelles contaminations de la suspension par des microorganismes exogènes au cours des expériences.

Pour certaines expériences, les légionelles ont été dénombrées dans de l'eau provenant d'un réseau d'eau contaminée. Pour dénombrer les légionelles dans ce milieu non spécifique et réel, il est primordial de disposer d'un milieu sélectif, qui empêchera aux bactéries autres que les légionelles de former des UFC.

III.1.2.2 Culture en milieu liquide

Il n'y a pas de recommandations pour la réalisation de cultures en milieu liquide car la culture liquide n'intervient pas directement dans le dénombrement des légionelles dans la méthode normalisée NF T 90-431.

La réalisation des cultures de légionelles est prise en charge par le centre d'analyses environnementales (CAE) qui est le pôle d'expertise analytique de Veolia en France.

³¹ L'insuline humaine utilisée par les diabétiques et les hormones de croissances humaines utilisées pour soigner le nanisme sont produites *in vitro* par des levures ou des bactéries dans lesquelles a été insérée la séquence d'ADN humain codant pour l'une ou l'autre.



Les légionelles sont auxotrophes à la cystéine. Il faut leur en fournir dans le milieu de culture. Elles ont donc besoin d'un milieu spécifique pour se développer.

Le milieu le plus souvent utilisé (Alleron, 2008; Girardin, 2009) pour les cultures liquides est le « Buffered Yeast Extract with α -ketoglutarate » (BYE α). Sa composition est identique au BCYE α mais ne contient pas d'agar ni de charbon pulvérulent. Il est réalisé en laboratoire de la façon suivante :

- 2,3 g d'extrait de levure
- 1,2 g de tampon ACES (N-(2-Acetamido)-2-aminoethanesulfonic acid)
- 0,2 g de ketoglutaric acid
- 200 mL qsp d'eau distillée
- ajustement avec du KOH à pH 6,9+/-0,2

Autoclave 15 min, 121 °C

Extemporaneément :

- 0,08 g de L-cystéine
- 0,05 g de pyrophosphate de fer

L'ajout de la L-cystéine et du pyrophosphate de fer est réalisé lorsque la température est redescendue en dessous de 50°C car ces éléments sont thermosensibles. La stérilisation du milieu ne pouvant se faire par autoclavage, elle est assurée par filtration sur membrane de nitrocellulose 0,22 μ m.

L'ensemencement d'un bouillon de 50 mL est réalisé avec 1 à 3 colonies de la souche Lps1 environnementale provenant d'une culture sur gélose GVPC ou BCYE de moins de 3 jours, (isolation et identification de la souche préalable). Puis l'incubation est réalisée au bain-marie (37°C, agitation 95+/-5 Tr/min). Le temps nécessaire à atteindre la phase stationnaire varie entre 3 et 5 jours.

III.1.3. Préparation des suspensions « d'eau contaminée » à partir des cultures

III.1.3.1 Généralités

Les populations de bactéries qui se développent dans l'eau ou le biofilm n'ont pas le même comportement que celles se développant dans des milieux de culture.

La croissance des bactéries en milieu riche non renouvelé est bien connue. Elle se décompose en plusieurs phases :

- 1) La phase de latence : elle dure de l'ensemencement aux premières multiplications cellulaires. Elle se caractérise par une modification de l'activité métabolique des bactéries, leur permettant de s'adapter au nouveau milieu.
- 2) La phase d'accélération : Les cellules mères commencent à se diviser.
- 3) La phase de croissance exponentielle : Les cellules filles se divisent à leur tour, donnant d'autres bactéries qui se diviseront aussi rapidement. La concentration en bactéries augmente continuellement, et cette augmentation est de plus en plus grande au fur et à mesure que le nombre de bactéries augmente. Comme le temps entre deux divisions est constant (bien que spécifique à la souche étudiée : 20 min pour *E. coli*, 3 h pour *L. pneumophila*) l'accélération de la croissance est constante.
- 4) La phase de décélération : Elle intervient lorsque le milieu devient moins riche en éléments nutritionnels et plus hostile du fait de la consommation des nutriments par les bactéries et de leurs rejets de sous-produits métabolisés. Certaines bactéries ne se divisent plus mais la



population augmente encore car il y a globalement plus de cellules qui se divisent que de cellules qui meurent.

- 5) La phase plateau : Le milieu de culture s'appauvrit encore. Le nombre de bactéries qui meurent et de bactéries qui se divisent s'équilibre. Le nombre de bactéries reste constant.
- 6) La phase de déclin : Beaucoup de cellules meurent et les cellules ne se divisent plus. La population diminue.
- 7) La phase cryptique : Quelques cellules se divisent grâce aux nutriments stockés dans les cellules mortes, qui sont relarguées dans le milieu.

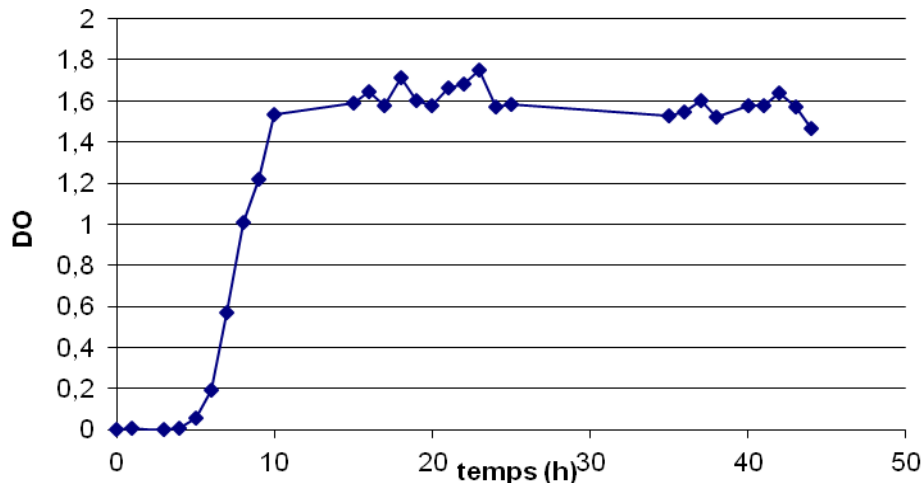


Figure 90: Courbe de croissance de *E. coli* BL21(DE3), basée sur la mesure de la densité optique à la longueur d'onde de 600 nm (à λ_{600}).

Une colonie de *E. coli* BL21(DE3) est incubée dans 200 mL de milieu de culture LB (lysogeny broth). L'incubation est réalisée dans un erlenmeyer de 500 mL, à 37°C et sous une agitation de 230 rpm.

III.1.3.2 Principe du protocole expérimental

Pour pouvoir montrer des abattements conséquents, il faut disposer d'une eau fortement chargée en bactéries. En effet, l'abattement se calcule en faisant le rapport entre les concentrations initiales et finales. Plus l'écart est grand entre ces deux valeurs, plus l'abattement sera grand. La première étape de tous les protocoles de traitement consiste donc à réaliser une culture pour produire un très grand nombre de bactéries. Elles sont récupérées pour être suspendues dans de l'eau de même nature que l'eau de TAR stérilisée (appelée « eau recomposée » voir Partie V -III.2 Eau recomposée).

Pour ce faire, les cultures sont incubées dans leurs milieux nutritifs (conformément aux indications des paragraphes précédents) jusqu'à ce que la population bactérienne soit en phase plateau. Ainsi un maximum de bactéries est obtenu en un minimum de temps.

Elles sont ensuite centrifugées 20 min à 3000 g. Le surnageant est éliminé et le culot est suspendu dans de l'eau recomposée. La suspension subit une étape de centrifugation avec des conditions identiques à celles précédemment utilisées. L'opération est répétée deux fois. Suite à ces deux « lavages », elles sont maintenues à 33°C pendant 1 h. Cette phase d'incubation prétraitement permet de laisser le temps aux bactéries de recouvrer un métabolisme adapté aux milieux pauvres, plus proche de celui qu'elles auraient si elles s'étaient intégralement développées dans de l'eau de TAR.



III.2. EAU RECOMPOSEE

L'eau de TAR possède une composition particulière due à son séjour dans les canalisations et à une concentration ionique élevée permanente due à une évaporation. Divers produits sont ajoutés afin de limiter l'entartrage, la corrosion des canalisations, mais aussi le développement bactérien.

Afin de permettre une bonne répétabilité et reproductibilité des conditions testées en laboratoire, il est nécessaire d'avoir une matrice eau dont la composition est constante. C'est pourquoi, il est préférable de réaliser une eau de laboratoire, plutôt que d'utiliser une eau réelle (l'eau de la TAR pilote). Il est nécessaire de déterminer les caractéristiques moyennes de l'eau de TAR sur une longue période.

III.2.1. Données réelles (eau pilote TAR)

Selon les analyses régulières qui ont été réalisées par le CAE³², l'eau de la TAR pilote présente la composition moyenne en ions suivante :

Tableau 15: Concentration des principaux ions dans l'eau du pilote TAR.

Ions	Concentration sur toute la période étudiée	Concentration en période normale de fonctionnement	Concentration de l'eau recomposée
[Cl ⁻]	80 mg/L	100 mg/L	100 mg/L
[SO ₄ ²⁻]	160 mg/L	200 mg/L	200 mg/L
[Ca ²⁺]	6,5 mg/L	5 mg/L	5 mg/L
[Mg ²⁺]	1,5 mg/L	1 mg/L	1 mg/L
[Fe ²⁺ /Fe ³⁺]	200 µg/L	100 µg/L	100 µg/L
[Na ⁺]	-	-	120 mg/L

Ces données sont les moyennes issues des valeurs présentées dans la Figure 91.

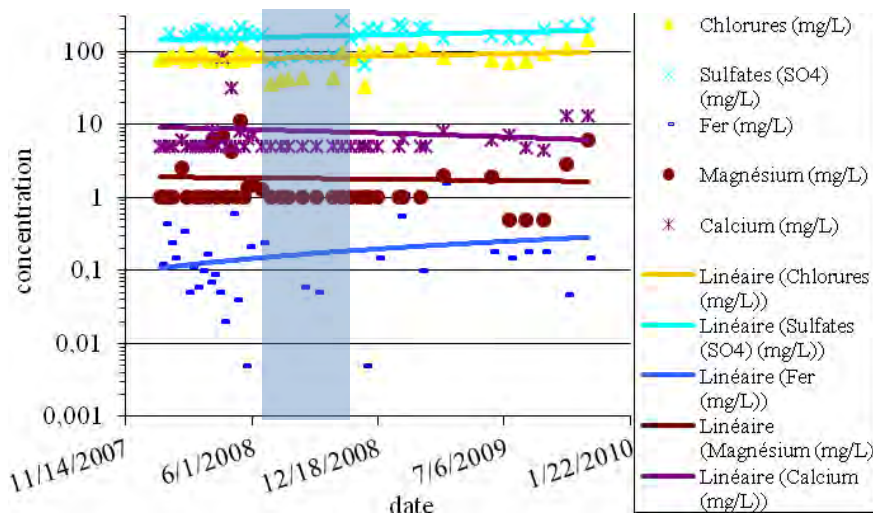


Figure 91 : Mesure de la qualité de l'eau de TAR au niveau ionique sur la période de novembre 2007 à février 2010.

³² Le Centre d'Analyses Environnementales ou CAE est le pôle d'expertise analytique de Veolia en France.



Les données obtenues lorsque la TAR ne fonctionnait pas en mode normal (arrêt de l'échange thermique, ou introduction inhabituelle de solutions dans l'eau du circuit pour divers tests) ne doivent pas être prises en compte. Ainsi, ces valeurs (mentionnées en bleu sur le graphique) sont éliminées dans le calcul des moyennes des concentrations en ions. Pour les ions majoritaires, les quantités présentes dans l'eau du pilote sont indiquées dans le *Tableau 15*.

Par ailleurs, certains paramètres ne faisant pas l'objet d'analyses au CAE sont connus tels que :

- La concentration en ions sodium (120 mg/L) suite à l'utilisation d'un adoucisseur remplaçant les ions calcium par des ions sodium
- La présence de traitement anticorrosion dont la concentration est de 90 mg/mL.
- L'ensemble des espèces d'ions et l'apport d'autres éléments confèrent à l'eau de TAR un pH de 9,1 et une conductivité de 2500 $\mu\text{s/cm}$.

Dans l'eau représentative de l'eau de TAR, les ions Ca^{2+} , Mg^{2+} , $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ et le traitement anticorrosion sont en faibles concentrations. Ce dernier est négligé, mais les ions précités sont susceptibles d'intervenir dans la croissance bactérienne.

L'eau recomposée est alors réalisée selon les concentrations décrites dans le *Tableau 15*. Le pH est ajusté à 9,1 et la conductivité à 2500 $\mu\text{s/cm}$.

III.2.2. Composition des solutions tampons

Afin d'élaborer *de novo* une eau ayant une composition proche de l'eau de TAR, des solutions tamponnées³³ sont utilisées, avec l'ajout de différents sels de façon à obtenir des concentrations identiques en ions à celles mesurées dans la TAR pilote et d'ajuster la conductivité. Deux tampons sont testés, le tampon Tris, qui tamponne bien à pH 9, mais qui est considéré comme toxique pour les cellules de mammifères à forte concentration, et le tampon phosphate qui est souvent utilisé en microbiologie, mais dont le pouvoir tampon est faible à pH 9.

III.2.2.1 Tampon phosphate

Formule semi-développée : HPO_4^{2-} .

Le

³³ Une solution tampon est une solution qui permet de maintenir le pH stable malgré l'ajout d'acide ou de base (dans une certaine limite). Selon la solution tampon, le pH peut être maintenu à différentes valeurs.



Tableau 16 montre la quantité de chaque sel à solubiliser dans 1 L d'eau osmosée pour obtenir les concentrations voulues pour chaque ion. Il permet de déterminer l'augmentation de la concentration en ions induit par l'introduction de chaque sel.



Tableau 16 : Tableau permettant de déterminer la concentration des différents sels à introduire, de façon à obtenir la quantité désirée d'espèces ioniques dans l'eau recomposée.

	M en g/mol	NaCl	Na ₂ O ₆ Ca;4H ₂ O	NaSO ₄	MgSO ₄ ;7H ₂ O	FeCl ₃	Total					
Cl ⁻	35,5	99,8	0,61			0,2	0,66	100				
Na ⁺	23	64,7	0,39	5,8	0,18	47	0,2	117				
SO ₄ ⁻	96					196	0,8	4	0,39	200		
Ca ⁺⁺	40			5	0,16					5		
Mg ⁺⁺	24,3						1	0,1		1		
Fe ⁺⁺	55,8								0,1	0,34	0,1	
H ₂ O	18			9	0,28			5	0,51		14,2	
O	16			12	0,38						12	
total	308,6	164	1	31,8	1	243	1	10	1	0,3	1	

Légende:

Masse désirée

Masse relarguée

Part de la masse de l'ion considéré, pour chaque sel

Les concentrations sont exprimées en mg/L. La masse molaire M en g/mol.

Selon la loi de Kohlrausch, cette eau a une conductivité théorique de : $\sigma = \sum z_i \cdot \lambda_i \cdot [X_i]$ s.m⁻¹. Avec z_i le nombre de charge de l'espèce i, λ_i la conductivité molaire de l'espèce i en mS.m².mol⁻¹, [X_i] la concentration de l'espèce i en mol.m⁻³.

Tableau 17 : Conductivité théorique de l'eau en fonction des espèces ioniques présentes.

	λ en mS.m ² .mol ⁻¹	nb de charge	concentration en mol.m ⁻³	z _i .λ _i . [X _i] en mS.m ⁻¹	z _i .λ _i . [X _i] en μS.cm ⁻¹
Cl ⁻	7,6	1	2,8	21,5	215
Na ⁺	5	1	5,1	25,6	256
SO ₄ ⁻	16	2	2,1	66,7	667
Ca ⁺⁺	11,9	2	0,13	3	30
Mg ⁺⁺	10,6	2	4,1x10 ⁻²	0,87	8,7
Fe ⁺⁺	10,8	2	1,8x10 ⁻³	0,04	0,4
σ				117,6	1176

L'ajout des ions donne théoriquement la valeur de : z_i.λ_i. [X_i] = **1176 μS.cm⁻¹** ; l'expérience montre que cette dernière est néanmoins plus faible. Mais en ajoutant le tampon phosphate (à environ 50 mmol/L), et la soude (concentration suffisante pour atteindre pH=9), la conductivité atteint environ 2500 μS.cm⁻¹.

III.2.2.2 Tampon Tris (Trishydroxyméthylaminométhane buffer)

Formule semi-développée : NH₂-C-(CH₂-OH)₃.

Le protocole est identique au précédent. Cependant, la concentration en Tris ne doit pas excéder 5 mmol/L car c'est un composé toxique à plus forte concentration. La conductivité finale est de l'ordre de 1500 μS/cm. L'ajustement de la conductivité à 2500 μS.cm⁻¹ est réalisé avec du chlorure de sodium dont l'influence semble négligeable sur la viabilité des bactéries *E. coli*.

III.2.2.3 Stabilité des solutions tamponnées

Afin de s'assurer de la stabilité des solutions tamponnées, des *E.coli* BL21(DE3) y sont suspendues à la valeur de 1 unité DO_{λ=600nm}. Ces solutions sont comparées à l'eau de TAR de référence. Les



bactéries suspendues dans les différents types d'eau sont détruites par sonication (traitement par ultra-sons). Cette destruction entraîne une libération du contenu cytoplasmique pouvant potentiellement modifier l'équilibre ionique et le pH.

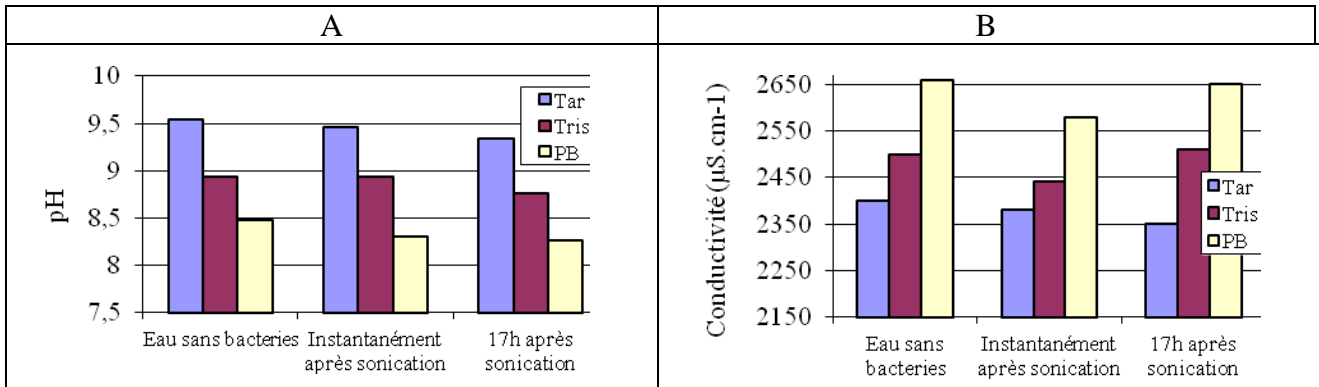
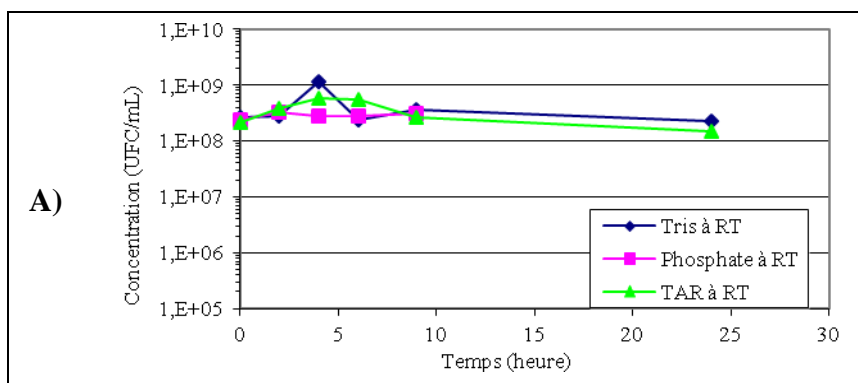


Figure 92 : pH et conductivité ($\mu\text{S}/\text{cm}$) de l'eau de TAR et des eaux recomposées avec ou sans *E. coli* BL21(DE3) à une $\text{DO}_{\lambda=600\text{nm}}$ de 1 après sonication.

Les résultats obtenus instantanément après sonication, puis après une longue durée post traitement, montrent que les eaux recomposées gardent des valeurs de pH proches de leurs valeurs initiales (à 0.2 unité pH près) (Figure 92A). Un résultat identique est observé pour la conductivité (Figure 92B). Le pouvoir tampon semble maintenu lors de l'étude sur l'eau du pilote TAR et les deux eaux reconstituées.

III.2.2.4 Viabilité des bactéries dans les différents tampons au cours du temps

Afin d'observer la viabilité des microorganismes dans les différentes eaux, les bactéries sont incubées et leur capacité à former des colonies (UFC) déterminée à des temps différents. Le nombre d'UFC obtenu est ensuite rapporté en termes de nombre de bactéries par mL pour définir la concentration en bactéries vivantes présentes dans les eaux étudiées. Ces expériences ont été menées pour les températures suivantes : i) à température ambiante (RT), ii) à 37°C : température proche de la température de prolifération optimale des bactéries, iii) à 33°C : température mesurée dans le pilote TAR, et qui sera utilisée pour les expériences de décontamination.



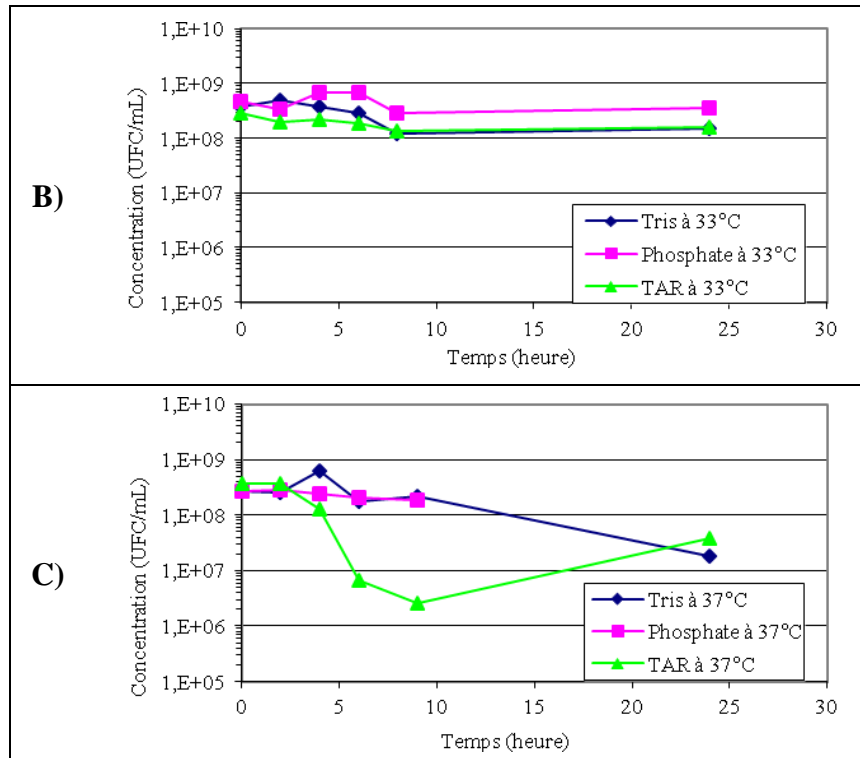


Figure 93 : Effet de la température sur la viabilité des bactéries *E. coli* BL21(DE3) au cours du temps dans l'eau de TAR et les eaux recomposées (N=2 en triplicata).

Les résultats obtenus montrent que pour deux des températures étudiées (RT et 33°C) la concentration en bactéries reste stable pendant au moins 24 h. A 37°C, l'eau de TAR présente une certaine toxicité (Figure 93 C). Cependant l'analyse de la variance (ANOVA) en utilisant le logiciel KyPlot (Kyens Lab, Japon) indique que les différences observées ne sont pas significatives. Il semble que les eaux recomposées s'approchent plus ou moins du comportement de l'eau du pilote TAR.

III.2.3. Conclusion

Le but de cette étude consistait à mettre au point une eau synthétique dont les caractéristiques se rapprochent de celles de l'eau de la TAR pilote.

Comme certains ions n'ont pas fait l'objet d'analyses à long terme sur l'eau de la TAR pilote, il n'est pas possible d'assurer que la composition des eaux recomposées soit rigoureusement identique. Néanmoins, les ions principaux y ont été ajoutés et les paramètres importants comme le pH et la conductivité sont respectés.

Selon les expériences décrites dans la Partie V -III.2.2.4, il s'avère que le comportement des bactéries à 33°C dans l'eau de TAR est proche de celui des bactéries dans les eaux recomposées.

Concernant le choix entre les deux eaux recomposées, bien que les différences de comportement des bactéries soient relativement minimales, la préférence s'est portée sur celle utilisant le tampon Tris. En effet, les résultats obtenus montrent qu'aux concentrations où il est utilisé, le pouvoir tampon est suffisant pour maintenir le pH stable (Figure 92) et ne semble pas toxique pour les bactéries (Figure 93). Le choix s'est porté sur celui dont le pouvoir tampon optimum est le plus proche du pH utilisé. C'est donc le tampon Tris qui sera utilisé pour la suite des expériences.





**Partie VI - EXPERIMENTATIONS EN
LABORATOIRE - RESULTATS**



I. ETUDE D'OPTIMISATION DE L'ABATTEMENT PAR NSCEP – GENERATEUR G0

I.1. ETUDE PRELIMINAIRE AVEC *E. COLI*

Actuellement, peu de choses sont connues sur les effets des champs électriques pulsés nanosecondes sur les bactéries. Afin de réaliser des essais dans les conditions les plus proches de celles qui seront retrouvées lors du traitement de l'eau des TAR, de nombreux paramètres ont dû être vérifiés.

I.1.1.1 Impact de l'état physiologique des bactéries

Dans le cas des champs électriques pulsés (CEP) dont la durée est comprise entre les millisecondes et les microsecondes, l'état physiologique des bactéries est un paramètre à prendre en considération. En effet, il a été montré que les CEP ont un effet direct sur la membrane (Chang et al., 1992), or la membrane se modifie entre la phase exponentielle et la phase stationnaire (Takeo et al., 1976). Il est en effet apparu que les champs électriques ont un effet bactéricide plus important sur des bactéries en phase exponentielle de croissance (Pothakamury et al., 1996). Afin de s'assurer de l'effet bactéricide de ces CEP, les tests ont été réalisés en phase stationnaire, phase au cours de laquelle les membranes sont stables et plus difficiles à déstabiliser (Takeo et al., 1976). Si un effet bactéricide est observé en phase stationnaire, l'effet sera plus important en phase exponentielle.

Des essais ont été réalisés pour comparer la sensibilité des CEP au début du stade plateau (plateau précoce, c'est-à-dire juste après la fin de la phase de croissance exponentielle) et à la fin de ce stade (plateau tardif). Le champ électrique appliqué est de 100 kV/cm avec des impulsions de 60 ns. Les expériences ont été réalisées à température ambiante. Les résultats obtenus apparaissent *Figure 94*.

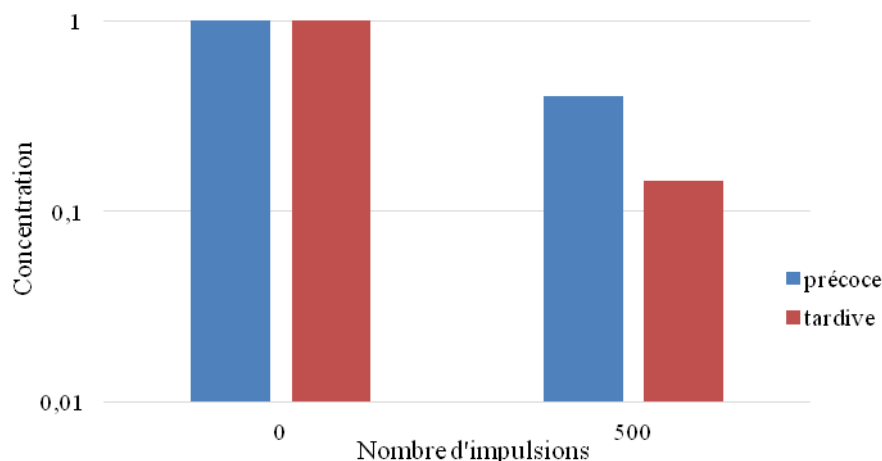


Figure 94 : Effet de l'état physiologique des bactéries.

Ces résultats montrent que les bactéries sont moins sensibles au début du stade plateau qu'à la fin. Notons au passage que les populations de bactéries en milieu environnemental (milieu pauvre) sont plus proches des bactéries en fin de phase plateau qu'en phase exponentielle. En effet, en phase exponentielle, la concentration en nutriment est forte, alors qu'en fin de phase plateau, elle est



faible, comme en milieu environnemental. Une seule expérience a été réalisée, il n'y a donc pas de données statistiques sur ces résultats.

I.1.1.2 Effet de la conductivité

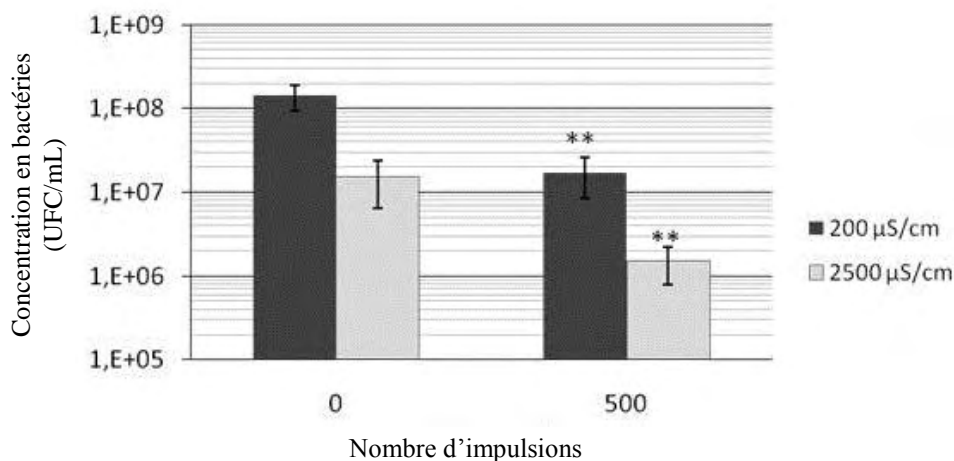
La conductivité du milieu définit la résistance de l'applicateur et est un facteur conditionnant la valeur du champ électrique entre les électrodes, et donc la capacité du générateur à fournir la tension demandée.

En prenant en compte la littérature scientifique, un champ électrique de 100 kV/cm a été défini comme la valeur minimale à atteindre (cf. Partie III -IV.8). En effet, plus la cible est petite, plus la valeur du champ électrique doit être élevée. Ceci est d'autant plus vrai que les impulsions électriques sont de courtes durées (de l'ordre de quelques dizaines de nanosecondes).

Les premiers tests ont été réalisés avec des suspensions bactériennes dans de l'eau dont la conductivité est de 200 $\mu\text{S}/\text{cm}$, correspondant à la conductivité moyenne des eaux du réseau d'eau courante. Les essais suivants ont été effectués avec de l'eau issue du pilote TAR dont la conductivité est de 2500 $\mu\text{S}/\text{cm}$.

Pour cette étude, des bactéries *E. coli* sont traitées par 500 impulsions de 100 kV/cm et 60 ns dans des eaux de deux conductivités différentes. L'une à conductivité normale (200 $\mu\text{S}/\text{cm}$) et l'autre à une conductivité nettement plus forte correspondant à de l'eau de TAR (2500 $\mu\text{S}/\text{cm}$). Ces expériences ont été réalisées à température ambiante.

Les résultats obtenus au niveau de la *Figure 95* montrent que, par elle-même et sans l'apport des nsCEP, l'eau de TAR est susceptible d'entraîner un abattement d'*E. coli* de l'ordre de 1 \log_{10} . Dans cette série, il s'avère que les nsCEP sont capables d'entraîner un abattement de 1,1 \log_{10} par rapport à leurs contrôles respectifs (eaux normale et de TAR sans nsCEP). Il semblerait qu'il n'y ait pas de différences notoires entre une eau peu ou fortement chargée. Cependant, il est à noter qu'avec ce type de générateur, la tension pour une eau à 2500 $\mu\text{S}/\text{cm}$ passe de 22 kV à 16 kV. Il est possible d'envisager un meilleur abattement si une tension équivalente à l'eau normale est obtenue dans une eau fortement chargée et conductrice. Un des prérequis consiste à avoir un générateur capable de supporter une eau fortement chargée sans perte de tension.



*Figure 95 : Effet des nsCEP en fonction de la conductivité ($\vec{E} = 100 \text{ kV}/\text{cm}$, $T = 60 \text{ ns}$, $F = 1 \text{ Hz}$. Nombre d'expériences indépendantes = 3, nombre de réplicas par expérience = 3. Les statistiques sont obtenues par le logiciel KyPlot® en réalisant une ANOVA suivie d'un test de Dunnett. **: $P \leq 0,001$.*



I.2. EFFET DES nsCEP SUR LA VIABILITE BACTERIENNE

Grace aux expériences précédentes et à la confection d'une eau se rapprochant de l'eau du pilote TAR, les conditions d'étude sont bien définies. La température, la nature de l'eau et l'état physiologique des bactéries sont fixées. Ces paramètres ne sont désormais plus susceptibles d'impacter les résultats d'abattement, car ils seront identiques pour toutes les prochaines expériences réalisées.

I.2.1. Résultats initiaux en batch

Dans un premier temps, un protocole de test « en batch », c'est à dire sur une suspension bactérienne non circulante, a été mis au point.

Il s'agit d'expériences préliminaires, permettant d'apprécier la capacité de décontamination du générateur G0.

Les bactéries sont traitées lorsqu'elles sont en phase plateau avec des impulsions en nombre croissant. Les résultats obtenus montrent que les nsCEP ont un effet sur les bactéries *E. coli* dès 100 impulsions (Figure 96). Ces expériences sont réalisées à température ambiante. Le maximum d'abattement avec une diminution de 1 log₁₀ est observé pour 500 impulsions à une fréquence de 1 Hz.

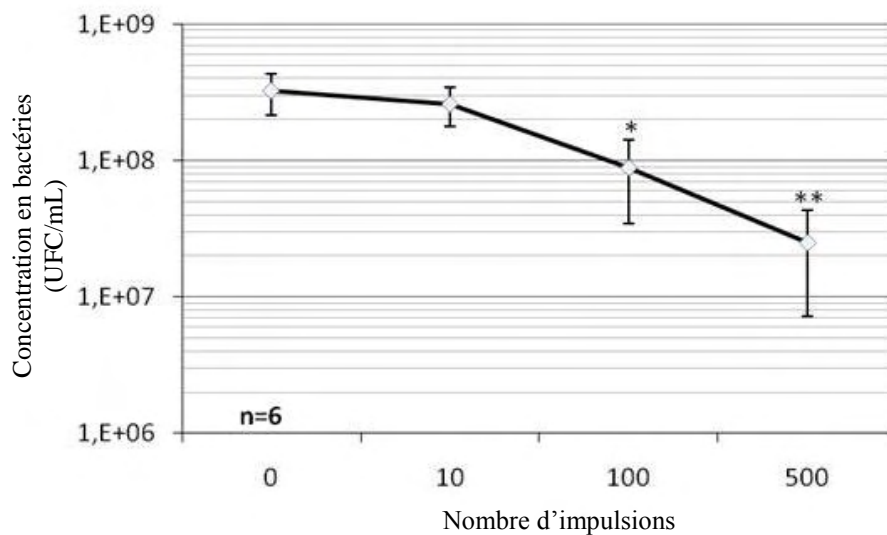


Figure 96 : Effet des nsCEP en fonction du nombre d'impulsions ($E = 100 \text{ kV/cm}$, $T = 60 \text{ ns}$, $F = 1 \text{ Hz}$, $\sigma = 200 \text{ }\mu\text{S/cm}$). Nombre d'expériences indépendantes = 6, nombre de répliques par expérience = 3. Les statistiques sont obtenues par le logiciel KyPlot® en réalisant une ANOVA suivie d'un test de Dunnett. * : $P \leq 0,05$; ** : $P \leq 0,001$.

Les résultats obtenus montrent que même si l'abattement n'est pas très élevé, les nsCEP sont capables de tuer *E. coli*. La diminution est significative dès 100 impulsions, et 500 impulsions permettent d'obtenir un abattement de 1 log₁₀. D'un point de vue du rendement énergétique, 1 log₁₀ d'abattement est obtenu en 500 impulsions de 0,3 joules sur 0,162 mL.



Le calcul de l'énergie consommée rapporté à un abattement de 1 log₁₀ pour 1 L dans un système en batch est donné par l'équation suivante :

Équation 16 : Energie consommée en batch pour 1 log₁₀ d'abattement rapporté à 1 L.

$$W_c = \frac{W_{pulse} \times N_{pulse} \times 1L}{V_{tot}}$$

Avec :

W_c : Énergie consommée pour traiter 1 log₁₀ rapporté à 1 litre (J/L)

W_{pulse} : Énergie fournie par 1 impulsion (J)

N_{pulse} : Nombre d'impulsions nécessaire à 1 log₁₀ d'abattement (Sans unité)

V_{tot} : Volume total traité (L)

L'énergie nécessaire à l'abattement de 1 log₁₀ correspond à :

$$W_c = \frac{0,3 \times 500}{0,162 \times 10^{-3}} \approx 920\,000 \frac{J}{L} = 920 \frac{kJ}{L}$$

I.2.2. Résultats en dynamique - Passage en flux

Comme expliqué précédemment dans la partie (cf. Partie V -II), les pompes sont choisies en fonction du débit voulu. Les résultats obtenus en batch permettent de déterminer le débit à utiliser pour les premières expériences en flux. Il doit être fixé de façon à maintenir un temps de résidence dans l'applicateur d'au moins 100 secondes. En effet, il faut qu'au minimum 100 impulsions soient délivrées lors de chaque passage dans l'applicateur, car c'est le nombre d'impulsions nécessaire à l'obtention d'un abattement visible. Or, lors des premières expériences en flux, le générateur est réglé pour délivrer 1 impulsion par seconde. 100 impulsions sont donc délivrées en 100 s.

Pour toutes les courbes d'abattelements des essais en flux, les courbes contrôles sont représentées en mauve, et les courbes essais sont représentées en bleu.

I.2.2.1 Essais en flux ouvert (avec G0)

Pour cette première expérience d'abattement, le volume à traiter est modeste. Il s'agit avant tout de valider la possibilité de réaliser une décontamination en flux. Ensuite des étapes optimisant le procédé permettront de traiter des volumes plus importants. L'objectif au cours de cette étude est de maintenir un temps de résidence dans l'applicateur suffisamment long pour que les bactéries reçoivent au moins 100 impulsions quand elles le traversent.

Sachant que l'applicateur a un volume utile de 162 μL, le débit de la pompe est fixé à 1 μL/s. Le temps de résidence dans l'applicateur est de 162 secondes, permettant aux bactéries de recevoir 162 impulsions lorsque la fréquence du générateur est de 1 Hz.

En utilisant ce débit, le temps de traitement (t) en seconde est obtenu par le volume (V) en mL divisé par le débit (d) exprimé en mL/s. Donc $t = V/d = 5/0,001 = 5000 \text{ s} \approx 83 \text{ min}$.

Cinq cycles ont été réalisés.



Tableau 18 : Conditions de traitement en flux ouvert.

Conditions :	Volume de départ (mL)	Débit de la pompe (mL/s)	Durée nécessaire au passage de 5 mL (min)	Volume de la chambre de traitement (mL)	Nombre d'impulsions par passage	Fréquence des impulsions (Hz)
	5	0,001	83,3	0,162	162	1

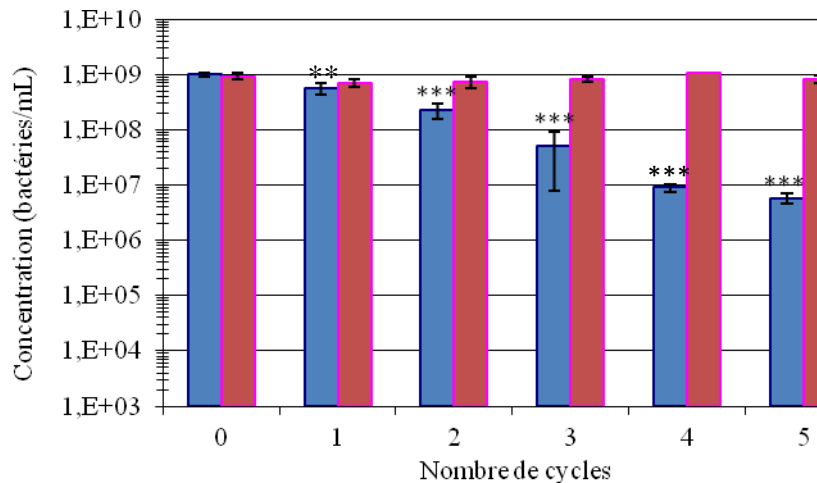


Figure 97 : Résultats d'abattement en flux ouvert. Moyenne de 2 expériences contrôles (mauve) et 2 expériences essais (bleu). Pour chaque expérience, deux étalements par point sont réalisés. Les statistiques sont obtenues par des tests de Student réalisés entre la série de valeur du point à T0 et la série de valeur du point considéré : ** : $P \leq 0,01$, *** : $P \leq 0,005$.

L'abattement est significatif dès le premier cycle de 162 impulsions. Un \log_{10} d'abattement est obtenu après 2,5 cycles. Cela signifie que chaque bactérie a reçu 2,5 x 162 impulsions soit 405 impulsions. Le nombre d'impulsions nécessaire à 1 \log_{10} d'abattement en flux ouvert est donc très proche de celui en batch.

Le calcul de l'énergie consommée rapportée à un abattement de 1 \log_{10} pour 1 L dans un système en flux ouvert est le même qu'en batch (Équation 16).

Sachant qu'un \log_{10} d'abattement est obtenue après 2,5 cycles de 83,3 min et que la fréquence des impulsions est de 1 Hz, le nombre d'impulsions utilisé pour traiter les 5 mL à 1 \log_{10} est $N_{impulsion} = \text{nombre de cycles} \times \text{durée d'un cycle en seconde} \times \text{fréquences des impulsions} = 2,5 \times 83,3 \times 60 \times 1 = 12\,500$ impulsions.

Une impulsion délivre une énergie de 0,3 J, d'où :

$$W_c = \frac{0,3 \times 12\,500 \times 1}{0,005} \approx 750\,000 \frac{J}{L} = 750 \frac{kJ}{L}$$

Le calcul du pourcentage d'erreur permet de prendre en compte la dispersion des mesures, ainsi : $588 \text{ kJ/L} < W_c < 912 \text{ kJ/L}$. Pour l'obtenir cet encadrement, les écarts types de tous les points obtenus jusqu'au premier \log_{10} d'abattement sont moyennés, puis le pourcentage d'erreur caractérisé par cet écart type moyen est appliqué à W_c pour obtenir la valeur maximale et minimale de l'encadrement.

Deux \log_{10} d'abattement sont obtenus en quatre cycles. Suite à ces résultats, il peut être déterminé qu'à chaque passage dans l'applicateur, la concentration en bactéries est diminuée d'environ 68 %



(car $[b] \times (1 - (68,4/100))^4 \approx [b]/100$ ou $[b]$ est la concentration en bactéries initiale). Pour une détermination plus précise, la diminution de la concentration entre chaque passage est calculée. La moyenne de ces valeurs donne 66 %.

Notons que ces expériences en flux ouvert posent un problème de « volume mort ». En effet, il est nécessaire de remplir en solution l'applicateur avant de mettre en fonctionnement le générateur pour éviter la présence d'air entre les électrodes (inducteur d'arc électrique).

Il y a donc une partie de liquide non traité dans le tuyau reliant l'applicateur au tube de récupération qui est éliminée afin d'éviter qu'elle ne se mélange au volume traité.

En outre le générateur ne peut pas non plus être laissé en fonctionnement jusqu'au passage intégral de tout le liquide à traiter, également pour éviter les claquages dus au manque de liquide entre les deux électrodes. Il est également nécessaire d'éliminer ce volume résiduel.

Ces deux problèmes apparaissent au démarrage de l'expérience et à chaque changement de cycle. Si ces volumes ne sont pas censés biaiser les résultats, car jamais mélangés aux volumes réellement traités, ils engendrent une perte assez importante de matrice. De fait, à la fin des cinq cycles, l'échantillon traité s'en trouve fortement réduit et correspond à environ 2 mL.

I.2.2.1.1 Essais en flux fermé (avec GO)

Le traitement en flux ouvert offre une meilleure distribution par rapport à la méthode en flux fermé où le volume traité retourne dans le contenant initial. Ainsi, il y a un mélange constant, de façon qu'une partie du volume n'est jamais traité, une autre partie l'est toujours et le reste se répartit de façon gaussienne autour d'une valeur moyenne correspondant au « nombre de cycles ». Il est possible de calculer cette répartition grâce aux calculs suivants :

En considérant V (μL) le volume total à traiter, T la durée nécessaire au passage de tout le volume à traiter (correspondant au temps pour 1 cycle en flux ouvert) et D le volume traité par seconde,

Soit

C_{y0} le volume de liquide traité 0 fois, C_{y1} le volume de liquide traité 1 fois [...] C_{yx} le volume de liquide traité x fois.

