

École doctorale de Chimie

Laboratoire des Matériaux, Surfaces et Procédés pour la Catalyse –
European Laboratory for Catalysis and Surface Sciences
Laboratoire de Génétique Moléculaire, Génomique, et Microbiologie

Décontamination photocatalytique d'un bioaérosol contaminé par *Legionella pneumophila* et autres agents biologiques

*Contribution à la conception de
dispositifs de décontamination de l'air*

Pour l'obtention du grade de docteur en sciences chimiques

Par Sébastien JOSSET, le 17 octobre 2008.

Rapporteur interne : Dr. Sylvie BEGIN
Rapporteurs externes : Dr. Pierre PICHAT
Dr. César PULGARIN
Directrices de thèse : Dr. Valérie KELLER-SPITZER
Dr. Marie-Claire LETT

Examinatrice : Dr. Pascale BAUDA
Membre invité : Dr. Nicolas KELLER

REMERCIEMENTS

Ce travail a été effectué au sein du *Laboratoire des Matériaux, Surfaces et Procédés pour la Catalyse* de l'École Européenne de Chimie, Polymères et Matériaux, ainsi qu'au *Laboratoire de Génétique Moléculaire, Génomique, Microbiologie*, tous deux rattachés à l'Université Louis Pasteur de Strasbourg.

Tout d'abord, je tiens à remercier Valérie Keller-Spitzer, Marie-Claire Lett et Nicolas Keller de m'avoir accueilli dans leurs équipes. Je leur suis particulièrement reconnaissant de l'immense confiance et de la grande liberté qu'ils m'ont octroyées durant ces trois années, tout en faisant preuve d'une constante disponibilité. Je les remercie infiniment pour leur soutien et l'aide précieuse qu'ils m'ont apportée pour la rédaction du présent mémoire.

Je tiens également à remercier la Région Alsace pour le financement d'une bourse de thèse qui m'a permis de réaliser ce travail ainsi que pour son soutien et sa confiance dans une thématique nouvelle et risquée, qui, à l'époque n'en était qu'à ses balbutiements en terme d'applicabilité pour la décontamination de l'air.

Un très grand merci à Pierre Bernhardt pour sa disponibilité, son attention, ses précieux conseils, et son soutien sans faille, qui ont permis de faire passer des idées du stade de la simple pensée à celui de la réalité.

De même, je remercie très sincèrement Alain Rach de m'avoir toujours aidé et avoir investi beaucoup de son temps dans ce projet qui lui doit aussi beaucoup, de même que Michel Wolf.

Je tiens aussi à remercier Cuong Pham-Huu pour son aide précieuse sur les structures tridimensionnelles à base de mousse de polyuréthane.

Les travaux réalisés au cours de cette thèse n'auraient pas été possibles sans la collaboration avec Jérôme Taranto et je l'en remercie.

De même, un grand merci à Florence Chollet qui m'a éclairé de ses lumières. J'ai sincèrement apprécié le travail réalisé ensemble, et je la remercie chaleureusement pour son soutien et ses conseils !

Un immense merci revient à Estelle Vanhaecke à qui je souhaite l'avenir doré qu'elle mérite. Je la remercie sincèrement pour tout !

De même, je souhaite plein de courage pour la suite des événements à mon collègue, colocataire et ami, Mathieu Grandcolas.

Merci aussi à tous les membres des deux laboratoires sans qui rien n'eût été possible.

Une pensée particulière revient à mes parents, qui ont toujours cru en moi, m'ont soutenu et m'ont aidé. De même, je remercie tous mes amis qui m'ont soutenu et motivé au cours de ces trois années.

Enfin, je tiens à remercier les membres du jury, qui me font l'honneur de prendre part à la concrétisation de ces trois années de travaux.

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS	1
SOMMAIRE	3
INTRODUCTION	5
I BIBLIOGRAPHIE	11
I ASPECTS MICROBIOLOGIQUES	11
I 1 Données sur la contamination microbiologique de l'air.....	11
I 2 Les agents biologiques aéroportés et les maladies associées.....	14
I 3 État de l'art des dispositifs de traitement de l'air au niveau biologique.....	26
II CONSIDÉRATIONS MÉTHODOLOGIQUES EN MICROBIOLOGIE	29
II 1 Méthodes de numération.....	29
II 2 Comptage des virus.....	37
II 3 Les bioaérosols : techniques de collecte	38
III ASPECTS PHOTOCATALYTIQUES ET PHOTOREACTEURS	41
III 1 La photocatalyse : aspects généraux.....	42
III 2 Applications.....	45
III 3 Les réacteurs photocatalytiques.....	47
III 4 Exemples de photoréacteurs	52
IV L'INTERFACE PHOTOCATALYSE - MICROBIOLOGIE	54
IV 1 Les paramètres influençant les tests de décontamination photocatalytique.....	54
IV 2 Les mécanismes de la décontamination photocatalytique.....	56
IV 3 Les modifications du photocatalyseur pour les applications biologiques.....	58
II PARTIE EXPÉRIMENTALE	61
I PRÉPARATION DES CATALYSEURS	61
I 1 Préparation des catalyseurs au cuivre.....	62
I 2 Préparation des catalyseurs à l'argent	62
I 3 Disques d'inhibition des photocatalyseurs au cuivre et à l'argent.....	64
II CONCEPTION ET PRÉPARATION DES RÉACTEURS	66
II 1 Réacteur « paillason »	66
II 2 Réacteur « torsadé ».....	67
II 3 Réacteur « tangentiel ».....	68
II 4 Média tridimensionnel à base de mousse de polyuréthane (PU).....	69
III PRÉPARATION DES MICROORGANISMES	72
III 1 Culture des microorganismes	73
III 2 Mise en suspension des microorganismes	74
IV TESTS DE DÉCONTAMINATION PHOTOCATALYTIQUE	75
IV 1 La boîte à gants	75
IV 2 Tests en mode « one pass »	76
IV 3 Tests en mode « recirculation » du réacteur tangentiel	78
V COMPTAGE ET NUMÉRATION DES MICROORGANISMES	80
V 1 Comptage par mise en culture	80
V 2 Comptage direct par épifluorescence.....	83

III RÉSULTATS ET CONSIDÉRATIONS PRÉLIMINAIRES AUX TESTS DE DÉCONTAMINATION	91
I Validation de la technique de coloration	92
I 1 Répétabilité et linéarité des mesures de viabilité et de densité avec le kit BacLight™	92
I 2 influences du TiO ₂ sur la coloration	99
II Réduction Logarithmique en Viabilité.....	106
III Survie des microorganismes à l'aérosolisation et à la collecte	110
IV RÉSULTATS SUR LES DIFFÉRENTES GÉOMÉTRIES DE RÉACTEURS.....	113
I Tests des réacteurs en mode « one pass »	113
I 1 Réacteur « paillason »	114
II 2 Réacteur « torsadé »	118
I 3 Réacteur « tangentiel »	120
II Tests sur le réacteur tangentiel en recirculation	124
II 1 Résultats sur <i>L.pneumophila</i>	124
II 2 Résultats sur spores de <i>B.subtilis</i>	127
II 3 Résultats sur bactériophages T2	130
V RÉSULTATS SUR LE MÉDIA PHOTOCATALYTIQUE TRIDIMENSIONNEL.....	135
I CARACTÉRISATION DU SUPPORT TRIDIMENSIONNEL	139
I 1 Mesure de la transmission de la lumière	140
I 2 Mesures de la surface géométrique des mousses de PU	143
I 3 Visualisations de l'effet de « mélangeur statique » de la mousse de PU	148
I 4 Estimations de l'effet protecteur de la couche de polysiloxane sur la mousse de PU	150
I 5 Mesures des pertes de charge de la mousse de PU	154
I 6 Mesure des effets bactéricides au noir des photocatalyseurs métallisés	156
II RESULTATS DE DECONTAMINATION DU MEDIA PHOTOCATALYTIQUE TRIDIMENSIONNEL.....	160
II 1 Tests de décontamination en réacteur tubulaire	161
II 2 Tests de décontamination en réacteur garni	163
VI TRANSFERT ET APPLICABILITÉ EN CONDITIONS RÉELLES.....	177
I Comparaison des différents systèmes en recirculation	177
I 1 Performances en recirculation sans effet de dilution	178
II 2 Performances en recirculation avec effet de dilution	187
II Comparaison des différents systèmes en un passage	198
CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES	201
ANNEXES	205
I Résultats chiffrés	205
II Prise et analyse des clichés microscopiques en épifluorescence.....	208
III Statistiques sur <i>E. coli</i>	211
IV Propriétés du Sivo 110.....	213
LISTE DES TRAVAUX	214
REFERENCES	217

INTRODUCTION

Le traitement de l'air au niveau biologique est devenu depuis quelques décennies une nécessité de santé publique ainsi qu'un enjeu économique de premier plan. Les coûts humains et financiers engendrés par les infections propagées par voie aérienne sont en constante augmentation. Le développement de systèmes de purification de l'air qui soient efficaces, peu coûteux et n'engendrant pas de pollution ou de risques supplémentaires est nécessaire pour faire face à des menaces grandissantes que rappellent les cas réguliers de légionellose, les récentes épizooties de grippe aviaire, ou l'épidémie de tuberculose dont l'ampleur ne cesse de croître. Le traitement de l'air doit suivre le même développement et le même intérêt que le traitement de l'eau afin de permettre la croissance d'une société de plus en plus vouée à s'établir dans des mégalo-poles.

La découverte en 1985 par l'équipe de Matsunaga (Matsunaga, Tomoda *et al.* 1985) des propriétés bactéricides du dioxyde de titane (TiO_2) en suspension aqueuse et illuminé par des ultraviolets (UVA) a lancé une nouvelle voie de décontamination qui suscite un engouement croissant. En effet, par comparaison au nombre limité de méthodes de décontamination existantes, la photocatalyse présente de nombreux avantages. Cette approche permet notamment de ne pas recourir à l'utilisation de produits chimiques ou à des méthodes physiques présentant des risques non négligeables pour les utilisateurs. Ainsi, un traitement relativement souple et modulable en continu et en présence humaine, de l'eau comme de l'air est possible par photocatalyse.

Paradoxalement, alors que l'intérêt porté à des appareils de traitement de l'air par voie « photocatalytique » ne cesse de croître, seule une part très faible des travaux amont de décontamination par voie photocatalytique est consacrée au traitement de l'air. Le nombre restreint d'applications de la photocatalyse à la décontamination biologique de l'air s'explique par le fait que cette thématique est à la croisée de domaines éminemment complexes dans lesquels de nombreuses questions restent en suspens ou sont sujettes à discussion :

- Les bioaérosols et la mécanique de fluides
- La récupération et la quantification des agents infectieux
- La photocatalyse (et ses mécanismes) appliquée à des agents biologiques

De plus, le travail avec des bioaérosols implique des mesures de sécurité lourdes, même pour des agents biologiques non pathogènes, qui ne nécessitent par ailleurs pas de contraintes particulières lors d'un travail en phase aqueuse.

Ce travail de thèse réalisé à l'interface chimie et biologie et qui porte sur la « Décontamination photocatalytique d'un bioaérosol contaminé par *Legionella pneumophila* et autres agents biologiques. Contribution à la conception de dispositifs de décontamination de l'air » a été soumis à un « cahier des charges » tacite. Il a pour objectif, par le biais d'une étude amont en laboratoire assez rare dans ce domaine, d'initier la création de dispositifs grand public de décontamination de l'air avec toutefois comme point fort la prévention des maladies nosocomiales en centre hospitalier, car c'est là que les infections présentent le plus de risque de complications. Ce type d'applications nécessite ainsi des contraintes très sévères :

- L'utilisation exclusive d'ultraviolets dans le domaine proche du visible (UVA $\lambda > 365$ nm) :

En effet, les ultraviolets germicides (UVC) bien qu'utilisés depuis le début du siècle dernier en décontamination sont mutagènes (c'est de là qu'ils tirent leurs propriétés de décontamination) et carcinogènes. Cependant, la décontamination d'air sous flux implique le traitement de débits élevés et donc des temps de passage dans les systèmes de décontamination relativement courts. Leur utilisation présente donc des risques biologiques (formation d'agents biologiques mutants due à des doses sublétales d'irradiation aux UVC) mais surtout un réel danger pour l'utilisateur final.

- L'utilisation préférentielle de photocatalyseurs disponibles commercialement comme matériau de base :

Les coûts moindres liés à l'utilisation des photocatalyseurs commerciaux permettent le développement plus rapide et moins coûteux d'un dispositif ainsi qu'une constance des qualités du matériau.

- Une perte de charge minimale :

Seuls des dispositifs nécessitant une consommation énergétique minimale ou n'entravant pas le bon écoulement de l'air, donc limitant les pertes de charge, peuvent prétendre s'imposer comme système de décontamination à grande échelle.

