

Demandeurs :

1. Laboratoire Chimie Provence – UMR6264

Equipe « Chimie de l'Environnement Continental »

3 place Victor Hugo – case 29

13331 Marseille cedex 3

Contact : jean-luc.boudenne@univ-provence.fr / Tél : 04 91 10 61 40 / 06 70 70 82 23

2. Institut Méditerranéen d'Ecologie et de Paléoécologie – UMR 6116

Equipe « Ecologie Microbienne et Biotechnologies »

Avenue Escadrille Normandie-Niemen/Boîte 452

13397 Marseille cedex 20

Contact : a-m.farnet@univ-cezanne.fr / ☎ 04 91 28 81 90 / 📠 04 91 28 85 29

Contexte de la recherche :

L'économie de la ressource en eau est un enjeu majeur du millénaire et la réutilisation des eaux usées traitées, autrefois « tabou », est devenue l'un des objectifs du Ministère en charge de l'Environnement (conforté en cela par les accords du Grenelle de l'Environnement).

Cette réutilisation est pour le moment limitée par les risques sanitaires que pourraient engendrer l'utilisation de ces eaux issues de station d'épuration sans traitement complémentaire qui puisse éliminer le risque microbiologique. En effet, si la majorité des pollutions chimiques et biologiques sont traitées au sein d'une station d'épuration, de nombreux microorganismes pathogènes survivent aux traitements actuels et présentent donc un risque lorsque les rejets sont effectués en mer ou dans des cours d'eau (zone de baignade, de pisciculture, de conchyliculture), ou lorsque ces eaux usées traitées sont utilisées pour l'irrigation ou l'arrosage des espaces verts.

Un traitement de désinfection au chlore est exclu de part les conséquences néfastes des sous-produits générés sur les écosystèmes aquatiques. Par contre, un traitement de désinfection par ultraviolet de ce type d'effluents partiellement épurés peut permettre de réduire la pollution microbiologique. Cette solution est très largement répandue dans le traitement de l'eau potable et sa mise en œuvre dans le traitement des eaux usées est de plus en plus importante. Cependant ces lampes utilisent du mercure, composé hautement toxique, et leur utilisation pourrait être limitée à cause de l'application de la **directive REACH**.

Aujourd'hui des progrès considérables ont été réalisés dans le développement technologique des diodes électroluminescentes (LED), opérant dans le domaine des ultraviolets et à différentes longueurs d'onde. Ces diodes présentent de nombreux avantages par rapport aux lampes UV traditionnelles : elles sont exemptes de mercure, moins coûteuses, plus puissantes et présentent une durée de vie plus longue. Couplées à une optique spécialement conçue pour favoriser l'exposition de l'effluent, elles ouvrent de nouvelles perspectives pour abaisser significativement les coûts d'investissement et de fonctionnement, et permettre d'envisager leur utilisation dans le traitement des eaux usées. Par ailleurs, les nouvelles LED disponibles sur le marché présentent aujourd'hui des longueurs d'onde reconnues comme germicides (254 nm, 280 nm, 365nm, 400 nm).

L'équipe « Ecologie Microbienne et Biotechnologies » de l'IMEP (UMR6116) et l'équipe Chimie de l'Environnement Continental du LCP (UMR6264) se sont associées pour développer un projet de recherche autour de la réutilisation des eaux usées après désinfection avec ce type de LED.

Pour cela, elles se sont également associées avec une PME locale (Light Technologies, Saint-Marcel, Marseille). Grâce à ce partenariat, une bourse Région-Entreprise a été obtenue. Anne-Céline Chèvremont a débuté sa thèse le 1^{er} novembre 2009 sur ce sujet, co-encadrée par Anne-Marie Farnet (IMEP) et Jean-Luc Boudenne (LCP).

Objectifs de ce projet de recherche :

Ce projet a pour objectifs (i) de développer un système de désinfection des eaux usées basé sur les technologies Diode Electro-Luminescente-UV, puis (ii) d'évaluer son efficacité pour réduire les abondances des contaminations microbiennes et chimiques et enfin, (iii) de vérifier l'impact des eaux usées traitées par ce procédé sur le sol lors de l'irrigation d'espaces verts ou agricoles.