Les suites sont respectivement :

$$C_{y0_{t=0}} = V$$

$$C_{y0_{t=1}} = C_{y0_{t=0}} - ((C_{y0_{t=0}} / V) \times D)$$

$$C_{y0_{t=n+1}} = C_{y0_{t=n}} - ((C_{y0_{t=n}} / V) \times D)$$

$$C_{y1_{t=0}} = 0$$

$$C_{y1_{t=1}} = D$$

$$C_{y1_{t=2}} = C_{y1_{t=1}} + ((C_{y0_{t=1}} / D) \times D) - ((C_{y1_{t=1}} / V) \times D)$$

$$C_{y1_{t=n+1}} = C_{y1_{t=n}} + ((C_{y0_{t=n}} / D) \times D) - ((C_{y1_{t=n}} / V) \times D)$$

$$C_{y2_{t=0}} = 0$$

$$C_{y2_{t=1}} = 0$$

$$C_{y2_{t=2}} = (C_{y1_{t=1}} / V) \times D$$

$$C_{y2_{t=3}} = C_{y2_{t=2}} + ((C_{y1_{t=2}} / D) \times D) - ((C_{y2_{t=2}} / V) \times D)$$

$$C_{y2_{t=n+1}} = C_{y2_{t=n}} + ((C_{y1_{t=n}} / D) \times D) - ((C_{y2_{t=n}} / V) \times D)$$

$$C_{yx_{t=x}} = (C_{y[x-1]_{t=[x-1]}} / Vt) \times D$$



Pour
 $V = 5000 \mu\text{L}$
 $D = 1 \mu\text{L/s}$
 $T = 5000 \mu\text{L} / 1 \mu\text{L/s} = 5000 \text{ s}$

Les courbes suivantes sont obtenues :

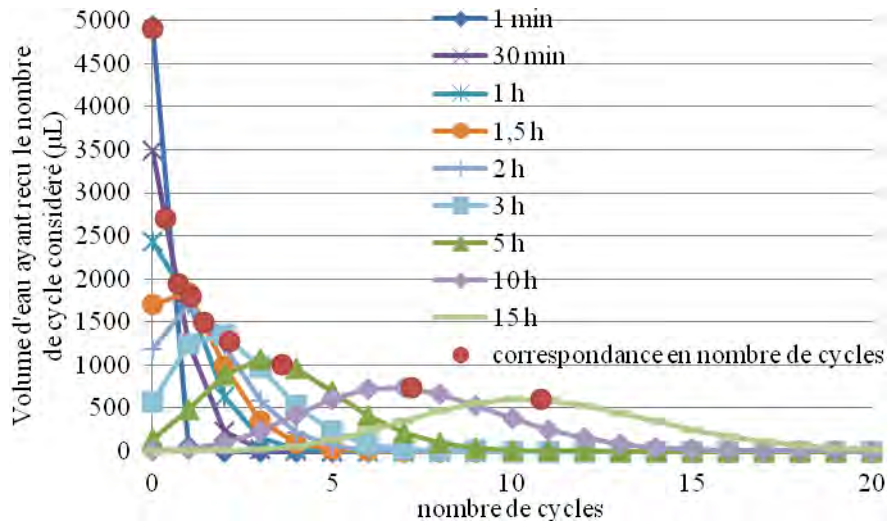


Figure 98 : Répartition du nombre de cycles reçus par le volume traité pour plusieurs durées de traitements.

La comparaison avec la correspondance du nombre de cycles que donneraient ces conditions en flux ouvert est représentée par les points rouges. Elle met en évidence que cette valeur correspond assez bien à l'état dans lequel est la majorité de l'échantillon.

A partir de ce constat, le terme 'nombre de cycles' pourra donc être utilisé même pour les conditions de flux fermé.

Il est à noter que ces calculs ne sont qu'une simulation mathématique d'un phénomène physique. Ils dérivent du fait que le prédicat est celui d'un mélange parfait. Dans les faits, le volume présent dans les tuyaux reliant le liquide entre l'applicateur et le contenant empêche un retour aussi rapide du volume traité dans le système de traitement. Par conséquent les valeurs devraient être moins dispersées autour de la moyenne.

Puisque la répartition des impulsions est moins bonne qu'en flux ouvert, des abattements plus faibles sont attendus. L'objectif est donc de se placer dans des conditions permettant d'avoir au moins trois cycles de traitement. Cela correspond au moment pour lequel plus de $1 \log_{10}$ d'abattement est visible en flux ouvert. Les conditions fixées sont représentées dans le *Tableau 19* :

Tableau 19 : Valeurs caractéristiques sur un volume de 5 mL avec G0 à 1 Hz et 1 µL/s.

Conditions :	Volume de départ (mL)	Débit de la pompe (mL/s)	Durée nécessaire au passage de 5 mL (min)	Volume de la chambre de traitement (mL)	Nombre d'impulsions par passage	Fréquence des impulsions (Hz)
	5	0,001	83,3	0,162	162	1

Il faut que l'expérience soit maintenue pendant 5 h pour que l'objectif des trois cycles soit dépassé.

En effet, au bout de cette durée $\frac{5 \times 60}{83,3} = 3,6$ cycles sont atteints.

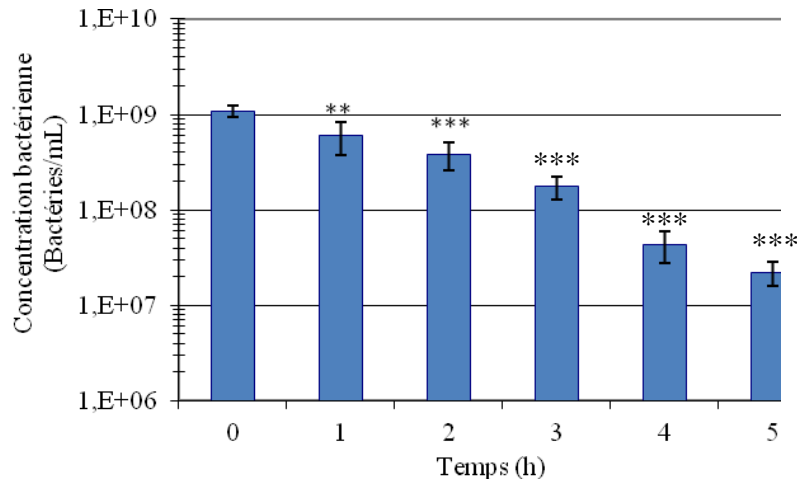


Figure 99: Cinétique d'abattement pour un volume traité de 5 mL avec G0 à 1 Hz et 1 μ L/s. Moyenne de 2 expériences. Pour chaque expérience, deux étalements par point sont réalisés. Les statistiques sont obtenues par des tests de Student réalisés entre la série de valeur du point à T0 et la série de valeur du point considéré : ** : $P \leq 0,01$, *** : $P \leq 0,005$.

Comme le montre la Figure 99, l'abattement est significatif et suit une décroissance logarithmique. 1 \log_{10} d'abattement est obtenu en légèrement moins de 3,5 h.

- Calcul de l'énergie pour un abattement de 1 \log_{10} rapporté à 1 L :

Le nombre d'impulsions délivrées pendant 3,5 h de traitement est de :

$$N_{impulsion} = 3,5 \times 3600 = 12\,600 \text{ impulsions}$$

D'où

$$W_c = \frac{0,3 \times 12\,600 \times 1}{0,005} \approx 756\,000 \frac{J}{L} = 756 \frac{kJ}{L}$$

Le calcul du pourcentage d'erreur, basé sur le calcul de la moyenne des écarts types, permet de prendre en compte la dispersion des mesures, ainsi : $622 \text{ kJ/L} < W_c < 890 \text{ kJ/L}$.

Ces résultats en flux fermé s'avèrent très proches de ceux obtenus en flux ouvert. Le fait de mélanger le volume traité avec le reste du volume ne diminue donc pas l'efficacité.

Suite à ces résultats, l'augmentation de la vitesse de traitement est indispensable à l'objectif fixé qui consiste à décontaminer des volumes importants. Pour ce faire, l'étude s'orienta naturellement vers l'augmentation du débit.

Cette augmentation du débit accroît le nombre de cycles en diminuant d'une part la durée nécessaire au passage du volume de 5 mL et d'autre part entraîne une réduction du temps de résidence dans l'applicateur. Globalement le nombre d'impulsions reçu par la suspension bactérienne reste le même que pour l'expérience précédente (car le volume traité, la fréquence de répétition des impulsions et la durée de traitement sont identiques), mais la répartition de ces impulsions est différente comme indiqué *Tableau 20*.



Tableau 20 : Valeurs caractéristiques de l'expérience sur 5 mL avec G0 à 1 Hz et 10 µL/s.

Conditions :	Volume de départ (mL)	Débit de la pompe (mL/s)	Durée nécessaire au passage de 5 mL (min)	Volume de la chambre de traitement (mL)	Nombre d'impulsions par passage	Fréquence des impulsions (Hz)
	5	0,01	8,3	0,162	16,2	1

La multiplication par 10 du débit provoque une division par 10 du nombre d'impulsions par passage dans l'applicateur. Or les premières expériences en batch ainsi que plusieurs publications (cf. Partie III -IV.8.5) montrent qu'une dizaine d'impulsions n'est pas suffisante pour obtenir un abattement.

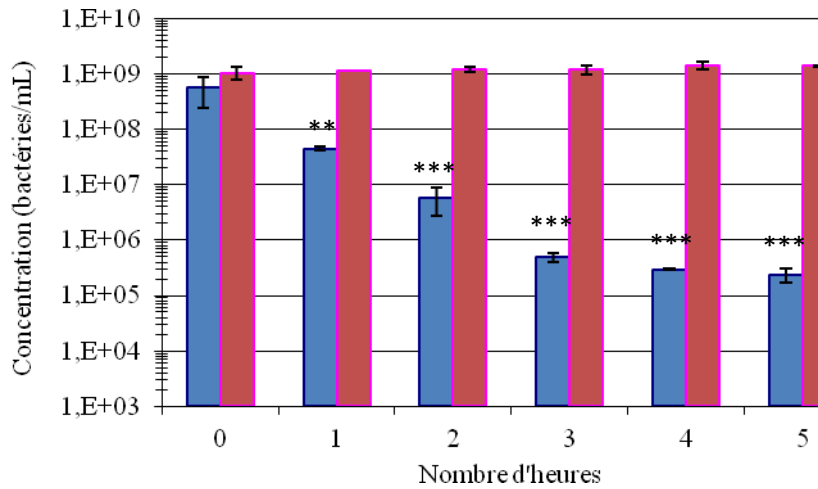


Figure 100 : Cinétique d'abattement pour un volume traité de 5 mL avec G0 à 1 Hz et 10 µL/s. Moyenne de 2 expériences. Pour chaque expérience, deux étalements par point sont réalisés. Les statistiques sont obtenues par des tests de Student réalisés entre la série de valeur du point à T0 et la série de valeur du point considéré : ** : $P \leq 0,01$ et *** : $P \leq 0,005$.

L'abattement obtenu (Figure 100) est meilleur que celui avec un débit faible (Figure 99). Un abattement de 1 \log_{10} est obtenu en 1 h.

- Calcul de l'énergie pour un abattement de 1 \log_{10} rapportée à 1 L :

Le nombre d'impulsions délivrées pendant cette unique heure de traitement est de :

$$N_{impulsion} = 1 \times 3600 = 3600 \text{ impulsions}$$

D'où

$$W_c = \frac{0,3 \times 3600 \times 1}{0,005} \approx 216\,000 \frac{J}{L} = 216 \frac{kJ}{L}$$

Le calcul du pourcentage d'erreur, basé sur le calcul de la moyenne des écarts types, permet de prendre en compte l'imprécision de la mesure, ainsi : $146 \text{ kJ/L} < W_c < 286 \text{ kJ/L}$. De plus, la comparaison de ces résultats avec les précédents montre que le débit a un effet positif sur le coût énergétique.

La non détection de l'abattement en batch avec une dizaine d'impulsions ne vient donc pas d'un nombre d'impulsions seuil à partir duquel elles deviendraient efficaces, mais il semble que chaque impulsion a un effet décontaminant faible, et le cumul devient progressivement visible jusqu'à devenir significatif. Les traitements successifs conduisent à rendre l'effet significatif.



I.3. OPTIMISATION DES PARAMETRES DE FONCTIONNEMENT DE LA TECHNOLOGIE NSCEP

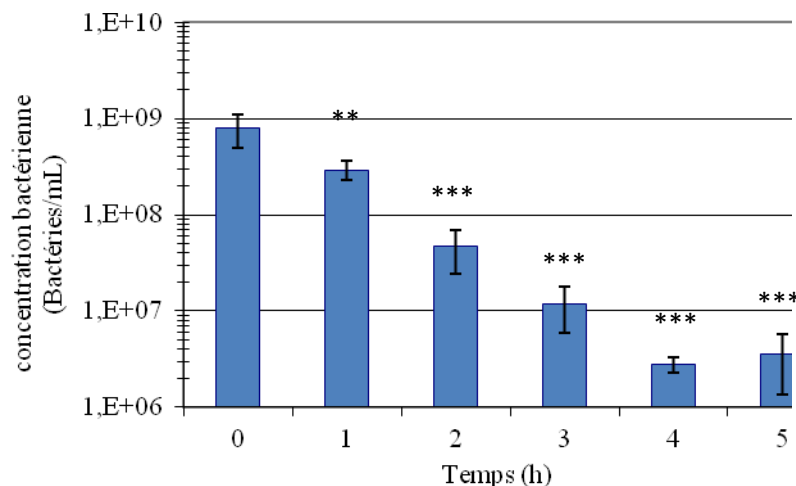
I.3.1. Augmentation de la fréquence

Outre le fait d'augmenter le débit, il est également possible, pour améliorer la vitesse de traitement, d'aborder le problème en faisant varier la fréquence. Pour éprouver l'effet de celle-ci, le G0 est utilisé à 2 Hz avec les conditions définies dans le *Tableau 21* :

Tableau 21 : Valeurs caractéristiques de l'expérience sur 5 mL avec G0 à 2 Hz et 2 µL/s.

Conditions :	Volume de départ (mL)	Débit de la pompe (mL/s)	Durée nécessaire au passage de 5 mL (min)	Volume de la chambre de traitement (mL)	Nombre d'impulsions par passage	Fréquence des impulsions (Hz)
	5	0,002	41,7	0,162	162	2

Le débit est augmenté de 1 à 2 µL/s dans le but de maintenir un nombre d'impulsions par passage dans l'applicateur identique à l'expérience précédente à 1 µL/s et 1 Hz.



*Figure 101 : Cinétique d'abattement pour un volume traité de 5 mL avec G0 à 2 Hz et 2 µL/s. Moyenne de 2 expériences. Pour chaque expérience, deux étalements par point sont réalisés. Les statistiques sont obtenues par des tests de Student réalisés entre la série de valeur du point à T0 et la série de valeur du point considéré : ** : $P \leq 0,01$, *** : $P \leq 0,005$.*

Les résultats obtenus sont représentés *Figure 101*, 1 log₁₀ d'abattement est obtenu en 1,5 h. Sachant qu'il fallait 3,5 h à une fréquence de 1 Hz et un débit de 1 µL/s, il apparaît que doubler la fréquence et le débit permet de diviser par plus de 2 le temps de traitement. Néanmoins il faut noter que la consommation énergétique, en utilisant ces conditions, reste peu affectée car pour une durée identique, le nombre d'impulsions est deux fois plus grand.

- Calcul de l'énergie pour un abattement de 1 log₁₀ rapporté à 1 L :



Le nombre d'impulsions délivrées pendant ces 1,5 h de traitement à 2 Hz est :

$$N_{pulse} = 1,5 \times 3600 \times 2 = 10\,800$$

D'où

$$W_c = \frac{0,3 \times 10\,800 \times 1}{0,005} \approx 648\,000 \frac{J}{L} = 648 \frac{kJ}{L}$$

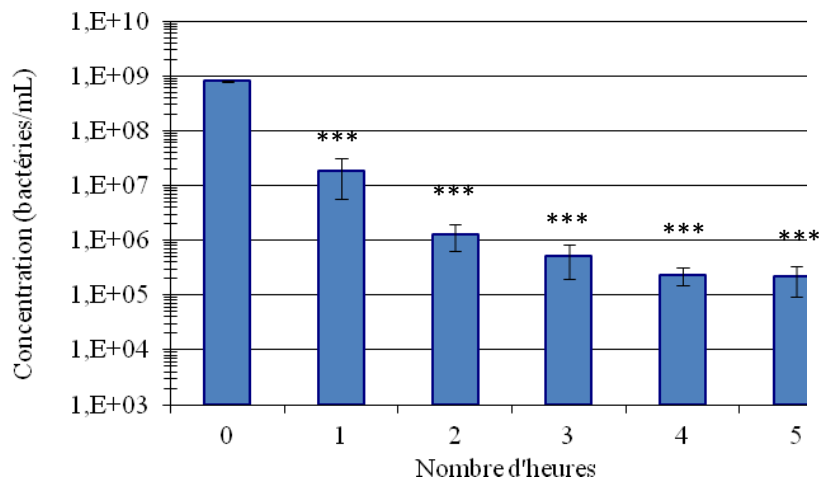
Le calcul du pourcentage d'erreur, basé sur le calcul de la moyenne des écarts types, permet de prendre en compte l'imprécision de la mesure, ainsi : $462 \text{ kJ/L} < W_c < 834 \text{ kJ/L}$.

Cette valeur de 648 kJ/L, n'est pas significativement différente des 756 kJ/L obtenus à une fréquence de 1 Hz et un débit de 1 $\mu\text{L/s}$. Doubler la fréquence et le débit n'affecte pas le coût énergétique.

Dans un souci d'améliorer l'abattement bactérien, des expériences avec le G0 ont été réalisées à la fréquence de 2 Hz avec un débit de 10 $\mu\text{L/s}$. Les données physiques sont résumées dans le *Tableau 22*.

Tableau 22 : Valeurs caractéristiques de l'expérience sur 5 mL avec G0 à 2 Hz et 10 $\mu\text{L/s}$.

Conditions :	Volume de départ (mL)	Débit de la pompe (mL/s)	Durée nécessaire au passage de 5 mL (min)	Volume de la chambre de traitement (mL)	Nombre d'impulsions par passage	Fréquence des impulsions (Hz)
	5	0,01	8,3	0,162	32,4	2



*Figure 102 : Cinétique d'abattement pour un volume traité de 5 mL avec G0 à 2 Hz et 10 $\mu\text{L/s}$. Moyenne de 2 expériences. Pour chaque expérience, deux étalements par point sont réalisés. Les statistiques sont obtenues par des tests de Student réalisés entre la série de valeur du point à T0 et la série de valeur du point considéré : *** : $P \leq 0,005$.*

Comme le montre la *Figure 102*, la réduction de 1 \log_{10} est obtenue en 0,7 h. L'allure de la courbe obtenue est similaire aux autres courbes à savoir qu'elle présente un tassement de l'abattement bactérien aux temps longs. Ce phénomène sera étudié en partie II.7.



- Calcul de l'énergie pour un abattement de $1 \log_{10}$ rapporté à 1 L :

Le nombre d'impulsions délivrées pendant ces 0,7 h de traitement est de :

$$N_{impulsion} = 0,7 \times 3600 \times 2 = 5040 \text{ impulsions}$$

D'où

$$W_c = \frac{0,3 \times 5040 \times 1}{0,005} \approx 302\,000 \frac{J}{L} \approx 300 \frac{kJ}{L}$$

Le calcul du pourcentage d'erreur, basé sur le calcul de la moyenne des écarts types, permet de prendre en compte l'imprécision de la mesure, ainsi : $197 \text{ kJ/L} < W_c < 408 \text{ kJ/L}$.

Si l'abattement obtenu dans cette dernière expérience est le plus rapide de l'ensemble des expériences présentées, il apparait que l'efficacité du traitement en termes d'énergie consommée n'est pas meilleure. Doubler la fréquence n'apporte pas de gain en coût énergétique.

I.3.2. Augmentation du volume à traiter

Le traitement à 2 Hz et 10 $\mu\text{L/s}$ est assez rapide pour envisager le traitement d'un volume plus important de l'ordre de 100 mL selon les caractéristiques détaillées dans le *Tableau 23*. L'expérience est réalisée sur quatre jours, à raison de six heures de fonctionnement le premier jour puis de dix heures les jours suivants. Ce protocole est dû au fait que le générateur ne doit pas être laissé sans surveillance. Il est mis en fonctionnement le matin puis arrêté le soir. Trois prélèvements par jour sont réalisés, le premier lors de la mise en fonctionnement du générateur, le second en milieu de journée et le dernier lors de l'arrêt du générateur.

Tableau 23 : Valeurs caractéristiques de l'expérience sur 100 mL avec GO à 2 Hz et 10 $\mu\text{L/s}$.

Conditions :	Volume de départ (mL)	Débit de la pompe (mL/s)	Durée nécessaire au passage de 100 mL (min)	Volume de la chambre de traitement (mL)	Nombre d'impulsions par passage	Fréquence des impulsions (Hz)
	100	0,01	166,7	0,162	32,4	2

En augmentant le volume à traiter, le nombre d'impulsions par passage dans l'applicateur ne change pas puisqu'il ne dépend que de son propre volume de traitement, du débit et de la fréquence. Par contre, le temps entre deux cycles s'en trouve considérablement augmenté par le fait que le temps nécessaire à l'écoulement de 100 mL est plus long que celui nécessaire à l'écoulement de 5 mL. La durée d'un cycle passe de 500 s à 10 000 s.

Représentation des résultats au cours du temps :

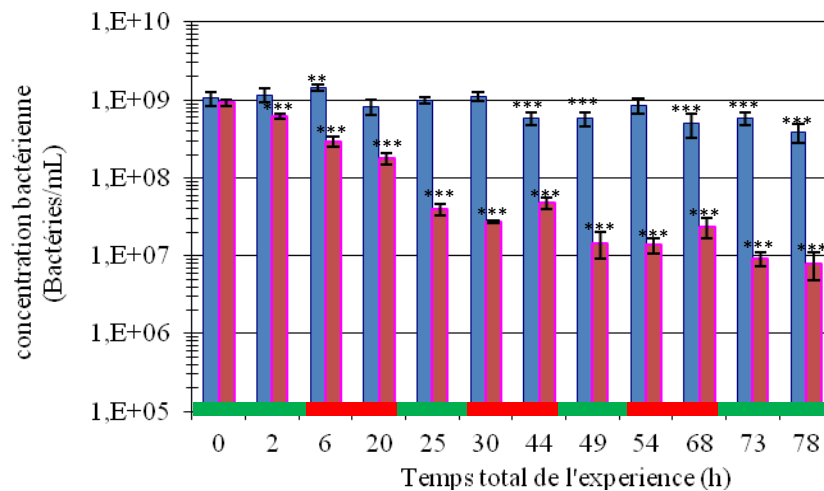


Figure 103: Evolution de la concentration au cours des 4 jours d'expériences, pour un volume traité de 100 mL avec G0 à 2 Hz et 10 µL/s, avec des phases d'arrêt du générateur (rouge). Moyenne de 2 expériences contrôles et 2 expériences essais. Pour chaque expérience, deux étalements par point sont réalisés. Les statistiques sont obtenues par des tests de Student réalisés entre la série de valeur du point à T0 et la série de valeur du point considéré : ** : $P \leq 0.01$, *** : $P \leq 0.005$.

Un \log_{10} est obtenu en huit heures de traitement.

- Calcul de l'énergie pour un abattement de 1 \log_{10} rapporté à 1 L :

Le nombre d'impulsions délivrées pendant ces 8 h est de :

$$N_{impulsion} = 8 \times 3600 \times 2 = 57\,600 \text{ impulsions}$$

D'où

$$W_c = \frac{0,3 \times 57\,600 \times 1}{0,1} \approx 173\,000 \frac{J}{L} = 173 \frac{kJ}{L}$$

Le calcul du pourcentage d'erreur, basé sur le calcul de la moyenne des écarts types, permet de prendre en compte l'imprécision de la mesure, ainsi : $158 \text{ kJ/L} < W_c < 187 \text{ kJ/L}$.

L'allongement de la durée du cycle a un effet positif sur le coût énergétique.

Comme la durée entre deux cycles est grande, la vitesse d'abattement est lente, d'où la réalisation de l'expérience sur plusieurs jours.

Malgré la lenteur de l'abattement, le rendement obtenu est meilleur que pour les expériences à cinq millilitres, car la consommation énergétique rapporté à un litre et un \log_{10} est plus faible ($173 \text{ kJ/L} < 300 \text{ kJ/L}$).

La population contrôle reste stable au cours du temps et la population bactérienne test reste également stable lorsque le générateur est arrêté.

I.3.3. Etude de reproductibilité des expériences entre les deux laboratoires (CERPEM et VERI)

Tout ce qui vient d'être décrit a été réalisé au CERPEM. La suite du travail a été réalisée dans l'un des laboratoires de microbiologie de VERI. Pour vérifier que les résultats obtenus au CERPEM sont comparables aux résultats obtenus au centre de recherche de VERI, l'expérience à 10 µL/s et 2 Hz sur 5 mL a été reproduite (cf. *Tableau 24*). Cela permet de déterminer si les expériences sont reproductibles d'un laboratoire à l'autre et par là la fiabilité du traitement.



Tableau 24: Valeurs caractéristiques de l'expérience sur 5 mL avec G0 à 2 Hz et 10 µL/s réalisée au centre de recherche de VERI.

Conditions :	Volume de départ (mL)	Débit de la pompe (mL/s)	Durée nécessaire au passage de 5 mL (min)	Volume de la chambre de traitement (mL)	Nombre d'impulsions par passage	Fréquence des impulsions (Hz)
	5	0,01	8,3	0,162	32,4	2

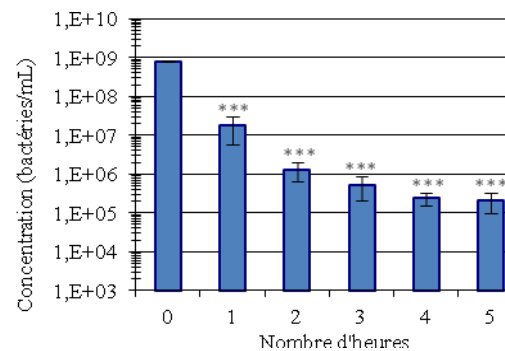
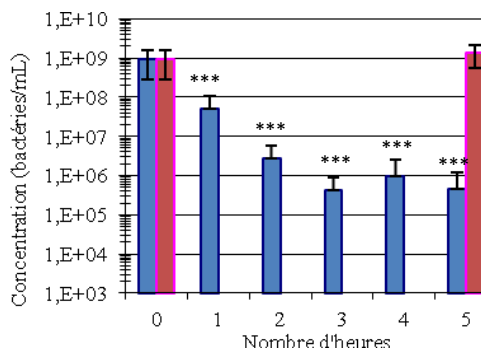


Figure 104 : Cinétique d'abattement pour un volume traité de 5 mL avec G0 à 2 Hz et 10 µL/s réalisé au centre de recherche de VERI. Moyenne de 3 expériences. Pour chaque expérience, trois étalements par point sont réalisés. Les statistiques sont obtenues par des tests de Student réalisés entre la série de valeur du point à T0 et la série de valeur du point considéré : *** : $P \leq 0,005$.

Cinétique obtenue précédemment au CERPEM (Figure 102).

Un \log_{10} d'abattement est obtenu en 0,8 h.

- Calcul de l'énergie rapportée à un litre et un \log_{10} :

Le nombre d'impulsions délivrées pendant ces 0,8 h de traitement est :

$$N_{puls} = 0,8 \times 3600 \times 2 = 5760$$

D'où

$$W_c = \frac{0,3 \times 5760 \times 1}{0,005} \approx 346\,000 \frac{J}{L} = 346 \frac{kJ}{L}$$

Le calcul du pourcentage d'erreur, basé sur le calcul de la moyenne des écarts types, permet de prendre en compte l'imprécision de la mesure, ainsi : $86 \text{ kJ/L} < W_c < 605 \text{ kJ/L}$.

Ces résultats en termes d'énergie consommée sont très proches de ceux obtenus précédemment au

CERPEM : $100 \times \left(1 - \frac{300}{346}\right) \approx 13\%$ de différences, et les valeurs sont comprises dans le même intervalle d'incertitude. Il y a donc une bonne reproductibilité des processus implantés sur deux sites différents



Il n'y a pas de différences significatives entre les deux séries d'expériences en termes de coût énergétique.

I.3.4. Conclusion

Ces premières expériences avec le générateur G0 ont permis de déterminer deux principes primordiaux dans l'optique du développement d'un système industriel. Sur la gamme de fréquence et de débit étudié, l'augmentation de la fréquence permet d'augmenter la vitesse de traitement, mais seule l'augmentation du débit améliore le rendement énergétique.

Le fait que le débit modifie l'efficacité est un résultat non intuitif. Le débit intervient sur la répartition globale des impulsions dans le volume total traité. En effet, lorsque le débit est lent, des grands groupes d'impulsions sont répétés à intervalle de temps long, alors que lorsque le débit est rapide, les groupes d'impulsions sont délivrés plus régulièrement mais en plus petit nombre.

Le générateur G2 va permettre d'approfondir ces deux constats sur une gamme de fréquence et de débit plus étendue.

I.4. CONCEPT DE DERIVATION – ETUDES EXPERIMENTALES

Les séries d'expériences suivantes ont pour but de valider de façon expérimentale les conclusions réalisées à partir des modèles théoriques. En particulier, vérifier que la vitesse de décontamination du volume total est bien prévisible à partir des valeurs d'abattement par passage dans l'applicateur, du volume total et du débit de traitement.

I.4.1. Modèle expérimental UV-C

Afin d'étudier expérimentalement la vitesse de décontamination d'un procédé de traitement par dérivation, des UV-C, connus pour leurs propriétés germicides, ont été utilisés.

Pour ce faire, deux systèmes en flux sont réalisés :

- L'un en flux ouvert permet de déterminer l'abattement induit par un unique passage dans la dérivation (*Figure 105 A*). Cette configuration permet d'éviter le mélange entre la suspension bactérienne traitée de celle qui ne l'est pas.
- L'autre en flux fermé simule les conditions d'une TAR (*Figure 105 B*). La configuration en flux fermé entraîne un mélange de la suspension traitée sortant de la dérivation avec celle stockée dans l'erenmeyer. C'est donc cette configuration qui est utilisée pour comparer les modèles théoriques.

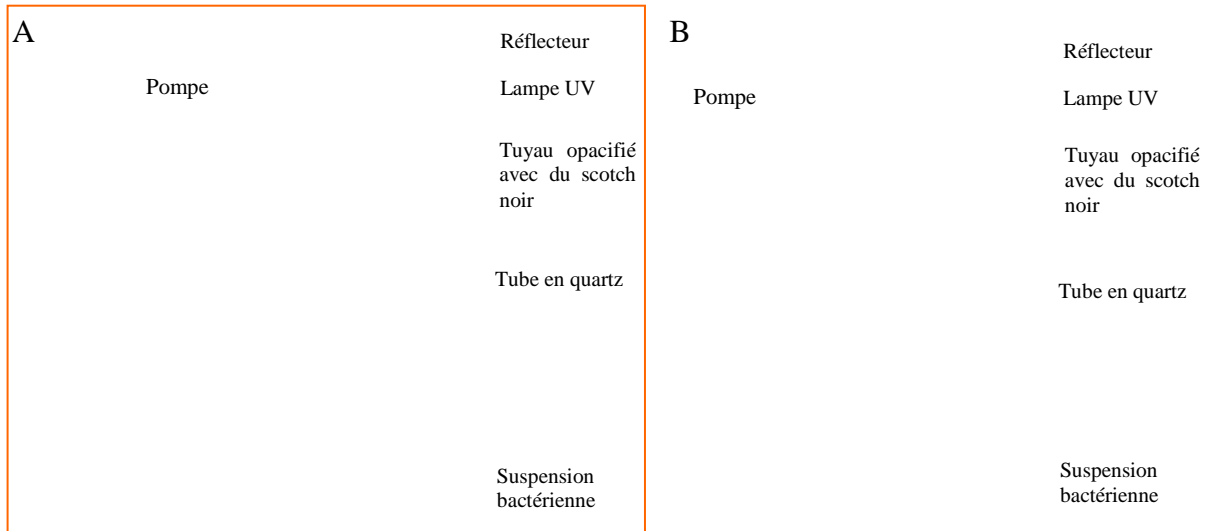


Figure 105 : (A) Appareillage UV-C en flux ouvert ; (B) Appareillage UV-C en flux fermé.

I.4.1.1 Détermination de la quantité d'UV émis

La décontamination bactérienne induite par le rayonnement UV-C d'une lampe à vapeur de mercure peut être déterminée par la « dose » reçue dépendante de plusieurs facteurs.

I.4.1.1.1 Calcul analytique

Les différentes variables sont présentées ci-dessous :

- Q_{uv} : la dose reçue en mJ.cm^{-2}
- I : l'intensité de radiation UV en mW.cm^{-2}
- t : le temps en s
- r : la distance entre la lampe et l'échantillon en cm. Elle doit être supérieure à 5 cm pour éviter les biais dus à l'échauffement
- l : la longueur de la lampe en cm
- P : la puissance de la lampe en W
- S : la surface de projection de la lampe en cm^2

Formules admise :

Équation 17 : Dose reçue selon l'intensité et le temps.

$$Q_{uv} = I \times t$$

Équation 18 : Intensité d'irradiation de la lampe.

$$I = \frac{P}{S}$$

Pour une distance r donnée, la puissance émise par la lampe (considérée comme une source cylindrique dans notre système) est répartie sur une surface S selon la formule :



Équation 19 : Surface de projection de la lampe.

$$S = 2 \times \pi \times r \times l$$

Il est possible de déduire la dose UV à partir des équations précédentes :

Équation 20 : Dose UV de la lampe selon la distance utilisée lors de l'expérience.

$$Q_{uv} = \left(\frac{P}{2 \times \pi \times r \times l} \right) \times t$$

Pour *E. coli*, la dose permettant une décontamination de 90 % (soit 1 log₁₀) est de 3,3 mJ/cm² (Hijnen et al., 2006). Cette valeur dépend de la nature et l'âge de source UV utilisée. Elle est prise en compte uniquement en tant qu'ordre de grandeur pour initier le premier protocole expérimental UV.

La lampe fonctionne à une puissance de 12 W avec un rendement considéré comme valant 100%. La longueur l de la lampe est de 12 cm. Avec ces éléments il est alors possible de réaliser l'application numérique en considérant que r = 10 cm. Dans ce cas :

$$t = \frac{3,3}{\frac{12\,000}{2 \times \pi \times 10 \times 12}} = 0,21 \text{ s}$$

I.4.1.1.2 Valeurs expérimentales en batch

Un test d'abattement a été mené en batch avec les conditions suivantes :

t = 2 s ; r = 10 cm ; l = 12 cm

Le protocole consiste à déposer une goutte de culture sur une lame de verre, pour l'exposer sous la lampe UV.

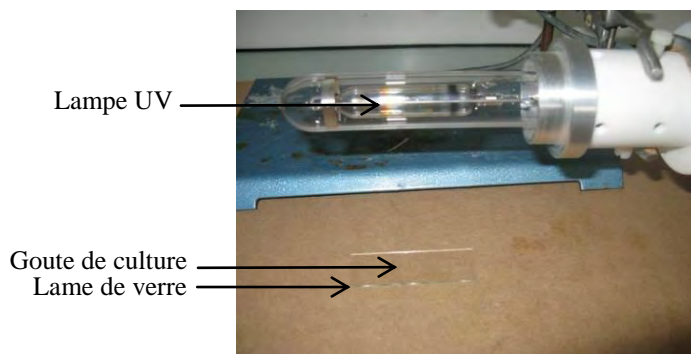


Figure 106: Mise en place du dispositif en batch.

En utilisant le dispositif montré dans la Figure 106, l'abattement obtenu est de 31%.

En considérant l'effet de dose linéaire, 90% aurait été obtenu en $t_{exp} = \frac{90}{31} \times 2 = 5,8 \text{ s}$.

A partir de ces données il est possible d'en définir la puissance :

$$P_{exp} = \frac{Q_{uv} \times S}{t} = \frac{3,3 \times 1885}{5,8} = 1072 \text{ mW}$$

La valeur est d'environ 1 W au lieu de 12 W attendus. Cette différence peut venir de l'âge de la lampe ou du spectre d'émission.



I.4.1.1.3 Comparaisons avec les valeurs expérimentales en flux

Pour cette étude, une pompe qui délivre 50 mL en 61 s a été utilisée. Son débit est alors de :
 $D = 50/61 = 0,82 \text{ mL/s}$.

Pour l'étude en flux nous pouvons considérer les paramètres suivants :

- L : Longueur de tube sous traitement en cm
- D : Débit de la pompe en mL/s
- d : Diamètre du tube de quartz en cm
- Z : Volume de la zone traitée en cm^3
- t : Temps de traitement induisant 1 \log_{10} d'abattement en min

Équation 21 : Formule de calcul de la zone traitée.

$$Z = \pi \times \left(\frac{d}{2}\right)^2 \times L$$

Pour obtenir 1 \log_{10} d'abattement avec un système en flux, il faut que le temps de résidence dans le tube corresponde au temps de traitement (t).

Le temps de résidence Tr correspond approximativement à Z/D .

Avec $L = 9 \text{ cm}$ et $d = 2 \text{ cm}$

$$Tr = \frac{Z}{D} = \frac{\pi \times \left(\frac{2}{2}\right)^2 \times 9}{0,82} = 34,5 \text{ s}$$

Le temps de résidence est de 34,5 s pour un abattement moyen de 50% alors que la valeur de référence est de 5,8 s pour un abattement de 90%. Cette différence vient probablement :

- Des approximations de la modélisation du flux dans le tube (Tr n'est pas exactement égal à Z/D)
- De la réflexion des UV à l'interface air-quartz et à l'interface quartz-eau
- De l'absorbance des UV dans le quartz et dans la suspension bactérienne où l'eau est chargée en divers ions et la concentration bactérienne est grande (10^8 bactéries/mL)
- De l'effet dose ayant un comportement non linéaire.

Les résultats en flux ouvert montrent un abattement d'environ 50%, ce qui est un peu faible. Pour augmenter l'efficacité des UV, deux « miroirs » ont été réalisés. L'un, en forme de demi-cylindre, est positionné au-dessus de la lampe, de façon à réfléchir les rayons partant à l'opposé du tube en quartz. L'autre, positionné sous le tube en quartz, a été réalisé de façon à ce que tous les rayons transmis soient réfléchis en direction du tube, comme le montre les *Figure 110* et *Figure 111*.

Grâce à ce système, l'abattement est passé de 50 % à environ 60 %.

I.4.1.1.4 Géométrie du miroir



Le miroir est parabolique, sa géométrie est réalisée de façon à réfléchir les rayons émis par la lampe en direction du tube. La partie centrale est positionnée à 10 cm sous le tube. Sa forme a été déterminée par le calcul.

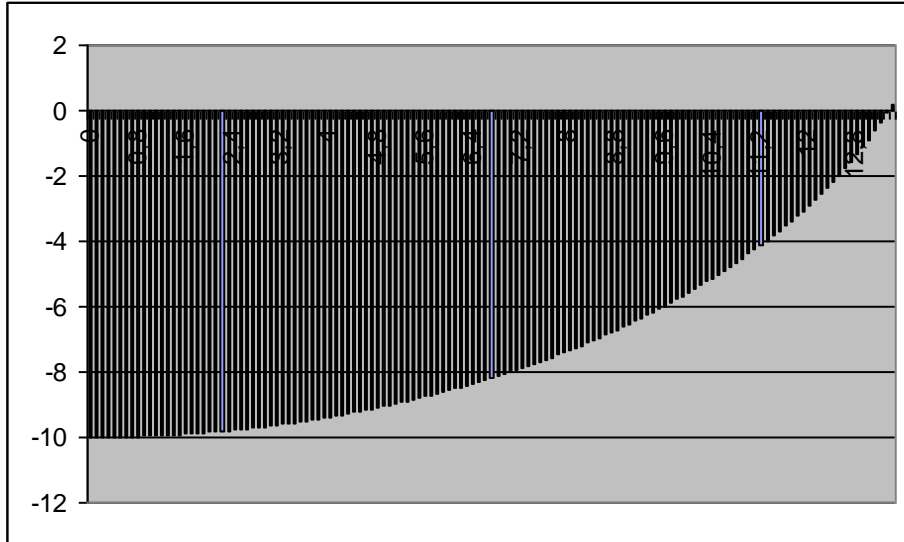


Figure 107: Graphique représentant la courbure du miroir calculé.

Réalisation du miroir :

Le miroir est réalisé à partir de la courbe obtenue avec le premier point A tel que $X = 0$ et $y = 10$. Plus le miroir est grand, plus il récupère de rayons donc plus il est efficace, mais plus il est encombrant.

La courbe est imprimée à l'échelle 1:1 en x et 1:1 en y, puis reportée sur deux surfaces en carton. Le symétrique par rapport à l'axe y est aussi reporté sur les deux surfaces, en repartant du premier point A, de façon à obtenir une parabole identique sur les deux surfaces. Les deux cartons sont ensuite fendus en suivant ces traits de constructions. La surface réfléchissante est construite avec une feuille de papier rigide, recouvert de papier aluminium. Elle est ensuite glissée dans les fentes des deux plaques en cartons positionnées de façon parallèle, séparées d'environ 12 cm.

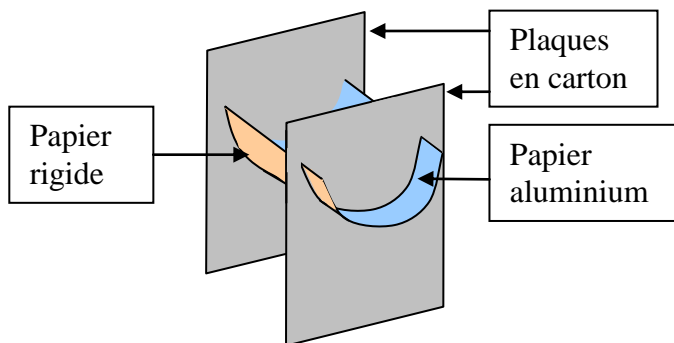


Figure 108: Schéma de la construction.



I.4.1.2 Résultats en flux fermé et comparaison avec le modèle théorique

I.4.1.2.1 Principe

Une suspension bactérienne (1 unité $DO_{\lambda=600}$) de 400 mL est stockée dans un erlenmeyer. Un système de pompe puise la suspension pour l'envoyer dans le tube en quartz soumis aux UV-C puis la renvoie dans l'erlenmeyer selon la *Figure 105B*.

Ce système constitue une TAR miniature : l'erlenmeyer correspond au réservoir où l'eau est stockée. La partie « tuyaux ; pompe ; système UV-C », correspond à la dérivation dans laquelle se trouve le système de décontamination. La concentration de la suspension est suivie au cours du temps, en utilisant la technique de dénombrement des UFC après étalement d'un échantillon sur boîte de Petri.

Avant et après l'expérience en flux fermé, un passage en flux ouvert dont le dispositif est représenté par la *Figure 105A* est réalisé afin de déterminer la valeur de l'abattement induit par un passage dans le tube exposé aux UV.



Figure 109: Photo d'expérience en flux, côté réservoir.

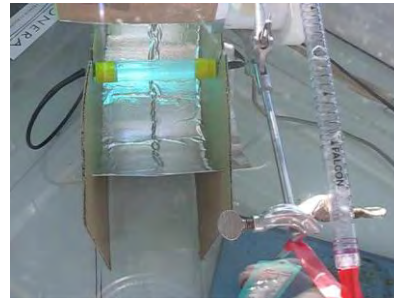


Figure 110 : Photo d'expérience en flux, côté dérivation.



Figure 111 : Vue globale du montage en flux.

I.4.1.2.2 Expérience contrôle

La lampe UV-C n'est pas allumée et de ce fait induit normalement un abattement nul. Elle permet de montrer l'incidence des passages mécaniques dans les tuyaux suite à l'action de la pompe péristaltique. Les résultats obtenus montrent qu'il n'y a pas d'abattement au cours du temps.



I.4.1.2.3 Expérimentations en flux – Concentration bactérienne initiale de 10^9 bactéries/mL

Les paramètres de flux sont identiques à ceux de l'expérience contrôle. Le volume à traiter est de 400 mL de suspension bactérienne à une concentration initiale proche de 10^9 bactéries/mL ; abattement par passage dans la dérivation de 60 % pour un débit de 0,8 mL/s.

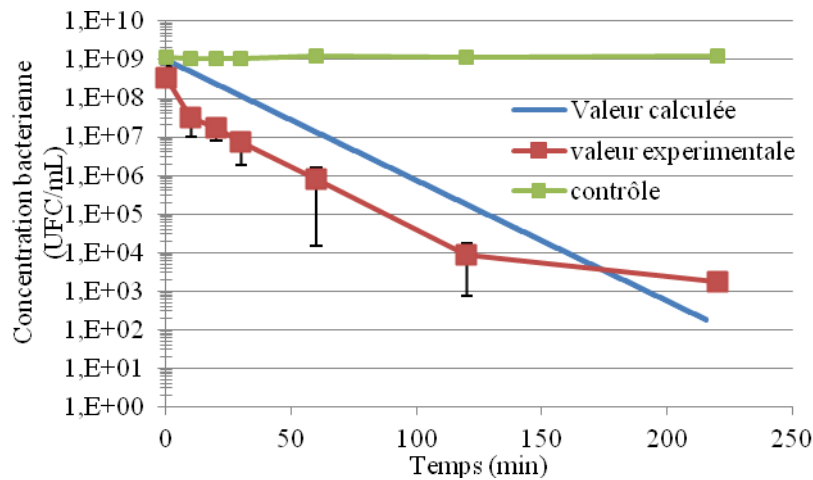


Figure 112 : Evolution de la concentration des bactéries *E. coli* BL21 (DE3) au cours du temps suite à l'exposition aux UV-C. Concentration initiale : 10^9 bactéries/mL, débit : 0,8 mL/s, volume total traité : 400 mL, abattement de 60% par passage dans la chambre de traitement. $N = 2$ expériences indépendantes. Pour chaque point de chaque expérience, 2 dénombrements des UFC sont réalisés.

Une réduction de $5 \log_{10}$ est observée en environ 200 min (Figure 112). Cette figure indique que le modèle théorique se comporte comme les données expérimentales jusqu'à 120 min. Après ce laps de temps, les résultats expérimentaux mettent en évidence une rupture de pente qui pourrait être assimilable au phénomène de « tailing ». Le tailing est un phénomène de diminution de l'efficacité de désinfection intervenant après un certain temps de traitement (cf. partie II.7).