- L'objectif « 0 » microorganisme viable en sortie de réacteur :

La diminution de la contamination en sortie n'est pas suffisante. En effet, un seul microorganisme peut en théorie être à l'origine d'une infection. Il faut donc viser plus loin, quitte à perdre en efficacité sur la dépollution chimique parallèle. Une attention particulière sera également portée aux risques de contamination liés à la dissémination potentielle de microorganismes stockés à l'intérieur du dispositif photocatalytique.

C'est en suivant ces conditions *sine qua non* que se sont dégagées deux systèmes principaux brevetés (N° 06/08533 et N° en cours d'attribution) bien distincts :

1. un dispositif auto entraîné dans lequel l'air est mû par l'intermédiaire de deux ventilateurs tangentiels intégrés permettant de traiter des débits d'air jusqu'à 200 m³/h. Cet appareil est commercialisé sous le nom de Biowind® (Fig.1) et est destiné pour l'instant principalement aux ambulances et aux salles d'attente.
2. un nouveau média photocatalytique tridimensionnel à intégrer directement dans les systèmes de ventilation en place ou dans des dispositifs mobiles. Grâce à une perte de charge minimale, à la grande surface active ajoutée et à un accroissement des turbulences, ces mousses photocatalytiques permettent de traiter des débits très importants.

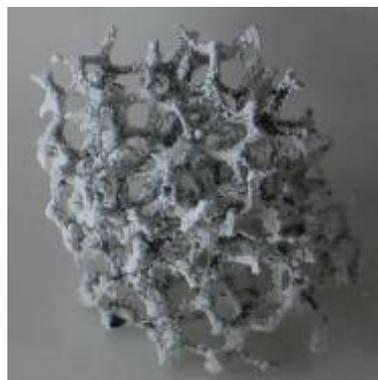


Figure 1. (g.) Dispositif Biowind®.
(d.) « Mousse photocatalytique »
magnifiée 10x

Ces deux concepts ont été validés pour leurs propriétés bactéricides (*Legionella pneumophila*, *Mycobacterium smegmatis*, *Lactococcus lactis*), sporicides (*Bacillus subtilis*) et virocides (bactériophage T2).

Dans ce travail de thèse, l'accent a été mis sur le transfert de technologies, d'études et de compétences développées en amont au laboratoire vers la conception de nouveaux médias et

prototypes de décontamination de l'air. Pour ce faire, différents domaines ont été explorés et étudiés :

- Plusieurs aspects microbiologiques ont été approfondis aussi bien en ce qui concerne la mise en aérosol de microorganismes, leur récupération que les méthodes de numération.
- Le domaine du génie photocatalytique alliant à la fois le design des réacteurs pour l'optimisation de l'illumination et l'amélioration du contact entre les contaminants et la surface active.
- Une approche « matériaux » basée tant sur l'étude de l'amélioration du photocatalyseur en vue d'applications biologiques que sur celle de son dépôt et de sa mise en forme macroscopique.

La première partie de ce mémoire fera tout d'abord un bilan des maladies liées aux bioaérosols, en focalisant notamment sur le cas de la légionellose, et présentera l'état de l'art des différentes méthodes utilisées pour y remédier. Ensuite, les techniques microbiologiques employées pour étudier les bioaérosols seront détaillées, depuis la collecte jusqu'à leur analyse en quantité et en viabilité. Enfin, nous présenterons les aspects photocatalytiques concernés par la décontamination au niveau biologique.

Le second chapitre de ce mémoire sera consacré aux protocoles expérimentaux. Il sera notamment sujet de l'ajout d'argent et de cuivre sur du TiO₂ commercial (P25), et de la fabrication des différents réacteurs. De même, le déroulement des tests de décontamination en mode « un passage » et en mode « recirculation » y sera présenté.

Une troisième partie s'attardera sur quelques considérations préliminaires aux tests de décontamination, à savoir la validation de la technique de coloration avec le kit de mesure de viabilité BacLight™, puisque nous montrerons qu'il existe en effet quelques précautions à prendre du fait de la présence de TiO₂. De plus, cette partie permettra de clarifier quelques hypothèses et quelques concepts qui seront utilisés dans les chapitres suivants.

Les quatrième et cinquième chapitres présenteront les résultats de décontamination respectivement obtenus avec les différentes géométries de réacteurs et avec le garnissage photocatalytique tridimensionnel, lequel y sera aussi caractérisé en détail.

Enfin, le dernier chapitre de ce mémoire consistera en l'extrapolation des résultats obtenus à la décontamination d'une pièce, puisque c'est l'objectif final des dispositifs de décontamination photocatalytiques développés.

I BIBLIOGRAPHIE

Ce chapitre va tout d'abord permettre de faire l'état des lieux des problèmes de santé publique liés aux bioaérosols et présenter les différentes techniques utilisées à l'heure actuelle pour y remédier. Une seconde partie sera l'occasion de montrer un aperçu des méthodes employées pour récupérer des microorganismes aérosolisés, et quantifier leur viabilité et leur nombre. En effet, la validité des résultats obtenus lors de tests de décontamination est tributaire de la précision et de la justesse de ces méthodes et il est donc important de s'y attarder. Enfin, nous présenterons succinctement la photocatalyse en focalisant notamment sur la partie située à l'interface avec la microbiologie.

I ASPECTS MICROBIOLOGIQUES

I 1 Données sur la contamination microbiologique de l'air

La connaissance du niveau de contamination biologique de l'air est une donnée essentielle dans un projet consistant à étudier la photocatalyse comme procédé de traitement de l'air et à développer des dispositifs de décontamination destinés à différents types de milieux. Il convient de distinguer le milieu médical qui contient à la fois les patients immunodéprimés et de nombreuses sources potentielles d'infections des autres domaines à traiter (écoles, bureaux, appartements...).

I 1.1 Les maladies nosocomiales

Le CDC (« Center for Disease Control », Atlanta, USA) a publié en 1996 un rapport (CDC 1996) portant sur 10 ans de suivi des maladies nosocomiales aux États-Unis (Fig. 2). Près de 3/4 concernent des maladies liées au contact direct avec les agents infectieux. On estime entre

10 % et 15 % la part des pneumonies dans les maladies nosocomiales (Eickhoff 1994; Durmaz, Kiremitci *et al.* 2005) la plupart étant liée à des bioaérosols (Tang, Li *et al.* 2006).

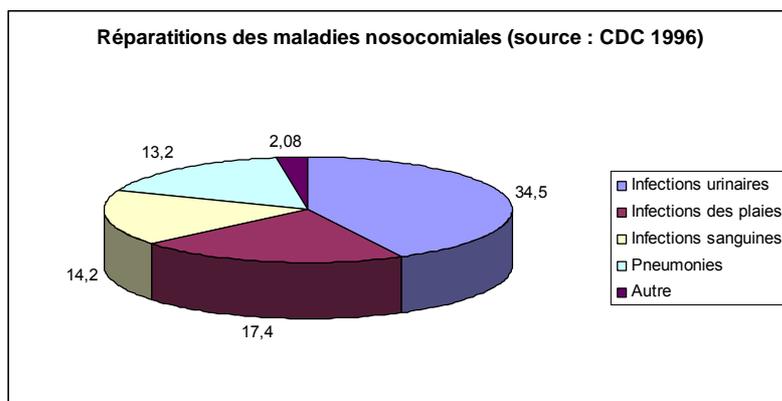


Figure 2. Répartition des maladies nosocomiales en 1996 aux États unis. Rapport du CDC.

Greene et ses collaborateurs ont publié en 1962 les résultats de mesures obtenues dans deux hôpitaux américains sur 15 mois (Greene, Vesley *et al.* 1962; Greene, Vesley *et al.* 1962). Cependant, ne bénéficiant pas des techniques actuelles d'identification, cette étude était avant tout qualitative.

Kowalski a présenté un résumé des agents pathogènes aéroportés (Tab. 1) rencontrés dans les hôpitaux et source de maladies nosocomiales, i.e. apparaissant (et étant diagnostiquées) entre 48 heures après l'admission et 30 jours après la sortie (Kowalski 2007).

Nom	Cas/an
Virus Influenza A	2000000
Virus de la rougeole	500000
<i>Streptococcus pneumoniae</i> (+)	500000
<i>Streptococcus pyogenes</i> (+)	213962
Virus syncytial respiratoire	75000
Virus de la varicelle Zoster	46016
Virus Parainfluenza	28900
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (m)	20000
<i>Bordella pertussis</i> (-)	6564
Virus Rubella	3000
<i>Staphylococcus aureus</i> (+)	2750
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (-)	2626
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (-)	1488
<i>Legionella pneumophila</i> (-)	1163
<i>Haemophilus influenzae</i> (-)	1162
<i>Histoplasma capsulatum</i> (fs)	1000
<i>Aspergillus</i> (fs)	666
<i>Serratia marcescens</i> (-)	479
<i>Acinetobacter</i> spp. (-)	147
<i>Corynebacterium diphtheriae</i> (-)	10
SARS virus	10

Tableau 1. Nombre de cas annuels mondiaux des principales maladies nosocomiales aéroportées et agents responsables. (+)/(-) : bactérie à Gram (+) ou (-). m : mycobactérie. fs : spore fongique.

I 1.2 Le niveau de contamination de l'air

Le niveau de contamination de l'air hospitalier

Peu de publications ou de rapports présentent le niveau de contamination de l'air à l'hôpital notamment à cause de la difficulté que présentent ces mesures. Greene et ses collaborateurs

ont estimé en 1962 une contamination moyenne par hôpital d'environ 700 CFU.m⁻³ (dont 17 % soit 120 CFU.m⁻³ étant des moisissures) (Greene, Vesley *et al.* 1962). Holcatova (Holcatova, Bencko *et al.* 1993) a présenté des mesures conduisant à une contamination bactérienne comprise entre 150 et 250 CFU.m⁻³ d'air. Des mesures de la contamination fongique indiquent une concentration entre 175 et 1396 spores par m³ d'air (Tormo, Gonzalo *et al.* 2002). Kowalski (Kowalski 2007) présente quant à lui des valeurs comprises entre 19 et 207 CFU.m⁻³ pour les bactériens et entre 9 et 194 CFU.m⁻³ pour les moisissures. Des valeurs plus élevées ont été mesurées dans un hôpital de Singapour (>500 CFU.m⁻³) (Obbard et Fang 2003).

En plus des variations évidentes dues aux différences d'époques et d'endroits où ont été réalisées ces mesures, il convient de prendre en compte les différences méthodologiques. Une partie de cette étude bibliographique concerne la métrologie des bioaérosols et expliquera les variations importantes observées entre les équipes de recherche. Étonnamment, il semble n'y avoir que très peu de données concernant l'Europe.

Le niveau de contamination de l'air non hospitalier

Même si le milieu médical reste le domaine le plus sensible, car touchant des sujets fragilisés, les applications de décontamination de l'air ne s'y limitent pas. En effet, la part des maladies acquises en « communauté » est de loin la plus importante numériquement.

Schillinger *et al.* indiquent, pour des bureaux américains, des valeurs comprises entre 44 et 150 CFU.m⁻³ pour les bactériens et entre 42 et 110 CFU.m⁻³ pour les moisissures (Schillinger, Vu *et al.* 1999). Une étude plus récente (Hui, Wong *et al.* 2007) basée sur 290 bureaux à Hong-Kong fournit, pour les bactériens, des valeurs comprises entre 204 et 2418 CFU.m⁻³ avec une moyenne de 703. Une autre étude de cette ampleur menée dans 100 bâtiments publics américains de 25 états sur 4 ans (Tsai et Macher 2005) donne une contamination bactérienne maximale de 474 CFU.m⁻³.

Awad présente des valeurs de loin plus élevées pour des classes en Égypte : 5500 CFU.m⁻³ pour les bactériens et 300 CFU.m⁻³ pour les moisissures (Awad 20XX). Il a aussi réalisé des mesures dans le métro du Caire (Awad 2002) et fournit des valeurs autrement plus inquiétantes : près de 80000 CFU.m⁻³ en station souterraine.

Concernant des logements privés, une étude japonaise indique des valeurs de l'ordre de 500 CFU.m⁻³ (Shin'ichiro et Naoki 2006).

On voit que les valeurs obtenues sont – de façon évidente - très dispersées. Cependant, on pourra considérer (notamment pour les calculs) une valeur « cible » de 10000 CFU.m⁻³ d'air à traiter. Notons que de la même façon que pour le milieu médical, il semble n'exister que très peu de données publiées sur la contamination biologique de l'air concernant l'Europe.

Nous allons maintenant présenter plus en détail les agents biologiques sur lesquels ont porté les travaux de cette thèse ainsi que les maladies occasionnées par des microorganismes qui leur sont proches.

I 2 Les agents biologiques aéroportés et les maladies associées

I 2.1 *Legionella* spp.

La bactérie et ses caractéristiques

La bactérie *Legionella pneumophila* a été découverte il y a plus de 50 ans. Néanmoins, son intérêt a pris de l'ampleur en 1976 lorsqu'une épidémie « mystérieuse » survenue lors du 28^{ème} congrès de l' American Legion Convention à Philadelphie, fit périr 29 personnes. On mit en évidence que *Legionella* était un pathogène à l'origine d'une pneumonie sévère pouvant entraîner la mort, la légionellose (Fraser, Tsai *et al.* 1977) (Fig. 3).