Afin d'être le plus proche possible de la réalité environnementale, le procédé sera validé sur des eaux usées traitées provenant de la station d'épuration du Frioul, gérée par la SERAM (Société d'Exploitation des Réseaux d'Assainissement de Marseille). Ce site présente bien les caractéristiques de

Réalisations prévues :

↳ *PHASE I : Conception, optimisation et validation du système de désinfection*

Tâche 1 : Test en laboratoire sur l'efficacité de désinfection des LED

Un objectif prioritaire de cette première partie sera de déterminer les longueurs d'onde optimales pour une action germicide pérenne. En effet, des études réalisées sur lampe à vapeur de mercure (Hg) ont montré que certains microorganismes pouvaient s'adapter aux traitements UV (légionelles, amibes, phages, adénovirus...). Des phénomènes de réactivations cellulaires liés à la capacité des microorganismes à réparer des lésions à la lumière (photoréactivation) ou à l'obscurité (« dark-repair ») ont également été mis en évidence¹. Par ailleurs, les lampes UV moyennes pressions (MP) se révèlent plus efficaces que les lampes UV basse pression (BP). A cet égard, de nombreuses publications scientifiques^{2,3} montrent que l'utilisation de la seule longueur d'onde, $\lambda=254$ nm ne permet pas de s'assurer de l'inactivation pérenne des microorganismes.

La validation du procédé DEL-UV pour le traitement de l'eau concernera en particulier le suivi de l'abattement de la teneur en microorganismes pathogènes repris dans la législation européenne - Directive Eaux de Baignades 2006/7/CE- (et transcrite en droit français dans le décret 2007-983 du 15 mai 2007) : coliformes et streptocoques fécaux ainsi que l'abattement d'autres microorganismes (comme préconisé par le Conseil Supérieur d'Hygiène Publique de France (CSHPF) dans son avis du 15 mai 2006) : salmonelles, légionelles et spores de bactéries sulfito-réductrices. Il s'agira de vérifier l'abattement de 7 log minimum de ces microorganismes, préconisé par l'Organisation Mondiale de la Santé en septembre 2006 (Safe Use of Wastewater Excreta and Wastewater, Geneva, WHO, 2006), voire l'absence de ces microorganismes après traitement UV.

L'ensemble de ces contrôles sera réalisé lors d'expérimentations simplifiées de laboratoire. Ces expériences utiliseront des tests normalisés de remise en culture sur milieux spécifiques (analyse classique de qualité microbiologique de l'eau) Ces travaux concerneront en premier lieu l'étude de souches bactériennes uniques. Ils concerneront ensuite l'étude de ces abattements microbiens dans des microflore plus complexes du milieu naturel (comme les effluents d'eaux résiduelles).

1 R. Beukers, A. P.M. Eker, P. H.M. Lohman, "50 years thymine dimer", DNA repair, 7, 530-543, 2008.

2 K. Oguma, H. Katayama, S. Ohgaki, "Photoreactivation of Legionella pneumophila after inactivation by low- or medium-pressure ultraviolet lamp", Water Research, 38, 2757-2763, 2004.

3 E. Nebot Sanz, I. Salcedo Dávila, J.A. Andrade Balao, J.M. Quiroga Alonso, "Modelling of reactivation after UV disinfection: Effect of UV-C dose on subsequent photoreactivation and dark repair", Water Research, 41(14), 3141-3151, 2007.

Tâche 2 : Validation de l'efficacité du procédé au niveau chimique

Il s'agira tout d'abord de vérifier si l'impact de l'exposition aux UV des substances chimiques initialement présentes dans le rejet ne favorise pas l'apparition de sous-produits indésirables du point de vue sanitaire et environnemental.

En plus du suivi des paramètres physico-chimiques classiques (pH, température, DCO, anions et cations majeurs), la nature et la concentration des molécules chimiques présentes dans l'effluent initial et dans l'effluent traité sera donc réalisé par HPLC/MS (pour les composés pharmaceutiques et détergents), GC/ECD (phytosanitaires), HPIC/conductivité (pour les anions et cations majeurs) et HPIC/MS (pour déterminer les petits acides résultant de l'oxydation photochimique des composés parents). Un suivi global de l'efficacité du traitement sera également déterminé par analyse COT/N (Carbone Organique Total/ Azote Total).