I.4.1.2.4 Expérimentations en flux à la concentration de 10^7 bactéries/mL

Lors de ces expériences, la suspension initiale a été diluée au $100^{\text{ème}}$ avant d'être utilisée, les autres paramètres restant identiques à ceux mentionnés plus haut : volume de suspension de 400 mL à la concentration initiale de l'ordre de 10^7 bactéries/mL, abattement de 60 % par passage dans la dérivation, débit de 0,8 mL/s. Les courbes de ces conditions de flux sont présentées dans la Figure 113.

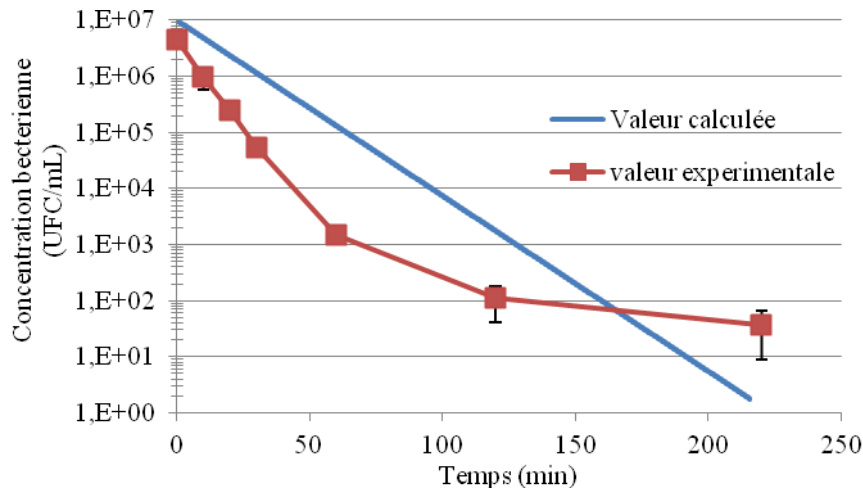


Figure 113 : Evolution de la concentration des bactéries *E. coli* BL21 (DE3) au cours du temps suite à l'exposition aux UV-C. Concentration initiale : 10^7 bactéries/mL, débit : 0,8 mL/s, abattement de 60% par passage dans la chambre de traitement. $N = 2$ expériences indépendantes. Pour chaque point de chaque expérience deux dénombrements des UFC sont réalisés.

La Figure 113 montre un comportement similaire aux résultats obtenus avec une concentration bactérienne plus élevée (Figure 112). Quelle que soit la concentration bactérienne de départ, un comportement similaire des bactéries est observé. La diminution de la concentration en *E. coli* BL21 (DE3) est rapide pour atteindre, au terme de 120 min, un abattement de l'ordre de $5 \log_{10}$. La diminution de concentration est légèrement plus lente à 10^9 UFC/mL qu'à 10^7 , traduisant un effet d'« ombrage » des UV par la densité optique élevée.

I.4.1.2.5 Expérimentation en flux - simulation de relargage de biofilm

Afin de simuler un relargage bactérien issu du biofilm, 5 mL de suspension non traitée sont ajoutés au milieu de culture toutes les 30 min, pour un volume de suspension de 400 mL à la concentration initiale proche de 10^8 bactéries/mL. L'abattement est de 60 % par passage dans la chambre de traitement et le débit est 0,8 mL/s.

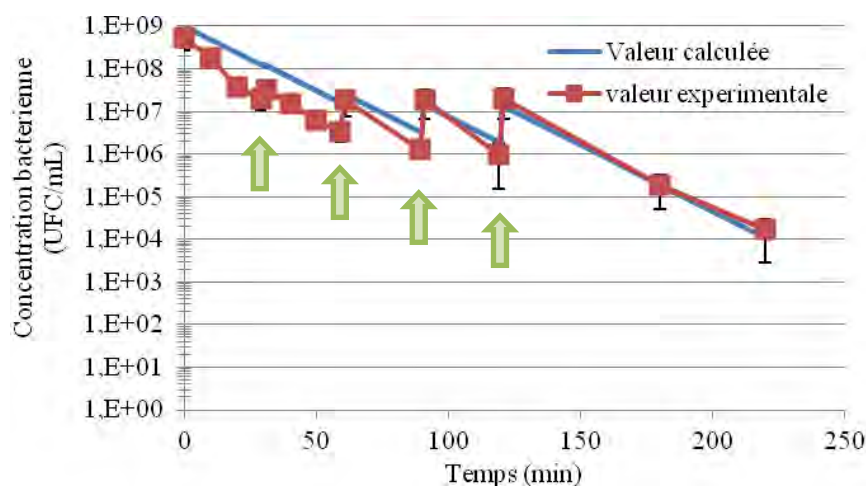


Figure 114 : Evolution de la concentration en bactéries *E. coli* BL21 (DE3) au cours du temps, après exposition aux UV-C et simulation de relargage de biofilm. Concentration initiale : 10^9 bact/mL, débit : 0,8 mL/s, volume totale traité : 400 mL, ajouts de 5 mL de bactéries à la concentration initiale, représentés par les flèches. $N = 2$ expériences indépendantes. Pour chaque point de chaque expérience, deux dénombrements des UFC sont réalisés.



Les résultats obtenus (*Figure 114*) montrent que lorsque l'équivalent d'un relargage de biofilm est ajouté à la suspension bactérienne, une augmentation conséquente de la concentration est observée, d'autant plus importante que la concentration bactérienne du milieu est faible. On constate la présence, suite à ces ajouts, de pentes constantes qui correspondent au taux d'abattement par passage (60% environ). Ces résultats sont en accord avec les prédictions du modèle théorique.

I.4.1.3 Conclusion sur les expériences UV

Pour cette étude, trois conditions différentes ont été testées :

- Suspension à forte concentration
- Suspension diluée
- Suspension à forte concentration, et ajout de suspension non traitée au cours de l'expérience afin de simuler des pics de contaminations (décrochement de biofilm), comme ils peuvent être observés dans les réseaux d'eaux industrielles.

Les courbes témoins permettent de mettre en évidence que sans traitement, il n'y a pas d'évolution de la concentration bactérienne au cours du temps. Cette stabilité correspond au postulat utilisé pour les calculs d'abattement dans le modèle théorique.

L'abattement par passage dans l'applicateur ne varie pas significativement au cours d'une expérience (il est déterminé deux fois : instantanément avant et instantanément après chaque expérience en flux fermé).

La valeur médiane d'abattement par passage dans l'applicateur est d'environ 60% sur l'ensemble des expériences. Malgré cet abattement par passage modéré, un très fort abattement global (de 5 \log_{10}) est obtenu en peu de temps (entre 120 et 220 min).

Suite à la validation du modèle par un système de décontamination utilisant les UV, des essais comparables ont été réalisés avec un système de décontamination par champs électriques pulsés nanosecondes (nsCEP).

I.4.2. Modèle expérimental « traitement nsCEP »

Le générateur G0 est utilisé pour comparer les résultats d'abattement obtenus par nsPEF avec le modèle théorique. Les conditions utilisées sont celles de l'expérience présentée dans la Partie VI - I.2.2.1 :

Tableau 25: Valeurs caractéristiques de l'expérience sur 5 mL avec G0 à 1 Hz et 1 $\mu\text{L/s}$.

Conditions :	Volume de départ (mL)	Débit de la pompe (mL/s)	Durée nécessaire au passage de 5 mL (min)	Volume de la chambre de traitement (mL)	Nombre d'impulsions par passage	Fréquence des impulsions (Hz)
	5	0,001	83,3	0,162	162	1

Comme pour les expériences UV-C, les premiers essais sont réalisés en flux ouvert afin de déterminer l'efficacité d'abattement produit par un passage dans l'applicateur.

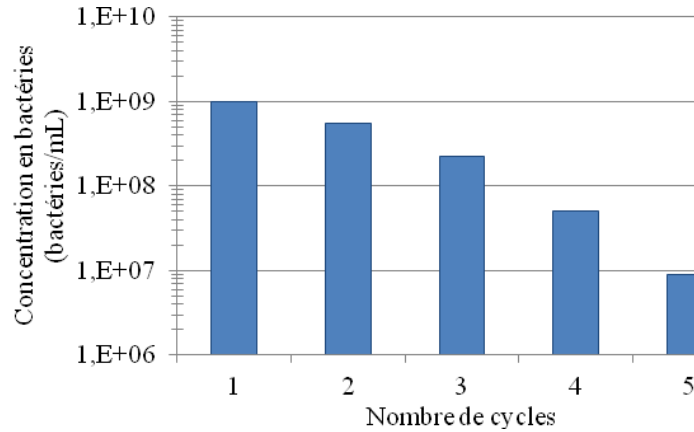


Figure 115: Expériences en flux ouvert permettant de déterminer le pourcentage de bactéries inactivées lors du passage dans l'applicateur.

Les résultats obtenus (Figure 115) montrent que l'abattement moyen induit par 1 passage (soit de n à $n+1$ cycles) dans l'applicateur est d'environ 66 % soit $0,47 \log_{10}$. A partir de cette valeur d'abattement, le modèle permet de déterminer la cinétique d'abattement en flux fermé. Cette cinétique est comparée aux résultats expérimentaux.

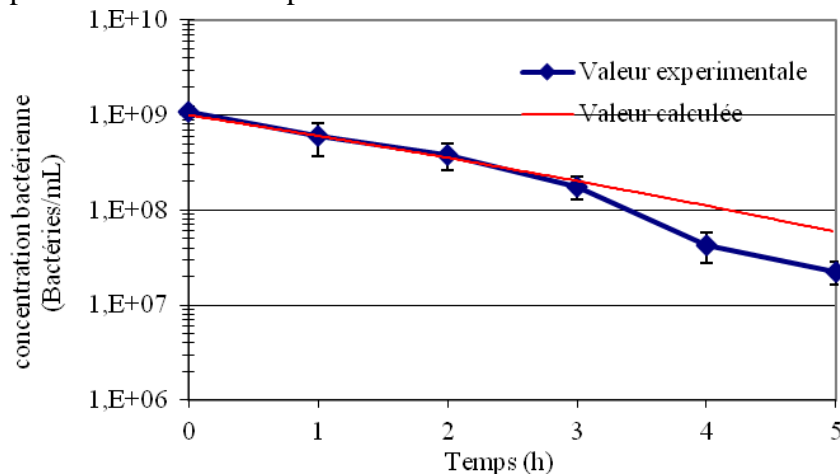


Figure 116 : Evolution de la concentration des bactéries *E. coli* BL21 (DE3) au cours du temps suite à l'exposition aux nsCEP. Concentration initiale : 10^9 bactéries/mL, débit : 0,001 mL/s, volume total traité : 5 mL, abattement de 66% par passage dans la chambre de traitement. $N = 2$ expériences indépendantes. Pour chaque point de chaque expérience, 2 dénombrements des UFC sont réalisés.

Les valeurs expérimentales et calculées sont très proches, ce qui montre que le modèle fonctionne bien avec des procédés nsCEP.

I.4.3. Conclusion

Plusieurs informations sont obtenues à partir de résultats précédents. En premier lieu, ils valident le modèle théorique sur les premières heures de traitement. En effet, la modélisation mathématique et les valeurs expérimentales montrent tous deux une décroissance de type logarithmique. Les vitesses de décontaminations globales calculées par le modèle et obtenues expérimentalement sont proches. La concentration de départ ne change pas l'efficacité. En effet, la pente de la courbe reste approximativement la même pour les expériences à 10^7 UFC/mL et 10^9 UFC/mL. Les résultats



montrent également qu'il est possible d'obtenir une décontamination globale de plusieurs \log_{10} à partir d'un système de traitement local ne détruisant qu'environ 60 % de bactéries. Le phénomène de tailing apparait dans certaines expériences (*Figure 112* et *Figure 113*). Il est expliqué dans la partie II.7 mais n'est pas prévu dans le modèle.

II. ESSAIS D'OPTIMISATION DE L'ABATTEMENT PAR NSCEP – GENERATEUR G2

Le générateur G2 peut fonctionner dans une gamme de fréquence comprise entre 1 et 20 Hz. Dans la plupart des expériences, il est utilisé à 20 Hz, c'est-à-dire au maximum de sa puissance. Les débits utilisés vont de 10 $\mu\text{L/s}$ à 3 200 $\mu\text{L/s}$. Les essais sont réalisés en flux fermé.

II.1. COMPARAISON AVEC LE GENERATEUR G0

Le G2 peut fonctionner dans une gamme de fréquence comprise entre 1 et 20 Hz. Cependant, il diffère du G0 par sa conception. Pour observer l'impact du changement de cette nouvelle technologie, l'expérience à 2 Hz, 10 $\mu\text{L/s}$ sur 5 mL, déjà réalisée sur G0 au CERPEM et à VERI, est réalisée avec ce nouveau générateur.

Tableau 26: Valeurs caractéristiques de l'expérience sur 5 mL avec G2 à 2 Hz et 10 $\mu\text{L/s}$.

Conditions :	Volume de départ (mL)	Débit de la pompe (mL/s)	Durée nécessaire au passage de 5 mL (min)	Volume de la chambre de traitement (mL)	Nombre d'impulsions par passage	Fréquence des impulsions (Hz)
	5	0,01	8,3	0,162	32,4	2

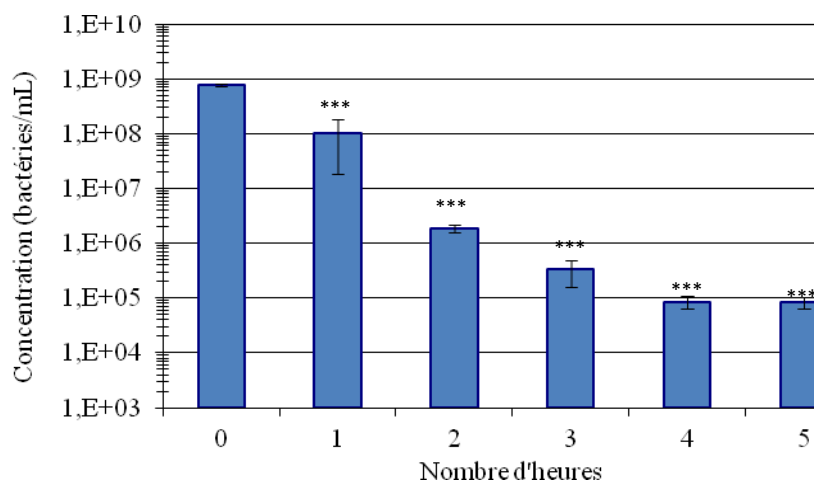


Figure 117 : Cinétique d'abattement pour un volume traité de 5 mL avec G2 à 2 Hz et 10 $\mu\text{L/s}$. Moyenne de 2 expériences. Pour chaque expérience, deux étalements par point sont réalisés. Les statistiques sont obtenues par des tests de Student réalisés entre la série de valeur du point à T0 et la série de valeur du point considéré : *** : $P \leq 0,005$.



Un \log_{10} d'abattement est obtenu en 1 h.

- Calcul de l'énergie rapportée à 1 L et 1 \log_{10} :

Le nombre d'impulsions délivrées pendant cette heure de traitement est :

$$N_{puls} = 1 \times 3600 \times 2 = 7200 \text{ impulsions}$$

D'où

$$W_c = \frac{0,3 \times 7200 \times 1}{0,005} \approx 432\,000 \frac{J}{L} = 432 \frac{kJ}{L}$$

Le calcul du pourcentage d'erreur, basé sur le calcul de la moyenne des écarts types, permet de prendre en compte l'imprécision de la mesure, ainsi : $245 \text{ kJ/L} < W_c < 619 \text{ kJ/L}$.

Ces résultats restent similaires à ceux obtenus précédemment avec le G0. Avec les mêmes modes de fonctionnement, les éradications ne varient pas en fonction des générateurs.

Les résultats des expériences réalisées avec le G0 peuvent donc être étendus à ceux obtenus avec le G2.

II.2. EFFET DE L'AUGMENTATION DE LA FREQUENCE

Pour vérifier les premiers résultats obtenus avec G0 indiquant que le rendement énergétique n'était pas affecté par l'augmentation de la fréquence, le générateur G2 est utilisé à 20 Hz. Le débit et le volume traité sont également multipliés par 10 afin de conserver respectivement les 32,4 impulsions par passage dans l'applicateur et les 8,3 min (500 s) de durée de cycle.

Tableau 27 : Valeurs caractéristiques de l'expérience sur 50 mL avec G2 à 20 Hz et 100 $\mu\text{L/s}$.

Conditions :	Volume de départ (mL)	Débit de la pompe (mL/s)	Durée nécessaire au passage de 50 mL (min)	Volume de la chambre de traitement (mL)	Nombre d'impulsions par passage	Fréquence des impulsions (Hz)
	50	0,1	8,3	0,162	32,4	20

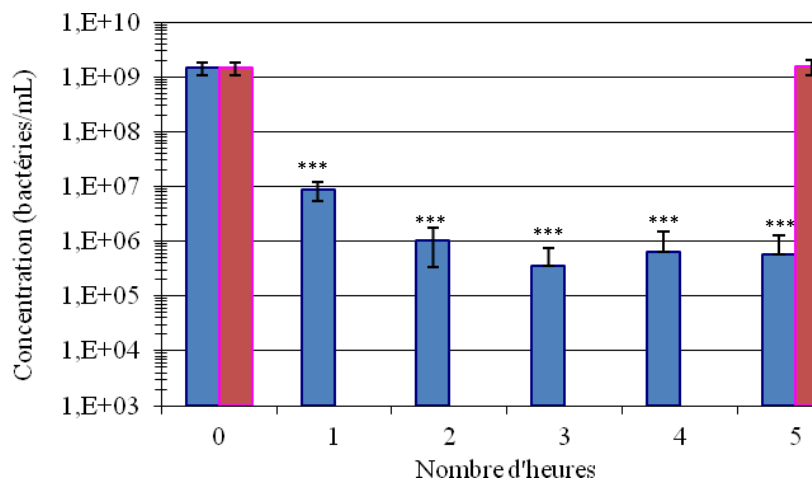


Figure 118 : Cinétique d'abattement pour un volume traité de 50 mL avec G2 à 20 Hz et 100 $\mu\text{L/s}$. Moyenne de 3 expériences. Pour chaque expérience, trois étalements par point sont réalisés. Les statistiques sont obtenues par des tests de Student réalisés entre la série de valeur du point à T0 et la série de valeur du point considéré : *** : $P \leq 0.005$.



1 log₁₀ d'abattement est obtenu en 0,5 h.

- Calcul de l'énergie pour un abattement de 1 log₁₀ rapporté à 1 L :

Le nombre d'impulsions délivrées pendant ces 0,5 h de traitement est :

$$N_{impulsion} = 0,5 \times 3600 \times 20 = 36\,000 \text{ impulsions}$$

D'où

$$W_c = \frac{0,3 \times 36\,000 \times 1}{0,05} \approx 216\,000 \frac{J}{L} = 216 \frac{kJ}{L}$$

Le calcul du pourcentage d'erreur, basé sur le calcul de la moyenne des écarts types, permet de prendre en compte l'imprécision de la mesure, ainsi : 148 kJ/L < Wc < 284 kJ/L.

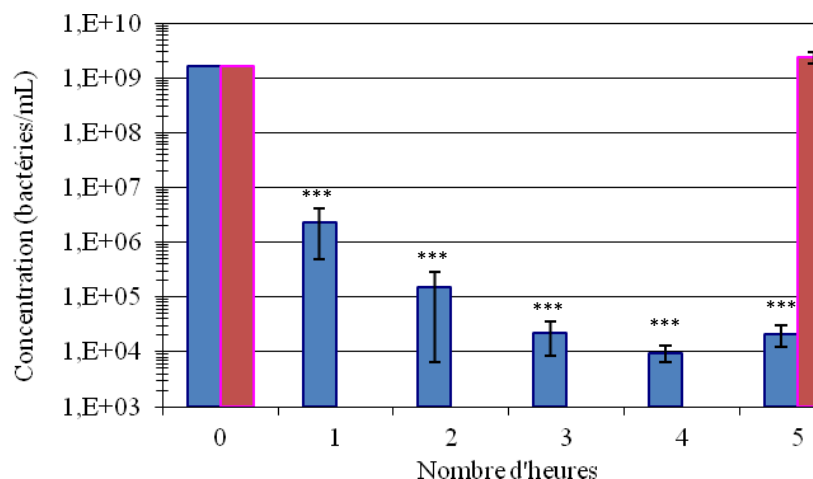
L'abattement pour 1 log₁₀ est obtenu en 30 minutes, avec une consommation énergétique de 216 kJ/L. Ces conditions sont les plus favorables en coût énergétique et comparables aux conditions 1 ou 2 Hz à 10 µL/s, donc aux mêmes temps de cycles.

II.3. EFFET DE L'AUGMENTATION DU DEBIT

Comme le débit semble avoir un impact important dans l'abattement bactérien, une expérience a été menée de telle façon à n'obtenir qu'une impulsion par passage dans l'applicateur. Ces conditions de traitement sont résumées dans le *Tableau 28* :

Tableau 28 : Valeurs caractéristiques de l'expérience sur 50 mL avec G2 à 20 Hz et 3 200 µL/s.

Conditions :	Volume de départ (mL)	Débit de la pompe (mL/s)	Durée nécessaire au passage de 50 mL (min)	Volume de la chambre de traitement (mL)	Nombre d'impulsions par passage	Fréquence des impulsions (Hz)
	50	3,2	0,26	0,162	1	20



*Figure 119 : Cinétique d'abattement pour un volume traité de 50 mL avec G2 à 20 Hz et 3 200 µL/s. Moyenne de 3 expériences. Pour chaque expérience, trois étalements par point sont réalisés. Les statistiques sont obtenues par des tests de Student réalisés entre la série de valeur du point à T0 et la série de valeur du point considéré : *** : P ≤ 0,005.*



Le temps de cycle est réduit à 16 s. Trois \log_{10} d'abattelements sont obtenus en 1 h. 1 \log_{10} d'abattement est donc atteint en 0,33 h.

- Calcul de l'énergie pour un abattement de 1 \log_{10} rapporté à 1 L :

Le nombre d'impulsions délivrées pendant ces 0,33 h de traitement est :

$$N_{impulsion} = 0,33 \times 3600 \times 20 = 24\ 000 \text{ impulsions}$$

D'où

$$W_c = \frac{0,3 \times 24\ 000 \times 1}{0,05} \approx 144\ 000 \frac{J}{L} = 144 \frac{kJ}{L}$$

Le calcul du pourcentage d'erreur, basé sur le calcul de la moyenne des écarts types, permet de prendre en compte l'imprécision de la mesure, ainsi : $86 \text{ kJ/L} < W_c < 199 \text{ kJ/L}$.

Ces deux nouvelles conditions où la fréquence a été multipliée par 10 (*Figure 118* et *Figure 119*) confirment que l'augmentation du débit entraîne une sensible amélioration du rendement énergétique.

Ces résultats confirment l'hypothèse basée sur les observations avec le G0 et 10 impulsions par passage : une impulsion a un effet minime mais qui se cumule. Ainsi, il n'existe pas un nombre d'impulsions seuil pour lequel les bactéries deviendraient sensibles, mais chaque impulsion induit l'inactivation de quelques bactéries au sein de la suspension. En cumulant ces impulsions, les inactivations s'ajoutent alors jusqu'à devenir visibles lors du dénombrement sur boîte de Petri.

II.4. ESSAI DE L'AUGMENTATION DE LA VITESSE D'ABATTEMENT

Pour montrer qu'il est possible d'obtenir de forts abattements très rapidement, il est intéressant de tester des conditions de traitements plus drastiques. Ainsi, les conditions de l'expérience II.3 sont testées avec un volume plus faible (5 mL). L'énergie du générateur n'est plus répartie dans les 50 mL de suspension mais est concentré dans un volume 10 fois plus faible. La pompe utilisée pour les expériences à 50 mL ne peut être utilisée pour les expériences à 5 mL, car le diamètre de tuyaux est trop important et induit un volume dans les tuyaux supérieur à 5 mL. Une pompe plus petite est utilisée. Elle n'atteint pas un débit suffisant pour obtenir 1 impulsion par passage, mais est beaucoup plus rapide que celle utilisée pour les premières expériences à 5 mL, ce qui permet d'atteindre 0,04 mL/s. A ce débit, 81 impulsions par passage sont délivrées à 20 Hz. Le temps de cycle devient égal à 125 s.

Un abattement très rapide est attendu puisque seulement 5 mL sont traités. Par conséquent, il est nécessaire de rapprocher les temps de prélèvements pour conserver une bonne résolution sur la partie descendante de la courbe. Car le tassement de la courbe interviendra plus rapidement.

Tableau 29 : Valeurs caractéristiques de l'expérience sur 5 mL avec G2 à 20 Hz et 40 $\mu\text{L/s}$.

Conditions :	Volume de départ (mL)	Débit de la pompe (mL/s)	Durée nécessaire au passage de 5 mL (min)	Volume de la chambre de traitement (mL)	Nombre d'impulsions par passage	Fréquence des impulsions (Hz)
	5	0,04	2,1	0,162	81	20

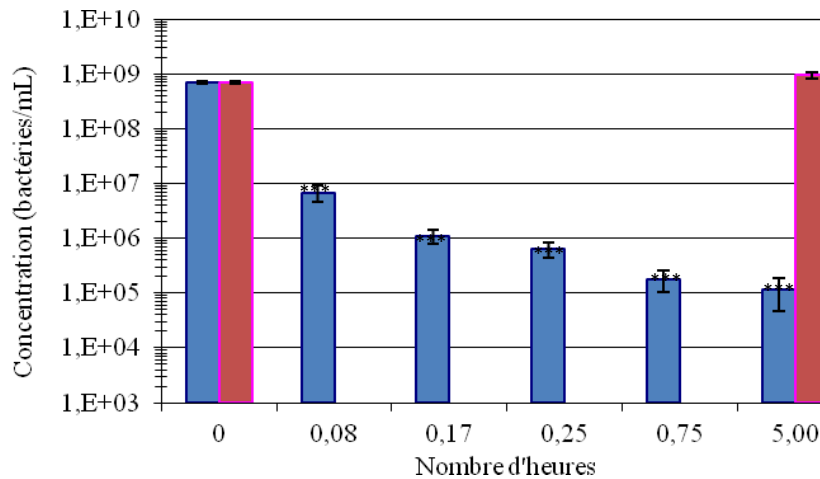


Figure 120 : Cinétique d'abattement pour un volume traité de 5 mL avec G2 à 20 Hz et 40 $\mu\text{L/s}$. Moyenne de 3 expériences. Pour chaque expérience, trois étalements par point sont réalisés. Les statistiques sont obtenues par des tests de Student réalisés entre la série de valeur du point à T0 et la série de valeur du point considéré : *** : $P \leq 0,005$.

Un \log_{10} d'abattement est obtenu en 2,5 min = 0,0414 h.

- Calcul de l'énergie pour un abattement de 1 \log_{10} rapporté à 1 L :

Le nombre d'impulsions délivrées pendant ces 0,0414 h de traitement est :

$$N_{\text{impulsion}} = 0,0414 \times 3600 \times 20 = 3024 \text{ impulsions}$$

D'où

$$W_c = \frac{0,3 \times 3024 \times 1}{0,005} \approx 181\,000 \frac{\text{J}}{\text{L}} = 181 \frac{\text{kJ}}{\text{L}}$$

Le calcul du pourcentage d'erreur, basé sur le calcul de la moyenne des écarts types, permet de prendre en compte l'imprécision de la mesure, ainsi : $145 \text{ kJ/L} < W_c < 218 \text{ kJ/L}$.

Comme attendu, l'abattement observé est très rapide. Cependant, comme seulement 5 mL sont traités, il apparaît que le rendement énergétique pour obtenir 1 \log_{10} d'abattement rapporté à 1 litre n'est pas amélioré. Il est similaire à ceux obtenus à 50 mL et 3200 $\mu\text{L/s}$ et 50 mL et 100 $\mu\text{L/s}$. Il apparaît donc que le débit n'est pas le seul paramètre à prendre en compte car cette dernière expérience est réalisée à 40 $\mu\text{L/s}$. Si seul le débit intervenait, le rendement aurait dû être plus faible que l'expérience à 100 $\mu\text{L/s}$. Le volume total traité et par là le « temps par cycle » impacte également le rendement.

II.5. IMPACT DE LA CONCENTRATION INITIALE

Toutes les expériences sont réalisées à 10^9 UFC/mL. Ces conditions sont classiques en recherche microbiologique. Cependant, en conditions pilotes, les concentrations seront forcément plus faibles sachant que le seuil d'alerte de contamination d'un réseau d'eau est à 10^3 UFC/mL. L'expérience suivante consiste donc à diluer par 100 la suspension normalement utilisée, pour travailler à 10^7 UFC/mL. Les conditions utilisées sont les mêmes que dans l'expérience présentée dans la partie II.4.



Tableau 30 : Valeurs caractéristiques de l'expérience sur 5 mL avec G2 à 20 Hz et 40 $\mu\text{L/s}$.

Conditions :	Volume de départ (mL)	Débit de la pompe (mL/s)	Durée nécessaire au passage de 50 mL (min)	Volume de la chambre de traitement (mL)	Nombre d'impulsions par passage	Fréquence des impulsions (Hz)
	5	0,04	2,1	0,162	81	20

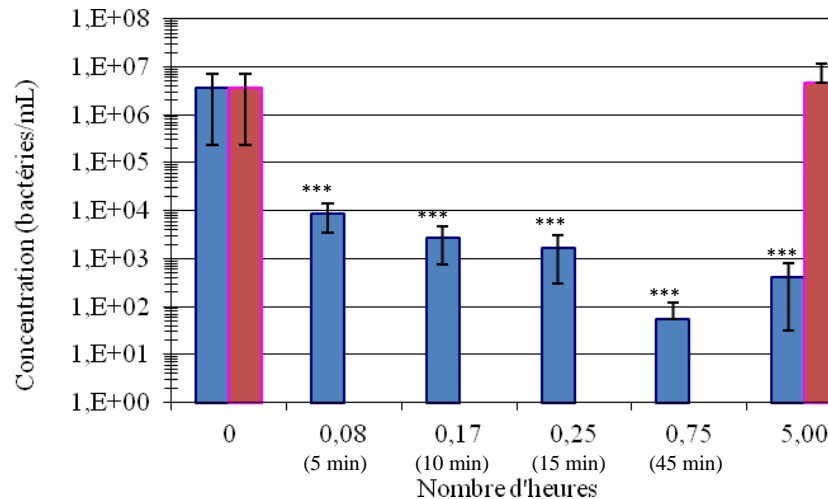


Figure 121 : Cinétique d'abattement pour un volume traité de 5 mL avec G2 à 20 Hz et 40 $\mu\text{L/s}$. Moyenne de 3 expériences. Pour chaque expérience, trois étalements par point sont réalisés. Les statistiques sont obtenues par des tests de Student réalisés entre la série de valeur du point à T0 et la série de valeur du point considéré : *** : $P \leq 0,005$.

2,5 \log_{10} sont obtenues en 5 min. Donc 1 \log_{10} d'abattement est obtenu en 2 minutes soit 0,033 h.

- Calcul de l'énergie pour un abattement de 1 \log_{10} rapporté à 1 L :

Le nombre d'impulsions délivrées pendant ces 0,033 h de traitement est :

$$N_{impulsion} = 0,033 \times 3600 \times 20 = 2400 \text{ impulsions}$$

D'où

$$W_c = \frac{0,3 \times 2400 \times 1}{0,005} = 144\,000 \frac{\text{J}}{\text{L}} = 144 \frac{\text{kJ}}{\text{L}}$$

Le calcul du pourcentage d'erreur, basé sur le calcul de la moyenne des écarts types, permet de prendre en compte l'imprécision de la mesure, ainsi : $33 \text{ kJ/L} < W_c < 255 \text{ kJ/L}$.

Ces résultats sont proches de ceux obtenus avec une suspension à 10^9 UFC/mL. La concentration initiale n'a donc pas d'impact sur l'efficacité d'abattement. Par ailleurs, dans les deux cas, environ 4 \log_{10} d'abattement sont obtenues au bout des 5 h de traitement. La concentration initiale est donc passée de 10^9 UFC/mL à 10^5 UFC/mL pour la première expérience, et de 10^7 UFC/mL à 10^3 UFC/mL pour la seconde. Cette conclusion renforce la validité du processus pour le maintien des populations de contaminants en dessous du seuil critique dans des conditions de coût définies.

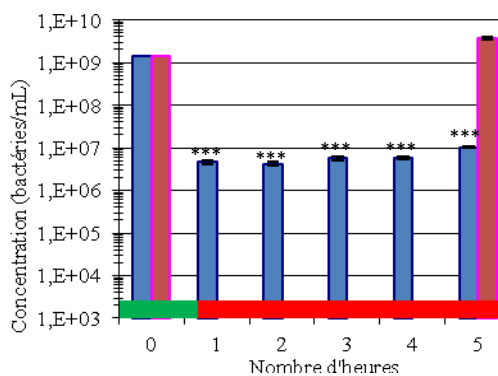


II.6. ETUDE DE L'EFFET DE REMANENCE

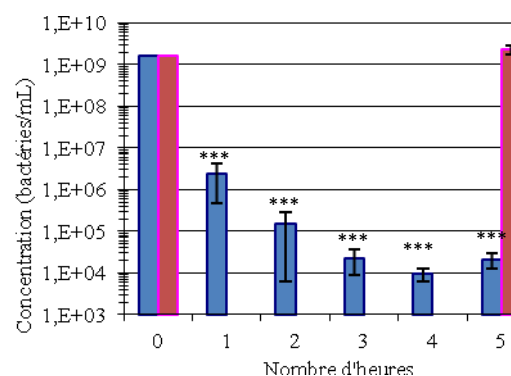
Certains procédés de décontamination comme l'UV et l'ozonation ont un effet rémanent, c'est à dire qu'ils continuent à avoir une activité bactéricide même après l'application du traitement (Lazarova et al., 1998). De plus, Reyns *et al* ont montré qu'une incubation post-traitement (pendant 1,5 h, après un traitement de 300 impulsions de 2 μ s à 26,7 kV/cm et selon une fréquence de 5 Hz) a un effet bactéricide (Reyns et al., 2004). Afin de déterminer si les nsCEP peuvent avoir un effet rémanent, une expérience a été menée en repartant des conditions de traitement à 50 mL (traitement « lent »), dont les caractéristiques sont résumées dans le *Tableau 31*.

Tableau 31 : Valeurs caractéristiques de l'expérience sur 50 mL avec G2 à 20 Hz et 3 200 μ L/s.

Conditions :	Volume de départ (mL)	Débit de la pompe (mL/s)	Durée nécessaire au passage de 50 mL (min)	Volume de la chambre de traitement (mL)	Nombre d'impulsions par passage	Fréquence des impulsions (Hz)
	50	3,2	0,26	0,162	1	20



*Figure 122 : Cinétique d'abattement pour un volume traité de 50 mL pendant 1 h (vert) avec G2 à 20 Hz et 3200 μ L/s. Moyenne de 3 expériences. Pour chaque expérience, trois étalonnages par point sont réalisés. Les statistiques sont obtenues par des tests de Student réalisés entre la série de valeur du point à T0 et la série de valeur du point considéré : *** : $P \leq 0,005$.*



Cinétique obtenue dans les mêmes conditions maintenues pendant 5 h (Figure 119).

2,5 \log_{10} d'abattement sont obtenus en 1 h. Donc 1 \log_{10} est obtenu en $1 / 2,5 = 0,4$ h.

- Calcul de l'énergie pour un abattement de 1 \log_{10} rapporté à 1 L :

Le nombre d'impulsions délivrées pendant ces 0,4 h de traitement est :

$$N_{impulsion} = 0,4 \times 3600 \times 20 = 28\,800 \text{ impulsions}$$

D'où

$$W_c = \frac{0,3 \times 28\,800 \times 1}{0,05} \approx 172\,800 \frac{J}{L} = 173 \frac{kJ}{L}$$



Le calcul du pourcentage d'erreur, basé sur le calcul de la moyenne des écarts types, permet de prendre en compte l'imprécision de la mesure, ainsi : $79 \text{ kJ/L} < W_c < 266 \text{ kJ/L}$.

Les données obtenues sur la première heure sont proches de celles avec l'expérience réalisée dans les mêmes conditions sur 5 h. Même si ce n'était pas l'objectif principal, ce point de comparaison permet d'assurer que les expériences sont reproductibles, avec une faible marge de dispersion.

La conclusion majeure est que la décontamination n'a lieu que lors de l'application du traitement nsPEF et qu'aucun effet n'est présent par simple contact avec de l'eau traitée. Il n'y a donc pas de toxicité sur le long terme de l'eau électro-traitée.

II.7. ETUDE DU PHENOMENE DE « TAILING »

Les différentes expériences d'abattement par un processus en flux fermé conduisent à des comportements similaires. En effet, elles sont assimilables à des droites sur les deux premiers \log_{10} d'abattement, puis s'infléchissent généralement à partir du troisième \log_{10} de réduction jusqu'à atteindre un plateau. Ce phénomène a déjà été décrit dans plusieurs publications traitant de la décontamination par nsCEP (Lubicki and Jayaram, 1997; Pataro et al., 2010; Perni et al., 2007).

Cet infléchissement de l'abattement au cours du temps existe également dans la décontamination par UV. Il est observé dans les expériences mentionnées dans la Partie VI -I.4.1.2, et également dans certaines publications où il est expliqué par la présence de particules obstruant la diffusion des UV dans la suspension ((Loge et al., n.d.; Qualls, R.G., Flynn, M.P., Johnson, 1983; Tan, 2007)). Il est nommé « tailing ». La technologie UV étant différente de la technologie des nsCEP, les conclusions sur le tailing en UV ne sont pas directement transposables sur les champs électriques. Une étude de ce phénomène a donc été réalisée avec le générateur G2.

Deux hypothèses ont pu être formulées :

- Les bactéries ont des mécanismes de réaction qui les rendent de moins en moins sensibles aux impulsions au cours de l'expérience (résistance acquise en quelques heures sans croissance).
- Il existe des volumes morts dans le système en flux qui ne sont jamais traités au niveau des raccords des tuyaux, en amont et en aval des électrodes comme dans les gouttelettes projetées sur les parois du contenant. Ces derniers rejettent alors de façon régulière de petits volumes de suspensions bactériennes à la concentration initiale.

Pour vérifier ces hypothèses, les conditions utilisées sont résumées dans le *Tableau 32*, et sont identiques à celles présentées dans la partie (II.4) où le plateau est obtenu très rapidement.

Tableau 32 : Valeurs caractéristiques de l'expérience sur 5 mL avec G2 à 20 Hz et 40 $\mu\text{L/s}$.

Conditions :	Volume de départ (mL)	Débit de la pompe (mL/s)	Durée nécessaire au passage de 5 mL (min)	Volume de la chambre de traitement (mL)	Nombre d'impulsions par passage	Fréquence des impulsions (Hz)
	5	0,04	2,1	0,162	81	20



Après 2 h, quand la phase plateau commence à être atteinte, le générateur est arrêté et la suspension traitée est alors récupérée dans un erlenmeyer stérile. Une fois vidé, le circuit est rincé à l'éthanol 70° puis à l'eau de façon à le remettre à son état initial. La suspension est alors réintroduite dans le circuit pour réaliser à nouveau 2 heures de traitement.

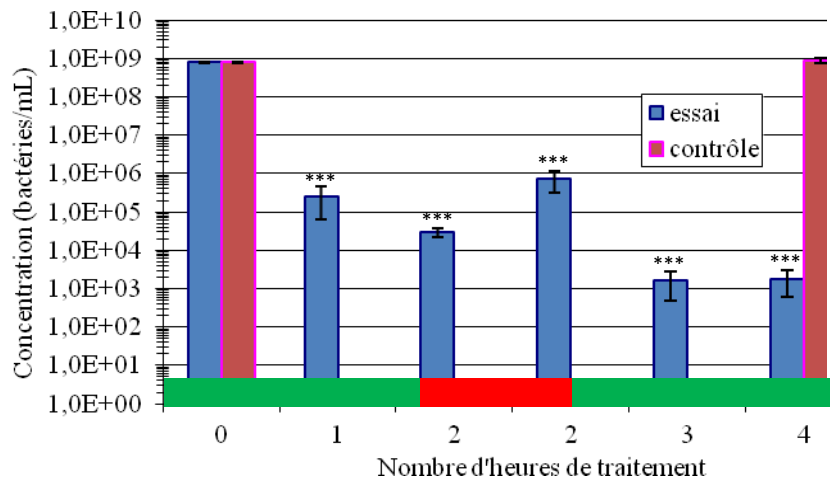


Figure 123 : Cinétique d'abattement pour un volume traité de 5 mL avec G2 à 20 Hz et 40 μ L/s traités en 2 périodes de 2 h (vert) avec une homogénéisation entre les 2 périodes (rouge). Moyenne de 3 expériences. Pour chaque expérience, trois étalements par point sont réalisés. Les statistiques sont obtenues par des tests de Student réalisés entre la série de valeur du point à T0 et la série de valeur du point considéré : *** : $P \leq 0,001$.

La Figure 123 montre que le fait d'homogénéiser le volume au milieu de l'expérience induit :

- Une reprise de la décontamination proche de celle à T0 ($3,5 \log_{10}$ entre T0 et T+1h et $3 \log_{10}$ entre T'0 et T'+1h) lors de la seconde phase.
- Un saut de la concentration mesurée juste après le remixage.

Ces deux phénomènes montrent que les bactéries n'ont pas développé de résistance et que la concentration totale de la suspension est supérieure à celle mesurée lors des prélèvements. Cette seconde observation montre qu'il y a un manque d'homogénéité dans la circulation de la suspension.

Ces résultats rejettent donc la première hypothèse et valident la seconde. Il y a donc nécessité de veiller à l'absence de tous les volumes morts dans le circuit principal pour limiter les risques.

III. ETUDE D'ABATTEMENT PAR NSCEP - GENERATEUR G3

Le générateur G3 a été testé en laboratoire. Des contraintes techniques ont imposé des adaptations. Pour ces essais, il n'a été utilisé qu'à 100 Hz, en unipolaire. La fréquence étant cinq fois plus élevée que celle du G2 (20 Hz), la vitesse de traitement est plus grande, le volume total traité est donc augmenté.

L'augmentation de la fréquence a également entraîné une augmentation du débit, afin de maintenir un faible nombre d'impulsions par passage dans l'applicateur.



Pour augmenter le débit, une nouvelle pompe a pu être utilisée. Sachant que le volume total traité est plus important (500 mL), il a été possible d'utiliser une pompe ayant un plus grand dimensionnement avec des tuyaux de plus gros diamètres. Le volume dispersé dans les tuyaux reste largement inférieur aux 500 mL. Dans ces conditions, le temps de cycle est de 60 s.

Tableau 33 : Valeurs caractéristiques de l'expérience sur 500 mL avec G3 à 100 Hz et 8 mL/s.

Conditions :	Volume de départ (mL)	Débit de la pompe (mL/s)	Durée nécessaire au passage de 500 mL (min)	Volume de la chambre de traitement (mL)	Nombre d'impulsions par passage	Fréquence des impulsions (Hz)
	500	8	1	0,162	2	100

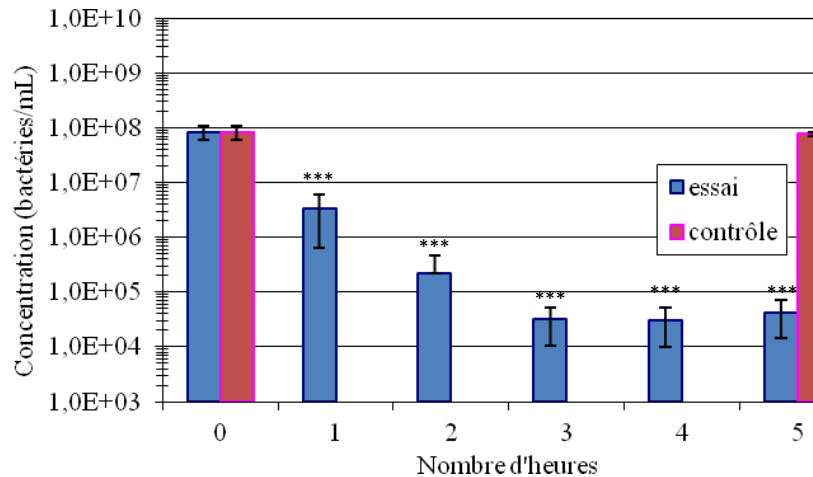


Figure 124: Cinétique d'abattement pour un volume traité de 500 mL avec le G3 à une fréquence de 100 Hz et un débit de 8 mL/s. Moyenne de 3 expériences. Pour chaque expérience, trois étalements par point sont réalisés. Les statistiques sont obtenues par des tests de Student réalisés entre la série de valeur du point à T0 et la série de valeur du point considéré : *** : $P \leq 0,001$.

Un \log_{10} d'abattement est obtenu en 0,7 h.

- Calcul de l'énergie pour un abattement de 1 \log_{10} rapporté à 1 L :

Le nombre d'impulsions délivrées pendant ces 0,7 h de traitement est :

$$N_{impulsion} = 0,7 \times 3600 \times 100 = 252\ 000 \text{ impulsions}$$

D'où

$$W_c = \frac{0,3 \times 252\ 000 \times 1}{0,5} \approx 151\ 000 \frac{J}{L} = 151 \frac{kJ}{L}$$

Le calcul du pourcentage d'erreur, basé sur le calcul de la moyenne des écarts types, permet de prendre en compte l'imprécision de la mesure, ainsi : $68 \text{ kJ/L} < W_c < 235 \text{ kJ/L}$.

Grace à l'augmentation de la fréquence et du débit, le volume traité a pu être augmenté. Le nombre d'impulsions par passage dans l'applicateur reste très faible et le rendement énergétique est très bon.



Les hautes intensités des champs électriques utilisés rendent difficile la réalisation d'applicateurs acceptant directement de gros volumes dans la chambre de traitement car les générateurs de tension sont limités à 20 kV. La solution technique est l'utilisation d'un flux qui apporte la suspension dans l'applicateur illustrant le concept de dérivation.