Figure 3. Vue au microscope électronique à balayage (MEB) de *L. pneumophila*. (Source : Center for Disease Control, CDC, Atlanta, USA).

Les protéobactéries du genre *Legionella* sont des bacilles à Gram négatif d'environ 2 µm de long dont on connaît 39 espèces pathogènes qui se déclinent en 60 sérogroupes (Peake, James *et al.* 1996; Fields, Benson *et al.* 2002). *Legionella pneumophila* étant responsable de 85 % des légionelloses (Chéron 2006), c'est elle qui est donc la plus représentative de cette maladie et qui nous servira de bactérie modèle pour l'ensemble du genre *Legionella*. Elles sont mobiles grâce à un ou plusieurs flagelles polaires et possèdent de nombreux pilis.

Les légionelles se développent particulièrement dans les eaux stagnantes dont la température est comprise entre 25 °C et 43 °C (Chéron 2006). Ce pathogène est donc dans les réservoirs d'eau et dans les canalisations où l'eau circule peu. Ces bactéries sont des parasites facultatifs d'amibes et de protozoaires et peuvent se multiplier dans les macrophages et déjouer les procédés de lyse, conduisant à la mort de la cellule parasitée (Fields 1996).

Tableau clinique

De façon assez étonnante, une infection provoquée par *Legionella pneumophila* peut avoir deux issues médicales très distinctes (Berbecar 1997) :

- La maladie du légionnaire, pneumonie sévère d'une période d'incubation de deux à dix jours dont la gravité peut varier d'une forme bénigne à une pneumonie multi lobaire entraînant la mort dans 15 % des cas pour des sujets préalablement sains, jusqu'à 70 % pour des sujets immunodéprimés.
- La fièvre de Pontiac, nom de la ville du Michigan où a eu lieu la première épidémie reconnue de ce type associée aux légionelles. Il s'agit d'une maladie respiratoire ressemblant à une sévère grippe associée à de violents maux de tête et des douleurs musculaires importantes. Il n'y a pas de cas de décès connus en Europe liés uniquement à cette variante d'une infection par légionelles.

La légionellose est une des dix maladies à déclaration obligatoire en France depuis 1987 tout comme dans la plupart des pays. Brown et Lerner estiment que les légionelles pourraient être à l'origine de 2 à 15 % des « pneumonies acquises en communauté », c'est-à-dire hors du milieu hospitalier, et nécessitant une intervention et des soins (Brown et Lerner 1998). Les légionelles pourraient ainsi se situer en quatrième position après *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* et *Chlamydia spp*, comme cause de pneumonies acquises en communauté.

Mode de transmission

Les légionelles colonisent naturellement à peu près tous les réservoirs naturels d'eau douce tempérée. C'est en fait une fois aérosolisées qu'elles présentent un risque, lorsqu'elles sont inhalées et pénètrent jusque dans les alvéoles pulmonaires. Les sources de bioaérosols de légionelles sont en fait principalement anthropiques (Chéron 2006):

- Tours de refroidissement aéroréfrigérées (TAR) (Negron-Alvira, Perez-Suarez *et al.* 1988)
- Tours des centrales nucléaires (AFFSET 2006)
- Douches (Bollin, Plouffe *et al.* 1985) et activités d'arrosage
- Piscines et bains à remous (Chéron 2006)

Les légionelles ainsi aérosolisées peuvent parcourir jusqu'à 6 km en restant infectieuses (Nguyen, Ilef *et al.* 2006), ce qui représente en milieu dense urbain un nombre de victimes potentielles très important. Il est primordial de préciser qu'il n'y a pas de contamination entre personne : sans eau contaminée source de bioaérosol, il n'y a pas de contamination (Peake, James *et al.* 1996).

Épidémiologie

Le *European Working Group for Legionella Infections* (EWGLI) a été créé en 1986 pour réunir les données attenantes à la surveillance de la légionellose en Europe. Ce groupe de travail, principalement financé par l'*European Centre for Disease Prevention and Control* (ECDPC), traite des observations de la légionellose faites dans 35 pays et porte sur 550,8 millions d'habitants. Les données présentées par la suite sont issues du rapport de Ricketts et Joseph (Ricketts et Joseph 2007) :

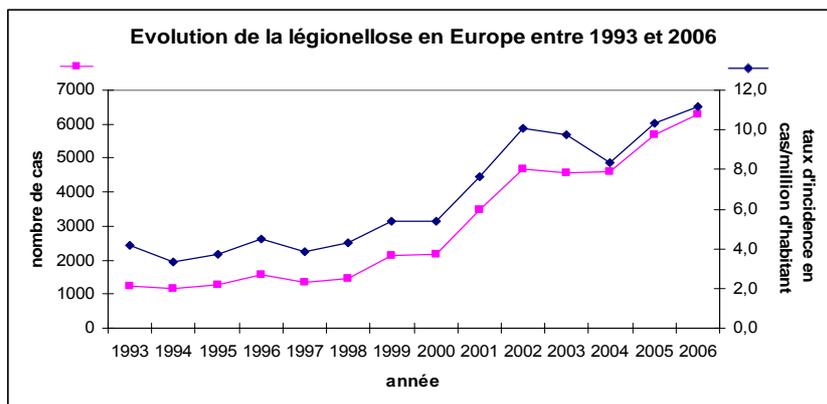


Figure 4. Évolution du nombre de cas européens annuels de légionellose et taux d'incidence associés. (Ricketts et Joseph 2007).

On peut constater sur la figure 4 une augmentation du nombre de cas déclarés et du taux d'incidence entre 1993 et 2006. Il est cependant délicat d'en conclure qu'il s'agit uniquement d'un plus grand nombre d'infections, car l'amélioration du dépistage et de la détection est aussi à prendre en compte dans cette augmentation apparente qui suggère au moins une sous-estimation jusque-là de l'importance de ces infections.

Une autre information importante du rapport européen de surveillance de la légionellose est la distribution entre pays de l'Union Européenne (Tab. 2). En effet, on peut noter de fortes disparités qui sont, au même titre que l'augmentation globale de l'incidence, difficiles à relier uniquement à un nombre de cas plus important :

	Pop. en millions	2005		2006	
		Nombre de cas	taux d'incidence en cas/million	Nombre de cas	taux d'incidence en cas/million
Belgique	10,5	175	16,7	230	21,9
Danemark	5,4	114	21,1	127	23,5
Angleterre+P. de Galles	53	340	6,4	544	10,3
France	62,6	1527	24,4	1140	18,2
Allemagne	82,4	459	5,6	484	5,9
Italie	58,5	869	14,9	800	13,7
Pays-Bas	16,3	273	16,7	440	27,0
Espagne	43,7	1229	28,1	1312	30,0
Suède	9,1	88	9,7	108	11,9
Suisse	7,5	157	20,9	176	23,5

Tableau 2. Évolution entre 2005 et 2006 par pays de l'Union Européenne des cas de légionellose et des taux d'incidence associés. (Ricketts et Joseph 2007).

A titre comparatif, le « Center for Disease Control » (CDC) basé à Atlanta, Georgie, U.S.A., pendant américain du ECDPC estime entre 8000 et 18000 cas de Légionellose par an (http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaseinfo/legionellosis_t.htm), soit pour une population de 301 millions d'habitants fin 2006, un taux d'incidence de 43,2 cas par million d'habitants alors qu'il n'est que de 11,2 en Europe pour la même période !

Réglementation

De très nombreuses fiches informatives existent afin de prévenir la prolifération des légionelles que ce soit à titre professionnel ou à titre individuel. Les actions à entreprendre dépendent en fait de la concentration en légionelles, à différents points de prélèvements (Barbaree, Gorman *et al.* 1987) dans l'eau, qui risque de produire un bioaérosol contaminé par des légionelles (Tab. 3) :

	Tours AéroRéfrigérées (T.A.R.) (en <i>Legionella</i> sp.)	Réseau d'eau chaude sanitaire et autres installations à risque (en <i>Legionella pneumophila</i>)
Niveau cible	< 1 000 UFC/L	< 1 000 UFC/L
Mesures associées	Mesures d'entretien et de surveillance normales	Mesures d'entretien et de surveillance normales
Niveau d'alerte	≥ 1000 UFC/L	≥ 1000 UFC/L
Mesures associées	Mesures nécessaires pour abaisser la concentration (désinfection) et renforcement de la surveillance	Renforcement des mesures d'entretien et de surveillance
Niveau d'action	≥ 100000 UFC/L	≥ 100000 UFC/L
Mesures associées	Arrêt, vidange, nettoyage et désinfection Information de la DRIRE	Interdiction des usages à risques Mesures curatives immédiates

Tableau 3. Actions en cas de contaminations par des légionelles. Recommandations du Conseil Supérieur d'Hygiène Publique de France - Avril 2002.

- Mesures curatives immédiates

Concernant les réseaux de distribution d'eau chaude, il est recommandé d'augmenter la température de l'ensemble du réseau d'eau chaude à plus de 70 °C pendant au moins 3 jours et de laisser s'écouler l'eau pendant 30 min quotidiennement à l'ensemble des points de prélèvements habituels. Néanmoins, Mouchtouri (Mouchtouri, Velonakis *et al.* 2007) a montré que ce traitement thermique seul n'est pas suffisant et qu'il faut l'associer à une chloration substantielle de 100 ppm pendant au moins 12 heures comme déjà suggéré il y a 20 ans par Muraca (Muraca, Stout *et al.* 1987).

Pour les tours aérorefrigérées, un arrêt du fonctionnement, une vidange et une désinfection sont obligatoires quand le seuil de 100000 UFC/L est atteint et la *Direction Régionale de l'Industrie de la Recherche et de l'Environnement* (DRIRE) doit en être informée (Recommandations du Conseil Supérieur d'Hygiène Publique de France –Avril 2002).

- Mesures préventives continues

En fait, ces méthodes concernent le traitement amont de l'eau et non pas le traitement des bioaérosols, qui constituent pourtant la dernière étape avant la contamination. On peut donc y voir un réel potentiel synergique entre le traitement de l'eau et le traitement de l'air dans le domaine de prévention de la légionellose. On peut notamment citer l'utilisation d'UVC germicides (Antopol et Ellner 1979; Knudson 1985; Muraca, Stout *et al.* 1987), de méthodes de sonication (Blume 2002), l'utilisation de produits chimiques (chlore, ions argent...) (Kim, Anderson *et al.* 2002) et bien sûr la photocatalyse (Rincon et Pulgarin 2004).

Rappelons, pour conclure, que la légionellose ne se transmettant pas d'humain à humain, il est suffisant de supprimer la source du bioaérosol. C'est ainsi que le traitement de l'eau est une voie très efficace et parfois suffisante. Néanmoins, ce sont les zones d'un réseau d'eau les moins utilisées qui présentent le plus de risque, car ce sont aussi elles qui sont souvent les moins bien entretenues. Or, une seule source dans un rayon de 6km peut suffire à provoquer un épisode de légionellose (Nguyen, Ilef *et al.* 2006). Le traitement de l'air reste donc nécessaire dans la prévention de la légionellose. En outre, ceci est d'autant plus vrai pour des maladies se transmettant d'humain à humain par bioaérosol (Yildiz et Fitnat 2007).

I 2.2 Autres microorganismes d'intérêt

Les microorganismes à l'origine de maladies transmises par voies aériennes sont de compositions chimiques et de tailles extrêmement différentes. Il nous a donc paru crucial de réaliser les tests de décontamination de bioaérosols par photocatalyse en essayant d'utiliser des représentants des agents pathogènes les plus typiques et aussi divers que possible.

La résistance à l'oxydation photocatalytique des microorganismes semble suivre l'ordre général suivant (Huang, Maness *et al.* 2000; Ibanez, Litter *et al.* 2003) :

Virus < Bactéries < Mycobactéries < Spores de champignons < spores de bactéries

Cependant, en plus de ces variations dues aux différentes compositions chimiques, le traitement de l'air à haut débit laisse une part très importante à l'aérodynamique des microorganismes dans le réacteur qui est liée à leur forme et à leur taille et à est donc un autre point important à considérer.

Différence structurale des bactéries Gram +/ Gram –

De façon historique, les bactéries sont divisées en deux principaux groupes selon la composition de leur paroi, laquelle peut être mise en évidence par la coloration mise au point à la fin du XIXe par Hans Christian Gram. Cette coloration consiste à teinter avec une solution phénolique de cristal violet toutes les bactéries. Le cristal violet est ensuite précipité à l'intérieur des bactéries avec du Lugol (solution d'iodure de potassium et de diiode) en un complexe bleu. C'est seulement en lavant les bactéries avec de l'éthanol à 96 % qu'apparaît une différence de coloration : les bactéries à Gram (+) ont une membrane épaisse que l'alcool ne traverse pas suffisamment pour pouvoir solubiliser le complexe lugol-cristal violet. Les bactéries à Gram (–) ont, par contre, une paroi plus fine (mais plus complexe) que l'alcool traverse : il décolore les bactéries.