Les schémas réactionnels de dégradation de ces molécules seront déterminés et étudiés en fonction des longueurs d'onde utilisées, de la puissance des lampes utilisées et de la turbidité de l'échantillon. Les verrous scientifiques à ce niveau vont concerner l'obtention des solutions standards des sous-produits. En effet, s'il l'on trouve facilement les substances actives contenues dans les composés pharmaceutiques et phytosanitaires, de nombreux sous-produits sont absents des catalogues de produits chimiques pour deux raisons principales : i) parce qu'ils sont difficiles à synthétiser, ii) parce qu'ils ne sont pas connus. C'est en effet l'un des grands challenges de la Directive REACH, connaître le devenir des produits chimiques dans l'environnement.

Pour cela, à l'aide d'un réacteur photochimique de laboratoire, les métabolites des principales substances actives seront synthétisés. Par comparaison avec les substances retrouvées dans les échantillons d'eaux usées avant et après traitement, par comparaison de leurs spectres de masse, il sera possible de déterminer les schémas réactionnels de transformation.

PHASE II : Validation et effets potentiels sur l'environnement

Tâche 3 : Impacts des eaux usées traitées sur le sol

- 1) L'apport de l'effluent affecte-t-il la diversité et le fonctionnement des communautés microbiennes du milieu ? Autrement dit, l'effluent présente-t-il une toxicité ou favorise-t-il les microflore indigènes ?
- 2) Quels populations microbiennes exogènes se maintiennent dans le sol face à l'antagonisme exercé par les microorganismes autochtones ?
- 3) Quel est l'effet des apports organiques et minéraux de l'effluent sur le développement végétal et, s'il est favorable, peut-il se substituer aux fertilisants traditionnels ?

Afin de répondre à l'ensemble de ces problématiques, des protocoles mettant en jeu différents traitements des eaux usées seront envisagés et sont décrits ci-dessous. Les travaux seront réalisés pour partie sous forme de test au laboratoire et complétés par des mesures *in situ* sur l'île du Frioul.

L'effluent d'eaux usées domestiques de l'île du Frioul, actuellement traité par un procédé physico-chimique avant d'être évacué en mer, sera soumis à différents traitements avant arrosage :

- traitement physico-chimique (le traitement mis en œuvre actuellement),
- traitement physico-chimique couplé à un traitement biologique en bassin d'aération,
- traitement physico-chimique couplé au traitement DEL-UV (procédé LEDEPUR),
- contrôle utilisant une eau d'arrosage classique.

Le traitement biologique de l'effluent sera assuré par un pilote de station d'épuration mis en place dans le LCP de l'Université de Provence (LCP UMR CNRS 6264). Des tests d'arrosage s'effectueront dans un premier temps sous serre et sur des plans de gazon qui correspondent au type végétal susceptible de bénéficier prioritairement de cet d'arrosage.

Un effluent d'eaux usées, par ses caractéristiques chimiques et microbiologiques, est susceptible de modifier les communautés microbiennes de l'écosystème dans lequel il est déversé. En effet, la

microflore introduite, notamment d'origine fécale, peut sensiblement modifier les équilibres microbiens du milieu récepteur. Par ailleurs, l'effluent peut présenter un risque chimique lié à son origine (présence de molécules à effet oestrogénique comme l'œstradiol ou les alkylphénols, dérivés de détergents) ou au traitement par les UV (réduction des nitrates en nitrites). L'évolution de la structure et de la composition des communautés telluriques (diversité génétique ou fonctionnelle) et des activités enzymatiques exprimées (indicateurs de fonctionnement du sol) sera donc évaluée en fonction du traitement subi par l'effluent. Les activités microbiennes retenues seront celles impliquées dans les cycles biogéochimiques du carbone (cellulases, phénoloxydases...), de l'azote (arylamidase) et du phosphore (phosphatases acides et alcalines) principalement.

L'ensemble de ce travail permettra de déterminer si la fonctionnalité du sol est modifiée ou pas (à travers la mesure des activités microbiennes) et si cette modification peut être corrélée à un changement de la structure et/ou de l'abondance des communautés microbiennes du milieu récepteur qui sera analysé du point de vue fonctionnel (profil catabolique ou CLPP, catabolic level physiological profile).