Il a été montré qu'il était assez aisé de passer d'un système en batch à un système en flux, puis d'augmenter la vitesse de traitement. En augmentant le débit conjointement à la fréquence de répétition des nsCEP, de façon à conserver au moins 1 impulsion par passage dans l'applicateur, il a été possible d'augmenter drastiquement le volume traité tout en améliorant le rendement énergétique. En effet, en batch, le volume traité était de 162 μL , avec un rendement énergétique de 920 kJ/L pour 1 \log_{10} (cf. partie I.2.1). Les expériences préliminaires en flux ont permis de traiter 5 mL avec un rendement de 760 kJ/L pour 1 \log_{10} (cf. partie I.2.2.1.1), et l'optimisation des conditions de traitement ont permis de traiter 500 mL avec un rendement de 150 kJ/L pour 1 \log_{10} (cf. partie III).

IV. ETUDE AVEC LEGIONELLA PNEUMOPHILA

Toutes les expériences sur *Legionella pneumophila* serogroupe 1 ont été réalisées chez VERI. Le dispositif de sécurité vis-à-vis du manipulateur est renforcé pour ces expériences utilisant une souche pathogène. Les boîtes de Petri étalées sous PSM sont placées dans des boîtes scellées puis introduites dans une étuve réservée aux bactéries pathogènes.

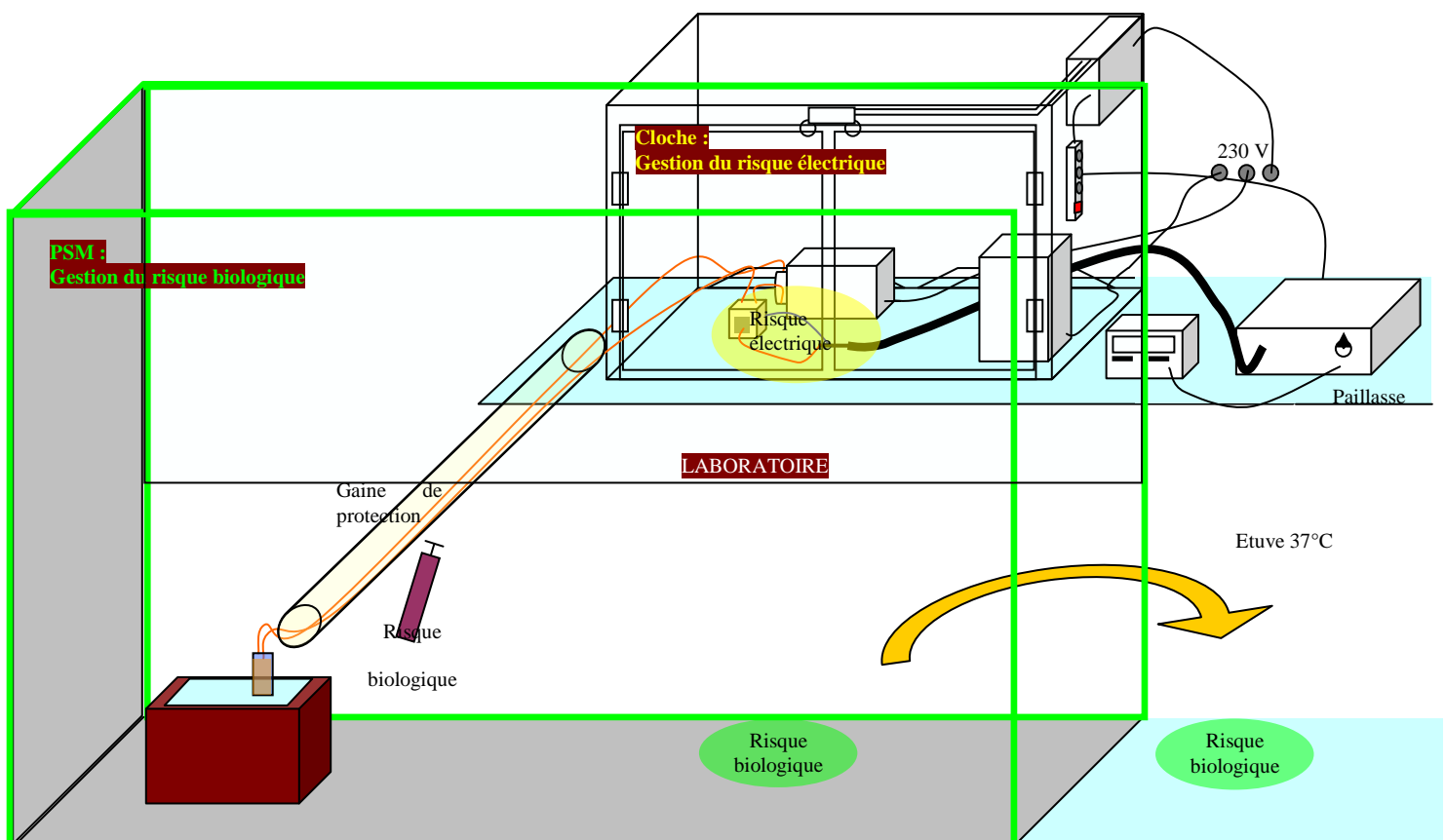


Figure 125: Gestion des risques électriques et biologiques lors des expériences réalisées sur *Legionella pneumophila* serogroupe 1.



IV.1.1. Essais avec le générateur G0

L'impact des nsCEP sur *L. pneumophila* a été évalué en utilisant le générateur G0 et l'applicateur en flux 1 (il s'agit de celui utilisé en laboratoire avec les expériences sur *E. coli* en flux).

Les conditions expérimentales utilisées sont identiques à celles ayant donné les meilleurs abattements avec *E. coli* (Tableau 34)

Tableau 34 : Valeurs caractéristiques de l'expérience sur 5 mL avec G0 à 2 Hz et 10 μ L/s.

Conditions :	Volume de départ (mL)	Débit de la pompe (mL/s)	Durée nécessaire au passage de 50 mL (min)	Volume de la chambre de traitement (mL)	Nombre d'impulsions par passage	Fréquence des impulsions (Hz)
	5	0,01	8,3	0,162	32,4	2

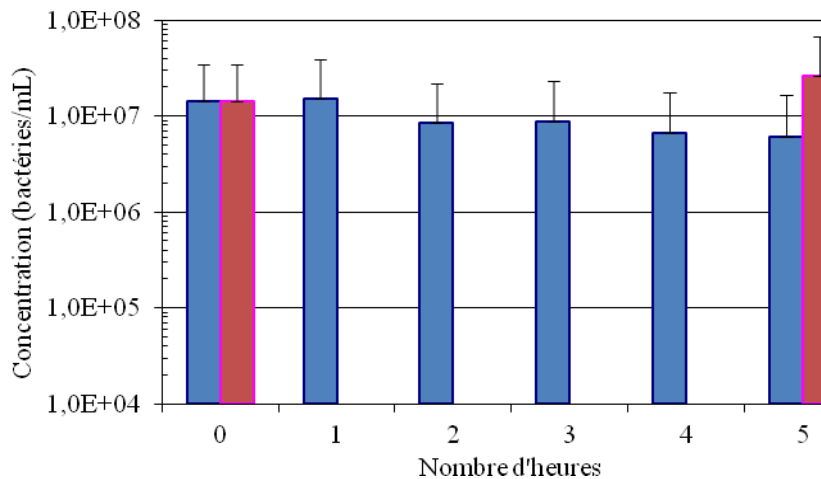


Figure 126 : Cinétique d'abattement pour un volume traité de 5 mL avec le générateur G0 à 2 Hz et 10 μ L/s. Moyenne de 3 expériences. Pour chaque expérience, trois étalements par point sont réalisés. Les statistiques sont obtenues par des tests de Student réalisés entre la série de valeur du point à T0 et la série de valeur du point considéré : tous les tests ont donné des résultats non significatifs par rapport au contrôle où $P > 0,05$.

La Figure 131 montre qu'un \log_{10} n'est pas obtenu en cinq heures.

IV.1.2. Essais avec G2

Malgré les faibles performances de l'expérience réalisée avec G0, l'abattement des *L. pneumophila* séro groupe 1 a été poursuivi en utilisant le générateur G2.



IV.1.2.1 Essai sur un volume de 50 mL à 100 µL/s et 20 Hz

Sur *E. coli*, l'expérience avec un volume de 50 mL, un débit de 100 µL/s et une fréquence de 20 Hz avait montré un abattement similaire à celui obtenu avec l'expérience à 5 mL à 10 µL/s et 2 h.

Tableau 35 : Valeurs caractéristiques de l'expérience sur 50 mL avec G2 à 20 Hz et 100 µL/s.

Conditions :	Volume de départ (mL)	Débit de la pompe (mL/s)	Durée nécessaire au passage de 50 mL (min)	Volume de la chambre de traitement (mL)	Nombre d'impulsions par passage	Fréquence des impulsions (Hz)
	50	0,1	8,3	0,162	32,4	20

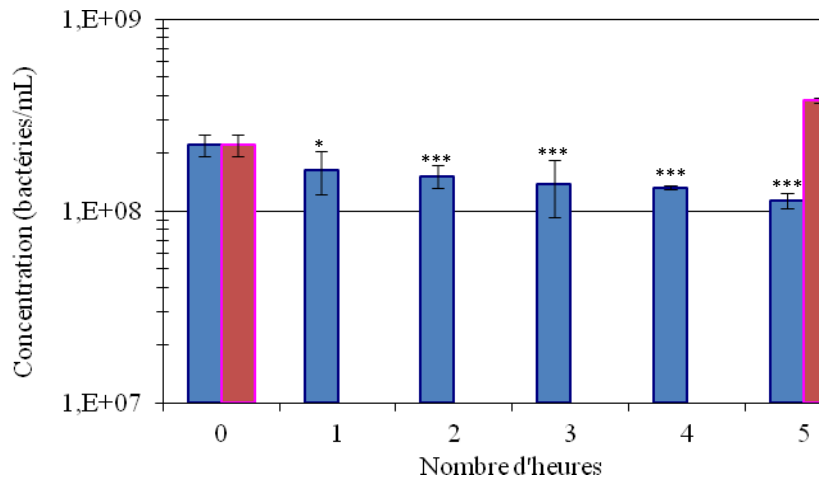


Figure 127 : Cinétique d'abattement pour un volume traité de 50 mL avec G2 à 20 Hz et 100 µL/s. Moyenne de 3 expériences. Pour chaque expérience, trois étalements par point sont réalisés. Les statistiques sont obtenues par des tests de Student réalisés entre la série de valeur du point à T0 et la série de valeur du point considéré : * : $P \leq 0,05$, *** : $P \leq 0,005$.

L'allure de la courbe observée au niveau de la Figure 127 est semblable à celle présentée dans la Figure 126, et de fait, un \log_{10} n'est pas obtenu après cinq heures.

IV.1.2.2 Effet de l'augmentation du débit sur la réduction de *L. pneumophila*

Les travaux réalisés sur *E. coli* ont montré que l'augmentation du débit améliore l'efficacité du traitement. L'expérience à 3200 µL/s a donc été reproduite avec les légionelles.

Tableau 36 : Valeurs caractéristiques de l'expérience sur 50 mL avec G2 à 20 Hz et 3,2 mL/s.



Conditions :	Volume de départ (mL)	Débit de la pompe (mL/s)	Durée nécessaire au passage de 50 mL (min)	Volume de la chambre de traitement (mL)	Nombre d'impulsions par passage	Fréquence des impulsions (Hz)
	50	3,2	0,26	0,162	1,0	20

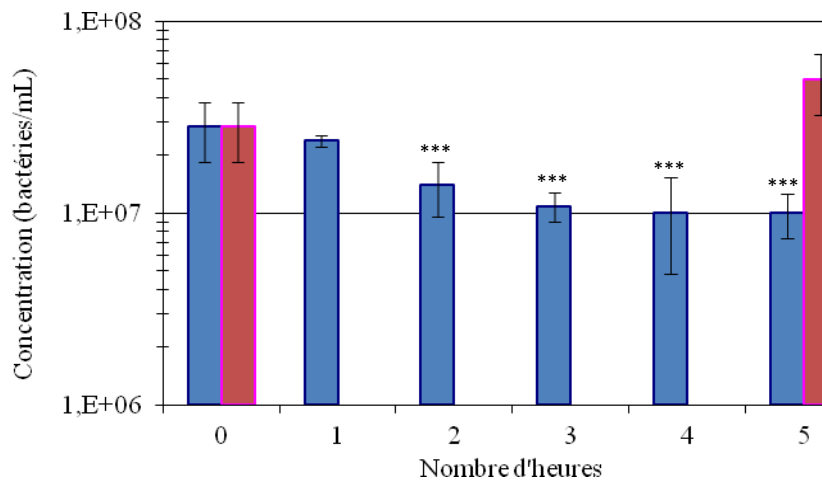


Figure 128: Cinétique d'abattement pour un volume traité de 50 mL avec G2 à 20 Hz et 3200 $\mu\text{L/s}$. Moyenne de 3 expériences. Pour chaque expérience, trois étalements par point sont réalisés. Les statistiques sont obtenues par des tests de Student réalisés entre la série de valeur du point à T0 et la série de valeur du point considéré : *** : $P \leq 0,005$.

La Figure 128 montre que sur les trois premières heures de traitement, la pente de la courbe est légèrement plus forte que dans l'expérience précédente. La valeur de $1 \log_{10}$ n'est cependant pas atteinte après les 5 h de traitement. De façon surprenante, un plateau apparaît à partir de 3 h de traitement. Les hypothèses de fluidiques émises à ce sujet précédemment (cf. partie II.7) ne peuvent pas expliquer ces observations, car le plateau intervient après une diminution de concentration beaucoup plus faible.

IV.1.2.3 Etude avec des conditions de traitement plus drastiques

A ce stade, il est nécessaire de trouver des conditions où les *L. pneumophila* sérotype 1 soient sensibles aux nsCEP. Il s'agit désormais de se placer dans les conditions les plus drastiques possibles afin de mettre en évidence un abattement d'au moins un \log_{10} avant la fin des cinq heures d'expérience.

Pour ce faire, la fréquence des impulsions est maintenue à 20 Hz, mais le volume est réduit à 5 mL (Tableau 37). Sur *E. coli*, ces paramètres ont permis les abattements les plus rapides (une réduction de $1 \log_{10}$ atteinte en 2,5 min).



Tableau 37 : Valeurs caractéristiques de l'expérience sur 5 mL avec G2 à 20 Hz et 40 µL/s.

Conditions :	Volume de départ (mL)	Débit de la pompe (mL/s)	Durée nécessaire au passage de 5 mL (min)	Volume de la chambre de traitement (mL)	Nombre d'impulsions par passage	Fréquence des impulsions (Hz)
	5	0,04	2,1	0,162	81	20

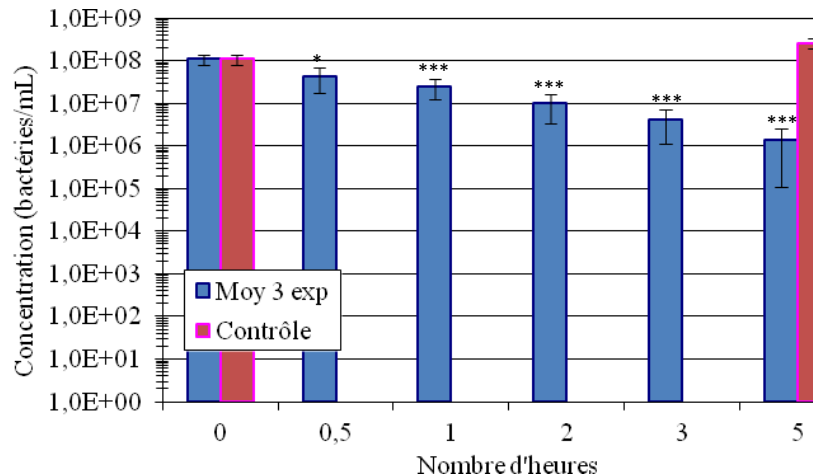


Figure 129 : Cinétique d'abattement pour un volume traité de 5 mL avec G2 à 20 Hz et 40 µL/s. Moyenne de 3 expériences. Pour chaque expérience, trois étalements par point sont réalisés. Les statistiques sont obtenues par des tests de Student réalisés entre la série de valeur du point à T0 et la série de valeur du point considéré : * : $P \leq 0,05$, *** : $P \leq 0,005$.

Un \log_{10} est obtenu en deux heures de traitement.

- Calcul de l'énergie W_c pour un abattement de 1 \log_{10} rapportée à 1 L :

Le nombre d'impulsions délivrées est :

$$N_{impulsion} = 2 \times 3600 \times 20 = 144\,000 \text{ impulsions}$$

D'où

$$W_c = \frac{0,3 \times 144\,000}{0,005} \approx 8\,640\,000 \frac{J}{L} = 8\,640 \frac{kJ}{L}$$

Le calcul du pourcentage d'erreur, basé sur le calcul de la moyenne des écarts types, permet de prendre en compte l'imprécision de la mesure, ainsi : $4\,320 \text{ kJ/L} < W_c < 12\,960 \text{ kJ/L}$.

La courbe de concentration en bactéries (Figure 129) diminue régulièrement pendant les 5 h de traitement jusqu'à atteindre 2 \log_{10} d'abattement. Cette expérience montre que les *L. pneumophila* séro groupe 1 sont sensibles aux nsCEP. Elles présentent toutefois une sensibilité beaucoup plus faible que *E. coli* BL21(DE3). En effet, dans ces conditions de traitement, *E. coli* BL21(DE3) exigeait un coût énergétique pour 1 \log_{10} d'abattement de 181 kJ/L (pour une concentration initiale de 10^9 UFC/L) et de 144 kJ/L (pour une concentration initiale de 10^7 UFC/L). Les *L. pneumophila* séro groupe 1, montrent un coût de 8640 kJ/L, demandant ainsi environ 50 fois plus d'énergie que *E. coli*.



IV.2. TEST D'ABATTEMENT AVEC LE GENERATEUR G3

Le générateur G3, adapté précédemment à une utilisation en laboratoire pour la réalisation des essais sur *E. coli* est testé sur les légionelles dans des conditions identiques.

Tableau 38 : Valeurs caractéristiques de l'expérience sur 500 mL avec G3 à 100 Hz et 8 mL/s.

Conditions :	Volume de départ (mL)	Débit de la pompe (mL/s)	Durée nécessaire au passage de 500 mL (min)	Volume de la chambre de traitement (mL)	Nombre d'impulsions par passage	Fréquence des impulsions (Hz)
	500	8	1,04	0,162	2	100

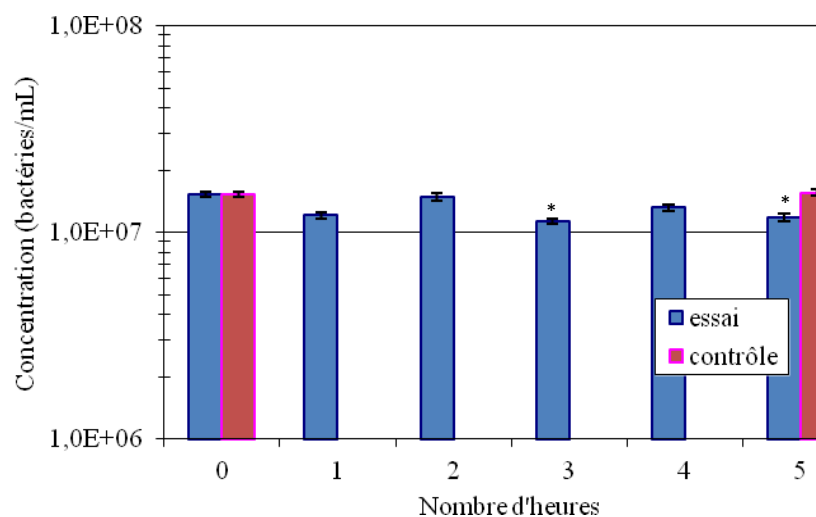


Figure 130 : Cinétique d'abattement pour un volume traité de 500 mL de suspension de légionelles avec G3 à 100 Hz et 8 mL/s. Moyenne de 3 expériences. Pour chaque expérience, trois étalements par point sont réalisés. Les statistiques sont obtenues par des tests de Student réalisés entre la série de valeur du point à T0 et la série de valeur du point considéré : * : $P \leq 0,05$.

Tout comme les expériences à 50 mL et 20 Hz, l'effet des impulsions n'est pas visible sur les légionelles. Comparée à ces dernières, la fréquence est multipliée par 5 et le volume traité multiplié par 10.

Pour rappel, sur *E. coli* ces conditions avaient permis l'obtention d'un \log_{10} en 0,7 h.

Sachant que les expériences sur 50 mL avec le générateur G2 à 20 Hz n'avaient pas non plus mise en évidence un abattement sur les légionelles, alors que l'abattement de 1 \log_{10} sur *E. coli* était obtenu en 0,33 h, il est rationnel de ne pas non plus observer d'abattement à 500 mL et 100 Hz. Cette absence d'abattement a un caractère confirmatoire.



IV.3. EFFET DES NSCEP SUR *L. PNEUMOPHILA* SEROGRUPE 1 SUITE A UNE CONSERVATION DE LA CULTURE PENDANT PLUS D'UN MOIS ET DEMI A 4°C

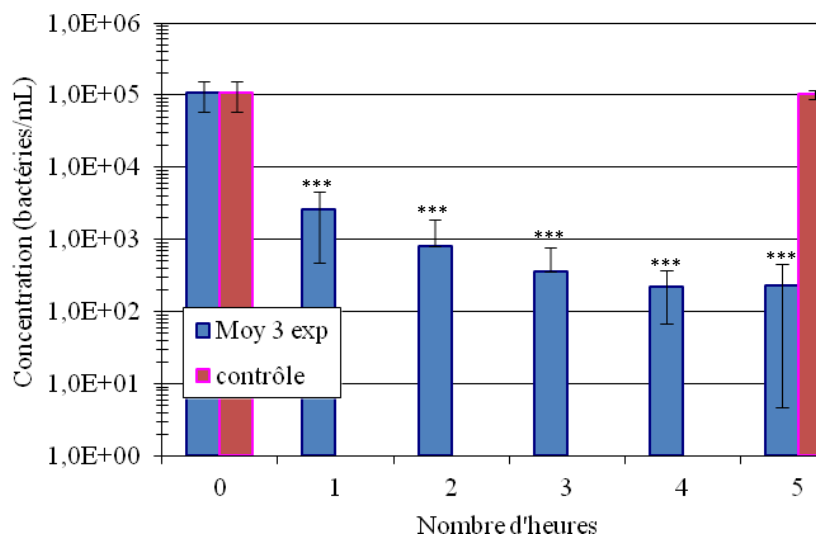
Pour tenter de reproduire l'état physiologique des légionelles d'un réseau d'eau chaude, (= sans division), elles sont maintenues dans leur milieu de culture plus d'un mois et demi à 4°C après la fourniture de la culture par le CEA. En effet, dans ces conditions, elles ne se divisent plus et ont un métabolisme ralenti. *A contrario*, pour les autres expériences, les légionelles sont toujours utilisées moins de 15 jours après leur réception.

Au terme de ce mois et demi, les bactéries sont alors traitées selon les données résumées dans le *Tableau 39* où le volume de traitement est de 5 mL, la fréquence du générateur G2 de 20 Hz et le débit de 40 µL/s.

Notons qu'afin de ne pas trop stresser les cultures, la conservation à 4°C a lieu dans du milieu de culture très riche et non pas dans l'eau de TAR recomposée.

Tableau 39 : Valeurs caractéristiques de l'expérience sur 5 mL avec G2 à 20 Hz et 40 µL/s avec des légionelles conservées plus d'un mois et demi à 4°C.

Conditions :	Volume de départ (mL)	Débit de la pompe (mL/s)	Durée nécessaire au passage de 5 mL (min)	Volume de la chambre de traitement (mL)	Nombre d'impulsions par passage	Fréquence des impulsions (Hz)
	5	0,04	2,1	0,162	81	20



*Figure 131 : Cinétique d'abattement de *L. pneumophila* sérogrupe 1 conservées pendant 1,5 mois à 4°C pour un volume traité de 5 mL avec G2 à 20 Hz et 40 µL/s. Moyenne de 3 expériences. Pour chaque expérience, trois étalements par point sont réalisés. Les statistiques sont obtenues par des tests de Student réalisés entre la série de valeur du point à T0 et la série de valeur du point considéré : *** : P ≤ 0,001.*



Sous ces conditions de culture et de conservation, un \log_{10} est obtenu en 0,7 h.

- Calcul de l'énergie W_c pour un abattement d'un \log_{10} rapportée à un litre :

Le nombre d'impulsions délivrées est :

$$N_{impulsion} = 0,7 \times 3600 \times 20 = 48\,000 \text{ impulsions}$$

D'où

$$W_c = \frac{0,3 \times 48\,000}{0,005} \approx 2\,880\,000 \frac{J}{L} = 2\,880 \frac{kJ}{L}$$

Le calcul du pourcentage d'erreur, basé sur le calcul de la moyenne des écarts types, permet de prendre en compte l'imprécision de la mesure, ainsi : $1\,047 \text{ kJ/L} < W_c < 4\,713 \text{ kJ/L}$.

Les *L. pneumophila* séro groupe 1 conservées plus de un mois et demi à 4°C demeurent plus résistantes aux nsPEF que les *E. coli* BL21(DE3). En effet, leurs coûts énergétiques sont respectivement de 2 880 et 173 kJ/L. Les résultats obtenus montrent qu'elles sont plus sensibles aux nsCEP que celles n'ayant pas subi l'incubation prolongée à 4°C.

Le rendement énergétique reste moins bon que celui obtenu sur *E.coli* BL21(DE3) dans les mêmes conditions.

Génériquement, les *L. pneumophila* utilisées dans ces expériences sont représentatives de celles contaminant les TAR puisque la souche utilisée a été isolée d'une TAR contaminée. Cependant les conditions de culture (en milieu nutritif spécifique) font qu'elles demeurent physiologiquement assez éloignées des légionnelles se développant dans des amibes et dans le biofilm des TAR.

IV.4. RECAPITULATION DES TESTS D'ABATTEMENTS

L'ensemble des expériences réalisées au cours de cette étude est très riche en informations. Il y a beaucoup de paramètres d'entrée et également plusieurs paramètres de sortie. Le regroupement des résultats au niveau du *Tableau 40* permet de les comparer.

Il est possible de conclure quant à l'influence des différents paramètres dans la vitesse de traitement et le rendement énergétique. Pour l'expérience sur *E.coli* à 20 Hz sur 5 mL avec un débit de 40 $\mu\text{L/s}$ (soit 2,1 min pour que 5 mL soit traité par l'applicateur) 1 \log_{10} est obtenu en 2 minutes. Pour l'expérience à 1 Hz sur 5 mL avec un débit de 1 $\mu\text{L/s}$, 1 \log_{10} est obtenu en 3,5 heures.

La vitesse de traitement dépend donc fortement de la fréquence. A volume de traitement constant, plus la fréquence est grande, plus le nombre d'impulsions appliquées est grand. Elle dépend également du nombre de cycles, soit le nombre de fois où le volume est traité.

Le rendement énergétique a aussi pu être fortement amélioré grâce à l'augmentation du débit, permettant une meilleure répartition des impulsions dans le volume traité. Il est apparu que pour un nombre d'impulsions donné, délivrer une unique impulsion pour chaque passage d'un volume dans l'applicateur offre le meilleur abattement. En effet, l'expérience à 3 200 $\mu\text{L/s}$ (correspondant à une impulsion par passage et un temps pour un cycle de 16 s), offre un meilleur rendement que l'expérience à 100 $\mu\text{L/s}$ (correspondant à 32 impulsions par passage et un temps pour un cycle de 500 s).



Tableau 40 : Tableau récapitulatif de toutes les expériences réalisées en flux.

Entrée	Laboratoire	CERPEM								VERI(1.13bis)											
	Technologie	G0.2								G2								G3			
	Tension (kV)	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	18	18
	Champ (kv/cm)	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	90	90	
	Fréquence (Hz)	2	1	1	2	2	2	2	2	20	20	20	20	20	20	20	20	20	100	100	
	Polarité (unipolaire (uni) ou bipolaire (bi))	uni	uni	uni	uni	uni	uni	uni	bi	bi	bi	bi	bi	bi	bi	bi	bi	bi	uni	uni	
	Débit (µL/s)	2	10	1	10	10	10	10	10	100	3200	100	3200	40	3200	40	40	40	8000	8000	
	Volume (mL)	5	5	5	100	5	5	5	5	50	50	50	50	5	50	5	5	5	500	500	
	Souche (noté E pour <i>E.coli</i> et L pour <i>L.pneumophila</i>)	E	E	E	E	E	E	L	E	E	E	E	L	L	E	E traité 1 h	E concentration réduite	L	L incubée 2 mois à 4°C	E	L
	tps entre 2 cycles	41,7	8,3	83,3	167	8,3	8,3	8,3	8,3	8,3	0,26	8,3	0,26	2,1	0,26	2,1	2,1	2,1	1	1	

Sortie	Abattement max (log ₁₀)	2,5	3,5	1,5	2	3,5	3,5	0,5	4	3	5	0,5	0,5	4	2,5	4	2	2	3,5	0
	Temps pour 1 log ₁₀ (H)	1,5	0,8	3,5	8	0,5	0,8	>5	1	0,5	0,33	>5	>5	0,04	0,4	0,033	2	2	0,7	>5
	Energie pour 1 log ₁₀ d'abattement (kJ/L)	648	216	756	173	300	346	xxx	432	216	144	xxx	xxx	181	173	144	8640	2880	151	xxx
	Taux (%)	107	32	91	80	46	40	xxx	32	64	3	xxx	xxx	192	2,5	240	4	11,4	5,71	xxx

Pour toutes les expériences, la valeur de τ (c'est-à-dire le pourcentage de bactéries détruites lors d'un passage dans l'applicateur) est calculée grâce à l'Équation 10. Cette valeur est légèrement surestimée dans toutes les expériences du fait que lors des expériences, le mélange ne se fait pas de façon parfaite. En effet, la partie de liquide présente dans les tuyaux ne peut pas se mélanger avec le reste de liquide resté dans le contenant. Lorsque le volume dans les tuyaux n'est pas négligeable face au volume total traité, le système expérimental est un système hybride, dont la partie tuyauterie est assimilable à un flux ouvert et la partie réservoir à un flux fermé. Ces conditions sont plus favorables qu'un système fonctionnant totalement en flux fermé, car la partie en flux ouvert interdit le mélange de la portion traitée avec la portion non traitée. Comme les calculs considèrent un fonctionnement moins favorable (total en flux fermé) que la réalité (hybride fermé/ouvert), la valeur de τ est légèrement surestimée.

De facto, pour l'expérience sur 5 mL à 1 Hz et 1 µL/s, qui a été réalisée en flux ouvert et en flux fermé, on constate qu'en flux ouvert (mode qui permet de déterminer directement τ de façon expérimentale), $\tau \approx 66\%$ alors que la valeur calculée à partir des résultats en flux fermé, $\tau \approx 91\%$. Pour les 2 expériences sur 5 mL à 20 Hz et 40 µL/s, cas où les contraintes techniques ont conduit à réduire le volume de liquide dans le contenant à une faible fraction du volume total (la plupart du volume étant dans les tuyaux), les valeurs de τ deviennent aberrantes (>100%). Dans ces conditions, le mode de traitement se rapproche des conditions en flux ouvert. Effectivement, le calcul de τ avec les formules en flux ouvert donne 86 % (Sachant que 2 log₁₀ sont obtenus en 5 min et qu'un cycle

dure 2,1 min, l'abattement par cycle est de $\frac{2}{5} \times 2,1 = 0,84$ log₁₀ d'éradication soit $100 - \left(\frac{100}{10^{0,84}}\right) = 85,5\%$).

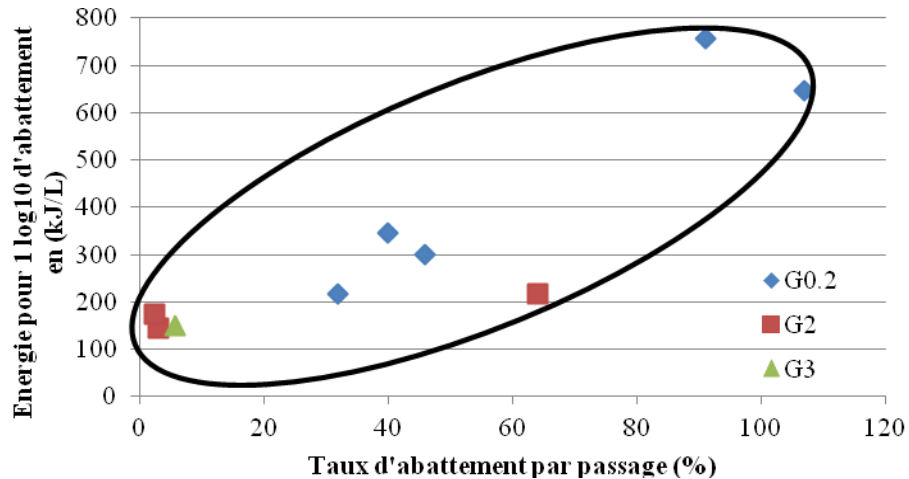


Figure 132 : Energie nécessaire à l'obtention de 1 log₁₀ d'abattement pour différents taux d'abattement par passage dans l'applicateur (en pourcentage de bactéries détruites).

En ne conservant que les valeurs de *E. coli*, avec des volumes totaux de 5 mL pour les expériences avec G0, 50 mL pour les expériences avec G2 et 500 mL avec G3, il est possible de déterminer l'influence du taux d'abattement par passage sur le rendement énergétique indépendamment de tout autre paramètre. On observe que plus ce pourcentage est faible, plus l'énergie nécessaire pour décontaminer de 1 log₁₀ est faible.

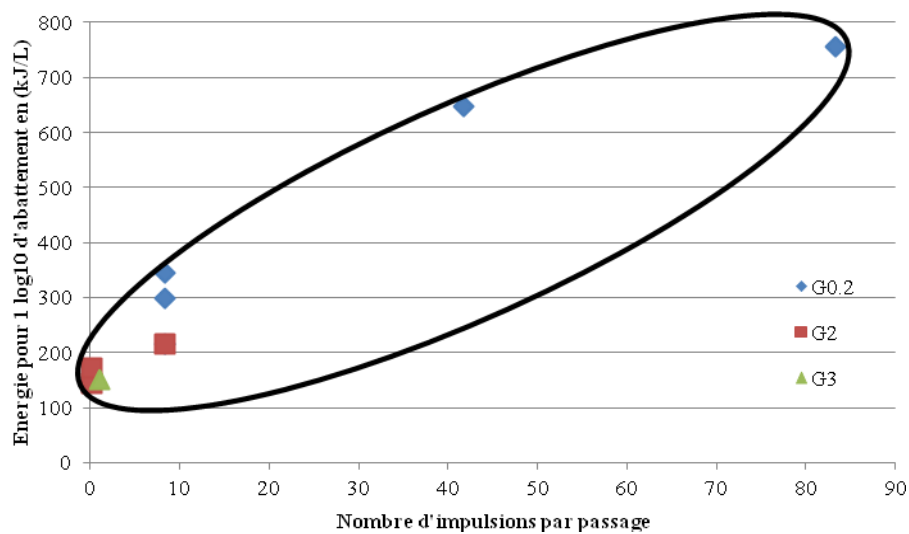


Figure 133: Energie nécessaire à l'obtention de 1 log₁₀ d'abattement pour différents nombres d'impulsions par passage dans l'applicateur.

Comme le taux d'abattement par passage est lié aux nombres d'impulsions délivrées, les mêmes observations que sur la Figure 132 peuvent être faites en fonction du nombre d'impulsions par passage. Les deux graphiques justifient que plus le débit est grand, plus faible est le coût énergétique pour l'obtention de 1 log₁₀ de traitement.

Au terme de ces expériences, l'applicateur en flux1 est démonté pour permettre l'observation des électrodes :

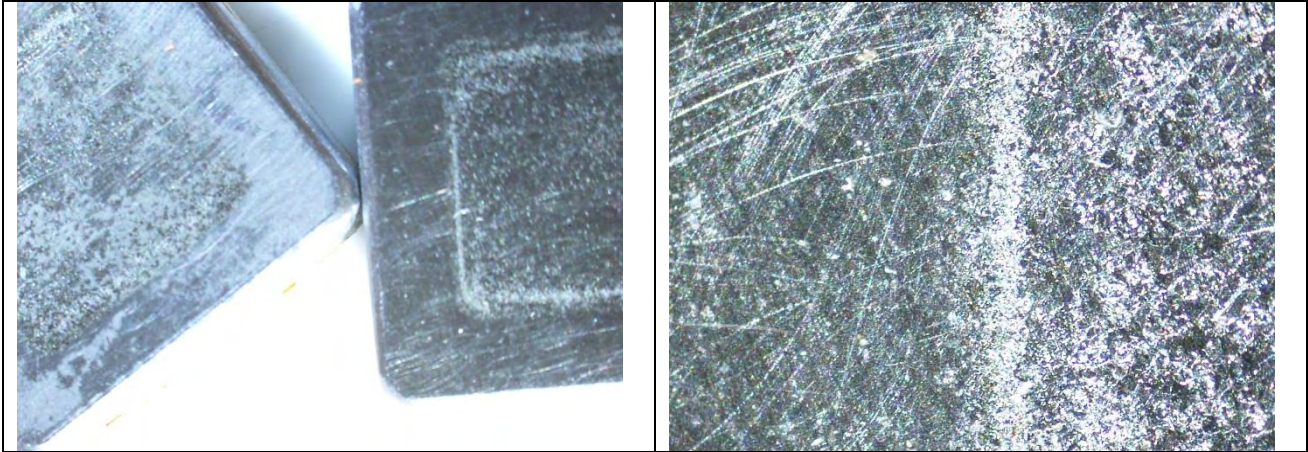


Figure 134 : Observation à la loupe binoculaire des électrodes.

Sur les deux électrodes, la partie centrale, exposée aux impulsions électriques présente un aspect moins lisse que la partie périphérique (non exposée). Malgré tout, l'usure reste superficielle, ce qui permet de considérer que l'usure des électrodes ne constitue pas un biais entre les premières et les dernières expériences réalisées avec l'applicateur flux1.

Après ces essais en différentes modulations du flux, de la fréquence, du volume etc, l'effet des nsCEP d'un point de vue cellulaire a été approfondi. Grâce à une collaboration entre le site VERI de Maisons-Laffitte et le site du CAE (centre d'analyse de l'eau) de Saint Maurice, une des conditions d'abatement a été étudiée en cytométrie en flux. Deux solutions de marquages et trois fluorochromes sont utilisés. Cette étude présente l'intérêt de diversifier les méthodes d'analyse dans la détermination des cinétiques d'abatement.

V. ETUDE PAR CYTOMETRIE EN FLUX DE L'EFFET DES NSCEP SUR LES BACTERIES

V.1. PRINCIPE

Le CAE dispose d'un cytomètre en flux Chemunex® permettant de déterminer le pourcentage de bactéries mortes, endommagées ou indemnes. De plus, l'activité métabolique peut être déterminée. Les résultats obtenus sont comparés aux dénombrements par UFC.

Deux solutions de marquage sont utilisées. La première solution est un mélange de deux fluorochromes : le SYBR Green I et l'iodure de propidium (IP). Ils peuvent tous deux se lier à l'ADN. Contrairement à l'iodure de propidium, le SYBR Green I peut traverser la membrane des bactéries et donc marquer toutes les cellules. L'IP étant arrêté par la membrane, ne peut marquer que les cellules ayant subi une perte d'intégrité membranaire. Les bactéries qui ne fluorescent qu'en rouge peuvent donc être considérées comme mortes. Celles qui fluorescent en vert et rouge peuvent être considérées comme endommagées. Celles qui ne fluorescent qu'en vert peuvent être considérées comme étant en bon état.

La seconde solution de marquage contient le fluorochrome ChemChrome V6. Il ne fluoresce qu'après clivage par des estérases. C'est donc un marqueur d'activité cellulaire. En effet, si les bactéries ont perdu les activités enzymatiques nécessaires à leurs survies, le fluorochrome ne sera pas clivé, et ne fluorescera pas.



V.2. PROTOCOLE

Le traitement de la suspension et l'étalement des boîtes de Petri pour le dénombrement des UFC sont réalisés au centre de Maisons Laffitte. La partie cytométrie est réalisée au CAE de Saint Maurice. Les échantillons doivent être observés en cytométrie peu de temps après le traitement. La partie traitement et la partie observation doivent être réalisées le même jour. La matinée est consacrée à la partie traitement, et l'après-midi à la partie observation.

Ces contraintes ne laissent que quelques minutes pour le temps de traitement. Afin de pouvoir observer des différences importantes entre les bactéries traitées et les contrôles, les conditions choisies sont celles offrant l'abattement le plus rapide, à savoir, un traitement de 5 mL à 40 $\mu\text{L/s}$ avec le générateur G2 réglé à 20 Hz. Ces conditions ont été testées sur les deux souches *E. coli* et *Legionella pneumophila* conservées 2 mois à 4°C (car dans ces conditions, les légionelles montrent un abattement assez important après seulement 1 h de traitement).

V.3. RESULTATS SUR *E. COLI*

V.3.1. Résultats obtenus en boîtes de Petri

L'effet de ces conditions de traitement est déjà montré dans la partie II.4. Les dénombrements des UFC lors de cette étude en cytométrie ont néanmoins été réalisés. L'objectif est de s'assurer que cette expérience s'est déroulée comme les précédentes et que les mêmes valeurs d'abattements sont obtenues.

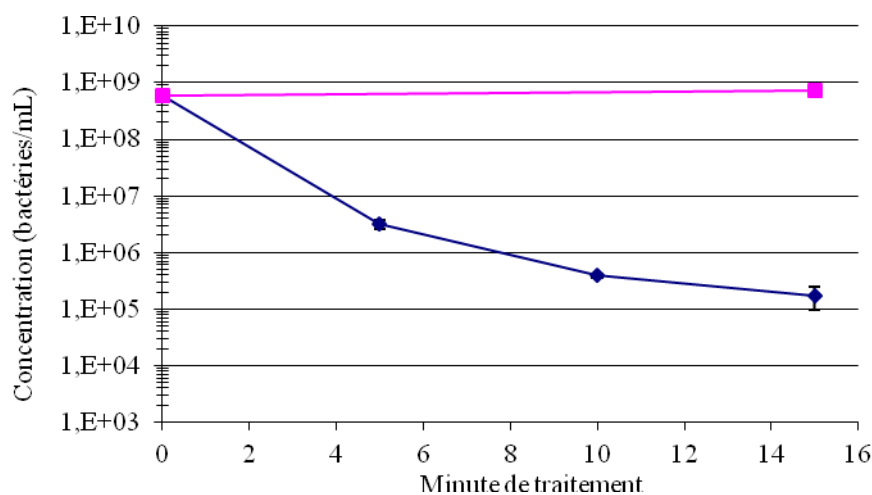


Figure 135: Cinétique d'abattement pour un volume traité de 5 mL de suspension de *E. coli* avec G2 à 20 Hz et un débit de 40 $\mu\text{L/s}$ obtenue sur une unique expérience. Trois étalements par point sont réalisés.

Ces résultats sont conformes à ceux attendus : 3,5 \log_{10} d'abattement sont obtenus au terme des 15 min de traitement.



V.3.2. Résultats obtenus en cytométrie en flux

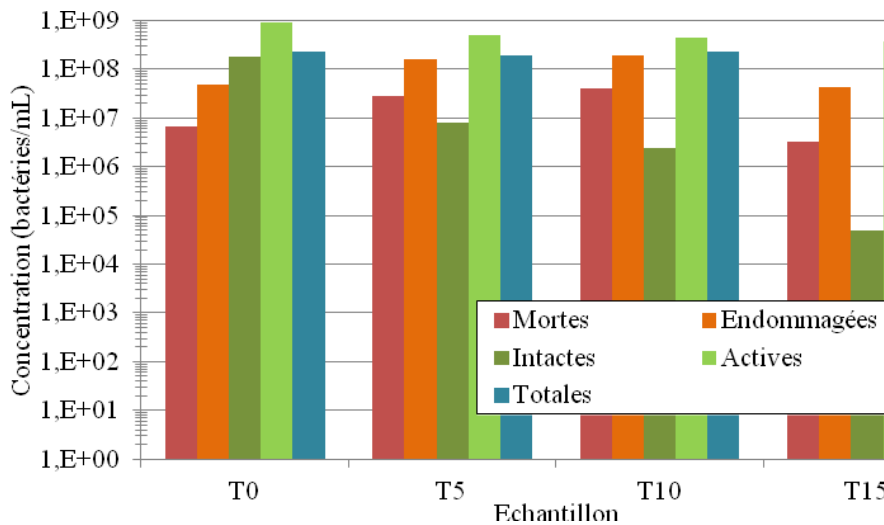


Figure 136: Nombres de bactéries *E. coli* mortes, endommagées, toujours en bon état et nombre de bactéries actives pour des échantillons non traités, traités 5 min, 10 min et 15 min.

Comme l'indique la Figure 136, les résultats obtenus montrent qu'à T0 la quantité de bactéries en bon état est proche de la quantité totale de bactéries. Après 15 min de traitement, la quantité de bactéries en bon état a diminué de 3,5 log₁₀, ce qui correspond aux résultats obtenus en boîtes de Petri. Étonnamment, la concentration en bactéries mortes n'augmente pas entre T0 et T15 et il n'y a qu'une faible diminution de l'activité enzymatique. Pour comparer plus facilement les proportions entre bactéries mortes, endommagées ou en bon état au sein de chaque échantillon, des représentations en diagrammes circulaires sont réalisées.