Du point de vue de la structure et de la composition (Figs. 5 et 6), on peut distinguer, dans les deux types de cellules, la présence d'une membrane (cyto)plasmique qui délimite l'intérieur de la cellule. Celle-ci est principalement composée d'une double couche de phospholipides (PL) (deux chaînes d'acide gras et un groupe phosphate relié à une molécule de glycérol) et de protéines assurant et régulant les échanges entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule (Fig. 5). Les bactéries à Gram (+) et à Gram (-) possèdent toutes deux une couche de peptidoglycane (PG) (polymère composé de N-acetylglucosamine (NAG) et d'acide N-acetylmuramique (NAM) reliés entre eux par des acides aminés) mais celle-ci est nettement

plus épaisse chez les bactéries à Gram (+) (20 nm – 80 nm) que chez celles à Gram (-) (10 nm).

Par contre, seules les bactéries à Gram (+) possèdent des acides téichoïques (AT) et lipotéichoïques (ALT), alors que les bactéries à Gram (-) se différencient par la présence d'une membrane externe composée elle aussi d'une double couche de PL mais contenant des lipopolysaccharides (LPS). Les LPS, aussi appelés endotoxines, sont des molécules complexes en grande partie responsables de l'immunogénicité bactérienne.

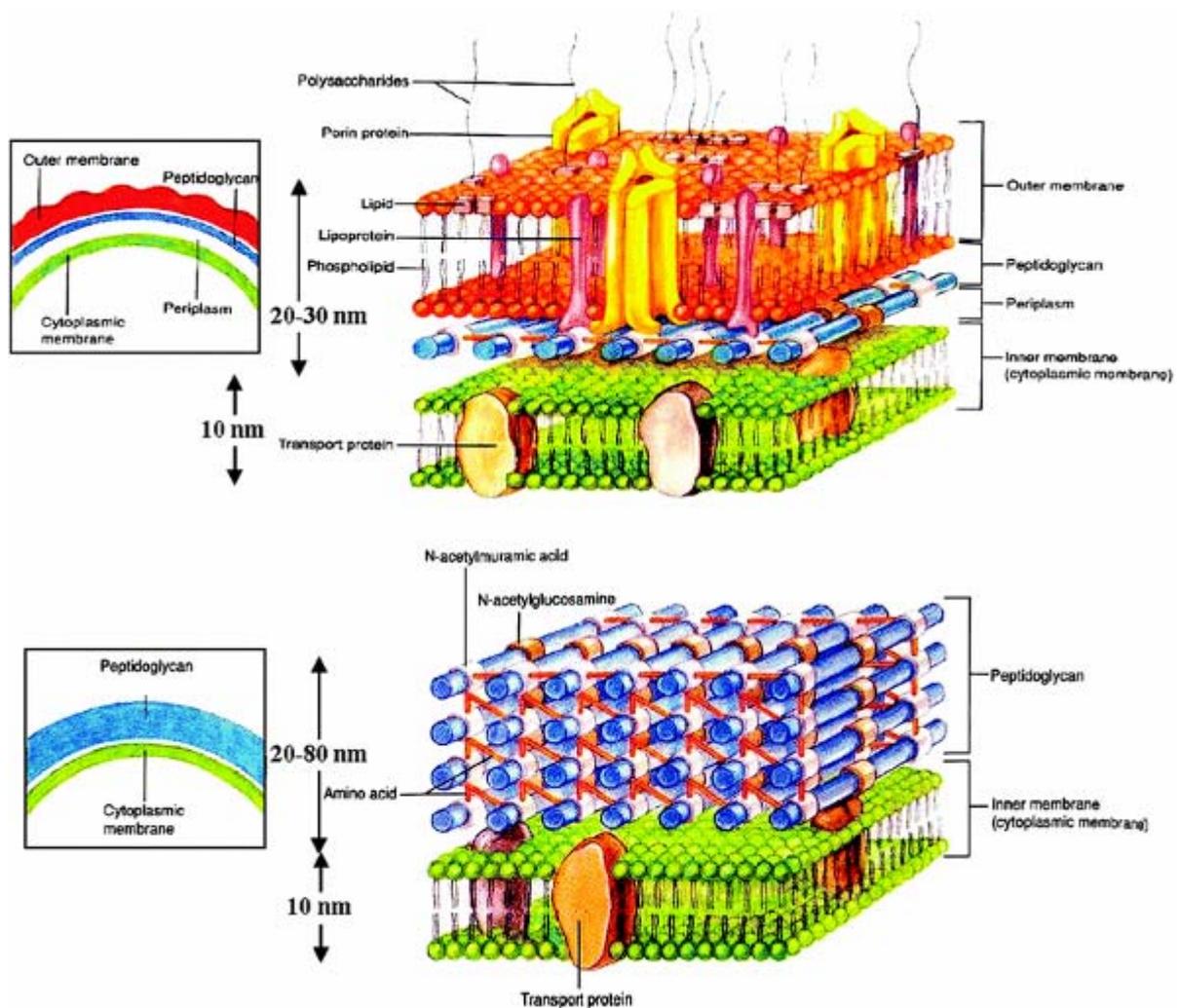


Figure 5. Différence de composition de la paroi de bactéries à Gram (-) (h.) et les bactéries à Gram (+) (b.).

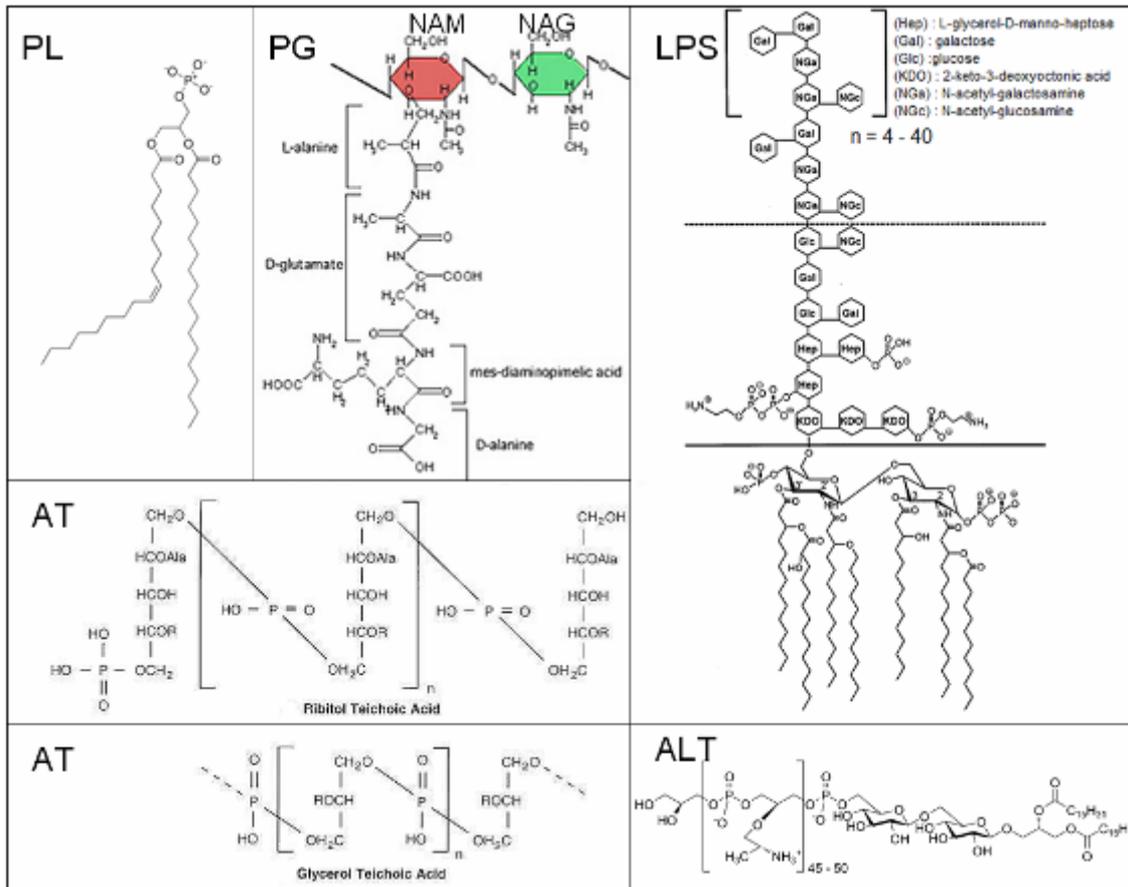


Figure 6. Exemples de structures chimiques de quelques molécules contenues dans les membranes bactériennes. (Légende : voir texte).

Cette séparation en deux groupes trouve une justification au niveau structural bien qu'il existe de nombreuses bactéries qui ne peuvent être classées dans un de ces deux groupes (mycobactéries...). C'est néanmoins un critère utile pour la photocatalyse dans la mesure où la membrane est la première barrière à l'oxydation photocatalytique (Sunada, Watanabe *et al.* 2003; Nadtochenko, Rincon *et al.* 2005).

Bactériens à Gram + : *Lactococcus lactis*

Comme indiqué dans le tableau 1, les deux bactéries responsables du plus grand nombre de pneumonies sont du genre *Streptococcus* (Fig. 7). Il s'agit de bactéries à Gram (+), diplocoques (i.e. qui se retrouvent accolées à deux à deux).

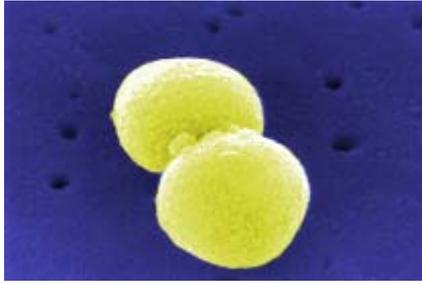


Figure 7. Vue au MEB de *S. pneumomniae*. (Source : Center for Disease Control, CDC, Atlanta, USA).

S'agissant du même genre que *S. pneumonia* et *S. pyogenes*, *Lactococcus lactis* (anciennement classé *Streptococcus lactis*) nous a semblé tout à fait adapté pour représenter ces deux agents pathogènes.

Bactériens à Gram - : *Legionella pneumophila*

La plupart des bactéries pathogènes sont à Gram (-) (Tab. 1) et *Legionella pneumophila* nous a paru être un représentant adéquat pour ce type de microorganismes parmi lesquels on peut notamment citer comme posant un problème de façon assez récente *Acinetobacter baumannii* (Fig. 8). Cette bactérie est proche de *Legionella* en composition et en taille, et certaines souches sont devenues particulièrement résistantes aux antibiotiques (Po-Ren Hsueh 2002), notamment depuis la guerre du Golfe. Cette bactérie peut provoquer chez les patients immunodéprimés méningites et pneumonies avec une très forte mortalité (Bergogne-Berezin et Towner 1996) et une transmission par bioaérosol est soupçonnée depuis longtemps.

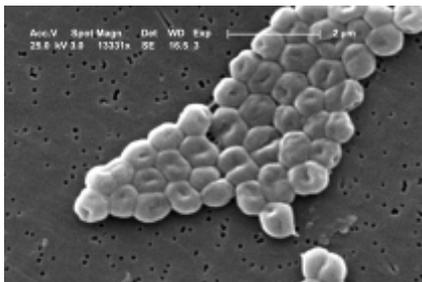


Figure 8. Vue au MEB de *A. baumannii*. (Source : Center for Disease Control, CDC, Atlanta, USA).

Spores bactériennes : *Bacillus subtilis*

Bacillus subtilis (reclassé *Bacillus atrophaeus* (Fritze et Pukall 2001)), est un bacille à Gram (+) d'une taille de l'ordre du micromètre. C'est cependant sous sa forme sporulée qu'elle est la plus intéressante pour nos tests :

- La spore bactérienne est l'une des formes biologiques les plus résistantes, que ce soit aux rayonnements, aux désinfectants chimiques ou à la chaleur (Deasy, Kuster *et al.* 1970; Atrih et Foster 2002; Horneck 2006). Elle n'est pas, sous cette forme,

biologiquement active, mais par contre elle demeure très stable dans le temps. Cette spore possède donc l'avantage de pouvoir être utilisée comme un réactif chimique classique. C'est donc une excellente cible pour les tests photocatalytiques, comme elle l'est déjà pour les tests de stérilisation par voie sèche (norme EN 866-2).

- Il a été montré que c'est un modèle adéquat pour simuler les spores de *Bacillus anthracis* (Fig. 9), plus communément appelé anthrax, lors de tests de décontamination par UVC (Nicholson et Galeano 2003). Les épisodes récents des lettres piégées aux États-Unis ont en effet montré que les menaces bioterroristes étaient une réalité à prendre en compte. Les spores de *B. anthracis* étant très résistantes, elles se prêtent très bien à une utilisation comme arme en bioaérosol. Elles provoquent la « maladie du charbon » dont les complications peuvent être mortelles sans traitement immédiat (Peake, James *et al.* 1996).



Figure 9. Vue au MEB de spores de *B. anthracis*. (Source : Center for Disease Control, CDC, Atlanta, USA).