Les interactions microbiennes (antagonistes ou facilitatrices) constituent un des paramètres fondamentaux qui régit l'équilibre des communautés microbiennes dans les écosystèmes. Dans le cas présent, il sera important de suivre la persistance de la microflore d'origine fécale au niveau du sol afin d'optimiser les traitements de l'effluent. En d'autres termes, une partie de cette microflore sera potentiellement éliminée par les phénomènes de concurrence dus à la présence des microorganismes telluriques et les traitements de l'effluent, destinés à diminuer la charge microbienne, pourront être éventuellement moins drastiques (avec en conséquence une limitation des coûts liés au traitement). Comme pour le paragraphe (ii) du programme scientifique *in vitro*, le suivi des contaminants fécaux dans le sol sera réalisé avec des techniques classiques de remise en culture permettant de sélectionner les microorganismes indicateurs de pollutions fécales (majoritairement les coliformes, streptocoques fécaux et spores de sulfito-réducteurs).

Tâche 4 : Impacts des eaux usées traitées sur le végétal

La productivité végétale (poids sec/unité de surface) sera quantifiée après apport des différents types d'effluents afin de déterminer le traitement qui serait le plus favorable au développement végétal : le traitement biologique impliquant la minéralisation de la matière organique permet-il une assimilation plus rapide des nutriments par les végétaux ? La productivité végétale sera corrélée à l'évolution de la matière organique dans le sol, évaluée par RMN du solide du ^{13}C : cette technique non destructrice (pas d'extraction en solvant organique mais analyse directe en champs magnétiques) permet de suivre les variations des concentrations des différents composés chimiques présents dans le sol (polysaccharides, phénols, lipides...) liées à la transformation de la matière organique. Ainsi des indices d'humification et de transformation de la matière organique peuvent être calculés. Ces études seront couplées à des analyses chimiques plus classiques (carbone et azote total, dosage du phosphore soluble et des ions orthophosphates, spectres de fluorescence, ...).

Réponse à un futur appel d'offres

Les collaborateurs initiateurs de ce projet (IMEP-LCP-Light Technologies) se sont déjà rapprochés de 2 autres partenaires industriels (la SERAM, et la société CLARANOR qui développe des réacteurs UV -à lampes à mercure- pour la désinfection des eaux).

Ce projet de recherche, supporté par ce consortium ainsi réorganisé, a été labellisé par deux pôles de compétitivité (Pôle CapEnergies et Pôle Risques -ci-joints). Une demande de financement a été déposée l'année dernière auprès du Conseil Régional PACA, dans le cadre de son appel d'offres 'Appel à Projet Finalisé'. Toutefois, ce projet n'a pas été retenu, car la « *preuve du concept n'a pas été apportée* ». En effet, l'étude bibliographique montre qu'à l'heure actuelle, il n'existe pas de réacteurs UV de désinfection à base de LED. Si l'aspect novateur de ce programme constitue un point fort dans l'objectif de déposer des brevets et de

concevoir des réacteurs UV de nouvelle génération, il faudra toutefois démontrer que les LED soient suffisamment efficaces pour la désinfection des eaux avant de déposer d'autres demandes de financements. Ainsi, le consortium se propose de répondre à plusieurs appels d'offres à partir des résultats de la première année de thèse d'Anne Céline Chèvremont : appel d'offres AAP-Eco-Industries, courant novembre prochain et ECOTECH de l'ANR.

Justification de la demande financière

Ce projet de recherche impliquant à l'heure actuelle l'IMEP, le LCP et la société Light Technologie ne bénéficie d'aucun financement, exceptée la bourse de thèse d'Anne Céline Chèvremont (Bourse Région-90%-Entreprise -10%-). La société Light Technologie est une micro-entreprise (3 salariés), spécialisée dans l'achat et la vente de LED (<http://www.light-technologies.fr/>).

Comme indiqué précédemment, afin de répondre à de futurs appels d'offres, il est nécessaire de prouver l'efficacité du procédé LED dans le traitement d'eaux usées.

Pour cela nous avons besoin de financements liés aux frais d'analyses (microbiologique et chimique), à l'achat de petit matériel (dont 1 radiomètre pour mesurer la puissance délivrée par les LED) et à l'achat de consommables (standards chimiques, souches bactériennes, ...). Nous ne faisons donc état dans le tableau suivant que des coûts estimés pour la première année de ce projet, puisque nous espérons obtenir d'autres subventions dans le cadre des appels à projets susmentionnés.

Matériel et consommables	Coût TTC (en €)
Radiomètre	4 000
Consommables microbiologie (microplaques, cônes, micropipettes, verrerie, souches bactériennes...)	4 000
Consommables chimie (standards, fluides, solvants, ...)	2 000
TOTAL	10 000 €