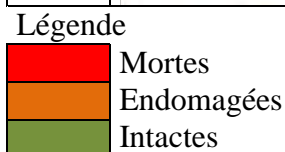
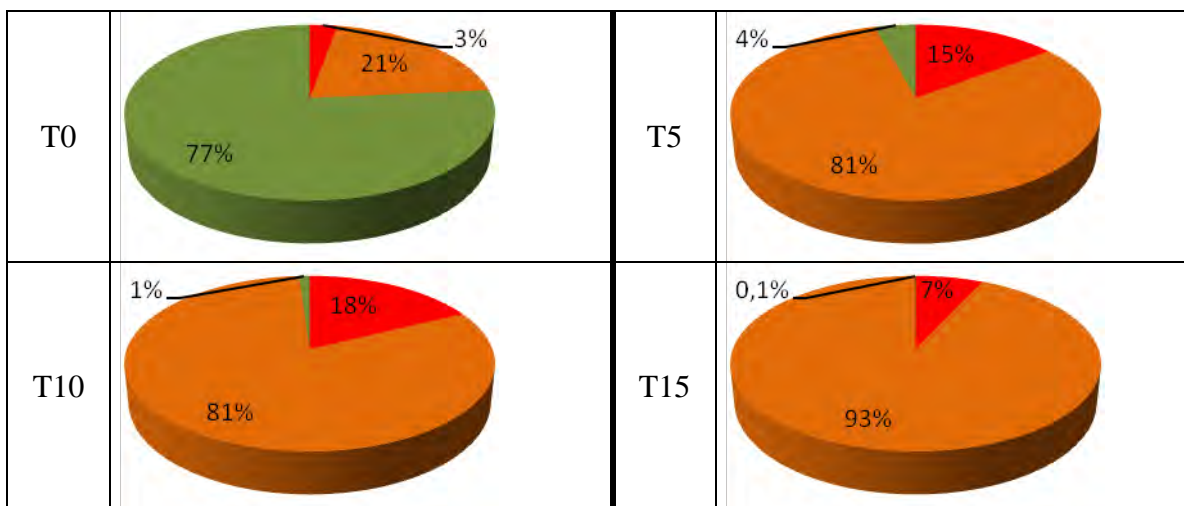


Figure 137 : Représentation au cours du traitement de la proportion entre bactéries mortes, endommagées et en bon état.



Comme l'indique la *Figure 137* la plupart des bactéries vivantes sont endommagées au cours du traitement.

V.4. RESULTATS SUR *LEGIONELLA PNEUMOPHILA*

V.4.1. Résultats obtenus en boîtes de Petri

Tout comme *E. coli*, bien que l'effet de ces conditions de traitement soit déjà montré dans une partie précédente (IV.1.2.3), un dénombrement des UFC a été effectué.

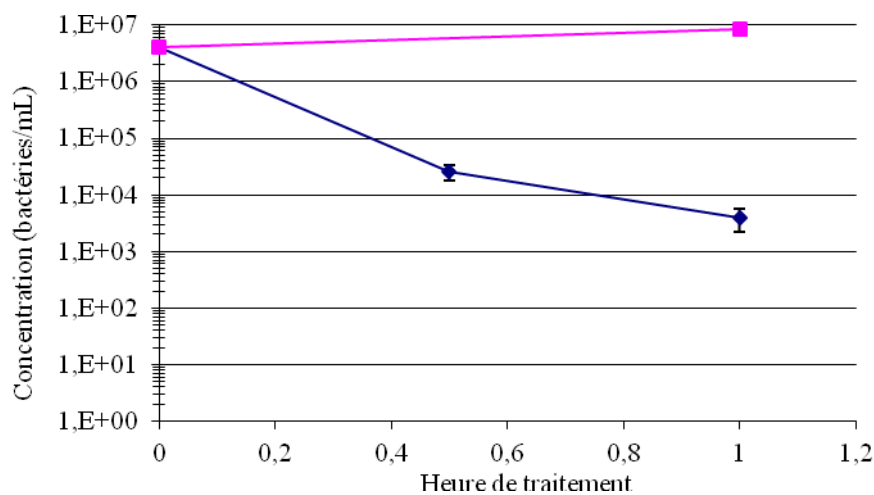


Figure 138: Cinétique d'abattement pour un volume traité de 5 mL de suspension de Legionella pneumophila serogroupe 1 avec G2 à 20 Hz et un débit de 40 µL/s obtenu sur une unique expérience. Trois étalements par point sont réalisés.

Deux \log_{10} sont obtenus en 30 min, ces résultats montrent un abattement plus important que celui attendu.

V.4.2. Résultats obtenus en cytométrie en flux

Les valeurs des bactéries endommagées n'ont pas pu être obtenues. Les légionelles sont plus difficiles à utiliser en cytométrie que les *E. coli*, et les mesures des bactéries endommagées montraient des résultats aberrants et très variables lors de différents tests sur un même échantillon.

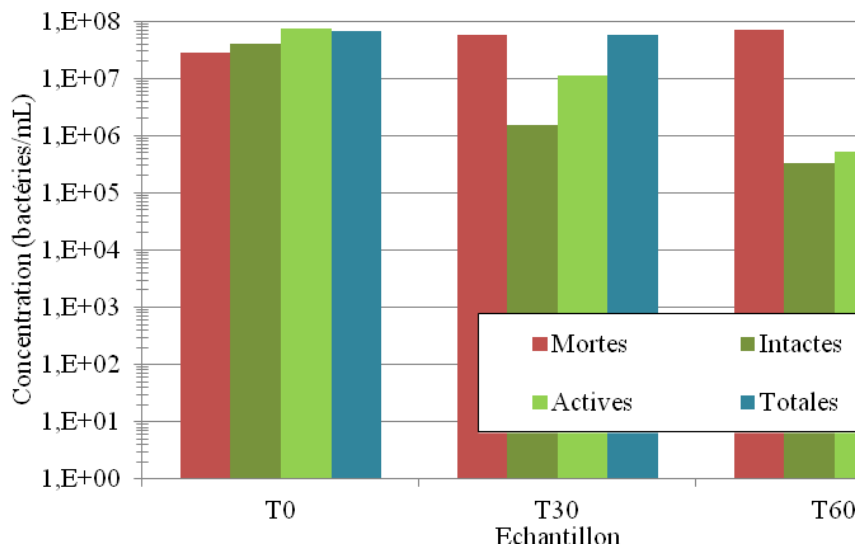
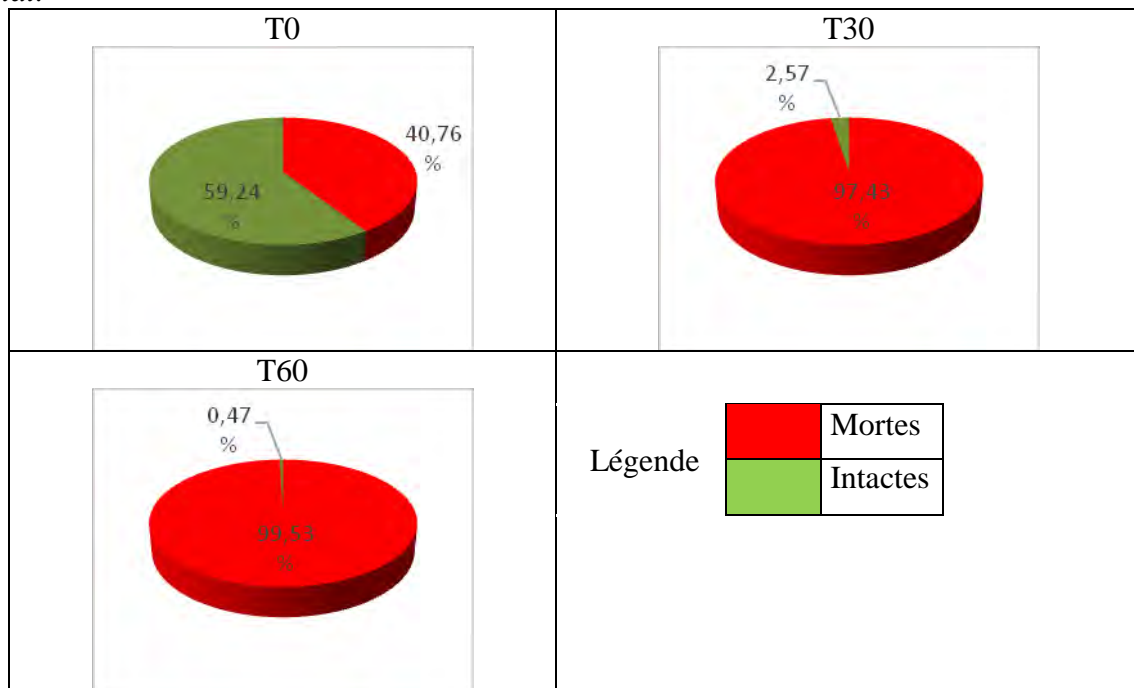


Figure 139: Nombre de *Legionella pneumophila* mortes ou toujours en bon état et nombre de bactéries actives pour les échantillons non traités, traités 30 min et 60 min.

En 30 min, la diminution observée de la concentration en bactéries viables est de 1,5 log₁₀. Cette diminution est 0,5 log₁₀ plus faible que celle observée par dénombrement des UFC. Contrairement aux expériences avec *E. coli*, la mesure de l'activité bactérienne est bien corrélée avec l'abattement : la concentration en bactéries viables est proche de la concentration en bactéries actives.

Tableau 41 : Représentation au cours du traitement de la proportion entre bactéries mortes et en bon état.





Comme l'indique le *Tableau 41* la plupart des bactéries vivantes meurent au cours de l'heure de traitement.

Ces résultats montrent que l'utilisation de deux techniques différentes permet de déterminer des résultats d'abatteurs similaires. La détermination de la concentration par dénombrement des UFC en boîte de Petri ne permet pas de différencier les bactéries mortes des bactéries « viables mais non cultivables ». Le fait d'observer par cytométrie une concentration en bactérie morte proche de celle qui peut être déterminée par le dénombrement en boîte de Petri, permet de confirmer que ces dénombrements en boîte de Petri mettent en évidence que les traitements appliqués induisent bien la mort des bactéries, et non la transformation de bactéries viables et cultivables en bactéries « viables mais non cultivables ».

Les résultats obtenus mettent en évidence une plus forte sensibilité des *E. coli* vis-à-vis des nsCEP. Il faut en effet un temps de traitement plus long sur *Lps1* pour un même abattement (abattement 1 \log_{10} de bactéries viables : *E. coli* < 5 min ; *Lps1* ~20 min).

Ces résultats sont confirmés par l'analyse par culture cellulaire montrant un abattement de 1 \log_{10} en 30 min pour *Lps1* et 3,5 \log_{10} en 15 min pour *E. coli*.

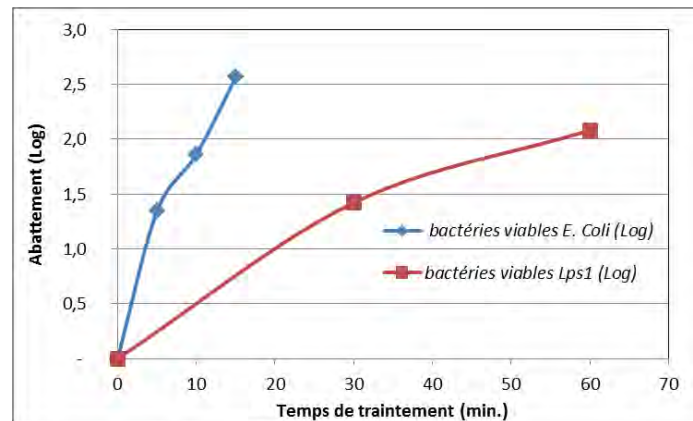


Figure 140: Evolution de l'abattement des bactéries viables en fonction du temps de traitement (5 mL traité avec G2 à 20 Hz et 40 $\mu\text{L/s}$) Cytométrie en flux – (N = 1 expérience).

Cela traduit une spécificité de souche. Celle-ci provient éventuellement d'une plus grande résistance de la membrane de *Legionella pneumophila* par rapport à *E. coli*. Sachant que les légionnelles se développent dans des environnements plutôt chauds, il paraît logique que leur membrane soit intrinsèquement moins fluide (donc plus résistante) que celle de bactéries se développant à des températures plus modérées. En effet, la fluidité membranaire diminue avec le refroidissement du milieu, et les bactéries sont capables de modifier la composition en acide gras de leur membrane afin de maintenir constante sa fluidité malgré les modifications de températures (de Mendoza and Cronan Jr., 1983). Ici, cet argument est peu pertinent puisque *E. coli* est également une bactérie se développant dans des environnements chauds.

Cette spécificité de souche peut également venir de la taille de la bactérie. En effet, l'observation à l'état frais des *E. coli* BL21(DE3) permet de constater qu'elle mesure environ 0,7 μm de diamètre sur 1,4 μm de long.

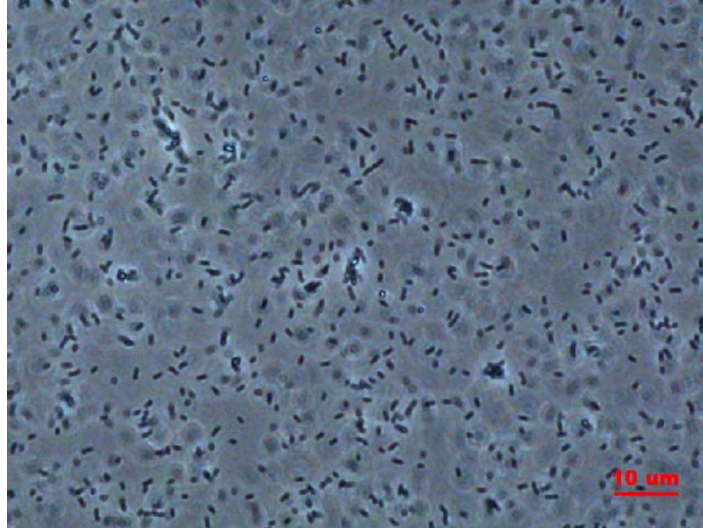


Figure 141 : Observation au fort grossissement (x100) de *E. coli* BL21(DE3) à l'état frais.

Les légionelles mesurent entre 0,3 μm et 0,9 μm de diamètre et 1,3 μm de long (George Garrity et al., 1984). Ces données sont conformes aux observations à l'état frais :

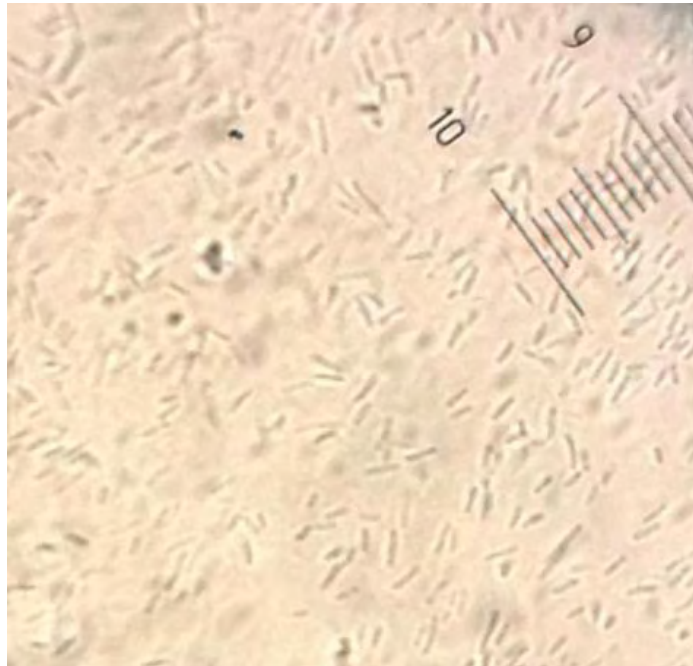


Figure 142: Observation au fort grossissement (x100) de *L. pneumophila* serogroupe 1 à l'état frais.

Elles sont donc environ 50 % moins grosses que les *E. coli*. Or il a été montré que le diamètre des cellules intervient directement dans le calcul de la charge de la membrane. Plus les bactéries sont grosses, plus l'effet des CEP est grand (Partie V -I.4). En considérant que l'augmentation de la taille réduit linéairement la résistance aux nsCEP, il faut un champ électrique 50 % plus fort pour obtenir le même effet sur *L. pneumophila* que sur *E. coli*. Ce qui nécessite deux fois plus d'énergie. Le champ électrique appliqué dans les expériences (100 kV) semble donc insuffisant pour *Legionella pneumophila*.

Une autre différence morphologique est que les légionelles sont plus filiformes que les *E. coli*. Outre par observations microscopiques cette différence est également mise en évidence par le cytomètre.

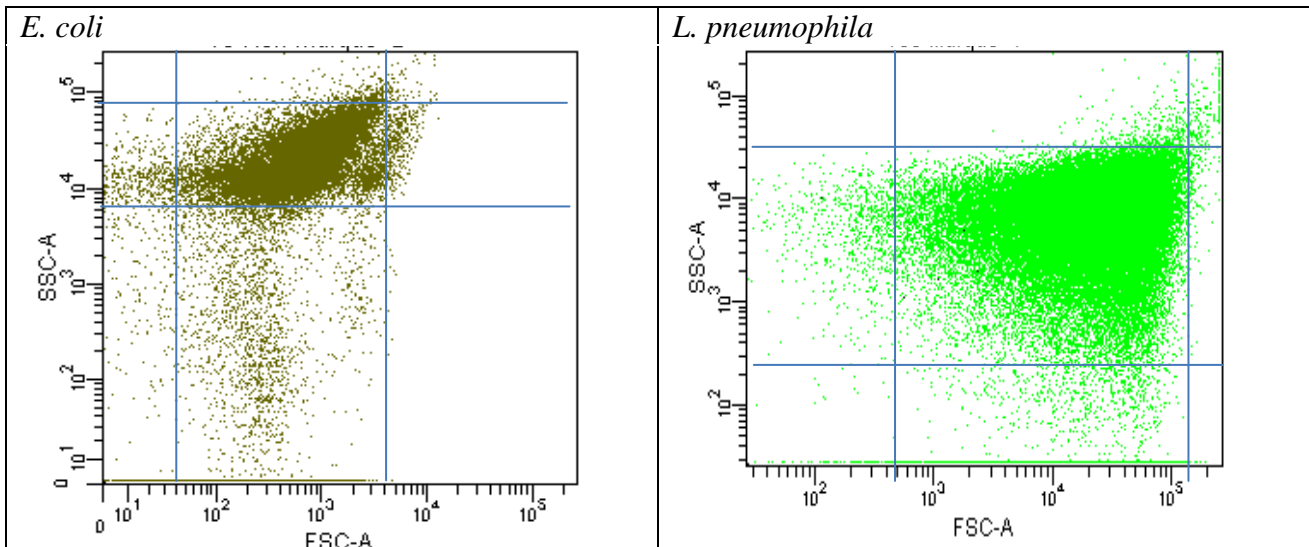


Figure 143: Répartition de taille des particules observées par le cytomètre sur un échantillon de *E. coli* et de *L. pneumophila* serogroupe 1.

Le nuage de point couvre environ $2 \log_{10}$ SSC-A (unité arbitraire représentant la granularité relative) et $2,5 \log_{10}$ FSC-A (unité arbitraire représentant la taille relative) chez *L. pneumophila* alors qu'il ne couvre uniquement $1 \log_{10}$ SSC-A et $2 \log_{10}$ FSC-A chez *E. coli*. Cela peut témoigner de la plus grande dispersion de taille et de forme chez *L. pneumophila* que chez *E. coli*.

Ces hypothèses de fluidité membranaire et de taille et forme des bactéries sont des pistes à explorer. En effet, pour confirmer ces hypothèses il faudra mettre en place un protocole de caractérisation de la membrane, d'observation par microscopie électronique ou AFM (Atomique Force Microscope) et d'utiliser des générateurs dont la tension serait plus grande et variable.





Partie VII - **PUBLICATIONS**



Dans la partie bibliographique, il a été montré que les champs électriques nsCEP ont un effet biologique différent des champs électriques msCEP ou μ sCEP. Contrairement à ces derniers, l'effet décontaminant ne serait pas dû à la rupture de la membrane cytoplasmique.

Dans cette thèse, il a été calculé que la charge maximum n'est pas atteinte lors d'une impulsion. Cependant, eu égard à la grandeur du champ électrique appliqué, il n'est pas nécessaire d'atteindre la charge maximum pour perméabiliser la membrane. La TMP augmente très rapidement dès le début de l'impulsion. Le seuil critique de 200 mV, à partir duquel la membrane se perméabilise, est atteint très rapidement. Selon ces calculs, de telles impulsions permettraient finalement une perméabilisation de la membrane pendant la quasi-totalité de la durée de l'impulsion, et le fait que la charge maximum ne soit pas atteinte représente simplement une perte d'énergie utile.

Certaines publications ont montré que l'ADN serait susceptible d'être affecté par les CEP. Il convient d'être très prudent dans l'utilisation des procédés affectant l'ADN (tel que les UV-C par exemple). En effet, lorsque l'ADN est 'cassé', divers phénomènes de réparation interviennent, et la reconstitution de la séquence peut se faire de façon erronée. Or il n'est pas anodin de modifier les séquences (codantes ou non) de l'ADN. Sur un organisme pluricellulaire, la modification du génome peut entraîner le développement de tumeurs, et sur les bactéries, elle augmente artificiellement la variabilité génétique, offrant ainsi plus de chance aux bactéries de générer des séquences favorables à leurs développements (comme par exemple, un gène de résistance à un antibiotique).

Les travaux réalisés dans le but d'étudier l'influence des nsCEP dans la modification des bactéries a fait l'objet d'une publication dans le journal « Journal of Applied Microbiology ».

La modification des bactéries par les champs électriques est étudiée sur trois points.

- Le protéome : Le protéome est l'ensemble des protéines produites par une cellule par l'intermédiaire du transcriptome (ensemble des ARNm) lui-même issu de l'expression du génome.
- La résistance aux antibiotiques : Des antibiogrammes sont réalisés pour observer d'éventuelles modifications de résistances après expositions aux nsCEP
- Au niveau membranaire : de l'iodure de propidium (IP, fluorochrome) est utilisé pour observer une éventuelle perméabilisation pendant ou après traitement.



ORIGINAL ARTICLE

Effect of nanosecond pulsed electric field on *Escherichia coli* in water: inactivation and impact on protein changes

A. Guionet^{1,2,3,*}, V. Joubert-Durigneux^{4,*}, D. Packan⁵, C. Cheype⁴, J.-P. Garnier⁴, F. David¹, C. Zaepffel⁵, R.-M. Leroux⁶, J. Teissié^{2,3} and V. Blanckaert⁶

1 VERI, Chemin de la Digue, Maisons Lafitte, France

2 CNRS UMR5089 – IPBS (Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale), Toulouse, France

3 Université de Toulouse, UPS, IPBS, Toulouse, France

4 CERPEM, Laval Mayenne Technopole, Laval, France

5 ONERA, DMPH, Chemin de la Hunière, Palaiseau, France

6 Mer, Molécules, Santé, IUML-FR 3473 CNRS, Université du Maine, IUT de Laval, Département Génie Biologique, Laval, France

Keywords

electropermeabilization, *Escherichia coli*, inactivation, waste water treatment, water.

Correspondence

Vincent Blanckaert, IUT de Laval, Département Génie Biologique, 52 rue des docteurs Calmette et Guérin, F-53000 Laval Cedex 9, France.

E-mail: Vincent.Blanckaert@univ-lemans.fr

*These authors contributed equally.

2014/0194: received 29 January 2014, revised 23 May 2014 and accepted 29 May 2014

doi:10.1111/jam.12558

Abstract

Aims: This article shows the effect of nanosecond pulsed electric field (nsPEF) on *Escherichia coli*, which could imply a durable change in protein expressions and then impacted the phenotype of surviving bacteria that might lead to increase pathogenicity.

Methods and Results: The effects of nsPEF on *E. coli* viability and membrane permeabilization were investigated. One log₁₀ reduction in bacterial counts was achieved at field strength of 10⁷ V m⁻¹ with a train of 500 successive pulses of 60 × 10⁻⁹ s. Incubation of germs after treatment with propidium iodide showed that membrane permeabilization was reversible. Possible protein changes of surviving bacteria were checked to assess potential phenotypical changes using two-dimensional electrophoresis. In our study, after 40 generations, only UniProt #P39187 was up-regulated with *P* ≤ 0.05 compared with the control and corresponded to the uncharacterized protein YtfJ. Antibiograms were used to check whether or not the pattern of cultivable bacteria after nsPEF deliveries changed.

Conclusions: The results tend to show that nsPEFs are able to inactivate bacteria and have probably no serious impact in *E. coli* protein patterns.

Significance and Impact of the Study: The use of nsPEF is a safe promising new nonthermal method for bacterial inactivation in the food processing and environmental industry.

Introduction

Inactivation of micro-organisms with pulsed electric fields (PEFs) is one of the nonthermal methods used in liquid food pasteurization (Barbosa-Cánovas *et al.* 1999; Calderón-Miranda *et al.* 1999; Heinz *et al.* 2001; Wu *et al.* 2005; Marsellés-Fontanet *et al.* 2009; Puértolas *et al.* 2009) or waste water treatment (Rieder *et al.* 2008). In these studies, different parameters were used and it appeared that the inactivation efficiency was depending on the micro-organisms, the medium and the electrical parameters such as PEF electric field magnitude

(10–40 × 10⁶ V m⁻¹) or duration (10⁻⁶ to 0.1 s) (Sale and Hamilton 1967; Teissié *et al.* 2002; Mosqueda-Melgar *et al.* 2007, 2008). Micro- and millisecond PEFs were shown to induce membrane permeabilization (Rowan *et al.* 2000; Schoenbach *et al.* 2000; Teissié *et al.* 2002), leading to cell death when the permeabilization was irreversible (Huang *et al.* 2012).

Several years ago, high-power electrical technologies were able to generate a new type of PEF: the nanosecond pulsed electric field (nsPEF), characterized (i) by a very short pulse duration (few tens of nanoseconds), (ii) a high electric field intensity (several hundreds of



thousands V m^{-1}) and (iii) a delivered energy low enough to avoid heating effect. These nsPEFs were used to inactivate bacteria in liquid (MacGregor *et al.* 2000; Rowan *et al.* 2000; Schoenbach *et al.* 2000). The mechanisms of inactivation with nsPEF were proposed to be different from those induced by milli- or microsecond PEFs. A study showed that nsPEF could induce an injury accumulation in survival bacteria leading to subsequent death (Perni *et al.* 2007; Gusbeth *et al.* 2009). Indeed, it is now well known that nsPEFs are able to permeabilize the mammalian cell membrane, as observed with propidium iodide or calcein experiments (Chen *et al.* 2004; Pakhomov *et al.* 2007; Dalmay *et al.* 2011; Nesin *et al.* 2011) but, until now, no information has been published on the permeabilization of bacterial membranes.

Besides, the nsPEFs may be acting directly at the protein or DNA levels by inducing the destruction and/or the denaturation of these molecules (Stacey *et al.* 2003, 2011). These observations opened a critical question as it was shown that other physical methods of decontamination, such as ultraviolet, led to DNA mutation (Haas 1966; Witkin 1976). Therefore, it is of major interest to delineate the impact of the nsPEFs to induce protein expression changes in bacteria if this technology is used on a larger scale for decontamination purposes. Recently, in HeLa S3 mammalian cells, nsPEFs have been shown to be involved in the activation of MAP kinase (MAPK) and Janus kinase (JNK) pathways inducing, respectively, the transcriptional activation of early genes in the MAPK pathways and phosphorylation of JNK1 and MKK4. nsPEF application with a pulse width at half maximal of 80×10^{-9} s and electric field of $20 \times 10^6 \text{ V m}^{-1}$ also showed increased phosphorylation of c-jun protein with increased c-jun and c-fos mRNA levels (Morotomi-Yano *et al.* 2011a,b). Additionally, it was shown that nsPEFs stressed these mammalian cells by acting on the AMP-activated protein kinase (AMPK). AMPK activation by nsPEFs was mediated by CaMKK and required extracellular Ca^{2+} . Therefore, an experimental evidence for a direct link between activated cellular signalling and Ca^{2+} mobilization in nsPEF-exposed cells was established (Morotomi-Yano *et al.* 2012). Thus, nsPEFs can have a physiological impact in mammalian cells. At the micro-organism level, it was shown on *Pseudomonas putida* with the use of 10 square pulses with 10^7 V m^{-1} electric field amplitude and submicrosecond (0.6×10^{-6} s) pulse duration that neither mutagenicity nor genotoxicity was found due to the treatment in hospital waste water or tap water (Gusbeth *et al.* 2009). Thus, this nonchemical method showed bacterial decontamination without side effects. However, it is now established that nsPEF ranged from one to 300×10^{-9} s for micro-organisms (Beebe

et al. 2012) and 0.5×10^{-6} s pulse can be considered as submicrosecond events.

The present work considered the effects of nsPEF with 60×10^{-9} s pulse duration with a fast rise time ($<20 \times 10^{-9}$ s) on bacteria viability and membrane permeabilization. Thus, until now, nsPEFs were unlikely to cause direct genetic mutation, but as stated by some reports on eukaryotic cells, they might affect gene expression and hence phenotype. To observe a possible change in *Escherichia coli*, studies were performed for differential protein expressions using two-dimensional electrophoresis. As all the CFU were not investigated by this method, antibiograms were used to a larger extent (i) to show that after the treatment, antibiotics were still able to neutralize these germs and (ii) if not, this will highlight that nsPEF could act on naked DNA by expressed proteins that might reduce the sensibility of the bacterium by overexpressing or modifying the tridimensional structure of the target for a given antibiotic.

Materials and methods

Nanosecond pulsed electric field delivery system

The nsPEF device delivery system was composed of a high-voltage generator and a chamber of treatment as shown in Fig. 1a.

The high-voltage generator was developed at the ONERA with the following characteristics: electric pulse duration of 60×10^{-9} s with a rise time of 20×10^{-9} s, a maximal voltage of 20 000 V and a repetition frequency of 1 Hz. The chamber of treatment or applicator was composed of two stainless steel cylindrical electrodes of 15×10^{-3} m diameter fixed on a structure in such a way that electrodes were plane and parallel with a gap of 2×10^{-3} m (Fig. 1b,c). The shape of the delivered voltage pulse is shown in Fig. 2.

Bacterial cultures

Escherichia coli (ATCC 11775) is a Gram-negative bacterium. This strain was cultured in Luria-Bertani (LB) broth medium (Grosseron, Saint-Herblain, France) for the liquid culture and on Plate Count Agar (Grosseron) for the solid medium. *Escherichia coli* (*E. coli*) was chosen as model because of its low pathogenicity. In addition, this bacterium is one of the most well-known bacteria and is often used as model for disinfection applications.

The strain was stored on Petri dishes at 4°C until a colony was used. For longer storage, strains were kept in suspension at -70°C in glycerol. All the materials were of analytical grade, and the water used was ultrapure (Milli Q; Millipore, Molsheim, France).

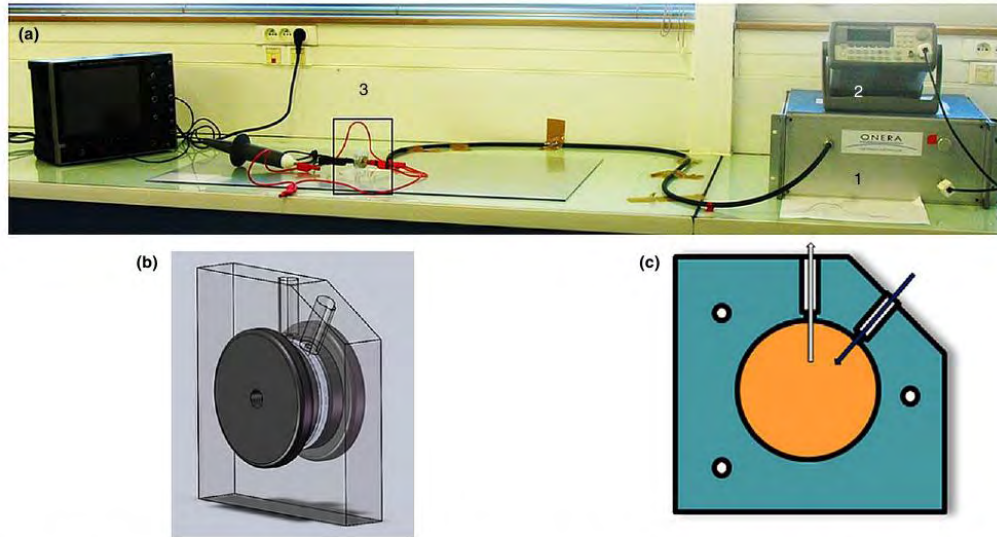


Figure 1 (a) The electrical setup (1—high-voltage generator; 2—low frequency generator; 3—chamber of treatment). (b) Drawing of the chamber of treatment. (c) Schema of a view along the axis of the chamber of treatment (the electrode appears in a single large disc).

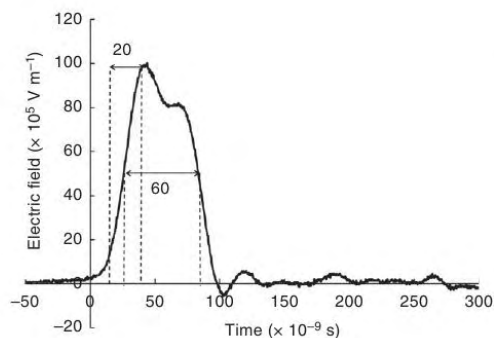


Figure 2 Shape of the voltage during a pulse.

NsPEF deliveries

Escherichia coli were grown until the stationary phase (after 16 h of culture) in a shaking incubator at 37°C, in LB Broth medium. Bacterial suspensions were harvested and washed twice in sterile water.

Bacterial suspension (10^{12} bacteria l^{-1}) in water with salt to reach a conductivity of $2 \times 10^{-2} \text{ S m}^{-1}$ was loaded into the treatment chamber. Immediately after nsPEF deliveries, the suspensions were incubated for 1 h at room

temperature (Žgalin *et al.* 2012; Goettel *et al.* 2013). Successive dilutions were performed to spread approximately 100 bacteria on each Petri dish for incubation overnight at 37°C. Colony-forming units (CFU) were counted, and concentrations in CFU l^{-1} evaluated.

Propidium iodide labelling

To visualize the effect of nsPEF on bacteria, a fluorescent dye Propidium Iodide (PI) (P4864, Sigma-Aldrich, L'Isle d'Abeau-Chesne, France) was added to the bacterial suspension at a final concentration of $5 \times 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$. PI is a fluorescent nucleic acid dye that very poorly penetrates across an intact cell membrane. If the plasma membrane was sufficiently disturbed when exposed to the nsPEFs, the fluorescent dye entered into the cytosol of the cell and readily bound to nucleic acids, displaying a light to strong red fluorescence (Bowman *et al.* 2010).

In a first protocol to assay membrane and wall permeabilization, PI was present in the bacterial suspension during nsPEF deliveries, and in a second protocol to assay intact bacteria, bacteria were exposed to nsPEF deliveries and incubated 1 h at room temperature before adding PI. Bacteria were then observed under a microscope (Leica, Leitz Biomed, Grosseron, Saint Herblain, France) to determine the percentage of fluorescent bacteria (PI positive).



Antibiogram

Six antibiotics were used: gentamicin (GM), vancomycin (VA), erythromycin (E), trimethoprim associated with sulphamethoxazole (SXT), penicillin (P) and ceftazidime (CAZ). Ten percent of the CFU growing in all Petri dishes used in the tests (in the limit of 10 CFU per dish maximum) were picked out for antibiogram assays.

Each CFU was incubated in LB broth medium. When stationary phase was reached, culture was spread on a Petri dish at high concentration. Six discs soaked with one of each antibiotic were put on Petri dish. After incubation overnight at 37°C, a film of bacteria was formed. Antibiotics had diffused in the solid culture medium forming a gradient of concentration. If bacteria were sensitive and killed by antibiotic, a lyzed zone was observed. If bacteria became resistant for an antibiotic, the lyzed zone would not be present or had a smaller size.

Two-dimensional electrophoresis

The two-dimensional electrophoresis (2-DE) was first carried out with an isoelectrofocusing (IEF) followed by a sodium dodecylsulphate-gel electrophoresis (SDS-PAGE) as previously described (Joubert *et al.* 2013). Briefly, IEF was performed by using an Ettan IPGPhor (GE Healthcare Bio-Sciences, Vélizy-Villacoublay, France) apparatus using 13-cm strips with a pH range of three to 10 (GE Healthcare Bio-Sciences). The strips were rehydrated overnight at room temperature according to the manufacturer's procedure with Destreak rehydration solution (GE Healthcare Bio-Sciences) containing 0.4% ampholytes pH 3–10 (GE Healthcare Bio-Sciences). After mounting the strips on the tray, the samples (250×10^{-6} g) were then cup-loaded near the anode of the IPG strips and mineral oil was introduced in the cups. Then, the tray was filled with mineral oil. The run was defined as follows: step at 500 V for 500 Vh, gradient to reach 6000 V for 10 000 Vh, step at 6000 V for 10 000 Vh and a step at 500 V until the strips were taken. Among the different experiments, the final running condition was 23 000 Vh to achieve equilibrium. Once IEF was complete, the strips were processed for SDS-PAGE by use of an equilibration buffer with urea 6 mol l⁻¹, glycerol 30% w/v, SDS 2% w/v, 0.125 mol l⁻¹ Tris, 0.1 mol l⁻¹ HCl containing either 0.05 mol l⁻¹ DTT (first equilibration step) or 0.15 mol l⁻¹ IAM (second equilibration step). Strips were soaked with DTT and IAM equilibration buffers for 25 min. Equilibrated IPG strips were sealed on top of 12% SDS-PAGE. The run was performed to reach 1200 Vh. Gels were washed two times 5 min in water and stained with the colloidal blue Bio Safe[®] method (Bio Rad, Marnes-la-Coquette, France) according to the manufacturer's recommendations.

Spot detection and quantification

The gels were scanned with a GS-800 densitometer (Bio Rad, Marnes-la-Coquette, France). Spot detection, quantification and analysis were performed using the Same-spots[®] analysis software (Nonlinear Dynamics, Newcastle upon Tyne, UK). Following linearization towards a reference gel chosen among the experimental gels, they were grouped either as control or treated. Each group was the result of three independent experiments each performed in duplicate. After spot detection and quantification determination, a difference was considered to be significant when a 1.5-fold increase or decrease at least was reached. Statistics using ANOVA were obtained with the in-built statistical software present in the Same-spots[®] analysis software.

Data analysis

Bacterial control and bacteria exposed to nsPEFs were derived from the same culture. All data presented are means \pm SD from three independent experiments. Statistical analysis (ANOVA) was performed using Kyplot software (KyensLab Inc., Tokyo, Japan); a *P* value lower than 0.05 was considered statistically significant.

Results

Effect of nsPEF deliveries on *Escherichia coli* viability

Escherichia coli suspensions were exposed to various numbers of nsPEF pulses with an electric field of 10⁷ V m⁻¹ and a repetition frequency of 1 Hz. *Escherichia coli* were sensitive to nsPEFs, and inactivation was statistically noticeable for 100 and 500 nsPEF pulses compared with the control with *P* values \leq 0.05 and \leq 0.01, respectively. The results obtained showed that a log₁₀ decrease was obtained after 500 nsPEFs at a frequency of 1 Hz (Fig. 3).

Effect of nsPEFs on membrane permeabilization

Escherichia coli suspensions were exposed to various numbers of nsPEF pulses (60×10^{-9} s, 10⁷ V m⁻¹, 1 Hz) in presence of PI. Results showed an increase of PI positive bacteria with the increasing number of nsPEF pulses (Table 1). Consequently, nsPEF induced a membrane permeabilization.

Escherichia coli suspensions were then exposed to nsPEFs under the same conditions as in the first protocol but without PI. After 1 h of incubation, PI was added to bacterial suspension. Results showed no PI positive bacteria (Table 1).

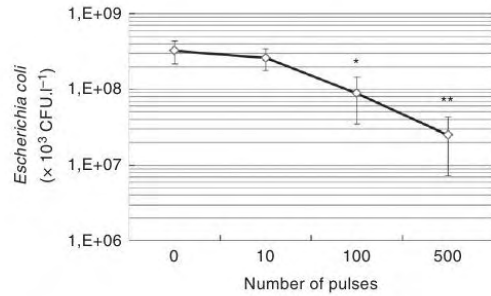


Figure 3 Effect of the number of nsPEF pulses (107 V m^{-1} , $60 \times 10^{-9} \text{ s}$, 1 Hz) on *E. coli* viability. The graph represents the average of six independent experiments (each performed in triplicate). The error bars represent standard deviation. Statistical analysis was performed using the software Kyplopt (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$).

Table 1 Percentage of fluorescent cells after nsPEF treatments. Protocol 1: bacteria were exposed to nsPEF deliveries in presence of PI. Protocol 2: bacteria were exposed to nsPEFs in absence of PI. After 1 h of incubation, PI was added to bacteria suspension

Number of nsPEF delivered	Protocol 1	Protocol 2
0	1.9 ± 1.8	2.3 ± 2.0
1	4.8 ± 1.4	2.7 ± 2.0
10	8.0 ± 1.4	2.9 ± 2.0
30	8.4 ± 2.2	3.2 ± 1.8
75	17.8 ± 0.5	3.4 ± 1.3
150	38.9 ± 12.3	3.5 ± 3.1
500	48.0 ± 8.6	3.5 ± 2.5

These results showed that nsPEFs were able to permeabilize the membrane, but this permeabilization was reversible.

Effect of nsPEFs in response to antibiotics

To get more information of the effects of application of nsPEFs to *E. coli*, several colonies of treated (500 pulses) or untreated germs being able of survival or recovery with growing capacity were taken for antibiogram purpose. Forty-five CFU of each condition were used for the study and treated statistically by means of ANOVA. As shown in Fig. 4, diameters of inhibition were measured parallel to the border of the Petri dish (arrow) and performed in the same way for of all the antibiotics. It was possible to determine if the bacteria were resistant (R), intermediary (I) or sensitive (S) to the action of antibiotics used according to the Pasteur Institute recommendation. As shown in Fig. 5, nonstatistically significant differences occurred with the antibiotics CAZ and GM.

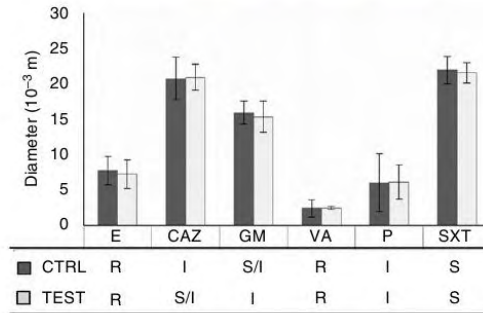
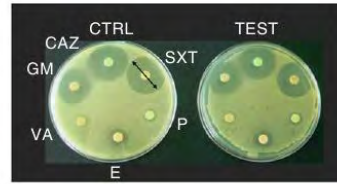


Figure 4 Antibiogram of *E. coli* with six different antibiotics: gentamicin (GM), vancomycin (VA), erythromycin (E), trimethoprim associated with sulphamethoxazole (SXT), penicillin (P) and ceftazidime (CAZ). Each bar corresponds to 45 takings of five independent experiments. Statistical analysis was performed using the software Kyplopt: no significant differences are noticeable for a given antibiotic between the treated and the control. R means resistance to the antibiotic, I for intermediate and S for sensitive.

For CAZ, the control was (I), and after nsPEF, it was found to be (S/I), and for the other antibiotic, it passed from (S/I) to (I). The rationale showed that bacterial sensitivity to antibiotics was not affected in their efficacy after nsPEF deliveries.

Effect of nsPEFs on protein expression

An open question was to know whether nsPEFs were able to induce differential protein expression due to the high electric field towards the bacteria. Thus, the change in protein expression, if effective, would reflect a probable phenotypical change. 2-DE was performed on CFU treated or not by nsPEF. As shown in Fig. 5, 2-DE between the control and the bacteria treated with 500 nsPEFs, only few changes in protein expression were present but only one of all the sets presented a differential expression pattern with a P value ≤ 0.05 . By comparison with a master gel of *E. coli* in the SWISS-2D PAGE database (www.expasy.ch), only one candidate with a relative molecular mass (M_r) of 18 300 with a pI of 6.35 was observed after TagIdent determination (www.expasy.ch) (Table 2).

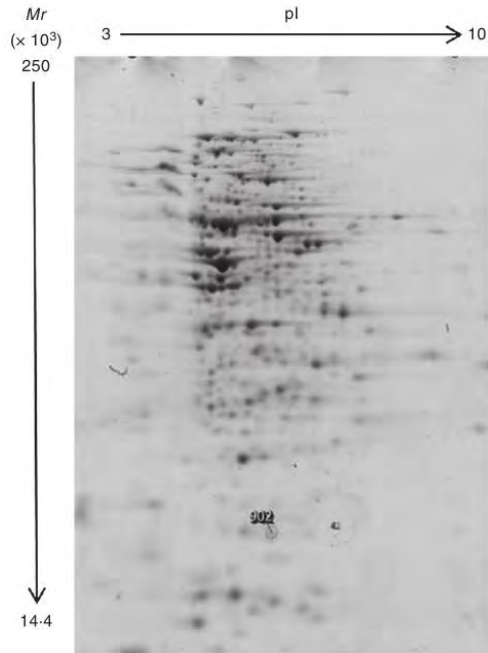


Figure 5 Two-dimensional electrophoresis gel of *E. coli*. The IEF was performed with a gradient 3–10 followed by a 12% SDS-PAGE. After spot alignment, gels were analysed using the software Samespot. To avoid bias, two independent experiments were conducted in triplicate and compared altogether. pI means isoelectric point and Mr means relative molecular mass.

Discussion

The nsPEF deliveries on *E. coli* suspension induced a bacterial inactivation (around one \log_{10} after 500 pulses). Data direct monitoring of the electrical parameters during the train of pulses showed that *E. coli* deactivation was possible at low energy cost for 500 pulses with 2.6×10^{-3} Wh for a volume of 250×10^{-6} l. The transient capacity of nsPEF to allow PI intake or not showed that membrane permeability of a subpopulation was reversible and could act only partially on bacteria abatement. Bacterial death (when bacteria are exposed to PEF)

is considered as due to an irreversibility of membrane permeation. Thus, in the nsPEF scheme, other phenomenon should participate to bacterial deactivation. In eukaryotic cells, it has been shown that calcium redistribution occurred after nsPEF treatment (Beier *et al.* 2012); it is possible that in prokaryotic cell, ionic disorder might stress the cell leading to the death. Shock waves can also be quoted. A recent study showed that shock waves was responsible of *Bacillus subtilis* var. *niger* inactivation (Joubert *et al.* 2013) underlying the importance of this parameter but under corona discharge conditions.