Mycobactéries : *Mycobacterium smegmatis*

Mycobacterium smegmatis est une mycobactérie non pathogène mais qui est un très bon modèle pour simuler *Mycobacterium tuberculosis* (Fig. 10), agent principal bien connu de la tuberculose depuis 1882 après la découverte de cet agent par l'allemand Robert Koch. Les autres mycobactéries pouvant provoquer la tuberculose sont : *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium africanum* et *Mycobacterium microti*. Le principal mode de transmission est la voie aéroportée, d'une personne infectée à une autre. Ce qui est peut être moins connu en revanche, c'est l'étendue de cette maladie à travers le monde : l'Organisation Mondiale de la Santé estime qu'un tiers de la population mondiale est infectée et qu'une personne de plus l'est chaque seconde. Parmi tous ces cas, 9 millions développent la tuberculose (notamment les immunodéprimés) et 1,6 million de personnes en meurent chaque année (WHO 2007).

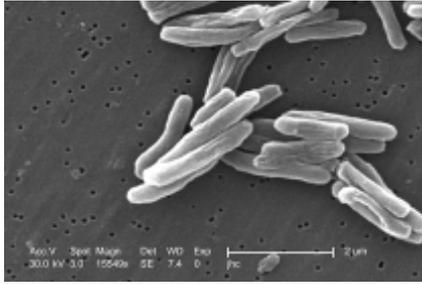


Figure 10. Vue au MEB de *M. tuberculosis*. (Source : Center for Disease Control, CDC, Atlanta, USA).

Le vaccin BCG (bacille de Calmette et Guérin - une souche vivante atténuée de *Mycobacterium bovis*, proche de *M. tuberculosis*), protège bien les enfants, mais les adultes dans un cas sur deux seulement. Et de plus en plus de souches sont devenues multi résistantes, ce qui rend nécessaire une action au niveau du mode de transmission, notamment au niveau des hôpitaux. Une étude de la BBC estime en effet à 2000\$ le coût des soins d'une tuberculose classique et à 250.000\$ celui d'une tuberculose multi résistante.

(http://news.bbc.co.uk/2/hi/health/medical_notes/100618.stm).

Virus : bactériophage T2

Les plus grandes menaces biologiques en termes de rapidité de propagation et de nombre de personnes touchées semblent actuellement provenir des virus (Tab. 1). Les viroses telles que le SARS (première pandémie du XXIe siècle), qui a provoqué d'après l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) en 2003 916 décès de par le monde ou le virus H5N1, le virus de la « grippe aviaire », en sont deux exemples particulièrement inquiétants.

Chaque année, les épidémies de grippe dues au virus *Influenza* seraient selon l'OMS (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs211/en/>) responsables de 3 millions de cas sévères de grippe et de 250 000 à 500 000 décès. De plus, ces épidémies annuelles ont un coût exorbitant pour la société. Une des voies de transmission de la grippe sont les postillons, de même que pour les gastroentérites dues à certains norovirus. Il est à noter que les gastroentérites (toutes origines confondues) ont encore été responsables en l'an 2000 de 1,5 million de morts sur la planète et constituent, elles aussi, une des épidémies saisonnières les plus onéreuses.

Il y a peu de travaux concernant les bioaérosols bactériens, mais il y en a encore moins concernant les bioaérosols viraux. Ceci a une raison, somme toute, assez simple : les virus sont des entités à la limite du monde « vivant ». Ils sont des parasites obligatoires qui plus est spécifiques de leur hôte. Ainsi, ils n'ont pas de métabolisme propre et ne se reproduisent pas

en dehors d'une cellule hôte. Ainsi, la seule quantification (à quelques exceptions près) de la charge virale d'un échantillon passe par une mesure indirecte : le nombre d'infections provoquées. Pour des bactériophages, cette mesure indirecte correspond au nombre de plages de lyse dans un tapis bactérien et pour des virus animaux, à la « dose létale 50 », LD50, dilution pour laquelle on obtient une mortalité de plus de 50 % des individus.

De ce fait, on comprend aisément que les études sur la transmission de virus anthropiques restent surtout d'ordre qualitatif (mode de transmission : par sécrétions, par contact, par aérosolisation...) et épidémiologique. Ceci nécessite des conditions de sécurité drastiques, ce qui n'est pas le cas avec les bactériophages puisqu'ils n'infectent que les bactéries.

Au niveau de la désinfection virale (par voie chimique), on sait que les petits virus nus sont plus résistants que les gros virus enveloppés (Moorer 2003). Ces derniers doivent d'abord fusionner leur enveloppe avec la cellule hôte et observer certaines transformations avant d'être infectieux, alors que chez les virus nus, la capsid sert uniquement à pénétrer dans l'hôte. Dès que l'enveloppe est abîmée, il n'y a plus de fusion possible.

Comme Washam (Washam, Black *et al.* 1966), nous avons choisi le bactériophage T2 (virus nu) comme modèle pour les virus, car c'est un petit bactériophage (capsid : 65x80 nm, queue : 120x20 nm). Avec une taille de l'ordre de grandeur des principaux virus aéroportés d'intérêt (Rhinovirus 30 nm, Influenza 100 nm, SRAS 80-160 nm (Zhang, Cui *et al.* 2003)) il répond donc aux exigences aérodynamiques de nos tests. De plus, il est aisé de les dénombrer par la méthode des plages de lyse (voir méthodes microbiologiques, § II.2 Comptage des virus) ou du nombre le plus probable (MPN) (Kott 1966).

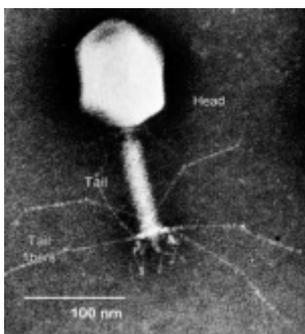


Figure 11. Vue au MEB d'un virus T4 (les virus T2 font partie de cette famille). (Source : CDC, Atlanta, USA).

I 3 État de l'art des dispositifs de traitement de l'air au niveau biologique

Le traitement de l'air au niveau biologique est un domaine assez récent. Jusque-là, il était surtout réservé aux salles particulièrement sensibles, comme les salles de transplantation. Cependant, avec l'amélioration de la qualité de vie et la prise de conscience des risques dus aux agents pathogènes aéroportés, le traitement de l'air est devenu une nécessité globale aussi bien dans les environnements professionnels, collectifs que domestiques. De plus, l'intensification des échanges longues distances rend les risques de propagation de maladies d'autant plus probables.

Il existe de nombreuses techniques de traitement de l'air et il convient de différencier deux concepts : le traitement de l'air d'une pièce « en recirculation » et le traitement de l'air « en un passage » (*one-pass*). Ce dernier nécessite en effet un procédé d'autant plus efficace que le temps de passage dans le système de décontamination est court du fait des débits élevés à traiter. De plus, il ne doit donc pas provoquer de pertes de charge excessives.

Ultraviolets germicides

Comme déjà évoqué, bien qu'il existe de nombreux dispositifs basés sur les UVC pour le traitement de l'air (Beggs, Noakes *et al.* 2006), les applications à haut débit posent le problème d'imposer des temps de passage très courts. Ceci peut résulter en des doses sublétales qui sont premièrement inefficaces du point de vue de la décontamination, mais en plus, ceci pose des questions d'ordre environnemental et de santé publique puisque ces doses sublétales peuvent aboutir à la formation d'organismes mutants. Enfin, les rayonnements UVC sont carcinogènes et nécessitent une utilisation précautionneuse et une maintenance par des professionnels.

Filtration

La filtration est sans doute la méthode la plus simple pour prétraiter l'air arrivant dans une pièce et permet d'obtenir de très grandes efficacités (Washam, Black *et al.* 1966). Initialement développés pour éviter la dissémination de particules radioactives lors du projet Manhattan, les filtres à « haute efficacité » sont devenus un standard. On distingue notamment (ISO 14644):

- Les filtres HEPA (High Efficiency Particulate Air) : ils doivent retenir 99,97 % de particules avec un diamètre de 0,3 μm
- Les filtres ULPA (Ultra-Low Penetration Air) : ils doivent retenir plus de 99,999 % de particules avec un diamètre supérieur à 120 nm

Une augmentation de l'efficacité du filtre se traduit par une augmentation des pertes de charge et donc par une augmentation des coûts énergétiques. Cette méthode n'est cependant qu'une barrière sur laquelle les microorganismes s'accumulent et ne sont pas détruits. Par conséquent, les filtres sont rarement utilisés seuls, car cette accumulation pourrait présenter des risques en cas de rupture et conduit progressivement à une augmentation significative des pertes de charge. On y adjoint souvent des UVC pour inactiver les microorganismes piégés à la surface du filtre. Ainsi, bien que la filtration soit possible de façon continue et en présence humaine, les pertes de charge et le colmatage progressif des filtres occasionnent une augmentation rapide des coûts d'entretien et de maintenance, en plus d'une accumulation de microorganismes potentiellement pathogènes.

Nébulisation

Le principe de cette technique récente de désinfection est de former un « brouillard sec » composé principalement de peroxyde d'hydrogène, très oxydant, qui se maintient longtemps dans l'air et se dépose lentement sur les surfaces grâce à une granulométrie adéquate (Hager 2000). Cette méthode ne peut cependant pas être utilisée en présence humaine et reste un traitement ponctuel qui nécessite l'emploi de produits chimiques.

Plasma froid

Cette autre technique consiste à créer un plasma entre deux électrodes qui va former des formes réactives de l'oxygène (FRO) (« Reactive Oxygen Species », ROS) permettant aussi de désinfecter l'air ainsi traité (Roth 2005; Taylor et Kuennen 2005; Müller et Zahn 2007). Cette technique, bien que très intéressante, car permettant un traitement en continu et en présence humaine, possède néanmoins quelques désavantages majeurs comme la formation d'ozone. De plus, son coût, sa taille et surtout sa maintenance ne permettent pas d'envisager cette technique à grande échelle.

Ionisation

Cette méthode de séparation consiste à créer des ions négatifs qui vont charger les microorganismes dans l'air. Ceux-ci se déposent ensuite électrostatiquement sur les surfaces, ce qui nécessite alors un post traitement des surfaces. Le plus souvent, ils sont collectés sur une plaque chargée positivement et détruits (Taylor, Laub *et al.* 2005).

Bien que beaucoup de progrès aient été réalisés pour diminuer la quantité d'ozone produite (Boelter et Davidson 1997), celle-ci reste encore élevée, ce qui n'est pas acceptable en présence humaine.

Ozonation

Il s'agit ici de former volontairement de l'ozone qui va décontaminer les surfaces et l'air (Masaoka, Kubota *et al.* 1982) en oxydant les bactéries. Les concentrations nécessaires (de l'ordre de 2.5ppmv) à la désinfection empêchent cependant un traitement en présence humaine.

Photocatalyse

Depuis quelques années, on compte de plus en plus d'appareils photocatalytiques dont le but premier est surtout la dépollution, mais de plus en plus la décontamination bactérienne de l'air, de l'eau et des surfaces (Goswami 1999; Watanabe, Kitamura *et al.* 1999). Basée sur les propriétés oxydantes de certains semi-conducteurs (notamment le dioxyde de titane en ce qui concerne les applications en développement commercial) éclairés par une source de lumière adéquate, la photocatalyse offre un traitement continu de l'air, en présence humaine, ceci sans apport de produits chimiques ou de sources d'énergie coûteuse voire polluante. Cette technologie sera détaillée dans la section III de cette partie.

II CONSIDÉRATIONS MÉTHODOLOGIQUES EN MICROBIOLOGIE

Cette partie concerne les questions d'ordre méthodologique ainsi que les techniques relatives à la numération des microorganismes et à l'étude des bioaérosols.

II 1 Méthodes de numération

Un enjeu très ancien de la microbiologie est la numération des microorganismes. En effet, on suppose qu'il existe une relation dose-réponse entre la quantité d'agents pathogènes inhalée et le développement d'une maladie (Gutting, Channel *et al.* 2008). Nous allons donc présenter les différentes méthodes de numération puis présenter quels sont les avantages et les défauts de chacune d'entre elles pour des mesures de décontamination photocatalytique (Josset, Keller *et al.* 2008). Il convient de distinguer les méthodes de culture (comptage indirect : on n'observe pas directement les bactéries, mais les colonies formées par leur prolifération) et les méthodes microscopiques (comptage direct : on observe directement les bactéries).

NB : les méthodes présentées ci-après concernent les microorganismes vivants. Les virus seront traités en fin de cette partie.

II 1.1 Méthode de comptage par mise en culture

Dénombrement des « Unités Formant des Colonies » par étalement

Autrefois qualifiée de « standard », cette méthode fut mise au point par Robert Koch à la fin du XIXe siècle. Elle consiste à étaler sur (ou à couler dans) de l'agar nutritionnel un aliquot d'une dilution en cascade (souvent au $1/10^{\text{ème}}$) de la suspension dont on veut connaître le titre en microorganismes (Fig. 12).