Even if, just after nsPEF applications, transient overexpressions of proteins or enzymes that might act at the DNA level might occur, *E. coli* after several generations were able to recover almost a normal pattern. It was shown that, if DNA damage occurred after UV-C, the mechanisms of repair could be very effective (Ramsey *et al.* 2004; Chang *et al.* 2010). Two-dimensional electrophoresis and proteomic experiments showed that only one protein was still overexpressed after 24 h of multiclonal proliferation, suggesting that the treated cells were not affected or that repair, if the DNA was damaged, was still effective. This is quite speculative to assess DNA damage and mutagenesis as the volume of the chamber of the applicator was not large (0.25×10^{-3} l) enough to make 2-DE experiment directly from the sample after nsPEF deliveries. However, studies on mammalian cells showed that strong pulsed electric fields might affect DNA configuration (Stacey *et al.* 2003, 2011). As size of the cell could also be a concern, the electric field of 10^7 V m⁻¹ with pulse duration of 60×10^{-9} s was able to allow PI internalization, suggesting that the nsPEF had an impact on membrane permeation in a reversible manner. This has already been described in other biological models (Nesin *et al.* 2011). Consequently, after this type of treatment, *E. coli* might sustain some biochemical disorders capable to alter gene activities. In this work, no significant change was observed at the antibiogram level. However, if changes occurred in cells, the fact that so few modifications in the phenotypic status were observed would suggest that the viable bacteria that encountered nsPEFs had strong recovery capabilities. Proteomic studies using 2-DE showed only a significant change for a protein that co-migrated with Mr 18 800 protein and isoelectric point of 6.35. The comparison with the master gel of *E. coli* in the SWISS-2D

Table 2 Characteristics of the spot #902 after 2-DE comparison

2-DE data					TagIdent		UniProt number		
Spot Number	Regulation	Fold	<i>P</i> -value ANOVA	Mr	pI	Mr	pI	Number	Biological Function
902	Up	1.5	0.045	18 300	6.3	18 248	6.35	P39187	Unknown



PAGE data base (www.expasy.ch) and the use of TagIdent (www.expasy.ch) showed that only one protein matched and consisted in the uncharacterized protein Ytff with the UniProt number P39187. Nevertheless, the difference in the level of protein expression between nsPEF-treated vs nontreated cells could be considered as high enough due to the sensitivity of the staining method used. Thus, the slight differences observed between the treatment and the control of the protein pattern might also suggest a good recovery among time of these bacteria after the treatment or no changes at all.

This study showed that 60×10^{-9} s long nsPEFs i) had an impact on membrane permeation and ii) were able to decrease viable *E. coli* by one decimal magnitude after 500 pulses. The use of high pulsed electric fields appeared to affect very slightly the phenotypic status of the cell as the nonkilled cells were able to recover as quickly as nontreated cells. The treatment showed only minor changes and might be an interesting and safe way to deactivate or destroy bacteria in waste water at low energy cost. However, it remains to determine to what extent this technology enables to treat large volumes, in accordance with an industrial process.

Acknowledgements

This work was supported by a grant from the Agence Nationale pour la Recherche ANR-08-ECOT-019. We thank Julie Goulard for technical assistance. CNRS-IPBS and CERPEM are members of COST Action TD1104.

Conflict of interest

No conflict of interest declared.

References

- Barbosa-Cánovas, G.V., Gongora-Nieto, M.M., Pothakamury, U.R. and Swanson, B.G. (ed.) (1999) Fundamentals of high-intensity pulsed electric fields (PEF). In *Preservation of Foods with Pulsed Electric Fields*. pp. 1–19, 76–107, 108–155. San Diego, CA: Academic Press.
- Beebe, S.J., Chen, Y.-J., Sain, N.M., Schoenbach, K.H. and Xiao, S. (2012) Transient features in nanosecond pulsed electric fields differentially modulate mitochondria and viability. *PLoS ONE* **7**, e51349.
- Beier, H.T., Roth, C.C., Tolstykh, G.P. and Ibey, B.L. (2012) Resolving the spatial kinetics of electric pulse-induced ion release. *Biochem Biophys Res Commun* **423**, 863–866.
- Bowman, A.M., Nesin, O.M., Pakhomova, O.N. and Pakhomov, A.G. (2010) Analysis of plasma membrane integrity by fluorescent detection of Ti^+ uptake. *J Membr Biol* **236**, 15–26.
- Calderón-Miranda, M.L., Barbosa-Cánovas, G.V. and Swanson, B.G. (1999) Inactivation of *Listeria innocua* in liquid whole egg by pulsed electric fields and nisin. *Int J Food Microbiol* **51**, 7–17.
- Chang, X., Yang, L., Zhao, Q., Fu, W., Chen, H., Qiu, Z., Chen, J., Hu, R. *et al.* (2010) Involvement of recF in 254 nm ultraviolet radiation resistance in *Deinococcus radiodurans* and *Escherichia coli*. *Curr Microbiol* **61**, 458–464.
- Chen, N., Schoenbach, K.H., Kolb, J.F., James Swanson, R., Garner, A.L., Yang, J., Joshi, R.P. and Beebe, S.J. (2004) Leukemic cell intracellular responses to nanosecond electric fields. *Biochem Biophys Res Commun* **317**, 421–427.
- Dalmay, C., Villedemane, J., Joubert, V., Français, O., Mir, L.M. and Le Pioufle, B. (2011) Design and realization of a microfluidic device devoted to the application of ultrashort pulses of electrical field to living cells. *Sens Actuators B Chem* **160**, 1573–1580.
- Goettel, M., Eing, C., Gusbeth, C., Straessner, R. and Frey, W. (2013) Pulsed electric field assisted extraction of intracellular valuables from microalgae. *Algal Res* **2**, 401–408.
- Gusbeth, C., Frey, W., Volkmann, H., Schwartz, T. and Bluhm, H. (2009) Pulsed electric field treatment for bacteria reduction and its impact on hospital wastewater. *Chemosphere* **75**, 228–233.
- Haas, F.L. (1966) Study of the UV-induction of mutations in bacteria. *J Ark Med Soc* **62**, 357–361.
- Heinz, V., Alvarez, I., Angersbach, A. and Knorr, D. (2001) Preservation of liquid foods by high intensity pulsed electric fields—basic concepts for process design. *Trends Food Sci Technol* **12**, 103–111.
- Huang, K., Tian, H., Gai, L. and Wang, J. (2012) A review of kinetic models for inactivating micro-organisms and enzymes by pulsed electric field processing. *J Food Eng* **111**, 191–207.
- Joubert, V., Cheybe, C., Bonnet, J., Packan, D., Garnier, J.-P., Teissié, J. and Blanckaert, V. (2013) Inactivation of *Bacillus subtilis* var. niger of both spore and vegetative forms by means of corona discharges applied in water. *Water Res* **47**, 1381–1389.
- MacGregor, S.J., Farish, O., Fouracre, R., Rowan, N.J. and Anderson, J.G. (2000) Inactivation of pathogenic and spoilage micro-organisms in a test liquid using pulsed electric fields. *IEEE Trans Plasma Sci* **28**, 144–149.
- Marsellés-Fontanet, A.R., Puig, A., Olmos, P., Mínguez-Sanz, S. and Martín-Belloso, O. (2009) Optimising the inactivation of grape juice spoilage organisms by pulse electric fields. *Int J Food Microbiol* **130**, 159–165.
- Morotomi-Yano, K., Akiyama, H. and Yano, K. (2011a) Nanosecond pulsed electric fields activate MAPK pathways in human cells. *Arch Biochem Biophys* **515**, 99–106.
- Morotomi-Yano, K., Uemura, Y., Katsuki, S., Akiyama, H. and Yano, K. (2011b) Activation of the JNK pathway by nanosecond pulsed electric fields. *Biochem Biophys Res Commun* **408**, 471–476.



- Morotomi-Yano, K., Akiyama, H. and Yano, K. (2012) Nanosecond pulsed electric fields activate AMP-activated protein kinase: implications for calcium-mediated activation of cellular signaling. *Biochem Biophys Res Commun* **428**, 371–375.
- Mosqueda-Melgar, J., Raybaudi-Massilia, R.M. and Martín-Belloso, O. (2007) Influence of treatment time and pulse frequency on *Salmonella Enteritidis*, *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* populations inoculated in melon and watermelon juices treated by pulsed electric fields. *Int J Food Microbiol* **117**, 192–200.
- Mosqueda-Melgar, J., Elez-Martínez, P., Raybaudi-Massilia, R.M. and Martín-Belloso, O. (2008) Effects of pulsed electric fields on pathogenic micro-organisms of major concern in fluid foods: a review. *Crit Rev Food Sci Nutr* **48**, 747–759.
- Nesin, O.M., Pakhomova, O.N., Xiao, S. and Pakhomov, A.G. (2011) Manipulation of cell volume and membrane pore comparison following single cell permeabilization with 60- and 600-ns electric pulses. *Biochim Biophys Acta* **1808**, 792–801.
- Pakhomov, A.G., Shevin, R., White, J.A., Kolb, J.F., Pakhomova, O.N., Joshi, R.P. and Schoenbach, K.H. (2007) Membrane permeabilization and cell damage by ultrashort electric field shocks. *Arch Biochem Biophys* **465**, 109–118.
- Perni, S., Chalise, P.R., Shama, G. and Kong, M.G. (2007) Bacterial cells exposed to nanosecond pulsed electric fields show lethal and sublethal effects. *Int J Food Microbiol* **120**, 311–314.
- Puértolas, E., López, N., Condón, S., Raso, J. and Álvarez, I. (2009) Pulsed electric fields inactivation of wine spoilage yeast and bacteria. *Int J Food Microbiol* **130**, 49–55.
- Ramsey, K.L., Smith, J.J., Dasgupta, A., Maqani, N., Grant, P. and Auble, D.T. (2004) The NEF4 complex regulates Rad4 levels and utilizes Snf2/Swi2-related ATPase activity for nucleotide excision repair. *Mol Cell Biol* **24**, 6362–6378.
- Rieder, A., Schwartz, T., Schön-Hölz, K., Marten, S.-M., Süß, J., Gusbeth, C., Kohnen, W., Swoboda, W. et al. (2008) Molecular monitoring of inactivation efficiencies of bacteria during pulsed electric field treatment of clinical wastewater. *J Appl Microbiol* **105**, 2035–2045.
- Rowan, N.J., MacGregor, S.J., Anderson, J.G., Fouracre, R.A. and Farish, O. (2000) Pulsed electric field inactivation of diarrhoeagenic *Bacillus cereus* through irreversible electroporation. *Lett Appl Microbiol* **31**, 110–114.
- Sale, A.J.H. and Hamilton, W.A. (1967) Effects of high electric fields on micro-organisms: I. Killing of bacteria and yeasts. *Biochim Biophys Acta* **148**, 781–788.
- Schoenbach, K.H., Joshi, R.P., Stark, R.H., Dobbs, F.C. and Beebe, S.J. (2000) Bacterial decontamination of liquids with pulsed electric fields. *IEEE Trans Dielectr Electr Insul* **7**, 637–645.
- Stacey, M., Stickley, J., Fox, P., Statler, V., Schoenbach, K., Beebe, S.J. and Buescher, S. (2003) Differential effects in cells exposed to ultra-short, high intensity electric fields: cell survival, DNA damage, and cell cycle analysis. *Mutat Res* **542**, 65–75.
- Stacey, M., Fox, P., Buescher, S. and Kolb, J. (2011) Nanosecond pulsed electric field induced cytoskeleton, nuclear membrane and telomere damage adversely impact cell survival. *Bioelectrochemistry* **82**, 131–134.
- Teissié, J., Eynard, N., Vernhes, M.C., Bénichou, A., Ganeva, V., Galutzov, B. and Cabanes, P.A. (2002) Recent biotechnological developments of electropulsation. A prospective review. *Bioelectrochemistry* **55**, 107–112.
- Witkin, E.M. (1976) Ultraviolet mutagenesis and inducible DNA repair in *Escherichia coli*. *Bacteriol Rev* **40**, 869–907.
- Wu, Y., Mittal, G.S. and Griffiths, M.W. (2005) Effect of pulsed electric field on the inactivation of micro-organisms in grape juices with and without antimicrobials. *Biosyst Eng* **90**, 1–7.
- Žgalin, M.K., Hodžić, D., Reberšek, M. and Kandušer, M. (2012) Combination of microsecond and nanosecond pulsed electric field treatments for inactivation of *Escherichia coli* in water samples. *J Membr Biol* **245**, 643–650.



Cette publication montre que dans les conditions de traitement utilisée, le protéome n'est pas modifié, il n'y a pas d'acquisition de résistance aux antibiotiques et l'électroporation est réversible. La conclusion essentielle qui a pu être tirée de la publication est que la technologie nsCEP ne semble pas induire de grandes modifications biochimiques sur les bactéries survivantes.

Les expériences avec IP montrent que la membrane est rendue perméable par le traitement. En effet, l'expérience avec introduction de l'IP avant l'application des nsCEP montre une forte pénétration de l'IP dans les cellules, mais que cette perméabilisation est réversible, car l'expérience avec introduction d'IP 1h après l'application des nsPEF ne montre plus de pénétration de l'IP.

En approfondissant les données de la publication, on peut s'interroger sur le phénomène intervenant dans la réparation de la paroi. Les résultats sont surprenants car l'IP, fréquemment utilisé comme marqueur de perméabilisation, est également un marqueur de viabilité. En effet, les cellules perdent leur intégrité membranaire quand elles meurent, l'IP peut donc entrer dans les cellules mortes. Or dans l'expérience réalisée, les bactéries traitées sont soumises à des conditions de traitement donnant 90% d'abattement. Les résultats devraient donc logiquement donner 90 % de cellules marquées, or il n'en est rien. Plusieurs hypothèses peuvent être formulées :

- 1) La mesure de l'abattement étant réalisée par dénombrement des UFC, les bactéries ne sont pas mortes mais sont entrées dans un état « viable mais non cultivable » (VBNC).
- 2) Le seuil de détection obtenu par le protocole est trop faible pour que les résultats soient utilisables.
- 3) Les bactéries sont mortes, mais les mécanismes de réparation de la membrane ont néanmoins pu se réaliser.

Pour compléter les informations obtenues par l'observation de l'IP au microscope, les expériences en cytométrie ont été réalisées. Elles sont détaillées dans la Partie VI -V.

Les résultats en cytométrie, conjointe à une étude de l'effet décontaminant d'impulsions de plus longue durée (réalisée par l'IPBS) ont également fait l'objet d'une publication :



Contents lists available at ScienceDirect

Bioelectrochemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bioelechem

E. coli electroeradication on a closed loop circuit by using milli-, micro- and nanosecond pulsed electric fields: Comparison between energy costs

Alexis Guionet^{a,b,c}, Fabienne David^c, Clément Zaepffel^d, Mathilde Coustets^b, Karim Helmi^c, Cyril Cheype^e, Denis Packan^d, Jean-Pierre Garnier^e, Vincent Blanckaert^f, Justin Teissié^{a,b,*}

^a CNRS, IPBS (Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale), 205 route de Narbonne, BP64182, F-31077 Toulouse, France

^b Université de Toulouse, UPS, IPBS, F-31077 Toulouse, France

^c VERI, Chemin de la Digue, 78600 Maisons Laffitte, France

^d ONERA, DMPH, Chemin de la Hunière, 91761 Palaiseau, France

^e CERPEM, Maison de la Technopole, 6 rue Léonard de Vinci, F-53000 Laval, France

^f MicroMar, Mer Molécules Santé, IUML-FR 3473 CNRS, Université du Maine, IUT de Laval, Dept. Génie Biologique, BP2045, 53020 Laval Cedex 9, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 17 February 2014

Received in revised form 25 July 2014

Accepted 12 August 2014

Available online xxxxx

Keywords:

Nanosecond pulsed electric field

Microsecond pulsed electric field

Bacterial inactivation

Energy consumption

Flow rate

ABSTRACT

One of the different ways to eradicate microorganisms, and particularly bacteria that might have an impact on health consists in the delivery of pulsed electric fields (PEFs). The technologies of millisecond (ms) or microsecond (μ s) PEF are still well known and used for instance in the process of fruit juice sterilization. However, this concept is costly in terms of delivered energy which might be too expensive for some other industrial processes.

Nanosecond pulsed electric fields (nsPEFs) might be an alternative at least for lower energetic cost. However, only few insights were available and stipulate a gain in cost and in efficiency as well. Using *Escherichia coli*, the impact of frequency and low rate on eradication and energy consumption by msPEF, μ sPEF and nsPEF have been studied and compared. While a $1 \log_{10}$ was reached with an energy cost of 100 and 158 kJ/L with micro- and millisecond PEFs respectively, nsPEF reached the reduction for similar energy consumption. The best condition was obtained for a $1 \log_{10}$ deactivation in 0.5 h, for energy consumption of 143 kJ/L corresponding to 0.04 W·h when the field was around 100 kV/cm. Improvement can also be expected by producing a generator capable to increase the electric field.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Pulsed electric fields have been shown to affect bacterial viability [1] and are now proposed in liquid food processes to destroy microorganisms with no deleterious thermal effects [2]. This had been shown for milk [3], fruit juice [4,5] and wine [6] decontamination [7]. The mechanisms by which the pulsed electric field (PEF) with duration longer than microseconds (μ s) affects the membrane organization are proposed to affect the lipid bilayer [8]. A theoretical explanation has been proposed for μ sPEF where the formation of conducting defects is dependent on external field induced transmembrane potential modulation and therefore from the applied electric field amplitude [9]. Consequently, it appeared that these technologies using tens of kV/cm electric field amplitudes were effective in terms of decontamination for the food processing. One open question was that pulses with μ s duration period were associated with high energy consumptions. New pulse generators

provide a lot of flexibility in the choice of pulse duration, rise time, voltage, frequency and time of treatment. They therefore give access to a systematic investigation of the optimized conditions for a minimized energy consumption. A key observation is that energy consumption was not directly proportional to cell inactivation. This concept has been shown to be valid on *Escherichia coli* with pulsed electric fields using 2 different pulse durations at 32 ns and 700 ns; eradication levels were different while energy consumption used was equivalent [10].

A societal problem is to obtain a safe and “green” method to keep safe water in large volume reservoirs. PEF is clearly a solution. For technical reasons, a batch process is not conceivable and a flow process on a derivation can be a suitable method (Fig. 1).

In the resulting closed flow system, eradication depends on the electrical parameters, the flow rate, the volume of the decontamination chamber and the treated volume of the tank (reservoir). Trains of pulses are delivered when the bacteria are in the applicator. The technology is controlling the number of pulses that are delivered on the sample and the delay between the delivery of pulse trains on a given bacteria. This last parameter was shown to be important on the effect of PEF [11,12]. Increasing the flow rate will increase the number of passages where a

* Corresponding author at: CNRS, IPBS (Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale), 205 route de Narbonne, BP64182, F-31077 Toulouse, France.

E-mail address: justin.teissie@ipbs.fr (J. Teissié).

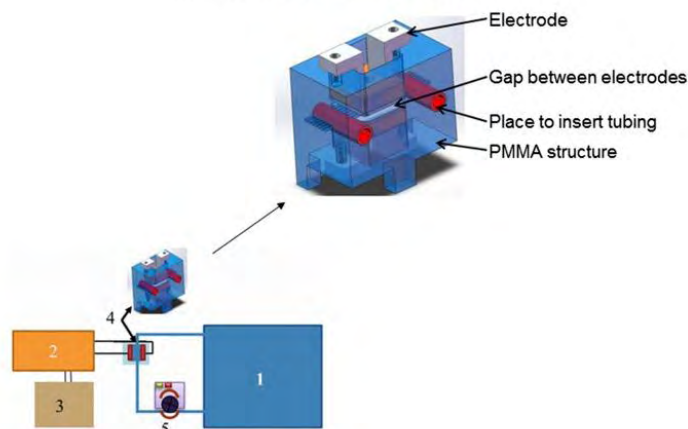


Fig. 1. Schematic drawing of a flow system with a derivation in order to destroy the bacteria. 1. Volume of water to be treated, 2. Generator, 3. TTL, 4. Flow disinfection chamber or flow applicator, 5. Peristaltic pump. Arrows on the peristaltic pump show the fluid travel in a clockwise direction. In the upper right corner: Applicator or treatment chamber with a gap between electrodes of 2 mm. The generators after pulse deliveries induced in the chamber a homogeneous electric field of 100 kV/cm.

cell is treated, but it decreases its residency per passage in the decontamination chamber, i.e. number of pulses that are applied.

In this study, several sequences of pulsed electric fields have been investigated: nsPEF, μ sPEF and msPEF with several frequency and flow conditions. From a more applied point of view, we took into account that the level of contamination is monitored in a quasi-continuous way. Bacteria contamination results not from the growth in the liquid phase but from the sporadic release from the biofilms present on the wall of the reservoir. Electrically mediated decontamination should act as soon as a small contamination is detected and a 1 \log_{10} eradication is therefore just what is needed. From a basic point of view, μ sPEF and msPEF were assumed to act by a membrane irreversible permeabilization while nsPEFs were predicted to act by the same way but in synergy with a direct effect on the cytoplasmic content [13,14]. The energetic consumptions needed for a 1 \log_{10} eradication after the millisecond, the microsecond or the nanosecond treatments have been compared.

2. Materials and methods

2.1. Microbiological culture and sample preparation

Experimental studies were performed by using *E. coli* BL21(DE3) grown in LB broth and throughout called *E. coli*. They were stored at 4 °C as "colony forming unit" (CFU) on Petri dish filled with "Plate count agar" PCA. A CFU was incubated at 37 °C under agitation in 60 mL of culture medium. After 15 h the bacteria population reached a stationary phase. Germs were harvested by centrifugation (3000 g, 10 min). The supernatant was discarded and the pellet resuspended in a Tris saline buffer (pH 9) after discarding supernatant and vortexing. The final concentration of *E. coli* in solution was 10^9 CFU/mL.

2.2. Pulsation solution

It was prepared by adding in ultra-pure water, ions at the same concentration than those measured in an industrial water. The pH was buffered with Tris and adjusted at pH = 9 (as found in industrial water) by NaOH or HCl. Conductivity was adjusted at 2.5 mS/cm using NaCl. Stability of pH, conductivity, and bacteria concentration were compared between water from industrial water and the Tris solution. No significant difference was observed in survival over 24 h.

2.3. Nanosecond batch or flow electropulsation assays

2.3.1. Generator characteristics

Two different pulse generators were used.

2.3.2. Generator characteristics

Two pulse generators were built by ONERA and used for this study. The aim of both generators is to apply an electric field of 100 kV/cm to the applicator, with an applicator gap of 2 mm, this correspond to a voltage of 20 kV. However, generator G2 operates within a different frequency range.

2.3.2.1. Generator G0. The first generator delivers square pulses of 70 ns, 20 kV at 2 Hz on an 80 Ω impedance corresponding to the reactor impedance. The principle is a 12-meter coaxial transmission line being charged by a high voltage DC power supply and then discharged to the applicator. The discharge of the transmission line is triggered using a commercial spark gap (GP-12B Excelitas) giving a pulse rising time of 20 ns. In an impedance matched case (impedance of the load equal to the impedance of the line), the voltage across the reactor should be half the transmission line charging voltage. Here we use a high impedance reactor (80 Ω) and avoid matching impedance to double this voltage thus reaching a voltage across the reactor equal to the charging voltage. The downside is the propagation of a reflected pulse toward the generator. A 12 Ω resistance is thus used to absorb this reflected pulse, this limits the maximum frequency of the generator. The pulse duration is directly correlated to the propagation inside the 12 m transmission line resulting in a pulse duration of 70 ns. A P6015 high voltage probe from Tektronix is used to monitor the high voltage on the applicator. A pulse profile of the G0 is presented Fig. 2.

2.3.2.2. Generator G2. The second generator was designed to deliver the same electric field of 100 kV/cm but at higher frequency up to 20 Hz and with alternating bipolar pulses to avoid electrolysis. As in the first generator, a 12-meter coaxial transmission line was used, that defined the pulse duration of 70 ns. The DC commercial power supply was replaced by a pulse transformer charging circuit able to deliver successively positive and negative high voltage pulses of 2 μ s charging the transmission line, a timing of 50 ms separated both pulses. To achieve this, two primary circuits were wired around the transformer, one for each polarity.

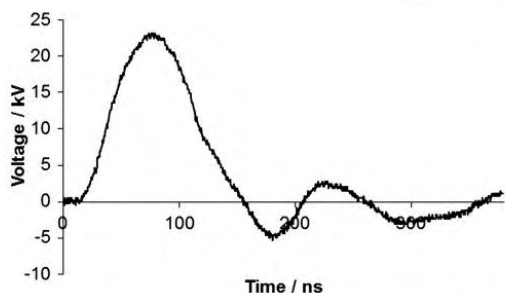


Fig. 2. Kinetics of the voltage pulse applied on the electrodes. The generator G0 was able to provide a tension of 20 kV. The pulse rising time was 20 ns and with a duration of 70 ns.

In order to increase the frequency, a new scheme was designed to avoid joule losses in the resistance used to absorb the reflected pulse. This was achieved using a cable transformer connected between the transmission line and the reactor. This cable transformer matched the impedance of the line (25 Ω here) to the one of the applicator (80 Ω). The matching was not perfect with 80 Ω as the initial design of the applicator was supposed to be a 100- Ω geometry, consequences were that the pulse shape was not a clean square pulse, in spite of this issue the study was done with this 80- Ω applicator. The spark gap used to discharge the transmission line was the same as in the previous generator, it was not meant to work with current flowing in both directions thus the two polarities are not perfectly identical. The pulses obtained by the generator G2 are shown in Fig. 3A and B for the positive and negative pulse profile respectively.

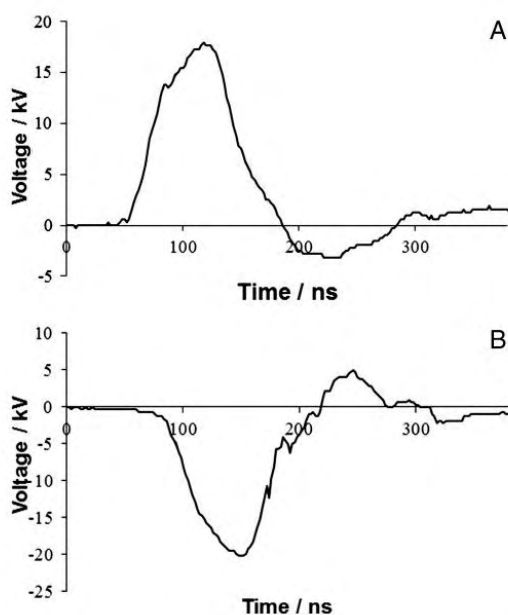


Fig. 3. Kinetics of the voltage pulse applied on the electrodes. The generator G2 was able to deliver bipolar or unipolar pulses. A: Positive pulse profile characterized by a rising time of 20 ns, and duration of 70 ns is shown. The voltage reached 20 kV; B: negative pulse profile with the same characteristics as positive pulse.

2.3.3. Applicator or treatment chamber

The applicator (Fig. 1) was composed of two stainless steel plate parallel flat electrodes at a distance of 0.2 cm of $10 \times 10 \text{ mm}^2$ fixed on a PMMA structure. Two holes on each side of PMMA structure allowed the filling and emptying the chamber volume with the flow process. Volume of the applicator between electrodes reached 160 μL .

2.4. Flow experiments with G0 or G2

To treat 5 mL, a suspension of 10 mL of *E. coli* was kept at 33 $^{\circ}\text{C}$. A peristaltic pump was used to fill the applicator and all tubings. The flow was held 1 h without delivering pulse as a pre-treatment to homogenize and stabilize bacteria suspension in the flow system. Then, 5 mL were transferred to a sample tube (control), and the train of pulses was delivered continuously on the remaining 5 mL volume flowing through the applicator.

To treat 50 mL, a suspension of 60 mL of *E. coli* was treated according a similar procedure. After 1 h, 10 mL were transferred to the control sample tube and the remaining 50 mL were flow-treated with the train of pulses.

Whatever the pulsed volume, 360 μL samples were picked up every 15 min both from the control and pulsed samples, put in a microtube and incubated at 33 $^{\circ}\text{C}$ for 1 h. Consequently, successive dilutions were performed with 40 μL of bacteria suspension mixed in 360 μL of sterile water and 100 μL of each dilution were spread on PCA dishes. Each condition and experiment was done in triplicate. After a 24 h incubation colony forming units (CFUs) were counted when their number ranged from 30 to 300.

2.5. Survival

The bacteria concentration for each sample was determined by using the following formula:

$$C = (N/V) \times D \quad (1)$$

where C represents the remaining number of bacteria (CFU/mL), N the number of CFU on the dish, V the spreading volume on the Petri dish (0.1 mL) and D the dilution factor. Survival was obtained, following the train of pulses, from the \log_{10} reduction in the number of CFU compared to the control.

2.6. Microsecond batch electropulsation

Pulsed electric fields were delivered on a 0.1 mL bacterial suspension poured between 2 parallel flat stainless electrodes at a distance of 0.2 cm. As shown in Fig. 4, trains of 100 pulses with a duration of 5 μs at a frequency of 1 kHz were delivered by an electropulsator (S20 Betatech, France) at a pre-set field strength with a manual polarity inversion (that lasted about 2 s). Delivered pulses were monitored on-line. *E. coli* was grown to the stationary phase, washed and resuspended in a 1 mS/cm saline solution. Survival was evaluated as previously described.

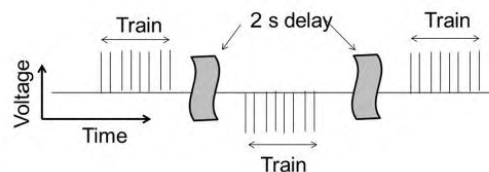


Fig. 4. Pulse sequence in the microsecond batch PEF. A train of 100 5 μs pulses at a frequency of 1 kHz was delivered (Train), then the polarity of the electrodes was manually inverted (2 s delay) and a train with the alternated polarity was delivered. This was continuously repeated to obtain the pre-defined number of pulses that are delivered.



2.7. Millisecond flow electropulsation

Pulse generators (DEEX-BIO, Betatech, France) and flow through applicators (CNRS) were designed to apply trains of bipolar pulses on the flow. The discharge chamber (flat parallel stainless steel electrodes) was built with a distance between electrodes of 3 mm, the width of 5 mm, and the volume of 150 μL [15]. Currents delivered on the applicator were monitored on-line.

Fifty milliliters of the suspension of *E. coli* in the stationary phase of growth were suspended in an aqueous buffer with a conductance of 2.58 mS/cm and were continuously flow processed according to the parameters (flow rate = 0.15 mL/s; $E = 4$ kV/cm; Duration of each single pulse = 2 ms, frequency = 1 Hz; delay between trains 330 s). With these settings, on the average, each bacteria was electropulsed by the bipolar train every 5.5 min. Due to the power limitations of the pulse generator, it was not possible to increase the frequency and to work with a shorter delay in the train delivery. Survival was evaluated as previously described.

2.8. Comparison between experiments

To compare each experiment, independently to frequency or flow rate or volume or other parameters, the energy consumption reported to a volume of 1 L to observe a 1 \log_{10} reduction was calculated. The value was determined in 3 steps: i) Determination of the time required to obtain a 1 \log_{10} reduction, ii) Determination of number of pulses delivered during this time obtained as:

$$\text{"Number of pulses"} = \text{"Frequency"} (\text{Hz}) \times 3600 \times \text{"Times for } 1 \log_{10}\text{"} (\text{h}) \quad (2)$$

and iii) Extrapolation of the energy expressed in J/L corresponding in the case that 1 L had to be treated given as:

$$\text{"Number of pulses"} \times \text{"Energy consumption for 1 pulse"} \times 1000 / \text{Volume treated (mL)}. \quad (3)$$

2.9. Flow cytometry

A flow cytometer (Chemunex®, Ivry sur Seine, France) was used to determine the part of bacteria killed, injured or alive. In addition, the device is able to determine the metabolic activity of each bacteria. The goal of this assay was to compare the results by this method and those obtained with Petri dishes. Samples providing with the following conditions, G2 with a frequency of 20 Hz, a flow rate of 40 $\mu\text{L}/\text{s}$ and 5 mL, were used.

Two solutions with fluorochromes were used to make a mix of SYBR Green I + propidium iodide (PI) and Chemchrom V6. SYBR Green and PI are both able to fix DNA. SYBR Green I can pass through the cell

membrane and able to stain all the bacteria. Propidium iodide can stain only bacteria with a damaged cell membrane. ChemChrom V6 becomes fluorescent by cleavage being the substrate of an esterase present when cell metabolism is still active. Consequently, bacteria having no damage will present only green fluorescence. Nevertheless the compound shows that cells maintain an activity even after injury, i.e. stained in red.

Samples were diluted from 10^{-1} to 10^{-4} with a physiologic solution. The dye SYBR Green I + PI was incubated 15 min at RT while Chemchrom V6 was incubated 30 min at 30 °C. Then, 10 μL of each dilution were used for flow cytometry assay. The dilutions used were those wherein a number of bacteria large enough to provide statistics were present.

2.10. Statistics

In order to verify if a value was statistically different, a Student's *t*-test has been performed. A value was considered statistically different when $P \leq 0.5$.

3. Results

3.1. Microsecond batch PEF

E. coli in the stationary phase was observed to be sensitive to the microsecond pulses with a cumulative effect (Fig. 5). Nevertheless, there was a need for a large number of pulses to get a 1 \log_{10} eradication. Increasing the field strength from 7.5 kV/cm to 9 kV/cm appears to strongly improve the eradication effect (Fig. 5).

For safety issues, it was impossible to increase further the field strength due to the risk of generating sparks between the electrodes. The other problem was to avoid a high temperature increase due to the Joule heating. This was obtained by the short pulse duration (5 μs), the relatively long delay in the train (1 ms) and the very long pause during the polarity inversion (2 s). Pulse polarity inversion prevented electrochemical reactions at the level of electrodes. This was checked by observing the potential toxicity of the pulsed buffer. We observed that even when a high number of pulses was delivered, adding the pulsed buffer to the bacteria did not affect their survival (Fig. 6).

The energy cost to obtain a 1 \log_{10} decrease in viability was 100 kJ/L (Table 1).

3.2. Millisecond flow PEF

E. coli in the stationary phase was observed to be sensitive to the millisecond pulses with a cumulative effect (Fig. 7).

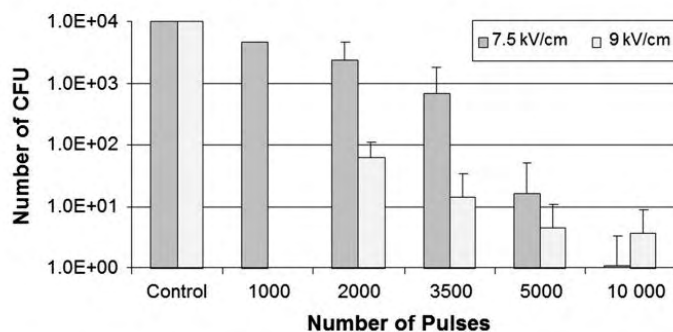


Fig. 5. *E. coli* sensitivity to the microsecond batch PEF treatment. The number of colony forming units (CFUs) was determined after being submitted to increasing number of pulses with 2 different field strengths (7.5 and 9 kV/cm).

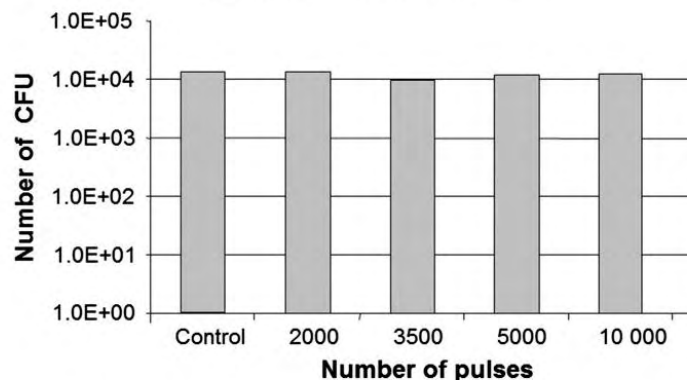


Fig. 6. Lack of toxicity of the pulsed buffer. The 1 mS/cm saline solution was treated with increasing number of pulses (7.5 kV/cm), mixed with the bacteria. *E. coli* survival (CFU) was followed by plating on agar.

Due to the high conductivity of the buffer, a high current (5 A) was delivered on the applicator even with the rather low field strength that was present between the electrodes (4 kV/cm). As a low frequency was used, only a limited temperature increase was observed (21 °C) but with the long delay between each bipolar train, a cooling effect down to room temperature (RT) was present meaning that along the treatment bacteria were kept at RT. The built-in polarity inversion feature of the DEEX-Bio electropulsator prevented the electrochemical reactions at the level of the electrodes. Again, adding a pre-pulsed buffer to the bacteria did not affect their survival (data not shown). With the relatively large volume that was treated (50 mL) at the low flow rate (0.15 mL/s), the delay between each bipolar train was long as mentioned in the method part.

The energy cost to obtain a 1 log₁₀ decrease in viability was 158 kJ/L (Table 1).

3.3. Nanosecond flow PEF

A 5 mL volume of *E. coli* in the stationary phase was observed to be sensitive to the nanosecond pulses with a cumulative effect when using G0 (Fig. 8A). A 1 log₁₀ decrease was reached after 1 h with 5 mL bacteria suspension and a flow rate of 10 μL/s (16 pulses delivered during the residency time in the applicator; average delay between delivery of 2 successive trains of pulses: 500 s). Consequently, the number of pulses defined in Material and Methods was 3600 pulses. The energy cost to obtain a 1 log₁₀ decrease in viability was 216 kJ/L (Table 1). If the same conditions were used at a frequency of 2 Hz (32 pulses delivered during the residency time in the applicator; average delay between delivery of 2 successive trains of pulses: 500 s) then energy cost reached 302 kJ/L (Table 1).

Using the same conditions but with a flow rate of 1 μL/s, it appeared that a 1 log₁₀ decrease was obtained after 3.5 h leading to a number of

pulses of 12,600 (160 pulses delivered during the residency time; average delay between delivery of 2 successive trains of pulses: 5000 s). The energy cost to obtain a 1 log₁₀ decrease in viability was 756 kJ/L. For a flow rate of 2 μL/s (80 pulses during the residency time) the energy cost was 670 kJ/L (Table 1).

E. coli in the stationary phase was observed to be sensitive to the nanosecond pulses with a cumulative effect when using G2 (Fig. 8B). One log₁₀ decrease was reached after 0.5 h with 50 mL of bacteria suspension, a 20 Hz frequency and a flow rate of 100 μL/s (32 pulses delivered during the residency time in the applicator; average delay between delivery of 2 successive trains of pulses: 500 s). The energy cost with these conditions was 216 kJ/L. With a flow rate of 3200 μL/s (1 single pulse delivered during the residency time in the applicator; average delay between delivery of 2 successive trains of pulses: 16 s) the decrease was obtained after 0.33 h leading to an energy cost of 143 kJ/L (Table 1).

Experiments performed with 5 mL suspension, 20 Hz frequency and a flow rate of 40 μL/s (80 pulses delivered during the residency time in the applicator; average delay between delivery of 2 successive trains of pulses: 125 s). The results obtained showed that the number of surviving bacteria decrease by 3.5 log₁₀ after 15 min of treatment (Fig. 9A). The cost in energy reached 181 kJ/L (Table 1).

These results showed that the flow conditions impact the decontamination energy cost of *E. coli*.

3.4. Nanosecond PEF and flow cytometry

To see if nsPEFs affect the cells according to the conditions established in the method part, non-treated or treated *E. coli* were passed through the flow cytometer (a 5 mL volume, a flow rate of 40 μL/s and a frequency of 20 Hz as just reported). No significant decrease of active bacteria was observed. At T0 (Fig. 9B), concentration of alive bacteria was close

Table 1
Parameters and energy cost with different generators for 1 log₁₀ eradication by using pulsed electric field at the millisecond or microsecond or nanosecond level.

Generator	Electric field (kV/cm)	Frequency (Hz)	Flow rate (μL/s)	Number of cycles	Time between 2 cycles (min)	Number of pulses per passage in applicator	Energy consumption (kJ/L)
G0 unipolar	100	1	1	2.53	83	162	756
G0 unipolar	100	1	10	7.23	8.3	16	216
G0 unipolar	100	2	2	2.14	42	162	670
G0 unipolar	100	2	10	5.06	8.3	32	302
G2 unipolar	100	20	100	3.61	8.3	32	216
G2 unipolar	100	20	3200	66.67	0.27	1	143
G2 unipolar	100	20	40	1.2	2.1	81	181
Microsecond unipolar	9	1000	Batch	–	–	–	100
Millisecond bipolar	4	5	150	–	5.5	1 (2)	158

Please cite this article as: A. Guionet, et al., *E. coli* electroeradication on a closed loop circuit by using milli-, micro- and nanosecond pulsed electric fields: Comparison between energy costs, *Bioelectrochemistry* (2014), <http://dx.doi.org/10.1016/j.bioelechem.2014.08.021>

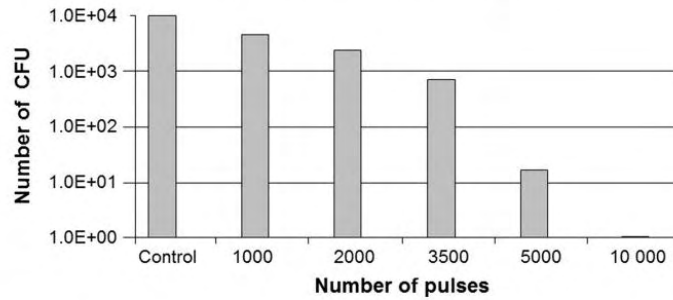


Fig. 7. *E.coli* sensitivity to the flow millisecond PEF treatment. The number of CFU was determined after the 50 mL solution being submitted to increasing time of treatment. Pulses were delivered at 4 kV/cm.

to the concentration of control bacteria while for other times all bacteria were injured. Surprisingly, concentrations of dead bacteria did not increase significantly between T0 and T15. Cellular activities stayed

the same for all samples. This phenomenon can be explained by residual enzymatic activities that still existed after cell death and that the esterases were not leaking out of the cytoplasm through the wall.

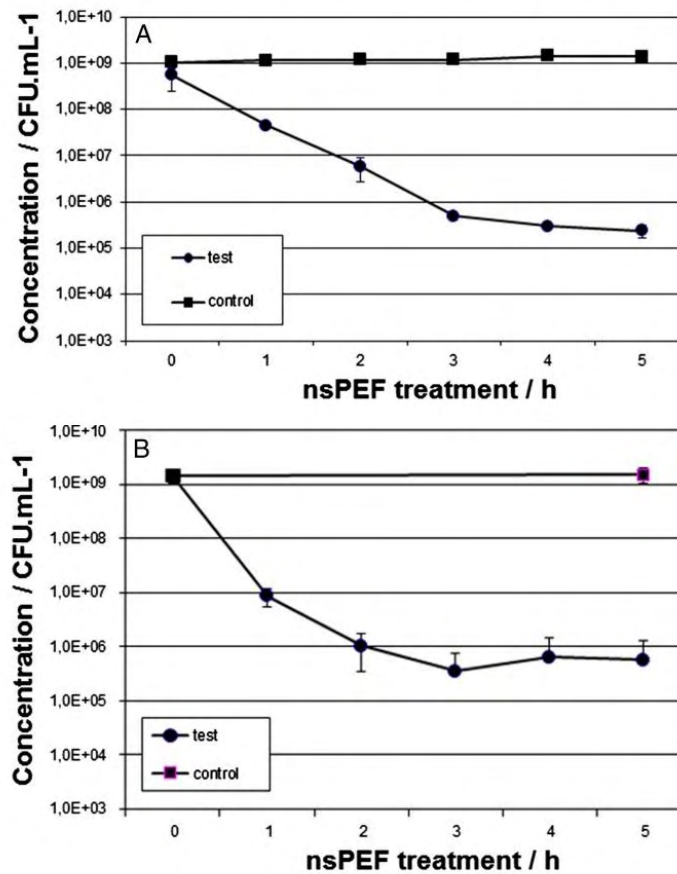


Fig. 8. Effect of nsPEF on *E. coli*. A—The following conditions were used: generator G0: sample volume of 5 mL, temperature of 33 °C, frequency of 1 Hz, electric field of 100 kV/cm, and flow rate of 10 $\mu\text{L/s}$. Squares and circles in the graph represent the control and the assay, respectively. The decrease of bacteria viability of 1 \log_{10} was reached after a 1 h treatment corresponding to an energy consumption of 216 kJ/mL. B—Increase in flow rate and frequency. The following conditions were used: generator G2: sample volume of 50 mL, temperature of 33 °C, frequency of 20 Hz, electric field of 100 kV/cm, and flow rate of 100 $\mu\text{L/s}$. Squares and circles in the graph represent the control and the assay, respectively. The decrease of bacteria viability of 1 \log_{10} was reached after a 0.5 h treatment corresponding to an energy consumption of 216 kJ/mL.

Please cite this article as: A. Guionet, et al., *E. coli* electroeradication on a closed loop circuit by using milli-, micro- and nanosecond pulsed electric fields: Comparison between energy costs, *Bioelectrochemistry* (2014), <http://dx.doi.org/10.1016/j.bioelechem.2014.08.021>



4. Discussion

By checking the different abatement experiments, it appeared that at the end of the curves, in most cases, a plateau was observed. In cause a probable tailing phenomenon which is a well-known matter in UV disinfection and observed by other authors using PEF [1,16–21]. But as explained in the introduction, for practical downstream reasons, the energy evaluation was performed for a 1 log₁₀ reduction, i.e. within the linear part of each curve. Cost efficiency for eradication is clearly dependent on the pulsing parameters (flow, frequency, delay between trains).

Previous batch experiments with nsPEF using *E. coli* brought conflicting observations but different conditions of electric field, pulse duration, frequency and number of pulses were applied. A train of 80 kV/cm, 10 Hz, 10 ns and 1000 pulses was inefficient [22] while a 2 log₁₀ abatement was observed with 100 kV/cm, 30 Hz, 9000 pulses [23]. We observed a 1.5 log₁₀ reduction with 100 kV/cm, 1 Hz, 500 pulses (Data not shown). These observations confirmed that the electric pulse

protocols used have an impact on bacteria deactivation; one of the major parameters being probably the electric field (80 kV/cm was ineffective). In addition, it has been shown that increasing pulse duration from 100 to 250 μs did not affect *E. coli* eradication [22]. Combination of ns- and μsPEF induced a 3 log₁₀ reduction with 8 × 200 μs pulses and 1000 pulses at 80 kV/cm, 10 Hz and 10 ns while 20 × 200 μs pulses were needed to reach the same abatement [22]. Consequently, the energy consumption was in favor of the combination leading to a synergistic effect [22]. Pre-damaged cells were sensitive to 80 kV/cm nsPEF. We should mention that due to a lack of technical details in their protocol it was impossible to evaluate the energy cost of their treatment.

Among the different nsPEF conditions with flow experiments, the most effective condition was 1 single pulse delivered during the residency time in the applicator; average delay between delivery of 2 successive trains of pulses: 16 s while the less favorable condition was 160 pulses delivered during the residency time; average delay between delivery of 2 successive trains of pulses: 5000 s Two major conclusions have been observed: i) frequency had no effect on energy needed to

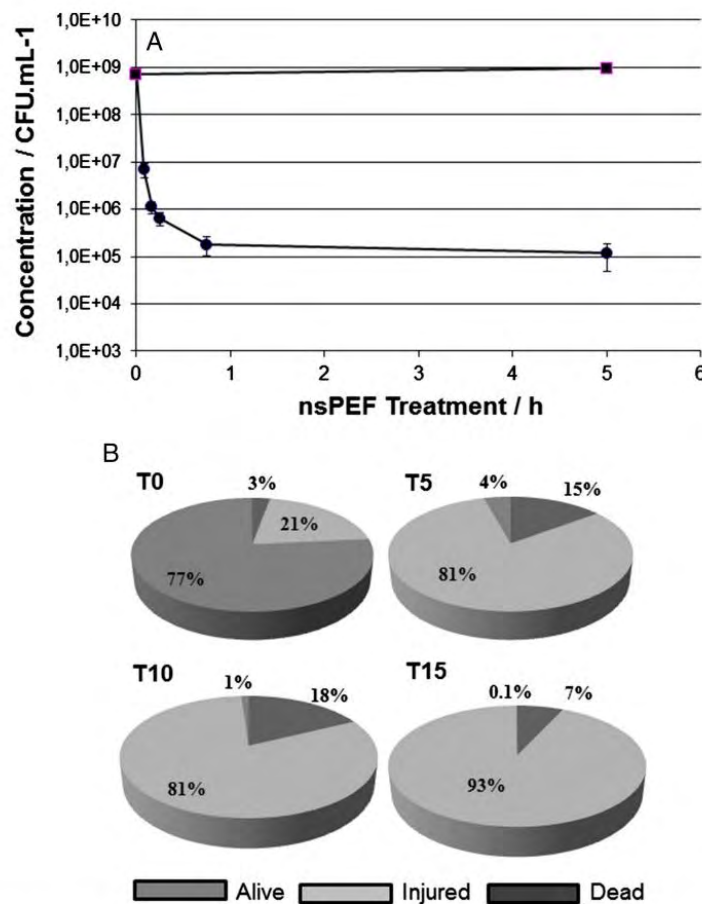


Fig. 9. Effect of nsPEF on *E. coli*: evaluation by flow cytometry. The conditions were a bacterial solution of 5 mL, a flow rate of 40 μL/s and a frequency of 20 Hz. A. The decrease of bacteria to 1 log₁₀ was reached after a 2.5 min treatment corresponding to an energy consumption of 181 kJ/mL. After 15 min 3.5 log₁₀ was reached. B. The different subpopulations of cells: alive, injured and dead are presented at T0, T5, T10 and T15 min. N = 3 experiments in triplicate.

Please cite this article as: A. Guionet, et al., *E. coli* electroeradication on a closed loop circuit by using milli-, micro- and nanosecond pulsed electric fields: Comparison between energy costs, Bioelectrochemistry (2014), <http://dx.doi.org/10.1016/j.bioelechem.2014.08.021>



obtain a 1 log₁₀ reduction in the range of 1 to 20 Hz and ii) the best performance was obtained when the delay between successive trains was the shortest. An explanation of these phenomena referred of bacteria behavior. It appeared that nsPEF induced sub-lethal injuries and bacteria able to restore themselves [10]. Therefore, number of PEFs is not the only parameter impacting bacteria inactivation; their repartitions have an influence too [24]. In our results, the best performance was observed at 1 pulse per 16 s. This period of time of 16 s is presumably not enough for bacteria restoration. Besides, the performance giving the lowest result was observed when bacteria stay 83 min without receiving nsPEF, i.e. a long period of time where some bacteria are able to recover. Considering the effect of nsPEF on cells, flow cytometry showed a decrease of viable bacteria about 3.5 log₁₀ between T0 and T15. Those results were rather confirmative from those with Petri dish (3 log₁₀ in 15 min). There is an indetermination about the ability of injured cells to recover and grow. Dead Bacteria are supposed to be irreversibly permeabilized due to a lack in membrane integrity. Reciprocally, cell membrane permeabilization leads generally to cell death. This is why bacteria marked as injured are generally considered as dead. But the bacteria can repair the cell membrane a long time after PEF treatment. This is concomitant and consistent with the cases where the delay between the trains of pulses was close or not. Thus, the difference of 0.5 log₁₀ between abatement determined by cytometer and by Petri dish may be relevant of a small part of injured bacteria that are still cultivable.

A disappointing point in the development of the nsPEF technology for bacterial eradication is that the energy cost was not improved as compared with the μ sPEF, that was used with a rather long delay between the train delivery (for technical reasons). Indeed most electro-eradication flow systems are using μ sPEF flow technologies [22,25–28]. One explanation may be in the mechanism of eradication. The nsPEFs were delivered with a submicrosecond duration, a condition where one of the field targets should be membrane electroporation. This field response is controlled by the induced transmembrane potential (TMP) that on the ns time scale is controlled by the membrane capacitive loading time and the dipolar properties of the microorganism [29]. Under the present experimental conditions (*E. coli* in a 2.5 mS/cm buffer), it is between 0.1 and 1 μ s. with the 70 ns long pulse, the steady state of the TMP is not reached meaning the field effect on the membrane remains limited while the energy is wasted in a Joule effect that may affect the membrane behavior [30]. This is not the case with a μ sPEF. The prediction is that using a higher field strength would be more effective for eradication at a lower cost as it is known i) that nsPEF induces membrane permeabilization [31–33], the key step in the PEF induced loss of viability and ii) that permeabilization is dependent on the pulse characteristics [34,35]. Another potential drawback of our nsPEF generators may be present due to the slightly bipolar character of the delivered pulse (Figs. 2 and 3). It was recently observed and published that bipolar nsPEFs were less effective than monopolar pulses to trigger permeabilization and loss of viability on mammalian cells [36]. The role of this tailing feature of the pulses in our experiments remains an open question.

In the goal of using nsPEF treatment in industrial process large volume have to be treated as fast as possible for a minimal energy consumption. The best efficiency in our conditions was obtained with a flow rate value that allowed the bacteria to receive only 1 pulse each time it passed through the applicator. If the volume to be treated is large, at the same flow rate and electrical parameters, the delay between 2 successive trains will increase leading to a longer decontamination time. To reduce the time between 2 cycles, there is a need to increase the volume of the applicator and/or the frequency. A redesign of the pulse generator and of its specifications is therefore requested.

To conclude, the process at a laboratory scale appears to be cost effective and, for instance, 143 kJ correspond to 0.040 kW·h. This should be improved when generators able to generate electric fields higher than 100 kV/cm will be available.

Acknowledgments

This work was supported by a grant from the Agence Nationale pour la Recherche ANR-08-ECOT-019. CNRS-IPBS and CERPEM are members of COST Action TD1104.

AG was the recipient of a CIFRE fellowship.

References

- [1] A.J.H. Sale, W.A. Hamilton, Effects of high electric fields on microorganisms: I. Killing of bacteria and yeasts, *Biochem. Biophys. Acta* 148 (1967) 781–788.
- [2] M. Amiali, M.O. Ngadi, J.P. Smith, V.G. Raghavan, Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enteritidis* in liquid egg white using pulsed electric field, *J. Food Sci.* 71 (2006) M88–M94.
- [3] A. Sobrino-López, O. Martín-Belloso, Review: potential of high-intensity pulsed electric field technology for milk processing, *Food Eng. Rev.* (2009) 17–27.
- [4] J. Mosqueda-Melgar, P. Elez-Martínez, R.M. Raybaudi-Massilia, O. Martín-Belloso, Effects of pulsed electric fields on pathogenic microorganisms of major concern in fluid foods: a review, *Crit. Rev. Food Sci.* 48 (2008) 747–759.
- [5] L. Salvia-Trujillo, M. Morales-de la Peña, M.A. Rojas-Graü, O. Martín-Belloso, Microbial and enzymatic stability of fruit juice–milk beverages treated by high intensity pulsed electric fields or heat during refrigerated storage, *Food Control* 22 (12) (2011) 1975–1983.
- [6] E. Puértolas, N. López, S. Condón, J. Raso, I. Alvarez, Pulsed electric fields inactivation of wine spoilage yeast and bacteria, *Int. J. Food Microbiol.* 130 (2009) 49–55.
- [7] D. Knorr, M. Geulen, T. Grahl, W. Sitzmann, Food application of high electric field pulses, *Trends Food Sci. Technol.* 5 (1994) 71–75.
- [8] U. Zimmermann, G. Pilwat, F. Riemann, Dielectric breakdown of cell membranes, *Biophys. J.* 14 (1974) 881–899.
- [9] G. Saulis, Electroporation of cell membranes: the fundamental effects of pulsed electric fields in food processing, *Food Eng. Rev.* 2 (2010) 52–73.
- [10] P.R. Chalise, S. Perni, G. Shama, B.M. Novac, I.R. Smith, M.G. Kong, Lethality mechanisms in *Escherichia coli* induced by intense sub-microsecond electrical pulses, *Appl. Phys. Lett.* 89 (2006) 153902.
- [11] D. Miklavcic, G. Pucihar, M. Pavlovic, S. Ribaric, M. Mali, A. Macek-Lebar, M. Petkovsek, J. Nastran, S. Kranjc, M. Cemazar, G. Sersa, The effect of high frequency electric pulses on muscle contractions and antitumor efficiency in vivo for a potential use in clinical electrochemotherapy, *Bioelectrochemistry* 65 (2) (2005) 121–128.
- [12] O.N. Pakhomova, B.W. Gregory, A.G. Pakhomov, Facilitation of electroporative drug uptake and cell killing by electrosensitization, *J. Cell. Mol. Med.* 17 (1) (2013) 154–159.
- [13] R.P. Joshi, Q. Hu, R. Aly, K.H. Schoenbach, H.P. Hjalmarson, Self-consistent simulations of electroporation dynamics in biological cells subjected to ultrashort electrical pulses, *Phys. Rev. E Stat. Nonlinear Soft Matter Phys.* 64 (1 Pt 1) (2001) 011913.
- [14] R.P. Joshi, K.H. Schoenbach, Bioelectric effects of intense ultrashort pulses, *Crit. Rev. Biomed. Eng.* 38 (3) (2010) 255–304.
- [15] M. Coustets, N. Al-Karablieh, C. Thomsen, J. Teissié, Flow process for electroextraction of total proteins from microalgae, *J. Membr. Biol.* 246 (2013) 751–760.
- [16] S. Jayaram, G.S.P. Castle, A. Margaritis, The effects of high field DC pulse and liquid medium conductivity on survivability of *Lactobacillus brevis*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 40 (1993) 117–122.
- [17] Q. Zhang, A. Mosalve-Gonzalez, G.V. Barbosa-Canovas, B.G. Swanson, Inactivation of *E. coli* and *S. cerevisiae* by pulsed electric fields under controlled temperature conditions, *Trans. Am. Soc. Agric. Eng.* 37 (1994) 581–587.
- [18] P. Lubicki, S. Jayaram, High voltage pulse application for the destruction of the Gram-negative bacterium *Yersinia enterocolitica*, *Bioelectrochem. Bioenerg.* 43 (1997) 135–141.
- [19] P. Mañas, L. Barsotti, J.C. Cheftel, Microbial inactivation by pulsed electric fields in a batch treatment chamber: effects of some electrical parameters and food constituents, *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 2 (2001) 239–249.
- [20] G. Donsi, G. Ferrari, G. Pataro, Inactivation kinetics of *Saccharomyces cerevisiae* by pulsed electric fields in a batch treatment chamber: the effect of electric field unevenness and initial cell concentration, *J. Food Eng.* 78 (2007) 784–792.
- [21] G. Pataro, G. Ferrentino, C. Ricciardi, G. Ferrari, Pulsed electric fields assisted microbial inactivation of *S. cerevisiae* cells by high pressure carbon dioxide, *J. Supercrit. Fluids* 54 (2010) 120–128.
- [22] M.K. Žgalin, D. Hodžić, M. Reberšek, M. Kanduđer, Combination of microsecond and nanosecond pulsed electric field treatments for inactivation of *Escherichia coli* in water samples, *J. Membr. Biol.* 245 (2012) 643–650.
- [23] S. Perni, P.R. Chalise, G. Shama, M.G. Kong, Bacterial cells exposed to nanosecond pulsed electric fields show lethal and sublethal effect, *Int. J. Food Microbiol.* 120 (2007) 311–314.
- [24] M.C. Vernhes, P.A. Cabanes, J. Teissié, Chinese hamster ovary cells sensitivity to localized electrical stresses, *Bioelectrochem. Bioenerg.* 48 (1) (1999) 17–25.
- [25] W. Frey, C. Gusbeth, T. Schwartz, Inactivation of *Pseudomonas putida* by pulsed electric field treatment: a study on the correlation of treatment parameters and inactivation efficiency in the short-pulse range, *J. Membr. Biol.* 246 (10) (2013) 769–781, <http://dx.doi.org/10.1007/s00232-013-9547-6>.
- [26] C. Gusbeth, W. Frey, H. Volkmann, T. Schwartz, H. Bluhm, Pulsed electric field treatment for bacteria reduction and its impact on hospital wastewater, *Chemosphere* 75 (2) (2009) 228–233, <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.11.066>.
- [27] A. Rieder, T. Schwartz, K. Schön-Hözl, S.M. Marten, J. Süß, C. Gusbeth, W. Kohnen, W. Swoboda, U. Obst, W. Frey, Molecular monitoring of inactivation efficiencies of



ARTICLE IN PRESS

A. Guionet et al. / *Bioelectrochemistry xxx (2014) xxx–xxx*

9

- bacteria during pulsed electric field treatment of clinical wastewater, *J. Appl. Microbiol.* 105 (6) (2008) 2035–2045.
- [28] K. Flisar, S.H. Meglic, J. Morelj, J. Golob, D. Miklavcic, Testing a prototype pulse generator for a continuous flow system and its use for *E. coli* inactivation and microalgae lipid extraction, *Bioelectrochemistry* (2014) (in press).
- [29] S.P. Stoylov, A.Y. Gyurova, V. Bunin, A. Angersbach, R.N. Georgieva, S.T. Danova, Electric dipole moments of *Escherichia coli* HB 101, *Bioelectrochemistry* 75 (2009) 50–54.
- [30] M. Kandušer, M. Šentjarc, D. Miklavčič, The temperature effect during pulse application on cell membrane fluidity and permeabilization, *Bioelectrochemistry* 74 (2008) 52–57.
- [31] A. Silve, I. Leray, L.M. Mir, Demonstration of cell membrane permeabilization to medium-sized molecules caused by a single 10 ns electric pulse, *Bioelectrochemistry* 87 (2012) 260–264.
- [32] F.M. André, M.A. Rassokhin, A.M. Bowman, A.G. Pakhomov, Gadolinium blocks membrane permeabilization induced by nanosecond electric pulses and reduces cell death, *Bioelectrochemistry* 79 (2010) 95–100.
- [33] B.L. Ibey, D.G. Mixon, J.A. Payne, A. Bowman, K. Sickendick, G.J. Wilmink, W. Patrick Roach, A.G. Pakhomov, Plasma membrane permeabilization by trains of ultrashort electric pulses, *Bioelectrochemistry* 79 (2010) 114–121.
- [34] M. Pavlin, D. Miklavčič, Theoretical and experimental analysis of conductivity, ion diffusion and molecular transport during cell electroporation – relation between short-lived and long-lived pores, *Bioelectrochemistry* 74 (2008) 38–46.
- [35] M.S. Venslauskas, S. Šatkauskas, R. Rodaitė-Riševičienė, Efficiency of the delivery of small charged molecules into cells in vitro, *Bioelectrochemistry* 79 (2010) 130–135.
- [36] B.L. Ibey, J.C. Ullery, O.N. Pakhomova, C.C. Roth, I. Semenov, H.T. Beier, M. Tarango, S. Xiao, K.H. Schoenbach, A.G. Pakhomov, Bipolar nanosecond electric pulses are less efficient at electroporation and killing cells than monopolar pulses, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 443 (2) (2014) 568–573.



Karim Helmi, born in 1974, MSc. in Applied Microbiology & Bioengineering, Pierre & Marie Curie University (Paris), a research engineer at the Dept. of Environment & Health (Veolia Environnement Recherche & Innovation) since 2008. He has previous experiences at Gabriel Lippmann Public Research Center (2005–2008, Luxembourg), Suez-Lyonnaises-Eaux (1998–2003, France). Main field of expertise – alternative approaches to collect and detect microorganisms from different environmental matrices, including sample concentration followed by optical detection methods as solid phase or flow cytometry.



Cyril Cheybe born in 1974, got a PhD in electromagnetism (IRCOM, Limoges University, 2001). He joined CERPEM in 2002 where he is working in the Electromagnetic Compatibility Laboratory. His main fields of interest are: Decontamination of water using physical process and characterization of the electromagnetic properties of the composite materials.



Denis Packan, born in 1973. He is an engineer from Ecole Centrale Paris (1996), and got his PhD in plasma physics from Stanford University (2002). Research scientist at Onera (Palaiseau, France) since 2004 on plasma applications: combustion enhancement, boundary layer control, shock wave mitigation, decontamination and electromagnetic shielding and space propulsion. Expertise: characterization of plasmas with optical diagnostics (emission and laser), numerical modeling of plasmas (nonequilibrium kinetics, collisional and excitation processes, chemical kinetics), and plasma source design (nanosecond pulse generator, transmission lines). Member of the scientific council of Labex "Plas@par".



Alexis Guionet, born in 1985, is currently a PhD student at the University of Toulouse and works jointly with the Research Center of "Veolia Environment Recherche et Innovation". He obtained a Master 1 (2009) and a Master 2 (2010) in Plant Biology and in Nanotechnology and Nanobioscience, respectively, at the University of Burgundy, France. He had trainee experiences for i) 2 months working on the quantification of arbuscular mycorrhization in the laboratory of INRA, Dijon, France and ii) 6 months working on the effect of pulsed electric field and of cold plasma on bacteria in a research center specializing in electromagnetism named CERPEM, Laval, France.



Fabienne David born in 1973, got a Master 2 "Instrumentation and Physico-chemical Analysis Methods" (Paris XI University). After her first experience that focused on the development of analytical technique to control horse-doping in LCH ("Laboratoire des courses hippiques"), she completed a Master "Water and Health" (Paris V University). She subsequently incorporated VERI ("Veolia Environnement Recherche et Innovation") in early 2004 as a researcher and currently acts as a project adjoint manager and researcher. She works in the field of water network's quality (drinking water network, private water network, cooling tower, water of process), especially in disinfection treatments in association with problematic of biofilm and pathogens.



Clément Zaeppfel, born in 1980, got a degree in Electrical and Optical Engineering (Polytech Orleans, 2003) and a PhD in Plasma Physics (GREMI, Orleans university, 2008). Hired by EPPRA SAS (2007–2011) as an electrical engineer working on high voltage pulsed power supply for UV sources, he later joined ONERA (the French aerospace lab) in 2011 where he is working in the Lightning and Plasma Applications Team. Main field of interests: Pulsed power for plasma discharges, decontamination of water and surface using electrical and plasma techniques, lightning effect, and optical diagnostics of plasma.



Mathilde Coustets got her MSc pro in Genic expression and Recombinant protein at the University Paul Sabatier of Toulouse in 2010, after a training at the Biomedical Research Park of Barcelona. After her involvement in the Electroextraction EU project, she is now non-permanent Engineer in Molecular Biology for a TTT funded project.



Jean-Pierre Garnier, born in 1961, graduated in Accelerators Physics from GRENOBLE Engineering High School in 1987. He spent about 20 years in various R&D positions for THOMSON Company working on cathode ray-tube technology development. He got several patents in that field. Since 2009, as CERPEM Director, he managed this organization dedicated to various applications of electromagnetism. He leads several research programs aimed at developing the usage of physical methods in biotechnology industry.



Vincent Blanckaert, born in 1961, is an associate professor in cell biology since September 1993 at the IUT of Laval, University of Maine, France. He is attached to the team EA-2160 (MMS): "Sea, Molecules, Health". From 1991 to 1993, he was a postdoctoral fellow at the Department of Genetics and Cell Biology, Washington State University, Pullman, WA, USA after his PhD was obtained in 1990 in the field of "Life and Health Sciences" at University of Lille 1. His research topics are focusing on molecules and cancer, protein purification, use of pulsed electric field or corona discharges in bacterial decontamination and in molecule-derived microalgae electroextraction.



Justin Teissié, born in 1947, got a Degree in Engineering from ESPCI (Paris, 1970), a PhD in Macromolecular Chemistry (Université Paris VI, 1973), and a DSc in Biophysics (Université Toulouse, 1979). Hired by the CNRS in 1973, he is a post doc fellow at the Johns Hopkins University (School of Medicine) (1979–81). He is also a DRCE CNRS Emeritus. His field of expertise – bioelectrochemical aspects of membrane biophysics. His research is a synergy between the development of new hypothesis and concepts and experimental validation through designs of new technologies. His contribution to electroporation and related phenomena is considered as a major one worldwide. He is an author of more than 200 papers and a recipient of several scientific prizes. More recently he was the recipient of the F Reidy Prize in 2012.

Cette publication montre que la façon de répartir l'énergie, peut modifier l'efficacité de décontamination. Selon la durée des impulsions, leur fréquence de répétition, et le choix de les appliquer avec un débit de dérivation plus ou moins rapide, le rendement énergétique pour atteindre $1 \log_{10}$ d'abattement est modifié.

Les observations permettent de suggérer la séquence des effets conduisant à la mort cellulaire en insistant sur la contribution du métabolisme cellulaire.



Partie VIII - **CONCLUSION GENERALE**



Le début du projet a consisté à déterminer le type de champ électrique pulsé le plus prometteur pour la désinfection de grands volumes d'eau. Une étude de la littérature a orienté le choix sur des impulsions de quelques dizaines de nanosecondes notamment, car les impulsions d'une telle durée pourraient agir sur d'autres éléments que la membrane plasmique (contrairement aux impulsions de plus longue durée). Le postulat émis étant que de ce fait, ces impulsions pourraient s'avérer moins énergivores.

La suite a consisté à augmenter la vitesse de décontamination et améliorer le rendement énergétique. Il est apparu qu'un grand nombre de paramètres influence le rendement et la vitesse d'abattement. Dès lors, l'idéal eut été de tester chaque paramètre indépendamment les uns des autres, de les faire varier d'une assez grande amplitude pour encadrer la valeur donnant le meilleur rendement, puis réaliser assez d'essais pour avoir une bonne résolution et ainsi s'approcher le plus possible de cette valeur. La réalisation d'un plan d'expérience avait d'ailleurs été envisagée.

Malheureusement, des limitations techniques et des contraintes de temps n'ont pas permis de réaliser un tel travail. Il a néanmoins été possible d'appréhender un bon nombre de paramètres, et d'optimiser grandement le rendement énergétique.

Malgré les problèmes techniques, de bonnes avancées ont été faites au cours du projet. Il a pu être montré que la technologie nsCEP ne pose pas de problème de mutagénèse. Les antibiogrammes n'ont montré aucune modification de la résistance aux antibiotiques. C'est un point essentiel de nos jours, où les bactéries multi-résistantes inquiètent le secteur médical. Grâce aux électrophorèses bidimensionnelles, on a également montré qu'il n'y a pas de grands changements dans le protéome, donc dans l'expression des gènes.

Les observations au microscope en fluorescence avec IP, puis les expériences de cytométrie en flux ont montré qu'il y a bien une perméabilisation de la membrane. Le moment auquel intervient cette perméabilisation reste à éclaircir. En effet, les observations en microscopie ont montré que les bactéries sont perméabilisées pendant les impulsions, mais plus après 1 h. Les expériences en cytométrie, montrent qu'elles le sont encore 2 h après le traitement.

Il a été montré, grâce au passage en flux, qu'il est possible de diminuer fortement la concentration bactérienne de grands volumes (plusieurs millilitres) à partir d'une cellule de décontamination n'offrant qu'un faible volume de traitement (162 μ L).

La vitesse de traitement a pu être augmentée grâce à l'augmentation de la fréquence (changement de générateur) et du nombre de cycles. Ainsi, pour l'expérience sur *E.coli* à 20 Hz sur 5mL avec un débit de 40 μ L/s, 1 \log_{10} est obtenu en 2 minutes.

Le rendement énergétique a aussi pu être fortement amélioré grâce à l'augmentation du débit, permettant une meilleure répartition des impulsions dans le volume traité. Il est apparu que pour un nombre d'impulsions donné, délivrer une unique impulsion pour chaque passage d'un volume dans l'applicateur offre le meilleur abattement.

La spécificité de souche est forte, et les légionelles apparaissent particulièrement résistantes comparées à *E. coli* BL21(DE3). Approfondir l'étude de l'influence de l'état physiologique des légionelles sur l'abattement aurait été intéressant. En effet, les conditions de culture des légionelles *in vitro* sont très différentes des conditions environnementales. Leurs états physiologiques sont donc nécessairement différents. Or il a été constaté que cet état influence la sensibilité au traitement.

L'utilisation à bon escient des différentes formules mathématiques semble permettre de donner de très bonnes indications quant à l'effet biologique (perméabilisation de la membrane) et la vitesse de traitement (modèle). Il s'agit d'un point stratégique dans le dimensionnement d'un procédé d'échelle industrielle.

L'étude de la composition de l'eau du pilote TAR, puis la confection d'eau *de novo* pour la réalisation des expériences en laboratoire et en pilote (RECS) ont permis d'obtenir des résultats rigoureux, indépendamment de la variabilité de l'eau du pilote tout en prenant en compte l'effet matrice.

Une part conséquente du travail, a été la sécurisation des expériences par rapport à l'utilisateur. L'outil utilisé par tous les collaborateurs de VERI est l'EVR (EVALUATION des Risques). Il permet de



faire ressortir les éléments dangereux lors de la réalisation de protocoles. En l'occurrence, le travail sur des souches pathogènes imposait une manipulation sous hotte (bec Bunsen proscrit) et les forts champs électriques imposaient d'enfermer les parties nues sous tension (électrodes de l'applicateur et connectiques branchées au câble coaxial HT), dans une boîte isolante. Lors de l'ouverture de la boîte, l'alimentation du générateur est coupée, de façon à ce que les parties nues ne soient jamais sous tension lorsque l'utilisateur y a accès.

Le phénomène de tailing aurait pu être inquiétant s'il n'avait pas pu être montré qu'il est dû à la nature de l'expérience (les conditions de fluidique), et non à une hypothétique acquisition de résistance par les bactéries. Un applicateur avait été spécialement conçu pour améliorer la fluidique. Il était attendu que cette applicateur diminue le phénomène de tailing. Malheureusement, le temps n'a pas été suffisant pour le tester à la fin du projet. A propos du comportement des bactéries, il a également été montré qu'il n'y a pas d'effet rémanent. Dès que le champ électrique est stoppé, le processus de décontamination s'arrête.

Comparées à certaines techniques de décontamination notamment chimiques, les performances des nsCEP peuvent sembler un peu faibles. En réalité, il n'y a aucune comparaison possible entre une technique qui consiste à disséminer des produits chimiques potentiellement nocifs dans l'eau, et une technique qui permet une destruction des bactéries sans aucune formation de sous-produits. D'autre part, obtenir 1 \log_{10} d'abattement sur 10 mL à une concentration de départ de 10^9 , représente quand même une destruction de 9×10^8 bactéries/mL. Ainsi, dans le flacon de 10 mL, 9×10^9 bactéries sont détruites (neuf milliards), soit plus que le nombre d'êtres humains sur Terre.

Techniquement dans nos conditions de définition des profils des impulsions (durée de l'ordre de 70 ns), la limite de la tension à 20 kV n'a pas permis d'évaluer l'efficacité d'intensité plus élevée. Cela est mis en cause pour interpréter le manque d'efficacité de l'élimination des légionelles. Compte tenu des données sur les travaux en impulsions microseconde, le développement de générateurs de plus haute tension de sortie apparaît indispensable pour valider cette hypothèse et le cas échéant de disposer d'un dispositif performant en termes industriels.





Partie IX - **REFERENCES**



- Agerholm-Larsen, B., Iversen, H.K., Ibsen, P., Moller, J.M., Mahmood, F., Jensen, K.S., Gehl, J., 2011. Preclinical validation of electrochemotherapy as an effective treatment for brain tumors. *Cancer Research* 71, 3753–3762. doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-0451
- Al-Qadiri, H.M., Al-Alami, N.I., Al-Holy, M.A., Rasco, B.A., 2008. Using Fourier transform infrared (FT-IR) absorbance spectroscopy and multivariate analysis to study the effect of chlorine-induced bacterial injury in water. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56, 8992–8997. doi:10.1021/jf801604p
- Albrich, J.M., McCarthy, C.A., Hurst, J.K., 1981. Biological reactivity of hypochlorous acid: implications for microbicidal mechanisms of leukocyte myeloperoxidase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78, 210–214.
- Allen, M.J., White, G.F., Morby, A.P., 2006. The response of *Escherichia coli* to exposure to the biocide polyhexamethylene biguanide. *Microbiology (Reading, Engl.)* 152, 989–1000. doi:10.1099/mic.0.28643-0
- Alleron, L., 2008. Etude de l'état viable non cultivable (vbnc) chez *legionella pneumophila* Lens après traitements monochloramine et thermique. Poitiers.
- Alvarez, U.M., Loske, A.M., Castaño-Tostado, E., Prieto, F.E., 2004. Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium and *Listeria monocytogenes* by underwater shock waves. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 5, 459–463. doi:10.1016/j.ifset.2004.07.002
- Amiali, M., Ngadi, M.O., Smith, J.P., Raghavan, V.G., 2006. Inactivation of *Escherichia coli* O157: H7 and *Salmonella enteritidis* in liquid egg white using pulsed electric field. *Journal of food science* 71, M88–M94.
- Anderson, J.G., Rowan, N.J., MacGregor, S.J., Fouracre, R.A., Parish, O., 2000. Inactivation of food-borne enteropathogenic bacteria and spoilage fungi using pulsed-light. *IEEE Transactions on Plasma Science* 28, 83–88. doi:10.1109/27.842870
- Antopol, S.C., Ellner, P.D., 1979. Susceptibility of *Legionella pneumophila* to Ultraviolet Radiation. *Appl Environ Microbiol* 38, 347–348.
- Arai, Y., Asai, Y., Ikeda, K., 1996. Method of treating waste water to remove harmful ion by coagulating sedimentation.
- Arnaud-Cormos, D., Leveque, P., Wu, Y., Sanders, J.M., Gundersen, M.A., Vernier, P.T., 2011. Microchamber setup characterization for nanosecond pulsed electric field exposure. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering* 1656–1662.
- Aronsson, K., Lindgren, M., Johansson, B.R., Rönner, U., 2001. Inactivation of microorganisms using pulsed electric fields: the influence of process parameters on *Escherichia coli*, *Listeria innocua*, *Leuconostoc mesenteroides* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 2, 41–54. doi:10.1016/S1466-8564(01)00021-2
- Backer, H., Hollowell, J., 2000. Use of iodine for water disinfection: iodine toxicity and maximum recommended dose. *Environ Health Perspect* 108, 679–684.
- Banerjee, M., Debkumari Sharma, B., 2005. Mars terraformation: Role of antarctic cyanobacterial cryptoendoliths. *National Academy Science Letters* 28, 155–160.
- Bansal, B., Chen, X.D., 2006. Effect of Temperature and Power Frequency on Milk Fouling in an Ohmic Heater. *Food and Bioproducts Processing, Fouling, Cleaning and Disinfection in Food Processing* 84, 286–291. doi:10.1205/fbp.06029
- Barbosa-Cánovas, G.V., 1999. Preservation of Foods With Pulsed Electric Fields, *Food Science and Technology International Series*. Academic Press.
- Barker, J., Brown, M.R., 1994. Trojan horses of the microbial world: protozoa and the survival of bacterial pathogens in the environment. *Microbiology (Reading, Engl.)* 140 (Pt 6), 1253–1259.
- Barsotti, L., Merle, P., Cheftel, J.C., 1999. Food processing by pulsed electric fields. I. Physical aspects. *Food Reviews International* 15, 163–180.



- Beebe, S.J., Fox, P.M., Rec, L.J., Somers, K., Stark, R.H., Schoenbach, K.H., 2002. Nanosecond pulsed electric field (nsPEF) effects on cells and tissues: apoptosis induction and tumor growth inhibition. *IEEE Transactions on Plasma Science* 30, 286–292. doi:10.1109/TPS.2002.1003872
- Berthollet, C.-L., 1791. *Éléments de l'art de la teinture*. Didot.
- Berthollet, C.-L., 1804. *Éléments de l'art de la teinture, avec une description du blanchiment par l'acide muriatique oxygéné*.
- Bessix, A., 2000. Le chlore: fiable, efficace, mais potentiellement dangereux. *Environnement & technique* 48–49.
- Black, A.P., Kinman, R.N., Keirn, M.A., Smith, J.J., Harlan, W.E., 1970. The disinfection of swimming pool waters. I. Comparison of iodine and chlorine as swimming pool disinfectants. *Am J Public Health Nations Health* 60, 535–545.
- Blangero, C., Rols, M.P., Teissié, J., 1989. Cytoskeletal reorganization during electric-field-induced fusion of Chinese hamster ovary cells grown in monolayers. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 981, 295–302. doi:10.1016/0005-2736(89)90040-0
- Bodenec, J., Dey, R., Pernin, P., 2007. Method for biologically combating the proliferation of legionella pneumophila, and disinfecting agent containing amoebic protozoa of the willaertia genus. WO 2008043969 A3.
- Borges, A., Simões, M., Martínez-Murcia, A., Saavedra, M.J., 2012. Detection of *Legionella* spp. in Natural and Man-made Water Systems Using Standard Guidelines. *Journal of Microbiology Research* 2, 95–102. doi:10.5923/j.microbiology.20120204.06
- Bull, R.J., 1985. Carcinogenic and mutagenic properties of chemicals in drinking water. *Science of The Total Environment* 47, 385–413. doi:10.1016/0048-9697(85)90344-4
- Cabiscol, E., Piulats, E., Echave, P., Herrero, E., Ros, J., 2000. Oxidative stress promotes specific protein damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 275, 27393–27398. doi:10.1074/jbc.M003140200
- Callen, J.-C., Perasso, R., 2005. *Biologie cellulaire - 2ème édition - Des molécules aux organismes - Livre+compléments en ligne: Des molécules aux organismes*. Dunod.
- Calvin, N.M., Hanawalt, P.C., 1988. High-efficiency transformation of bacterial cells by electroporation. *J Bacteriol* 170, 2796–2801.
- Camper, A.K., McFeters, G.A., 1979. Chlorine injury and the enumeration of waterborne coliform bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 37, 633–641.
- Cantor, K.P., Lynch, C.F., Hildesheim, M.E., Dosemeci, M., Lubin, J., Alavanja, M., Craun, G., 1998. Drinking water source and chlorination byproducts I. Risk of bladder cancer. *Epidemiology* 9, 21–28.
- Carlton, R.M., Loessner, M., 2004. Phages virulents destinés à la lutte contre la listeria monocytogenes dans des produits alimentaires et des usines de transformation des aliments. WO 2004004495 A1.
- Carpet Cleaning, Air Duct Cleaning, & Restoration | Residential & Commercial | Steamatic [WWW Document], 2013. URL <http://www.steamatic.com/> (accessed 12.19.13).
- Cascales, E., Buchanan, S.K., Duche, D., Kleantous, C., Lloubes, R., Postle, K., Riley, M., Slatin, S., Cavard, D., 2007. Colicin Biology. *Microbiol Mol Biol Rev* 71, 158–229. doi:10.1128/MMBR.00036-06
- Chalise, P.R., Perni, S., Shama, G., Novac, B.M., Smith, I.R., Kong, M.G., 2006. Lethality mechanisms in *Escherichia coli* induced by intense sub-microsecond electrical pulses. *Appl. Phys. Lett.* 89, 153902. doi:10.1063/1.2361271
- Chang, D.C., Chassy, B.M., Saunders, J.A., Sowers, A.E., 1992. *Guide to Electroporation and Electrofusion*. Academic Press.
- Chang, S.L., Morris, J.C., 1953. Elemental Iodine as a Disinfectant for Drinking Water. *Ind. Eng. Chem.* 45, 1009–1012. doi:10.1021/ie50521a042



- Chassy, B.M., Flickinger, J.L., 1987. Transformation of *Lactobacillus casei* by electroporation. *FEMS Microbiology Letters* 44, 173–177. doi:10.1111/j.1574-6968.1987.tb02263.x
- Clark, R.M., 1987. Evaluating the cost and performance of field-scale granular activated carbon systems. *Environ. Sci. Technol.* 21, 573–580. doi:10.1021/es00160a008
- Cole, K.S., 1937. Electric impedance of marine egg membranes. *Transactions of the Faraday Society* 33, 966–972.
- Cooper, M.S., 1995. Membrane potential perturbations induced in tissue cells by pulsed electric fields. *Bioelectromagnetics* 16, 255–262.
- Cours de cytométrie [WWW Document], 2013. URL <http://cytobase.montp.inserm.fr/Cours/Cours.html> (accessed 12.19.13).
- Coustets, M., Al-Karablieh, N., Thomsen, C., Teissié, J., 2013. Flow process for electroextraction of total proteins from microalgae. *J. Membr. Biol.* 246, 751–760. doi:10.1007/s00232-013-9542-y
- Croshaw, B., Groves, M.J., Lessel, B., 1964. Some properties of bronopol, a new antimicrobial agent active against *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 16, 127T–130T. doi:10.1111/j.2042-7158.1964.tb07549.x
- Cullum, J., Vicente, M., 1978. Cell growth and length distribution in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 134, 330–337.
- Curtin, J.J., Donlan, R.M., 2006. Inhibition de la formation de biofilm par un bacteriophage. WO2006063176 A3.
- De Laat, J., Gallard, H., 1999. Catalytic Decomposition of Hydrogen Peroxide by Fe(III) in Homogeneous Aqueous Solution: Mechanism and Kinetic Modeling. *Environ. Sci. Technol.* 33, 2726–2732. doi:10.1021/es981171v
- De Mendoza, D., Cronan Jr., J.E., 1983. Thermal regulation of membrane lipid fluidity in bacteria. *Trends in Biochemical Sciences* 8, 49–52. doi:10.1016/0968-0004(83)90388-2
- Declerck, P., 2010. Biofilms: the environmental playground of *Legionella pneumophila*. *Environ. Microbiol.* 12, 557–566. doi:10.1111/j.1462-2920.2009.02025.x
- Décret n° 2004-1331 du 1er décembre 2004 modifiant la nomenclature des installations classées, 2004.
- Décret n° 2013-1205 du 14 décembre 2013 modifiant la nomenclature des installations classées, 2013. , 2013-1205.
- Dernat, M., Choupeaux, J., Pouillot, M., Masschelein, W.J., 1997. Chlorine dioxide - An effective oxidant for disinfection of urban wastewater. *Eau, l'INDUSTRIE, les Nuisances* 63–70.
- Dey, R., Bodennec, J., Mameri, M.O., Pernin, P., 2009. Free-living freshwater amoebae differ in their susceptibility to the pathogenic bacterium *Legionella pneumophila*. *FEMS Microbiol. Lett.* 290, 10–17. doi:10.1111/j.1574-6968.2008.01387.x
- Diels, L., Dong, Q., Lelie, D. van der, Baeyens, W., Mergeay, M., 1995. The *czc* operon of *Alcaligenes eutrophus* CH34: from resistance mechanism to the removal of heavy metals. *Journal of Industrial Microbiology* 14, 142–153. doi:10.1007/BF01569896
- Donachie, W.D., 1968. Relationship between Cell Size and Time of Initiation of DNA Replication. *Nature* 219, 1077–1079. doi:10.1038/2191077a0
- Donlan, R.M., 2009. Preventing biofilms of clinically relevant organisms using bacteriophage. *Trends in Microbiology* 17, 66–72. doi:10.1016/j.tim.2008.11.002
- Donlan, R.M., Curtin, J.J., 2006. Inhibition de la formation de biofilm par un bacteriophage. WO2006063176 A2.
- Dower, W.J., Miller, J.F., Ragsdale, C.W., 1988. High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res* 16, 6127–6145.
- Drogui, P., Elmaleh, S., Rumeau, M., Bernard, C., Rambaud, A., 2001. Hydrogen peroxide production by water electrolysis: Application to disinfection. *Journal of Applied Electrochemistry* 31, 877–882. doi:10.1023/A:1017588221369
- Dublanchet, A., 2009. Des virus pour combattre les infections, Favre. ed.



- Dyas, A., Das, B.C., 1985. The activity of glutaraldehyde against *Clostridium difficile*. *Journal of Hospital Infection* 6, 41–45. doi:10.1016/S0195-6701(85)80016-5
- Espariz, M., Checa, S.K., Audero, M.E.P., Pontel, L.B., Soncini, F.C., 2007. Dissecting the *Salmonella* response to copper. *Microbiology (Reading, Engl.)* 153, 2989–2997. doi:10.1099/mic.0.2007/006536-0
- EUR-Lex - 31998L0008 - FR [WWW Document], 1998. . Journal officiel n° L 123 du 24/04/1998 p. 0001 - 0063; URL <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CELEX:31998L0008:FR:HTML> (accessed 8.29.13).
- EUR-Lex - 32006R1907 [WWW Document], 2006. URL <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CELEX:32006R1907:fr:NOT> (accessed 10.23.13).
- Feldman, D., Khodakovskaya, R., Shapiro, E., 2012. Stable aqueous suspensions of dbnpa, their preparation and uses thereof as biocides. WO2012066535 A1.
- Feldman, D., Lupin, M., 2010. A compacted 2,2-dibromo-3-nitrilopropionamide. CA2421769 C.
- Final Report on the Safety Assessment of Glutaral, 1996. . *International Journal of Toxicology* 15, 98–139. doi:10.3109/10915819609043792
- Fliermans, C.B., Cherry, W.B., Orrison, L.H., Smith, S.J., Tison, D.L., Pope, D.H., 1981. Ecological distribution of *Legionella pneumophila*. *Appl Environ Microbiol* 41, 9–16.
- Fojt, L., Strašák, L., Vetterl, V., Šmarda, J., 2004. Comparison of the low-frequency magnetic field effects on bacteria *Escherichia coli*, *Leclercia adecarboxylata* and *Staphylococcus aureus*. *Bioelectrochemistry, Proceedings of the XVIIth International Symposium on Bioelectrochemistry and Bioenergetics* 63, 337–341. doi:10.1016/j.bioelechem.2003.11.010
- Fraser, D.W., Tsai, T.R., Orenstein, W., Parkin, W.E., Beecham, H.J., Sharrar, R.G., Harris, J., Mallison, G.F., Martin, S.M., McDade, J.E., Shepard, C.C., Brachman, P.S., 1977. Legionnaires' Disease. *New England Journal of Medicine* 297, 1189–1197. doi:10.1056/NEJM197712012972201
- Frey, W., Gusbeth, C., Schwartz, T., 2013. Inactivation of *Pseudomonas putida* by Pulsed Electric Field Treatment: A Study on the Correlation of Treatment Parameters and Inactivation Efficiency in the Short-Pulse Range. *J. Membr. Biol.* doi:10.1007/s00232-013-9547-6
- Frey, W., White, J.A., Price, R.O., Blackmore, P.F., Joshi, R.P., Nuccitelli, R., Beebe, S.J., Schoenbach, K.H., Kolb, J.F., 2006. Plasma Membrane Voltage Changes during Nanosecond Pulsed Electric Field Exposure. *Biophys J* 90, 3608–3615. doi:10.1529/biophysj.105.072777
- Friedmann, E.I., Ocampo-Friedmann, R., 1995. A primitive cyanobacterium as pioneer microorganism for terraforming Mars. *Adv Space Res* 15, 243–246.
- Furuta, M., Yamaguchi, M., Tsukamoto, T., Yim, B., Stavarache, C.E., Hasiba, K., Maeda, Y., 2004. Inactivation of *Escherichia coli* by ultrasonic irradiation. *Ultrasonics Sonochemistry* 11, 57–60. doi:10.1016/S1350-4177(03)00136-6
- Gaines, W.A., Kim, B.R., Drews, A.R., Bailey, C., Loch, T., 2007. Controlling Cooling Water Quality by Hydrodynamic Cavitation. *Proceedings of the Water Environment Federation 2007*, 538–545. doi:10.2175/193864707787781656
- Ganz, T., Selsted, M.E., Szklarek, D., Harwig, S.S., Daher, K., Bainton, D.F., Lehrer, R.I., 1985. Defensins. Natural peptide antibiotics of human neutrophils. *J Clin Invest* 76, 1427–1435.
- GEA, 2013. GEA Process Engineering France, leader dans l'ingénierie de procédés ! [WWW Document]. URL <http://www.gea-pe.fr/> (accessed 12.19.13).
- Geiger, P.L., Hänle, G.F., von), J.L. (Freiherr, 1828. *Magazin für Pharmacie und die dahin einschlagenden Wissenschaften, ...* C.F. Winter.
- George Garrity, Don J. Brenner, Noel R. Krieg, James R. Staley, 1984. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*.