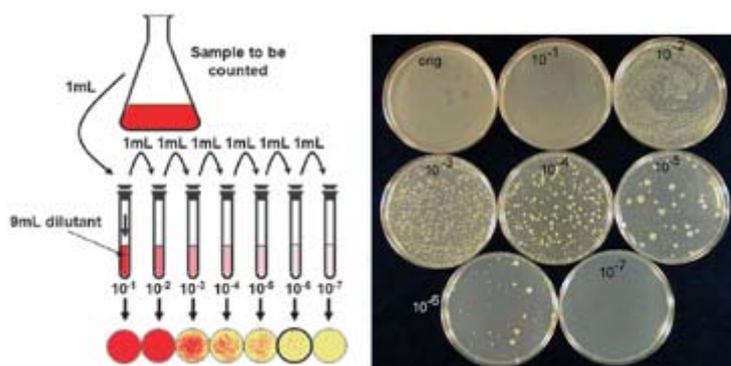


Figure 12. Description de la méthode de dilution en cascade et exemple de résultats obtenus par mise en culture d'un aliquot de chaque dilution.

Après une période d'incubation, on compte le nombre de colonies formées (en Unité Formant des Colonies, UFC) en considérant que le résultat est statistiquement significatif pour des valeurs comprises entre 25 et 250 UFC pour une boîte de 90 mm de diamètre (« Food & Drugs Administration », FDA).

Il y a deux méthodes « manuelles » classiquement employées :

- L'étalement sur boîte qui consiste à étaler à l'aide de billes de verre ou d'une baguette un aliquot sur la surface de l'agar nutritionnel
- Le coulage de l'aliquot dans l'agar nutritionnel en surfusion (environ 40°C).

L'avantage de la seconde méthode réside dans le fait que les colonies prises dans l'agar ne peuvent croître de façon trop importante (Fig. 13).



Figure 13. Exemple de colonies de *B. subtilis* en surface (trait plein) et prises dans de l'agar (trait pointillé). (x10)

Ainsi, on peut incuber les boîtes plus longtemps sans risquer la fusion de colonies proches (Fig. 13). De plus, on peut inoculer un volume plus important de liquide : jusqu'à 1 mL environ, contre seulement 200 μ L au maximum pour l'étalement. Par contre, on ne peut utiliser cette méthode qu'avec des organismes au moins facultativement anaérobies et peu sensibles à la chaleur. Une automatisation de ces méthodes de comptage sur boîte est « l'étalement spiral » (Gilchrist, Campbell *et al.* 1973). Il consiste en l'étalement en spirale sur une boîte d'agar nutritionnel d'un mélange de plus en plus dilué d'eau stérile et de la suspension à analyser, de sorte qu'après incubation, on puisse dénombrer des UFC isolées sur un segment de la spirale. Le volume de la suspension à analyser déposé entre deux points de

la spirale peut être déterminé très facilement et l'on peut ainsi remonter à la concentration en microorganismes. En général, la lecture est automatisée, facilitant grandement le travail de dénombrement.

Méthode de numération par le Nombre le Plus Probable

La méthode statistique dite du « Nombre le Plus Probable » (NPP ou « Most Probable Number », MPN) est une méthode assez ancienne (Cochran 1950; Stearman 1955; Seligman et Mickey 1964) mais qui présente certains avantages par rapport aux autres méthodes de culture pour suivre des tests de décontamination. Cette technique statistique repose sur l'hypothèse que les bactéries en suspension sont isolées les unes des autres à partir d'une certaine dilution et qu'il suffit d'une seule cellule pour former une colonie ou troubler un milieu liquide (hypothèses semblables aux méthodes de comptage par mise en culture sur boîte).

Le NPP de bactéries présentes dans un échantillon est le nombre qui maximalise la probabilité d'obtenir le schéma de croissance issu de la mise en culture répétée d'aliqouts de dilutions de la suspension à analyser (i.e. nombre de puits avec ou sans croissance pour chaque dilution). Il existe de nombreux programmes permettant de calculer le NPP (Nagel 1989) mais il est aisé d'utiliser la feuille de calcul validée par la Food & Drugs Administration (Garthright et Blodgett 2003) qui est d'emploi très simple et permet d'utiliser des nombres d'aliqouts variables pour chaque dilution tout en ayant accès aux calculs effectués.



Figure 14. Exemple de plaque « multipuits » utilisée pour réaliser des numérations par la méthode du nombre le plus probable. Les puits violacés indiquent une prolifération bactérienne au contraire des puits jaunes. Détails dans la partie expérimentale ou dans (Josset, Keller et al. 2008).

De la même façon que pour les autres méthodes de culture, on exprime préférentiellement les résultats obtenus soit en MPN par unité de volume, ou en Unité de Croissance (« Growth Unit », GU) par unité de volume afin de ne pas donner une fausse impression de précision quant au nombre réel de bactéries présentes dans l'échantillon.

Cette méthode de numération est souvent considérée comme moins précise que les méthodes par étalement, mais elle a fait ses preuves notamment pour suivre l'efficacité de tests de désinfection (Hunsinger 2005) ou dans des mesures effectuées en présence de matière dans l'échantillon à analyser qui peut rendre le comptage des colonies délicat (Capita et Alonso-Calleja 2003). Elle présente aussi l'avantage d'être très rapidement effectuée par exemple avec une pipette multi canaux et des microplaques (Fig. 14). De ce fait, elle n'est que très peu dépendante de l'opérateur et il est simple de spécifier toutes les informations inhérentes au comptage (volume de départ, facteurs de dilutions, nombre d'aliqots, schéma de croissance...). C'est donc une technique intéressante et simple, par exemple pour des tests préliminaires dans le cadre d'un criblage de photocatalyseurs d'autant qu'elle est très simple à mettre en œuvre et peu onéreuse du fait du gain de temps et de place en comparaison avec les autres méthodes de culture. Enfin, contrairement aux méthodes par étalement, la lecture des résultats peut s'effectuer après une période d'incubation plus longue, de sorte que les bactéries « viables, mais non cultivables » (« viable but non cultivable », VBNC) aient une plus grande probabilité de retrouver leur cultivabilité.

Les limitations des méthodes par mise en culture

Les méthodes indirectes de numération sont très largement employées du fait de leur mise en œuvre très simple. Il a cependant été occulté dans les explications précédentes le fait que le milieu de culture doit être adapté au type de microorganisme que l'on cherche à dénombrer. Ceci est simple à réaliser pour des tests de décontamination basés sur l'étude d'un organisme précis. Pour une étude en conditions réelles, c'est-à-dire avec une multitude d'organismes, ceci est un réel problème : il n'y a pas de milieu de culture universel et les temps d'incubation permettant d'arriver à une culture visible peuvent être très différents selon les organismes (Wagner, Amann *et al.* 1993).

De plus, les méthodes de culture présentent de nombreuses lacunes qui influent grandement sur la précision des résultats obtenus. En effet, ces méthodes partent de l'hypothèse qu'il existe un niveau de dilution tel que les bactéries se retrouvent isolées sur la boîte et que chacune va former une colonie. Ceci est bien souvent faux pour les bactéries qui se multiplient en amas, comme *Staphylococcus aureus* par exemple. Mais le point le plus problématique concerne le fait qu'une bactérie se multiplie et engendre une colonie. En effet, après un stress (changement de température, de pH, de composition nutritionnelle du milieu, aérosolisation (Heidelberg, Shahamat *et al.* 1997) ...), une partie des bactéries passe à l'état

« viable, mais non cultivable » (Manahan et Steck 1997; Besnard, Federighi *et al.* 2000). Cet état de la bactérie indique une période d'adaptation aux nouvelles conditions pendant laquelle la bactérie ne se multiplie pas et ne forme donc pas de colonie. De ce fait, la mesure de la charge bactérienne d'un échantillon mesurée par ces méthodes ne correspond pas à un nombre de bactéries par unité de volume, mais est exprimée en « Unité Formant des Colonies » (UFC) par unité de volume. Après un certain temps, la bactérie peut retrouver sa capacité à se multiplier, mais si d'autres bactéries présentes sur la même boîte étaient restées cultivables, on risque un chevauchement des colonies.

Enfin, il faut clairement mettre en évidence que les tests photocatalytiques représentent un « stress oxydatif » pour les bactéries qui n'apparaît pas lors des tests blancs (comme dans les tests de décontamination en général). Du fait de la perte de cultivabilité due à ce stress pour certaines bactéries - temporaire ou non - on a une surestimation de l'efficacité du traitement. Pour cette raison, la tendance récente est à l'utilisation de méthode de comptage direct, c'est-à-dire passant par l'observation microscopique des bactéries.

II 1.2 Méthodes de numération directe

Ces techniques présentent l'intérêt de passer par l'observation directe des cellules. Il s'agit le plus souvent d'observations réalisées par épifluorescence. Quoique les techniques de marquage des bactéries par fluorescence datent du milieu du XXe siècle (Hilbrich et Strugger 1942), leur utilisation courante est plus récente (Kogure, Simidu *et al.* 1979) et suscite un intérêt croissant (Kepner Jr et Pratt 1994). Le principe de ces méthodes est d'utiliser des molécules (fluorophores) qui vont permettre, une fois en interaction avec la cellule, de discriminer et de caractériser son état physique ou métabolique. Les mesures - optiques - sont soit réalisées directement au microscope à épifluorescence après filtration (voire la partie méthodologique) (grossissement x 400 ou plus), soit de façon entièrement automatisée par un cytomètre, bien qu'encore peu d'études utilisent cette technique de pointe dans le cadre de travaux de décontamination photocatalytique (Gogniat, Thyssen *et al.* 2006).

L'acridine orange

L'une des plus anciennes méthodes de coloration emploie l'acridine orange (AO) dont le résultat et la molécule sont représentés sur la figure 15 :

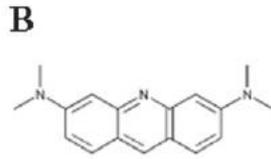
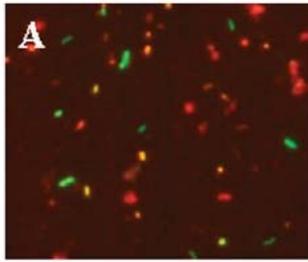


Figure 15. (A) Exemple d'*E. coli* colorées à l'aide d'acridine orange et observées par épifluorescence ($\times 1000$). (B) Molécule d'acridine orange.

L'AO est une molécule perméable aux membranes bactériennes qui présente une forte affinité pour les acides nucléiques, c'est-à-dire pour les acides désoxyribonucléiques (ADN) et pour les acides ribonucléiques (ARN). Une fois liée à l'ADN, l'AO présente une fluorescence verte (quand le complexe est excité par une longueur d'onde proche de 430 nm. Par contre, liée à de l'ARN, l'ensemble émet dans l'orange (Tomita 1967). L'ARN étant une molécule assez peu stable, il est couramment admis qu'une forte concentration en ARN dans une cellule est synonyme d'une activité métabolique récente alors que l'ADN se trouve aussi bien dans des cellules vivantes que mortes. Il a de ce fait été longtemps admis que les bactéries observées par épifluorescence et émettant dans le vert étaient inactives métaboliquement (i.e. mortes) alors que celles dans l'orange étaient métaboliquement actives et donc viables. Cependant, ceci a été remis en cause et de nombreuses améliorations ont été proposées, comme l'utilisation de l'AO en présence d'antibiotique (acide nalidixique) empêchant la division cellulaire finale (Kogure, Simidu *et al.* 1979). Ainsi, les cellules « cultivables » apparaissent allongées. Bien sûr, comme pour les méthodes de mise en culture, la division cellulaire ne concerne qu'une partie des bactéries viables. Cependant, Kogure a montré que le nombre de bactéries obtenues par numération directe dans des échantillons marins était 1000 fois supérieur à ceux obtenus par les méthodes classiques de mise en culture.

L'AO est utilisé seul comme fluorophore, mais la plupart des méthodes de coloration actuelles sont basées sur l'utilisation simultanée de plusieurs fluorophores. La publication de Kepner et de Pratt (Kepner Jr et Pratt 1994) sur ce sujet est particulièrement intéressante puisqu'ils présentent les tendances des numérations par épifluorescence et mettent l'accent sur les méthodes liées à cette technique.

DAPI - CTC

Citons aussi comme exemple de molécules couramment utilisées le couple de colorants 4',6'-diamidino-2-phenylindole/ 5-cyano-2,3-ditolyl tetrazolium chloride (DAPI-CTC, Fig. 16).

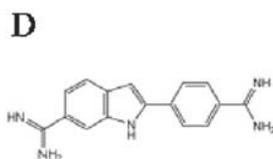
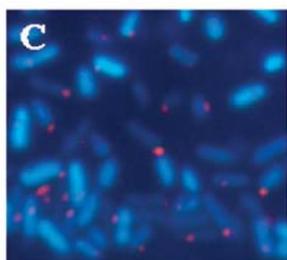


Figure 16. (C) Exemple d'*E. coli* colorées à l'aide du couple DAPI-CTC et observées par épifluorescence ($\times 1000$). (D) Molécule de DAPI.

Le DAPI est une molécule se liant de façon forte à l'ADN, marquant ainsi l'ensemble des cellules et émettant dans le bleu sous excitation UV. Le CTC n'émet dans le rouge qu'une fois réduit dans la chaîne respiratoire. C'est ainsi un indicateur métabolique de l'activité respiratoire (chaîne de transport des électrons) des microorganismes, qui concerne les organismes cultivables comme les VBNC (Roszak et Colwell 1987; Schaule, Flemming *et al.* 1993). De ce fait, il a été utilisé comme indicateur de viabilité pour suivre des tests de décontamination qui ont précédé les travaux réalisés lors de cette thèse au LMSPC (Keller, Keller *et al.* 2005).

Néanmoins, certaines réserves doivent être émises quant à l'utilisation du DAPI/CTC pour la détermination de la viabilité d'un échantillon. Certaines études basées sur d'autres tests montrent que, sous certaines conditions, les bactéries ne réduisent pas le CTC malgré une activité métabolique mesurée par d'autres méthodes (Ullrich 1999; Vollertsen, Jahn *et al.* 2001). Il y a donc une sous-estimation du nombre de bactéries marquées comme métaboliquement actives et *a fortiori* comme viables.

Baclight™

Depuis peu, un réel engouement est voué au couple iodure de propidium/Syto 9™ (Baclight™, Invitrogen) qui permet de vérifier l'intégrité de la membrane et a fourni de bons résultats dans diverses situations (Boulos, Prevost *et al.* 1999; Alonso, Mascellaro *et al.* 2002). Le Syto 9™ est une molécule qui peut traverser aussi bien les membranes endommagées que celles intactes. Une fois lié à l'ADN, le Syto 9™ (S9) émet par fluorescence dans le vert (excitation 480 nm, émission 500 nm, Fig. 17). L'iodure de propidium (IP) ne peut pénétrer que les cellules dont la membrane est très endommagée puisque cette molécule est du fait de ses deux fonctions ammonium quaternaire particulièrement lipophile (Fig. 17). Comme il a une plus grande affinité pour l'ADN que le S9, il se substitue au S9 complexé à l'ADN tout en émettant dans le rouge (excitation 530 nm, émission 620 nm, Fig. 17). Ce couple de fluorophores constitue donc un test de l'intégrité de la membrane tout à fait intéressant pour

des tests de décontamination photocatalytique puisqu'il caractérise l'intégrité de l'extérieur des microorganismes, première barrière à leur inactivation (Josset, Taranto *et al.* 2007).

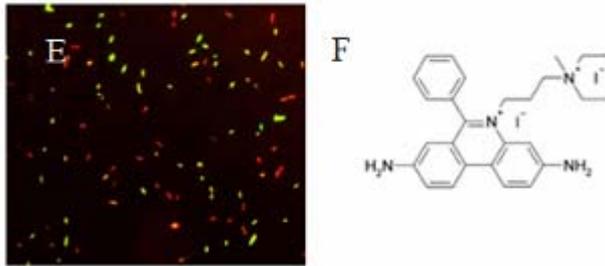


Figure 17. (E) Exemple de légionelles colorées avec le kit BacLight™ et observées par épifluorescence (x1000). (F) Molécule d'iodure de propidium.

Les techniques d'épifluorescence ont de très nombreux avantages face aux méthodes de culture. Premièrement, elles permettent de dénombrer directement les bactéries marquées comme viables et en plus celles considérées comme mortes, ce qui n'est pas le cas lors des méthodes de culture, puisque seules les cellules cultivables sont comptabilisées. De plus, du fait de l'obtention de résultats de façon très rapide (coloration avec le kit BacLight™ : 20min, croissance d'une colonie visible de *E.coli* : >12h), ces dénombrements sont très peu sensibles à d'éventuelles contaminations. En effet, pour certains microorganismes à croissance lente, la moindre contamination par des organismes à croissance plus rapide est rédhibitoire. Concernant le kit BacLight™, ce marquage a été validé sur des microorganismes divers et variés : *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* (*Bacillus atrophaeus*), *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Micrococcus luteus*, *Mycobacterium phlei*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas syringae*, *Salmonella oranienburg*, *Serratia marcescens*, *Shigella sonnei*, *Staphylococcus aureus* et *Streptococcus pyogenes* (données de Invitrogen).

Les limites des techniques de fluorescence

Il est cependant primordial de préciser que dans le cas du kit BacLight™, bien qu'une fluorescence rouge indique une bactérie ayant une forte probabilité d'être « morte » car ayant une membrane perméable, elle peut n'être qu'endommagée. De même, le fait qu'elle fluoresce dans le vert n'implique pas forcément qu'elle soit viable (Nocker, Sossa *et al.* 2007). Elle peut en effet avoir été inactivée d'une autre façon que par la perte d'intégrité de sa membrane, par exemple par l'action des UVC. Il faut donc rester extrêmement prudent dans l'interprétation des résultats obtenus par épifluorescence. Par exemple, des bactéries qui ont subi une importante oxydation par chloration peuvent avoir des acides nucléiques tellement endommagés qu'elles ne sont plus colorées par l'iodure de propidium (faux négatifs) (Stephen

A. Craik 2001). Au contraire, des bactéries dont la perméabilité de la membrane a été modifiée (par exemple en présence de TiO₂ (Gogniat, Thyssen *et al.* 2006)) peuvent apparaître « mortes ». Ainsi, bien que ces techniques de coloration aient été testées positivement pour suivre des tests de décontamination (Borazjani, May *et al.* 2000; Mendez-Hermida, Castro-Hermida *et al.* 2005), y compris photocatalytiques (Liu, John *et al.* 2007), il convient de vérifier avec attention au préalable qu'elles sont adaptées et ne donnent pas lieu à des artefacts.

Enfin, l'analyse, automatique ou non, peut aussi être fortement gênée par la présence de sédiments ou de poussières (*a fortiori* de grains de photocatalyseurs). De plus, malgré l'apparente simplicité d'interprétation des résultats (une couleur = un état), Kepner et Pratt (Kepner Jr et Pratt 1994) ont relevé de nombreuses sources de variabilité en compilant plus de 200 articles utilisant ces méthodes de numération et ils ont mis en avant le manque de précision dans la littérature concernant leur emploi (temps de coloration, de filtration, dépression utilisée, nombre de champs microscopiques photographiés, etc.).

II 2 Comptage des virus

Comme évoqué dans la partie bibliographique, les virus sont des organismes considérés comme à la limite du vivant. Ce sont des parasites obligatoires spécifiques d'un hôte bien précis. Ils ne se multiplient donc pas sur un milieu de culture, mais uniquement en infectant leurs cellules hôtes. En raison de leur petite taille, il est assez difficile de les observer au microscope et les méthodes de fluorescence bien que positivement testées pour des virus présentent tout de même certaines difficultés (Wen, Ortmann *et al.* 2004). De plus, du fait de leur absence de métabolisme propre on ne peut que caractériser leur infectiosité, ce qui implique le sacrifice des organismes hôtes, ce qui n'est bien sûr réalisable que dans peu de cas.

Il existe un test dit d'hémagglutination (Hierholzer, Suggs *et al.* 1969) qui permet de quantifier certains virus possédant des protéines de surface qui coagulent les globules rouges. C'est le cas d'Influenza ou de son cousin H5N1 (H est le nom de cette protéine : hémagglutinine). Néanmoins, ceci est lié à la quantité de cette protéine dans un échantillon, pas à son infectiosité. De plus, les résultats sont influencés par de très nombreux paramètres comme le matériel dans lequel sont faits les tests (Hirata, Grant *et al.* 1969).

En fait, seuls les bactériophages permettent de réaliser facilement des tests de décontamination sur virus puisqu'il est facile de les dénombrer. De plus, ils n'infectent que des bactéries ce qui permet de travailler sans recourir à des conditions de sécurité drastiques (Washam, Black *et al.* 1966). Ils présentent de plus l'avantage d'être relativement résistants (virus nus) ce qui en fait un outil adéquat et représentatif pour réaliser des tests de décontamination. Les techniques de numération dédiées à leur étude sont en fait le pendant des méthodes de culture présentées auparavant pour les autres microorganismes. La différence est que l'on ne dénombre pas des « colonies », mais les « plages de lyse » où chacune correspond à un foyer d'infection qui se traduit par la lyse des cellules, d'où une zone plus claire à cet endroit par rapport à une zone où les bactéries ont proliféré (Fig. 18). Ainsi, on étale sur de l'agar un aliquot d'une dilution en cascade de la suspension dont on veut déterminer le titre viral, puis on le recouvre avec du milieu nutritionnel gélifié préalablement ensemencé avec des bactéries hôtes de ce virus.

À la différence des bactéries qui peuvent se trouver dans un état VBNC, les virus sont simplement infectieux ou non. De ce fait, les résultats obtenus par cette méthode sont moins sujets à discussion.

De la même façon, le Nombre le Plus Probable de virus dans un échantillon peut être statistiquement évalué selon les mêmes principes que le NPP pour les bactéries, en supposant qu'un seul virus est suffisant pour être à l'origine d'une infection et que les virus soient distribués aléatoirement dans l'échantillon (Kott 1966). On remplace dans ce cas la gélose nutritive par du milieu préalablement ensemencé, la multiplication des virus se caractérisant alors par un éclaircissement du milieu.



Figure 18. Plage de lyses correspondant à des foyers d'infection dans l'agar ensemencé par Erwinia (Copyright 2003 de The American Phytopathological Society). Les foyers d'infection dans le tapis bactérien sont les zones où les bactéries ont été lysées. On observe alors par transparence le fond sombre sur lequel est déposée la boîte contrairement aux zones opaques où les bactéries ont proliféré.

II 3 Les bioaérosols : techniques de collecte

Les méthodes de comptage que nous avons présentées concernent des échantillons pouvant être mis en suspension. Les titrations des bioaérosols nécessitent une étape supplémentaire au comptage : la collecte des microorganismes. Il s'agit d'une étape de concentration puisque

nous avons vu que les bioaérosols sont relativement ténus. Nous allons présenter ici un aperçu des appareillages classiques permettant l'étude de bioaérosols (pour des mesures en conditions réelles).

L'impacteur

L'impacteur est utilisé pour séparer les particules dans un flux grâce à leur inertie (Nesa, Lortholary *et al.* 2001). L'impacteur consiste en un disque criblé d'orifices de diamètre très précis et d'une cible située en aval qui va recueillir les particules dont le diamètre est supérieur au « diamètre de coupure ». Les particules plus fines sont elles entraînées plus loin dans l'impacteur (à un étage suivant par exemple).

Voici les principaux systèmes utilisés basés sur ce principe :

- L'impacteur d'Andersen à 6 étages (Andersen 1958)

Il s'agit d'un impacteur ou d'un empilement de 2 à 6 impacteurs (Fig. 19) dont le diamètre des orifices (en général 400/impacteur) diminue progressivement (de 1,18 à 0,25 mm pour la cascade de 6 impacteurs). Il permet ainsi de séparer des particules avec des d_{50} : 7,0 4,7 3,3 2,1 1,1 0,65 μm dans un flux de 28,3 L/min (valeur fixée, non variable) dans le cas d'une cascade de 6 étages. Les cibles sont directement des boîtes de Pétri recouvertes de milieu de culture gélatinifié permettant la lecture après incubation. Il est à noter cependant qu'il faut apporter une correction aux résultats obtenus au fur et à mesure du recouvrement de la boîte d'un étage (Hinds 1999). En effet, la probabilité qu'une colonie ne soit issue que d'un seul microorganisme diminue très rapidement avec la densité (Chang, Hwang *et al.* 1994).



Figure 19. Impacteur d'Andersen à 6 étages. L'air est aspiré par l'orifice situé en haut à un débit précis de 28,3 L/min grâce à une pompe à vide. À chaque étage est disposée une boîte de Pétri sur laquelle les particules de tailles suffisantes vont s'impacter par inertie. Les particules plus petites continuent leurs trajets, entraînées par le flux.

- L'impacteur rotatif

C'est notamment pour éviter ces problèmes de masquage et de chevauchement que l'impacteur rotatif a été développé (à l'instar de l'appareil permettant l'étalement en spirale présenté dans les méthodes de comptage). Ici, une buse propulse l'air sur la surface d'une

boîte d'agar nutritionnel mise en rotation (Wagner et Macher 2003). Le d_{50} est d'environ 0,5 μm et le débit peut être réglé entre 15 et 700 L/min.

- L'impacteur centrifuge

Dans ce type d'appareillage, l'inertie des particules n'est pas issue que de la force communiquée par le déplacement du flux, mais aussi par celle due à la force centrifuge. Elle peut être communiquée par une buse (Call, Kenning *et al.* 2001) ou par une géométrie de type « cyclone » (Griffiths, Stewart *et al.* 1996; Griffiths, Stewart *et al.* 1997; Willeke, Lin *et al.* 1999). Cette force propulse les microorganismes sur un bandeau en anneau recouvert de milieu nutritif ou dans du liquide mis en rotation de sorte à former un « mur » sur lequel viennent s'impacter les microorganismes (Gorner, Fabries *et al.* 2006). Cette dernière méthode présente l'avantage notable d'éviter la dessiccation des bactéries lors de prélèvements longs. De plus, il n'y a pas de risque de surcharger les boîtes comme dans les autres techniques.