- GESTIS Substance database [WWW Document], 2013. URL [http://gestis-en.itrust.de/nxt/gateway.dll/gestis_en/034210.xml?f=templates\\$fn=default.htm\\$3.0](http://gestis-en.itrust.de/nxt/gateway.dll/gestis_en/034210.xml?f=templates$fn=default.htm$3.0) (accessed 4.13.14).
- Gholami, M., Dehghanifard, E., Zarghampour, Z., Mirzaei, R., Dehghani Nayeri, M., 2012. Performance of ultrasonic process on removal of fecal indicator bacteria of escherichia coli and enterococcus faecalis from drinking water. *Journal of Babol University of Medical Sciences* 14, 36–41.
- Girardin, N., 2009. Evaluation de l'efficacité d'un peptide pour la maîtrise des légionelles dans l'eau. Poitiers.
- Glaze, W.H., Kang, J.-W., Chapin, D.H., 1987. The Chemistry of Water Treatment Processes Involving Ozone, Hydrogen Peroxide and Ultraviolet Radiation. *Ozone: Science & Engineering* 9, 335–352. doi:10.1080/01919518708552148
- Golzio, M., Teissié, J., Rols, M.-P., 2002. Direct visualization at the single-cell level of electrically mediated gene delivery. *PNAS* 99, 1292–1297. doi:10.1073/pnas.022646499
- Gonzalez-Gomez, D., Cardoso, V., Bohoyo, D., Ayuso, M.C., Delgado-Adamez, J., 2013. Application of experimental design and response surface methodology to optimize the procedure to obtain a bactericide and highly antioxidant aqueous extract from orange peels. *Food Control*.
- Gorman, S.P., Scott, E.M., Russell, A.D., 1980. Antimicrobial Activity, Uses and Mechanism of Action of Glutaraldehyde. *Journal of Applied Bacteriology* 48, 161–190. doi:10.1111/j.1365-2672.1980.tb01217.x
- Gratia A., 1925. Sur un remarquable exemple d'antagonisme entre deux souches de colibacille. *Compt. Rend. Soc. Biol.*
- Greub, G., Raoult, D., 2004. Microorganisms resistant to free-living amoebae. *Clin. Microbiol. Rev.* 17, 413–433.
- Grosse, C., Schwan, H.P., 1992. Cellular membrane potentials induced by alternating fields. *Biophysical Journal* 63, 1632–1642.
- Gupta, S.B., Bluhm, H., 2008. The Potential of Pulsed Underwater Streamer Discharges as a Disinfection Technique. *IEEE Transactions on Plasma Science* 36, 1621–1632. doi:10.1109/TPS.2008.2001231
- Guyton de Morveau, L.-B., 1805. *Traité des moyens de désinfecter l'air, de prévenir la contagion et d'en arrêter les progrès*, par L.-B. Guyton-Morveau,... Bernard (Paris).
- Haas, F.L., 1966. Study of the UV-induction of mutations in bacteria. *The Journal of the Arkansas Medical Society* 62, 357–361.
- Hamanaka, D., Uchino, T., Furuse, N., Han, W., Tanaka, S., 2006. Effect of the wavelength of infrared heaters on the inactivation of bacterial spores at various water activities. *International Journal of Food Microbiology* 108, 281–285. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2005.11.019
- Hamilton, W.A., Sale, A.J.H., 1967. Effects of high electric fields on microorganisms: II. Mechanism of action of the lethal effect. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 148, 789–800. doi:10.1016/0304-4165(67)90053-0
- Harvey, E.N., Loomis, A.L., 1929. THE DESTRUCTION OF LUMINOUS BACTERIA BY HIGH FREQUENCY SOUND WAVES. *J. Bacteriol.* 17, 373–376.
- Harvey, W.A., Mullins, T.F., MacDonald, D.J., 1999. Method of disinfecting water with iodine species. US5919374 A.
- Hassan, M., Kjos, M., Nes, I.F., Diep, D.B., Lotfipour, F., 2012. Natural antimicrobial peptides from bacteria: characteristics and potential applications to fight against antibiotic resistance. *J. Appl. Microbiol.* 113, 723–736. doi:10.1111/j.1365-2672.2012.05338.x
- Hassen, A., Heyouni, A., Shayeb, H., Cherif, M., Boudabous, A., 2000. Inactivation of indicator bacteria in wastewater by chlorine—a kinetics study. *Bioresource Technology* 72, 85–93. doi:10.1016/S0960-8524(99)00086-3



- Hayakawa, I., Kanno, T., Tomita, M., Fujio, Y., 1994. Application of High Pressure for Spore Inactivation and Protein Denaturation. *Journal of Food Science* 59, 159–163. doi:10.1111/j.1365-2621.1994.tb06923.x
- Hiramoto, T., 1984. Method of sterilization. 4464336.
- Hochanadel, C.J., 1952. Effects of Cobalt γ -Radiation on Water and Aqueous Solutions. *J. Phys. Chem.* 56, 587–594. doi:10.1021/j150497a008
- Hofmann, G.A., 1985. Deactivation of microorganisms by an oscillating magnetic field. 4524079.
- Hohenberger, P., Eing, C., Straessner, R., Durst, S., Frey, W., Nick, P., 2011. Plant actin controls membrane permeability. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1808, 2304–2312. doi:10.1016/j.bbamem.2011.05.019
- Holub, W.R., Lamensdorf, M., 1995. Water purification composition, kit and method employing the same.
- Hozalski, R.M., Bouwer, E.J., 1998. Deposition and retention of bacteria in backwashed filters. *Journal - American Water Works Association* 90, 71–85.
- Hu, N., Zhang, X., Yang, J., Joo, S.W., Qian, S., 2013. A cell electrofusion microfluidic chip with micro-cavity microelectrode array. *Microfluidics and Nanofluidics* 15, 151–160. doi:10.1007/s10404-013-1136-6
- Hua, I., Hoffmann, M.R., 1997. Optimization of ultrasonic irradiation as an advanced oxidation technology. *Environmental Science and Technology* 31, 2237–2243. doi:10.1021/es960717f
- Huang, J.Y.C., Warriner, R., Ni, N.S.N., 1985. Pilot tests of chlorination facility for disinfecting secondary effluent. *Journal of the Water Pollution Control Federation* 57, 777–784 + 296a.
- Hughes, D.E., Nyborg, W.L., 1962. Cell Disruption by Ultrasound Streaming and other activity around sonically induced bubbles is a cause of damage to living cells. *Science* 138, 108–114. doi:10.1126/science.138.3537.108
- Ibey, B.L., Ullery, J.C., Pakhomova, O.N., Roth, C.C., Semenov, I., Beier, H.T., Tarango, M., Xiao, S., Schoenbach, K.H., Pakhomov, A.G., 2014. Bipolar nanosecond electric pulses are less efficient at electroporation and killing cells than monopolar pulses. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 443, 568–573. doi:10.1016/j.bbrc.2013.12.004
- Ibrahim, S.F., van den Engh, G., 2007. Flow cytometry and cell sorting. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 106, 19–39. doi:10.1007/10_2007_073
- InfoNormandie, 2014. Émanations de chlore dans une station d'épuration de la Créa à Petit-Quevilly [WWW Document]. <http://www.infonormandie.com>. URL http://www.infonormandie.com/Emanations-de-chlore-dans-une-station-d-epuration-de-la-Crea-a-Petit-Quevilly_a3437.html (accessed 2.19.14).
- InVS, 2012. Bilan des cas de légionellose survenus en France en 2011 [WWW Document]. URL <http://www.invs.sante.fr/Dossiers-thematiques/Maladies-infectieuses/Infections-respiratoires/Legionellose/Donnees/Bilan-des-cas-de-legionellose-survenus-en-France-en-2011> (accessed 3.14.14).
- IONISOS-prestataire de services pour la stérilisation par rayonnements ionisants [WWW Document], 2013. URL <http://www.ionisos.fr/> (accessed 12.19.13).
- Jakob, U., Muse, W., Eser, M., Bardwell, J.C., 1999. Chaperone Activity with a Redox Switch. *Cell* 96, 341–352. doi:10.1016/S0092-8674(00)80547-4
- Javier Raso, I.A., 2000. Predicting inactivation of *Salmonella* senftenberg by pulsed electric fields. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 21–29. doi:10.1016/S1466-8564(99)00005-3
- Jay, J.M., 2000. Radiation Preservation of Foods and Nature of Microbial Radiation Resistance, in: Jay, J.M. (Ed.), *Modern Food Microbiology*, Aspen Food Science Text Series. Springer US, pp. 301–321.
- Jia, Z., Shen, D., Xu, W., 2001. Synthesis and antibacterial activities of quaternary ammonium salt of chitosan. *Carbohydrate Research* 333, 1–6. doi:10.1016/S0008-6215(01)00112-4



- Johan Morren, B.R., 2003. Electrochemical reactions and electrode corrosion in pulsed electric field (PEF) treatment chambers. *Innovative Food Science & Emerging Technologies - INNOV FOOD SCI EMERG TECHNOL* 4, 285–295. doi:10.1016/S1466-8564(03)00041-9
- Joyce, T.M., McGuigan, K.G., Elmore-Meegan, M., Conroy, R.M., 1996. Inactivation of fecal bacteria in drinking water by solar heating. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 399–402.
- Junli, H., Li, W., Nanqi, R., Fang, M., Juli, 1997. Disinfection effect of chlorine dioxide on bacteria in water. *Water Research* 31, 607–613. doi:10.1016/S0043-1354(96)00275-8
- Katsuki, S., Moreira, K., Dobbs, F., Joshi, R.P., Schoenbach, K.H., 2002. Bacterial decontamination with nanosecond pulsed electric fields, in: *IEEE Conference Record of Power Modulator Symposium*. pp. 648–651.
- Khalemsky, A., Payusov, S., Kelner, L., Jo, J., 2004. Method and Device for Electroextraction of Heavy Metals from Technological Solutions and Wastewater. WO/2004/029333.
- King, W.D., Marrett, L.D., 1996. Case-control study of bladder cancer and chlorination by-products in treated water (Ontario, Canada). *Cancer Causes and Control* 7, 596–604. doi:10.1007/BF00051702
- Kirawanich, P., Satusap, P., Chavasit, V., Islam, N.E., 2011. Microorganism Inactivation by Nanosecond Pulsed Electric Fields: Full-wave Analysis and Experiment. Presented at the International Conference on Food Engineering and Biotechnology.
- Kishida, N., Simazaki, D., Kosaka, K., Kosuge, R., Akiba, M., Hayashi, K., 2013. Current situation and problems associated with inactivation of microorganisms in water using copper. *Nihon Koshu Eisei Zasshi* 60, 579–585.
- Knorr, D., Geulen, M., Grahl, T., Sitzmann, W., 1994. Food application of high electric field pulses. *Trends in Food Science & Technology* 5, 71–75. doi:10.1016/0924-2244(94)90240-2
- Knudson, G.B., 1985. Photoreactivation of UV-irradiated *Legionella pneumophila* and other *Legionella* species. *Appl. Environ. Microbiol.* 49, 975–980.
- Kolb, J.F., Stacey, M., 2012. Subcellular Biological Effects of Nanosecond Pulsed Electric Fields, in: Machala, Z., Hensel, K., Akishev, Y. (Eds.), *Plasma for Bio-Decontamination, Medicine and Food Security*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 361–379.
- Kotnik, T., Miklavcic, D., Mir, L.M., 2001. Cell membrane electropermeabilization by symmetrical bipolar rectangular pulses. Part II. Reduced electrolytic contamination. *Bioelectrochemistry* 54, 91–95.
- Krishnamurthy, K., Tewari, J.C., Irudayaraj, J., Demirci, A., 2010. Microscopic and Spectroscopic Evaluation of Inactivation of *Staphylococcus aureus* by Pulsed UV Light and Infrared Heating. *Food Bioprocess Technol* 3, 93–104. doi:10.1007/s11947-008-0084-8
- Kwaik, Y.A., Gao, L.-Y., Stone, B.J., Venkataraman, C., Harb, O.S., 1998. Invasion of Protozoa by *Legionella pneumophila* and Its Role in Bacterial Ecology and Pathogenesis. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 3127–3133.
- Labas, M.D., Zalazar, C.S., Brandi, R.J., Cassano, A.E., 2008. Reaction kinetics of bacteria disinfection employing hydrogen peroxide. *Biochemical Engineering Journal* 38, 78–87. doi:10.1016/j.bej.2007.06.008
- Labrie, S.J., Samson, J.E., Moineau, S., 2010. Bacteriophage resistance mechanisms. *Nat Rev Micro* 8, 317–327. doi:10.1038/nrmicro2315
- Lauque, P., 2009. De la couche sensible au système : dépôt par plasma froid et capteurs de gaz: Rapport de synthèse présenté pour obtenir une habilitation à diriger des recherches.
- Laura Salvia-Trujillo, Mariana Morales-de la pena, M. Alejandra Rojas-Graü, Olga Martín-belloso, 2011. Microbial and enzymatic stability of fruit juice-milk beverages treated by high intensity pulsed electric fields or heat during refrigerated storage. *Food Control*.
- Lazarova, V., Janex, M.L., Fiksdal, L., Oberg, C., Barcina, I., Pommepuy, M., 1998. Advanced wastewater disinfection technologies: Short and long term efficiency. *Water Science and Technology* 38, 109–117. doi:10.1016/S0273-1223(98)00810-5



- LeChevallier, M.W., Evans, T.M., Seidler, R.J., 1981. Effect of turbidity on chlorination efficiency and bacterial persistence in drinking water. *Appl Environ Microbiol* 42, 159–167.
- Lei, H., Mariñas, B.J., Minear, R.A., 2004. Bromamine Decomposition Kinetics in Aqueous Solutions. *Environmental Science and Technology* 38, 2111–2119. doi:10.1021/es034726h
- Li, M., QU, J., PENG, Y., 2004. Sterilization of *Escherichia coli* cells by the application of pulsed magnetic field. *Journal of Environmental Sciences* 16, 348–352.
- Lin, S.-Y., Clark, S., Powers, J.R., Luedecke, L.O., Swanson, B.G., 2002. Thermal, ultra high pressure, and pulsed electric field attenuation of *Lactobacillus*: Part 2. *Agro Food Industry Hi-Tech* 13, 6–11.
- Loge, F.J., Emerick, R.W., Heath, M., Jacangelo, J., Tchobanoglous, G., Darby, J.L., n.d. Ultraviolet disinfection of secondary wastewater effluents: prediction of performance and design. *Water environment research* 68, 900–916.
- Loginova, K., Loginov, M., Vorobiev, E., Lebovka, N.I., 2011. Quality and filtration characteristics of sugar beet juice obtained by “cold” extraction assisted by pulsed electric field. *Journal of Food Engineering* 106, 144–151. doi:10.1016/j.jfoodeng.2011.04.017
- López, N., Puértolas, E., Condón, S., Álvarez, I., Raso, J., 2008. Application of pulsed electric fields for improving the maceration process during vinification of red wine: influence of grape variety. *Eur Food Res Technol* 227, 1099–1107. doi:10.1007/s00217-008-0825-y
- Loske, A.M., Alvarez, U.M., Hernández-Galicia, C., Castaño-Tostado, E., Prieto, F.E., 2002. Bactericidal effect of underwater shock waves on *Escherichia coli* ATCC 10536 suspensions. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 3, 321–327. doi:10.1016/S1466-8564(02)00031-0
- Lubicki, P., Jayaram, S., 1997. High voltage pulse application for the destruction of the Gram-negative bacterium *Yersinia enterocolitica*. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* 43, 135–141. doi:10.1016/S0302-4598(96)05153-7
- Lyon Smith, H., 1915. THE VALUE OF TINCTURE OF IODINE AS A BACTERICIDE. *The Lancet* 185, 345–346. doi:10.1016/S0140-6736(00)52944-4
- MacGregor, S.J., Farish, O., Fouracre, R., Rowan, N.J., Anderson, J.G., 2000. Inactivation of pathogenic and spoilage microorganisms in a test liquid using pulsed electric fields. *IEEE Transactions on Plasma Science* 28, 144–149. doi:10.1109/27.842887
- Mahfoudh, A., 2010. Étude des mécanismes d’inactivation des microorganismes suite à un traitement à l’ozone.
- Mahfoudh, A., Moisan, M., Séguin, J., Barbeau, J., Kabouzi, Y., Kéroack, D., 2010. Inactivation of Vegetative and Sporulated Bacteria by Dry Gaseous Ozone. *Ozone: Science & Engineering* 32, 180–198. doi:10.1080/01919511003791971
- Marsellés-Fontanet, À.R., Puig, A., Olmos, P., Mínguez-Sanz, S., Martín-Belloso, O., 2009. Optimising the inactivation of grape juice spoilage organisms by pulse electric fields. *International Journal of Food Microbiology* 130, 159–165. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2008.12.034
- Mason, T.J., Joyce, E., Phull, S.S., Lorimer, J.P., 2003. Potential uses of ultrasound in the biological decontamination of water. *Ultrasonics Sonochemistry* 10, 319–323. doi:10.1016/S1350-4177(03)00102-0
- McDonnell, G., Russell, A.D., 1999. Antiseptics and Disinfectants: Activity, Action, and Resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* 12, 147–179.
- Meier, J.R., 1988. Genotoxic activity of organic chemicals in drinking water. *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology* 196, 211–245. doi:10.1016/0165-1110(88)90008-5
- Mesa, la différence par l’excellence [WWW Document], 2013. URL <http://www.mesa.fr/> (accessed 12.19.13).
- Meyer, A., Deiana, J., Bernard, A., 2004. Cours de microbiologie générale: avec problèmes et exercices corrigés. Wolters Kluwer France.



- Miller, J.F., Dower, W.J., Tompkins, L.S., 1988. High-voltage electroporation of bacteria: genetic transformation of *Campylobacter jejuni* with plasmid DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85, 856–860.
- Ministère des Affaires sociales et de la Santé, 2004. Plan d'action de prévention des légionelloses 2004 - 2008 [WWW Document]. URL <http://www.sante.gouv.fr/IMG/pdf/dp070604.pdf> (accessed 3.14.14).
- Mir, L.M., Orłowski, S., 1999. Mechanisms of electrochemotherapy. *Advanced Drug Delivery Reviews* 35, 107–118. doi:10.1016/S0169-409X(98)00066-0
- Mir, L.M., Orłowski, S., Belehradek Jr, J., Paoletti, C., 1991. Electrochemotherapy potentiation of antitumour effect of bleomycin by local electric pulses. *European Journal of Cancer and Clinical Oncology* 27, 68–72. doi:10.1016/0277-5379(91)90064-K
- Morotomi-Yano, K., Uemura, Y., Katsuki, S., Akiyama, H., Yano, K., 2011. Activation of the JNK pathway by nanosecond pulsed electric fields. *Biochemical and Biophysical Research Communications*.
- Morveau, L.-B.G. de, Gay-Lussac, J.L., Arago, F., Chevreul, M.E., Berthelot, M., Mascart, É.É.N., Haller, A., 1826. *Annales de chimie et de physique*. Masson.
- Mosqueda-Melgar, J., Elez-Martínez, P., Raybaudi-Massilia, R.M., Martín-Belloso, O., 2008. Effects of pulsed electric fields on pathogenic microorganisms of major concern in fluid foods: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 48, 747–759.
- Murga, R., Forster, T.S., Brown, E., Pruckler, J.M., Fields, B.S., Donlan, R.M., 2001. Role of biofilms in the survival of *Legionella pneumophila* in a model potable-water system. *Microbiology* 147, 3121–3126.
- Najdovski, L., Dragaš, A.Z., Kotnik, V., 1991. The killing activity of microwaves on some non-sporogenic and sporogenic medically important bacterial strains. *Journal of Hospital Infection* 19, 239–247. doi:10.1016/0195-6701(91)90241-Y
- Neumann, E., Schaefer-Ridder, M., Wang, Y., Hofschneider, P.H., 1982. Gene transfer into mouse lyoma cells by electroporation in high electric fields. *EMBO J* 1, 841–845.
- Neumann, E., Sowers, A.E., Jordan, C.A., 1989. Electroporation and Electrofusion in Cell Biology, in: *Electroporation and Electrofusion in Cell Biology*. New York : Plenum.
- Nicoletti, G., Boghossian, V., Gurevitch, F., Borland, R., Morgenroth, P., 1993. The antimicrobial activity in vitro of chlorhexidine, a mixture of isothiazolinones (“Kathon” CG) and cetyl trimethyl ammonium bromide (CTAB). *Journal of Hospital Infection* 23, 87–111.
- Otsuka, H., Okimura, S., Nagamura, M., Matsukuma, D., Kutsuzawa, K., Matsuda, N., Okabe, H., 2013. Low voltage pulse application to biological cells. *IEICE Transactions on Electronics E96-C*, 348–352. doi:10.1587/transele.E96.C.348
- Parrella, A., 1976. Disinfection of sewage by chlorine dioxide. *Igiene Moderna* 69, 19–36.
- Pataro, G., Ferrentino, G., Ricciardi, C., Ferrari, G., 2010. Pulsed electric fields assisted microbial inactivation of *S. cerevisiae* cells by high pressure carbon dioxide. *The Journal of Supercritical Fluids* 54, 120–128. doi:10.1016/j.supflu.2010.04.003
- Payen, G., 2012. , in: *Le Droit À L'eau Potable et À L'assainissement En Europe*. Sous La Direction d'Henri Smets.
- Pelczar, 1998. *Microbiology*. McGraw-Hill Education.
- Pereira, W.E., Hoyano, Y., Summons, R.E., Bacon, V.A., Duffield, A.M., 1973. Chlorination studies. II. The reaction of aqueous hypochlorous acid with α amino acids and dipeptides. *Biochimica et Biophysica Acta* 313, 170–180.
- Perni, S., Chalise, P.R., Shama, G., Kong, M.G., 2007. Bacterial cells exposed to nanosecond pulsed electric fields show lethal and sublethal effects. *International journal of food microbiology* 120, 311–314.
- Podda, F., Zuddas, P., Minacci, A., Pepi, M., Baldi, F., 2000. Heavy metal coprecipitation with hydrozincite $[\text{Zn}_5(\text{CO}_3)_2(\text{OH})_6]$ from mine waters caused by photosynthetic microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 5092–5098.



- Pothakamury, U.R., Vega, H., Zhang, Q., Barbosa-Canovas, G.V., Swanson, B.G., 1996. Effect of Growth Stage and Processing Temperature on the Inactivation of *E. coli* by Pulsed Electric Fields. *Journal of Food Protection* 59, 1167–1171.
- Pourmoghaddas, H., Stevens, A.A., 1995. Relationship between trihalomethanes and haloacetic acids with total organic halogen during chlorination. *Water Research* 29, 2059–2062. doi:10.1016/0043-1354(95)00026-H
- Powell, I.B., Achen, M.G., Hillier, A.J., Davidson, B.E., 1988. A Simple and Rapid Method for Genetic Transformation of Lactic Streptococci by Electroporation. *Appl Environ Microbiol* 54, 655–660.
- Prescott, Harley, Klein, 1995. *Microbiologie*, DeBoech Université. ed. DeBoech Université.
- Prescott, L.M., Harley, J.P., Klein, D.A., 2003. *Microbiologie*. De Boeck Supérieur.
- Qin, B.-L., Zhang, Q., Barbosa-Canovas, G.V., Swanson, B.G., Pedrow, P.D., 1994. Inactivation of microorganisms by pulsed electric fields of different voltage waveforms. *IEEE Transactions on Dielectrics and Electrical Insulation* 1, 1047–1057. doi:10.1109/94.368658
- Qualls, R.G., Dorfman, M.H., Johnson, J.D., 1989. Evaluation of the efficiency of ultraviolet disinfection systems. *Water Research* 23, 317–325. doi:10.1016/0043-1354(89)90097-3
- Qualls, R.G., Flynn, M.P., Johnson, J.D., 1983. The role of suspended particles in ultraviolet disinfection. *Journal of the Water Pollution Control Federation* 55, 1280–1285.
- Quirce, S., Gómez, M., Bombín, C., Sastre, J., 1999. Glutaraldehyde-induced asthma. *Allergy* 54, 1121–1122. doi:10.1034/j.1398-9995.1999.00388.x
- Racaud, P., Rawsy, S., 1994. Etude de la cinétique de formation des principaux sous-produits de chloration. *Tech. Sci. Muni*.
- Ramaroson, H., Helmer, C., Barberger-Gateau, P., Letenneur, L., Dartigues, J.-F., PAQUID, 2003. [Prevalence of dementia and Alzheimer's disease among subjects aged 75 years or over: updated results of the PAQUID cohort]. *Rev. Neurol. (Paris)* 159, 405–411.
- Raso, J., Pagan, R., Condon, S., Sala, F.J., 1998. Influence of Temperature and Pressure on the Lethality of Ultrasound. *Appl Environ Microbiol* 64, 465–471.
- Reddy, N. r., Solomon, H.M., Fingerhut, G. a., Rhodehamel, E. j., Balasubramaniam, V. m., Palaniappan, S., 1999. Inactivation of *Clostridium Botulinum* Type E Spores by High Pressure Processing. *Journal of Food Safety* 19, 277–288. doi:10.1111/j.1745-4565.1999.tb00252.x
- Reddy, N.R., Solomon, H.M., Tetzloff, R.C., Rhodehamel, E.J., 2003. Inactivation of *Clostridium botulinum* Type A Spores by High-Pressure Processing at Elevated Temperatures. *Journal of Food Protection* 66, 1402–1407.
- Reyns, K.M.F., Diels, A.M., Michiels, C.W., 2004. Generation of bactericidal and mutagenic components by pulsed electric field treatment. *International journal of food microbiology* 93, 165–173.
- Richardson, S.D., Plewa, M.J., Wagner, E.D., Schoeny, R., Demarini, D.M., 2007. Occurrence, genotoxicity, and carcinogenicity of regulated and emerging disinfection by-products in drinking water: a review and roadmap for research. *Mutat. Res.* 636, 178–242. doi:10.1016/j.mrrev.2007.09.001
- Richardson, S.D., Thruston, A.D., Caughran, T.V., Chen, P.H., Collette, T.W., Floyd, T.L., Schenck, K.M., Lykins, B.W., Sun, G., Majetich, G., 1999. Identification of New Drinking Water Disinfection Byproducts Formed in the Presence of Bromide. *Environ. Sci. Technol.* 33, 3378–3383. doi:10.1021/es9900297
- Rols, M.P., Tamzali, Y., Teissié, J., 2002. Electrochemotherapy of horses. A preliminary clinical report. *Bioelectrochemistry* 55, 101–105.
- Rols, M.P., Teissié, J., 1990. Electroporabilization of mammalian cells. Quantitative analysis of the phenomenon. *Biophys J* 58, 1089–1098.
- Rols, M.P., Teissié, J., 1998. Electroporabilization of mammalian cells to macromolecules: control by pulse duration. *Biophys J* 75, 1415–1423.



- Rosazza, C., Escoffre, J.-M., Zumbusch, A., Rols, M.-P., 2011. The Actin Cytoskeleton Has an Active Role in the Electrotransfer of Plasmid DNA in Mammalian Cells. *Mol Ther* 19, 913–921. doi:10.1038/mt.2010.303
- Rowan, N.J., MacGregor, S.J., Anderson, J.G., Fouracre, R.A., McIlvaney, L., Farish, O., 1999. Pulsed-Light Inactivation of Food-Related Microorganisms. *Appl Environ Microbiol* 65, 1312–1315.
- Saldaña, G., Puértolas, E., Álvarez, I., Meneses, N., Knorr, D., Raso, J., 2010. Evaluation of static treatment chamber to investigate kinetics of microbial inactivation by pulsed electric fields at different temperatures at quasi-isothermal conditions. *Journal of food engineering*.
- Sale, A.J.H., Hamilton, W.A., 1967. Effects of high electric fields on microorganisms: I. Killing of bacteria and yeasts. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 148, 781–788. doi:10.1016/0304-4165(67)90052-9
- Salzer, R., Schwering, H.-U., 1980. Process and apparatus for purification of industrial waste water.
- Sanden, D.G.N., Fields, B.S., Barbaree, J.M., Feeley, J.C., 1989. Viability of *Legionella pneumophila* in choline-free water at elevated temperatures. *Current Microbiology* 18, 61–65. doi:10.1007/BF01568833
- Saulis, G., 2010. Electroporation of Cell Membranes: The Fundamental Effects of Pulsed Electric Fields in Food Processing. *Food Engineering Reviews* 2, 52–73. doi:10.1007/s12393-010-9023-3
- Saulis, G., Balevicius, S., Saule, R., Stankevici, V., Zurauskiene, N., 2010. Determination of the electroporation threshold for pulses from 95 ns to 20 μ s, in: *Nanotechnology 2010: Bio Sensors, Instruments, Medical, Environment and Energy - Technical Proceedings of the 2010 NSTI Nanotechnology Conference and Expo, NSTI-Nanotech 2010*. pp. 506–509.
- Schaechter, M., Maaløe, O., Kjeldgaard, N.O., 1958. Dependency on Medium and Temperature of Cell Size and Chemical Composition during Balanced Growth of *Salmonella typhimurium*. *J Gen Microbiol* 19, 592–606. doi:10.1099/00221287-19-3-592
- Schäfer, A., Andritsos, N., Karabelas, A.J., Hoek, E.M.V., Schneider, R., Nyström, M., 2004. *Fouling in Nanofiltration*. Elsevier.
- Scheele, C.W., 1781. *Traité chimique de l'air et du feu*. Rue et Hôtel Serpente.
- Schoenbach, K.H., Joshi, R.P., Kolb, J.F., Nianyong Chen, Stacey, M., Blackmore, P.F., Buescher, E.S., Beebe, S.J., 2004. Ultrashort electrical pulses open a new gateway into biological cells. *Proc. IEEE* 92, 1122–1137. doi:10.1109/JPROC.2004.829009
- Schoenbach, K.H., Joshi, R.P., Stark, R.H., Dobbs, F.C., Beebe, S.J., 2000. Bacterial decontamination of liquids with pulsed electric fields. *IEEE Transactions on Dielectrics and Electrical Insulation* 7, 637–645. doi:10.1109/94.879359
- Schoenbach, K.H., Shu Xiao, Joshi, R.P., Camp, J.T., Heeren, T., Kolb, J.F., Beebe, S.J., 2008. The Effect of Intense Subnanosecond Electrical Pulses on Biological Cells. *IEEE Transactions on Plasma Science* 36, 414–422. doi:10.1109/TPS.2008.918786
- Schwan, H.P., 1963. Electric Characteristics of Tissues. *Biophysik* 1, 198–208. doi:10.1007/BF01195396
- Sedgwick, A.K., Tilton, R.C., 1983. Identification of *Legionella pneumophila* by latex agglutination. *J. Clin. Microbiol.* 17, 365–368.
- Segal, G., Shuman, H.A., 1999. *Legionella pneumophila* utilizes the same genes to multiply within *Acanthamoeba castellanii* and human macrophages. *Infect. Immun.* 67, 2117–2124.
- Selvaraj, R.J., Paul, B.B., Strauss, R.R., Jacobs, A.A., Sbarra, A.J., 1974. Oxidative peptide cleavage and decarboxylation by the MPO-H₂O₂-Cl⁻ antimicrobial system. *Infect. Immun.* 9, 255–260.
- Shapiro, E., Zolkov, C., Khodakovskaya, R., Effenberger, R., 2012. Broad-spectrum biocide compositions and a method for their preparation. EP2493300 A1.
- Sheryl Briggs S., 2003. Evaluation of lactic acid bacteria for the acceleration of cheese ripening using pulsed electric fields. McGill university, Montreal.



- Shih, K.L., Lederberg, J., 1976. Effects of chloramine on *Bacillus subtilis* deoxyribonucleic acid. *J. Bacteriol.* 125, 934–945.
- Shimizu, K., Ito, A., Lee, J.-K., Yoshida, T., Miwa, K., Ishiguro, H., Numaguchi, Y., Murohara, T., Kodama, I., Honda, H., 2007a. Construction of multi-layered cardiomyocyte sheets using magnetite nanoparticles and magnetic force. *Biotechnology and Bioengineering* 96, 803–809. doi:10.1002/bit.21094
- Shimizu, K., Ito, A., Yoshida, T., Yamada, Y., Ueda, M., Honda, H., 2007b. Bone tissue engineering with human mesenchymal stem cell sheets constructed using magnetite nanoparticles and magnetic force. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* 82B, 471–480. doi:10.1002/jbm.b.30752
- Shirai, A., Maeda, T., Itoh, M., Kawano, G., Kourai, H., 2000. Control of *Legionella* species and host amoeba by bis-quaternary ammonium compounds. *Biocontrol Science* 5, 97–102.
- Singer, S.J., Nicolson, G.L., 1972. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 175, 720–731.
- Smelt, J.P.P., 1998. Recent advances in the microbiology of high pressure processing. *Trends in Food Science & Technology* 9, 152–158. doi:10.1016/S0924-2244(98)00030-2
- Sobrino-López, A., Martín-Belloso, O., 2009. Review: Potential of High-Intensity Pulsed Electric Field Technology for Milk Processing. *Food Eng. Rev.* 2, 17–27. doi:10.1007/s12393-009-9011-7
- Sondi, I., Salopek-Sondi, B., 2004. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria. *Journal of Colloid and Interface Science* 275, 177–182. doi:10.1016/j.jcis.2004.02.012
- Stacey, M., Fox, P., Buescher, S., Kolb, J., 2011. Nanosecond pulsed electric field induced cytoskeleton, nuclear membrane and telomere damage adversely impact cell survival. *Bioelectrochemistry*.
- Steiner, H., Hultmark, D., Engström, Å., Bennich, H., Boman, H.G., 1981. Sequence and specificity of two antibacterial proteins involved in insect immunity. *Nature* 292, 246–248. doi:10.1038/292246a0
- Stricker, L., Lohse, D., 2014. Radical production inside an acoustically driven microbubble. *Ultrasonics Sonochemistry* 21, 336–345. doi:10.1016/j.ultsonch.2013.07.004
- Suslick, K.S., Price, G.J., 1999. Applications of ultrasound to materials chemistry.
- Sutherland, I.W., Hughes, K.A., Skillman, L.C., Tait, K., 2004. The interaction of phage and biofilms. *FEMS Microbiology Letters* 232, 1–6. doi:10.1016/S0378-1097(04)00041-2
- Ta, K., Ls, S., Lf, O., 1966. Comparison of chlorine, bromine, iodine as disinfectants for swimming pool water., Comparison of Chlorine, Bromine, and Iodine as Disinfectants for Swimming Pool Water. *Appl Microbiol* 14, 14, 276, 276–279.
- Takao, T., Sakanashi, M., Akiyama, H., Katsuki, S., 2013. Enhanced proliferation of yeast subjected to nanosecond electrical pulses. *IEEE*, pp. 1–1. doi:10.1109/PLASMA.2013.6634803
- Takeo, K., Shigeta, M., Takagi, Y., 1976. Plasma Membrane Ultrastructural Differences Between the Exponential and Stationary Phases of *Saccharomyces cerevisiae* as Revealed by Freeze-Etching. *J Gen Microbiol* 97, 323–329. doi:10.1099/00221287-97-2-323
- Tan, T.-C., 2007. Understanding the Effect of Particle-size on UV Disinfection: Kinetics, Mechanism and Modeling. University of Toronto (Canada).
- Teissié, J., Knox, B.E., Tsong, T.Y., Wehrle, J., 1981. Synthesis of adenosine triphosphate in respiration-inhibited submitochondrial particles induced by microsecond electric pulses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78, 7473–7477.
- Teissié, J., Rols, M.P., 1993. An experimental evaluation of the critical potential difference inducing cell membrane electropermeabilization. *Biophys J* 65, 409–413.
- Teissié, J., Rols, M.-P., 1994. Manipulation of Cell Cytoskeleton Affects the Lifetime of Cell Membrane Electropermeabilization. *Annals of the New York Academy of Sciences* 720, 98–110. doi:10.1111/j.1749-6632.1994.tb30438.x



- Teissié, J., Tsong, T.Y., 1980. Evidence of voltage-induced channel opening in Na/K ATPase of human erythrocyte membrane. *J. Membr. Biol.* 55, 133–140. doi:10.1007/BF01871155
- Thomas, D.J., Eubanks, L.M., Rector, C., Warrington, J., Todd, P., 2008. Effects of atmospheric pressure on the survival of photosynthetic microorganisms during simulations of ecopoesis. *International Journal of Astrobiology* 7, 243–249. doi:10.1017/S1473550408004151
- Thomas, E.L., 1979. Myeloperoxidase-Hydrogen Peroxide-Chloride Antimicrobial System: Effect of Exogenous Amines on Antibacterial Action Against *Escherichia coli*. *Infect Immun* 25, 110–116.
- Thomas, V., Bouchez, T., Nicolas, V., Robert, S., Loret, J.F., Lévi, Y., 2004. Amoebae in domestic water systems: resistance to disinfection treatments and implication in *Legionella* persistence. *J. Appl. Microbiol.* 97, 950–963. doi:10.1111/j.1365-2672.2004.02391.x
- Thompson, J., Blatchley III, E., 2000. Gamma Irradiation for Inactivation of *C. parvum*, *E. coli*, and Coliphage MS-2. *Journal of Environmental Engineering* 126, 761–768. doi:10.1061/(ASCE)0733-9372(2000)126:8(761)
- Thurman, R.B., Gerba, C.P., Bitton, G., 1989. The molecular mechanisms of copper and silver ion disinfection of bacteria and viruses. *Critical Reviews in Environmental Control* 18, 295–315. doi:10.1080/10643388909388351
- Toke, O., 2005. Antimicrobial peptides: new candidates in the fight against bacterial infections. *Biopolymers* 80, 717–735. doi:10.1002/bip.20286
- Türetgen, I., 2004. Comparison of the Efficacy of Free Residual Chlorine and Monochloramine against Biofilms in Model and Full Scale Cooling Towers. *Biofouling* 20, 81–85. doi:10.1080/08927010410001710027
- Unesco, 2006. World Water Assessment Programme.
- Unhoch, M.J., Choi, S., Roberts, K.P., O'Malley, L.P., 2008. Water treatment containing DBNPA for use in sanitizing recreational water. US20080274208 A1.
- VanBogelen, R.A., Kelley, P.M., Neidhardt, F.C., 1987. Differential induction of heat shock, SOS, and oxidation stress regulons and accumulation of nucleotides in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 169, 26–32.
- Vásquez, J.L., Gehl, J., Hermann, G.G., 2012. Electroporation enhances mitomycin C cytotoxicity on T24 bladder cancer cell line: A potential improvement of intravesical chemotherapy in bladder cancer. *Bioelectrochemistry* 88, 127–133. doi:10.1016/j.bioelechem.2012.08.001
- Venkobachar, C., Iyengar, L., Prabhakara Rao, A.V.S., 1977. Mechanism of disinfection: Effect of chlorine on cell membrane functions. *Water Research* 11, 727–729. doi:10.1016/0043-1354(77)90114-2
- Verdon, J., Berjeaud, J.-M., Lacombe, C., Héchard, Y., 2008. Characterization of anti-*Legionella* activity of warnericin RK and delta-lysin I from *Staphylococcus warneri*. *Peptides* 29, 978–984. doi:10.1016/j.peptides.2008.01.017
- Vernhes, M.C., Benichou, A., Pernin, P., Cabanes, P.A., Teissié, J., 2002. Elimination of free-living amoebae in fresh water with pulsed electric fields. *Water Research* 36, 3429–3438. doi:10.1016/S0043-1354(02)00065-9
- Vidal, A., Giloupe, S., Saby, S., 2005. Evaluation des traitements de désinfection des *legionella* dans les réseaux d'eau chaude sanitaire. TSM. *Techniques sciences méthodes, génie urbain génie rural* 39–50.
- Vos, J.G., Dybing, E., Greim, H.A., Ladefoged, O., Lambré, C., Tarazona, J.V., Brandt, I., Vethaak, A.D., 2000. Health effects of endocrine-disrupting chemicals on wildlife, with special reference to the European situation. *Critical Reviews in Toxicology* 30, 71–133.
- W. M. Thomas, J.E., 1999. Laboratory observations of biocide efficiency against *Legionella* in model cooling tower systems.
- Watt, B.E., Proudfoot, A.T., Vale, J.A., 2004. Hydrogen peroxide poisoning. *Toxicol Rev* 23, 51–57.
- Williams, T.M., 2006. The Mechanism of Action of Isothiazolone Biocide. *CORROSION* 2006.



- Wolf, H., Rols, M.P., Boldt, E., Neumann, E., Teissié, J., 1994. Control by pulse parameters of electric field-mediated gene transfer in mammalian cells. *Biophys. J.* 66, 524–531.
- Wolff, J., Chaikoff, I.L., Goldberg, R.C., Meier, J.R., 1949. The Temporary Nature of the Inhibitory Action of Excess Iodide on Organic Iodine Synthesis in the Normal Thyroid. *Endocrinology* 45, 504–513. doi:10.1210/endo-45-5-504
- Wouters, P.C., Smelt, J.P.P.M., 1997. Inactivation of microorganisms with pulsed electric fields: Potential for food preservation. *Food Biotechnology* 11, 193–229.
- Wright, J.M., Schwartz, J., Vartiainen, T., Maki-Paakkanen, J., Altshul, L., Harrington, J.J., Dockery, D.W., 2002. 3-Chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2(5H)-furanone (MX) and mutagenic activity in Massachusetts drinking water. *Environ Health Perspect* 110, 157–164.
- Zasloff, M., 1987. Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84, 5449–5453.
- Zasloff, M., 2002. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* 415, 389–395. doi:10.1038/415389a
- Zbinden, M.D.A., Sturm, B.S.M., Nord, R.D., Carey, W.J., Moore, D., Shinogle, H., Stagg-Williams, S.M., 2013. Pulsed electric field (PEF) as an intensification pretreatment for greener solvent lipid extraction from microalgae. *Biotechnology and Bioengineering* 110, 1605–1615. doi:10.1002/bit.24829
- Žgalin, M.K., Hodžić, D., Reberšek, M., Kandušer, M., 2012. Combination of Microsecond and Nanosecond Pulsed Electric Field Treatments for Inactivation of *Escherichia coli* in Water Samples. *The Journal of Membrane Biology* 245, 643–650. doi:10.1007/s00232-012-9481-z
- Zimmermann, U., Pilwat, G., Riemann, F., 1974. Dielectric breakdown of cell membranes. *Biophysical Journal* 14, 881–899.

RESUME

Les effets des champs électriques pulsés (CEP) sur les microorganismes ont été montrés depuis Sale et Hamilton. L'une des premières applications en a été l'électroporation cellulaire pour permettre la transfection de plasmides à travers la membrane plasmique. Il s'agit de la principale méthode de transfert de gènes. Un autre champ d'application est la décontamination de nourriture liquide. Mais la technologie capable de donner ces résultats en termes de décontamination requiert, pour un champ électrique de faible amplitude, l'utilisation d'impulsions de longues durées provoquant une grande consommation énergétique.



Ceci a été montré pour la décontamination du lait, des jus de fruits et du vin. Le mécanisme par lequel les CEP avec une durée milliseconde (ms) ou microseconde (μ s) agissent est bien décrit et intervient sur la bicouche lipidique. Le but de cette thèse est d'étudier les possibilités d'utilisation des champs électriques pulsés nanosecondes (nsCEP) pour décontaminer de l'eau de procédés industriels.

Un générateur d'impulsions haute tension associé à un applicateur constitué de deux électrodes planes permettent de générer un champ électrique homogène dans l'eau. Ce dispositif a d'abord été éprouvé en batch puis en flux sur des suspensions bactériennes (*Escherichia coli* BL21(DE3) et *Legionella pneumophila* séro-groupe 1) cultivées en laboratoire.

L'utilisation de générateurs de plus en plus performants et l'optimisation des conditions de flux ont permis d'améliorer drastiquement le rendement énergétique de décontamination et la vitesse globale de traitement. Il a également été montré qu'il est possible de déterminer par le calcul, la vitesse de décontamination d'un tel système, à partir des caractéristiques des générateurs et des paramètres de fluidiques.

Si ce travail n'a pas permis la réalisation d'un prototype d'échelle industrielle, les grandes lignes permettant le passage du procédé de l'échelle laboratoire à l'échelle industrielle ont été données.

Mots-clés :

Décontamination bactérienne, champs électriques pulsés nanoseconde (nsPEF), changement d'échelle, traitement de l'eau.

ABSTRACT

Since Sale and Hamilton, many effects of electric field pulse on microorganisms have been described. One of the first applications that has been performed was cell electroporation to allow plasmid transfection through the plasma membrane. This is the main method for gene transfer. Another application field leads in liquid food decontamination. However, the technology able to give these results in terms of decontamination needs, for low electric field amplitude, the use of pulses with a long duration period inducing higher energy consumption. This had been shown for milk, fruit juice and wine decontamination. The mechanisms by which pulsed electric field (PEF) with duration at the level of the millisecond (ms) or the microsecond (μ s) acts, are well described and affect the lipid bilayer. The goal of the thesis is to study the possibility of using nanosecond pulsed electric field (nsPEF) to decontaminate water in industrial processes.

A high voltage generator able to provide nanosecond pulses has been associated with an applicator which consists in 2 flat electrodes to generate an homogeneous electric field in water. These devices were tested first in batch and then flow on bacterial suspensions (*Escherichia coli* BL21(DE3), and *Legionella pneumophila* serogroup 1) grown in the laboratory.

The use of more efficient generators and optimization of flow requirements helped to drastically improve the decontamination efficiency and the overall processing speed. It has also been shown that it is possible to determine by calculation, the speed of decontamination of such a system, based on characteristics of generators and the parameters of fluidics.

If this work did not bring the development of an industrial scale prototype, the guidelines allowing the passage of the method for laboratory scale to industrial scale have been given.

Keywords:

Bacterial decontamination, nanosecond pulsed electric field (nsPEF), scale up, water treatment.