La filtration

Cette technique est de loin la plus couramment utilisée, car la plus simple à mettre en œuvre. Il s'agit de faire passer l'air à analyser à travers un filtre de porosité connue. On utilise généralement des filtres de 37 ou 47 mm de diamètre afin de limiter la perte de charge et ainsi d'améliorer le piégeage des particules.

Les filtres sont ensuite soit déposés directement à la surface d'une boîte de Pétri et les colonies comptées, soit analysés par microscopie (par épifluorescence par exemple) ou encore lavés afin de remettre les bactéries en suspension en vue d'une numération. Il existe aussi des filtres à base de gélatine qui peuvent se dissoudre après utilisation, fournissant une suspension pouvant être titrée (Hecker, Meier *et al.* 1983) ou sur laquelle des analyses d'identification peuvent être menées (Mastorides, Oehler *et al.* 1999).

Malgré un emploi simple, les techniques de filtration sont limitées aux microorganismes résistant à la dessiccation comme les spores bactériens ou fongiques (Li et Lin 2001).

Comparaison des efficacités des différentes techniques

Il existe de nombreuses études comparatives des différentes techniques de prélèvements (Griffiths et DeCosemo 1994). S'agissant de la première étape de mesure de la contamination

aéroportée, si celle-ci n'est pas efficace en nombre comme en viabilité, les mesures sont irrémédiablement faussées.

Il semble que la tendance générale soit vers l'utilisation de technique de collecte en milieu liquide (Jensen, Todd et al. 1992) qui évite la dessiccation. Ainsi, la récupération en milieu liquide d'un aérosol de légionelles résulte en une fraction cultivable 4 fois supérieure à celle obtenue par impact et 700 fois à celle obtenue par filtration (Deloge-Abarkan, Ha *et al.* 2007). Pour pallier l'évaporation qui pourrait s'avérer problématique lors de prélèvements longs, le liquide de collecte peut être astucieusement remplacé par de l'huile minérale (Lin, Reponen *et al.* 1999).

De la même façon, un refroidissement du liquide de collecte semble indiqué afin d'éviter les variations de concentration au cours du temps (Li et Lin 2001).

III ASPECTS PHOTOCATALYTIQUES ET PHOTOREACTEURS

On considère que le point de départ de la photocatalyse moderne est l'article de Fujishima et Honda publié dans « Nature » en 1972 concernant la dissociation l'eau (Fujishima et Honda 1972), à savoir la formation d'oxygène et d'hydrogène avec la lumière comme source directe d'énergie sur une électrode de TiO₂. C'est seulement en 1985 que Matsunaga et ses collègues ont mis en évidence les effets décontaminants de la photocatalyse (Matsunaga, Tomoda *et al.* 1985). Depuis, les recherches engagées dans ce domaine n'ont cessé de croître comme indiqué dans la bibliographie réalisée en 1999 par Blake (Blake 1999). Il en est de même pour les applications, comme on peut le juger au nombre de brevets déposés et d'entreprises ayant vu le jour.

III 1 La photocatalyse : aspects généraux

III 1.1 Définition, principes et mécanismes

Si la photocatalyse a connu un développement fulgurant depuis 25 ans, le terme de « photocatalyse » date au moins des années 30. D'un point de vue étymologique, il s'agit d'une « réaction chimique se déroulant en présence d'un catalyseur et de lumière ». Bien que d'apparence simple, cette définition regroupe en fait de nombreux mécanismes : le photon peut par exemple d'abord activer le catalyseur qui va alors participer à la réaction (réaction catalytique photogénérée) ou d'abord activer le réactif qui va ensuite comme en catalyse « classique » pouvoir réagir avec la participation du catalyseur (réaction photochimique catalysée, qui est en fait la définition classique de la catalyse) (Chen, Lei *et al.* 2004).

Teichner et Formenti ont ainsi défini de façon générale la photocatalyse hétérogène comme étant une « augmentation de l'avancement d'une réaction (permise thermodynamiquement) en présence d'un solide irradié. Ceci est dû à la création de nouveaux chemins réactionnels impliquant des espèces photocrées et un abaissement de l'énergie d'activation » (Schiavello 1985).

L'objectif final en dépollution et en décontamination biologique (mais de façon moindre) est d'arriver à la minéralisation complète des polluants sous forme de CO₂ et d'H₂O principalement. De ce fait, la photocatalyse fait partie des procédés d'oxydation avancés (« Advanced Oxidation Processes », AOP). Cette minéralisation passe par la réaction - après adsorption - du polluant avec une Forme Réactive de l'Oxygène (FRO) qui s'est formée en surface suite à l'irradiation du photocatalyseur (principalement l'anion superoxyde et le radical hydroxyle (Pichat, Guillard *et al.* 1995)).

Les photocatalyseurs sont des semi-conducteurs, à savoir des composés dont la différence d'énergie (Bande interdite, bandgap, E_g) entre la bande de valence et la bande de conduction est telle qu'il faut des photons ayant au moins une énergie égale à E_g pour faire passer un électron de la bande de valence vers la bande de conduction (Fig. 20). Lorsque cette activation se produit, il y a création formellement d'une paire « électron – trou » conduisant à un potentiel d'oxydoréduction constitué par les potentiels des bandes de valence et de conduction.

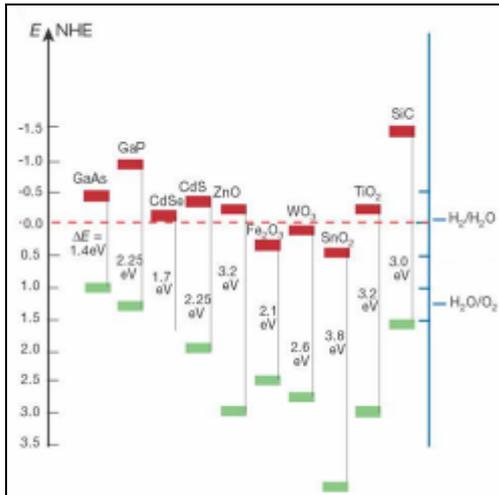


Figure 20. Représentation des bandes interdites, bandes de valence et bandes de conduction de quelques semi-conducteurs couramment utilisés. (Gratzel 2001).

Cet ensemble électron (e^-) – trou (h^+) peut soit se recombiner en surface, soit dans le volume de la particule, en générant un photon, de la chaleur ou un phonon ce qui limite considérablement le processus photocatalytique. Cependant, si ces électrons et/ou ces « trous d'électrons » atteignent la surface, ils peuvent donner lieu à des réactions d'oxydoréduction avec certaines espèces adsorbées, qui sont la base même de la photocatalyse (Fig. 21).

Enfin, il est à noter que l'on peut soit considérer une oxydation indirecte du polluant qui consiste en la formation préliminaire d'un oxydant (notamment une FRO, comme suggéré par Mills et Hoffmann (Mills et Hoffmann 1993) suite à l'observation d'intermédiaires hydroxylés lors de la photodégradation du pentachlorophénol) puis à sa réaction avec une autre molécule de polluant ou de réactif, soit une oxydation du réactif par action directe du « trou » (Draper et Fox 1990).

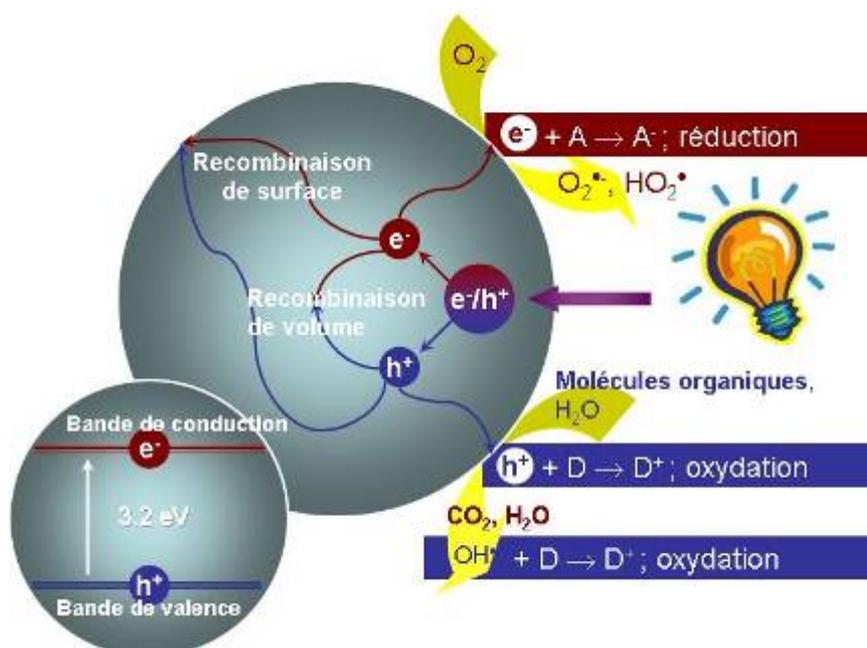


Figure 21. Schéma du processus photocatalytique.

Les détails mécanistiques généraux ne seront pas plus amplement détaillés en ce qui concerne la photodégradation de polluants moléculaires dans cette partie, car ils ne sont pas aisément transposables à la décontamination photocatalytique de superstructures comme les microorganismes. En effet, les concepts et les considérations souvent admis pour une molécule chimique simple ne s'appliquent plus aussi simplement à des microorganismes, ceux-ci étant de tailles nettement supérieures aux grains de photocatalyseurs (Fig. 22). Par contre, l'état des lieux des connaissances sur les mécanismes de décontamination sera présenté dans la partie recouvrant l'interface microbiologie/photocatalyse.

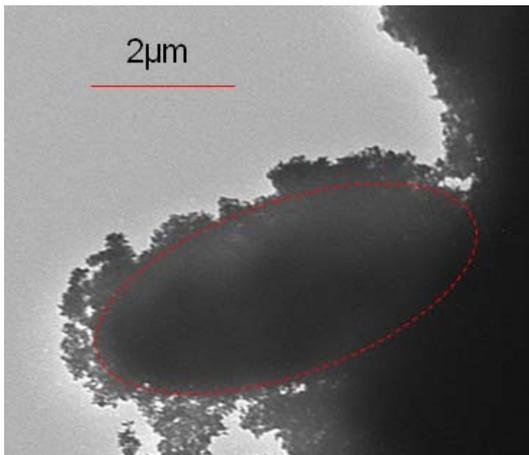


Figure 22. Cliché au microscope électronique à transmission d'une bactérie *E.coli* (pointillés) recouverte de grains de TiO_2 (P25).

III 1.2 Le TiO_2 : un photocatalyseur de choix

Il existe de nombreux catalyseurs qui ont fait l'objet d'études diverses et variées dans tous les domaines d'investigations et d'applications de la photocatalyse. Le choix d'un photocatalyseur est soumis à plusieurs contraintes :

Des bandes de valence et de conduction adéquates

Les positions des bandes de valence et de conduction caractérisent le potentiel d'oxydoréduction d'un semi-conducteur, leur différence indiquant l'énergie minimale d'activation (Fig. 20). Le dioxyde de titane est en cela intéressant, car il peut oxyder l'eau et ainsi former des radicaux très oxydants avec des photons de relativement faible énergie ne présentant quasiment pas de dangers pour l'Homme (domaine des UVA). De ce fait, presque toutes les molécules organiques sont minéralisables par le dioxyde de titane (exemple de molécule résistante aux POA : l'acide cyanurique (Vulliet, Emmelin *et al.* 2002)).

L'innocuité du photocatalyseur

Il est évident qu'un photocatalyseur destiné à des applications en présence humaine ne peut présenter de risque pour la santé. En effet, que ce soit pour le traitement de l'eau comme pour celui de l'air, il faut de façon évidente prendre en compte une éventuelle érosion ou attrition du revêtement photocatalytique et donc une perte de matière. A titre d'exemple (Fig. 20), l'oxyde de zinc, ZnO, est très similaire au dioxyde de titane par la position de ses bandes électroniques et pourrait ainsi lui faire concurrence. Néanmoins, il est beaucoup moins stable et son utilisation en milieu liquide ne se fait pas sans libération de zinc qui est un élément considéré comme toxique (Evgenidou, Konstantinou *et al.* 2007).

Il a été montré que le dioxyde de titane, même sous forme nanométrique, ne présente pas de risque sanitaire en l'absence d'activation (Cai, Kubota *et al.* 1992). Sa très large utilisation comme pigment blanc et comme additif pour plastiques avec une production japonaise pour 2007 supérieure à 250.000 tonnes (Pigments 2007) a permis d'obtenir des études de toxicité sur de très longues durées sans qu'on puisse mettre en évidence un caractère carcinogène (Fryzek, Chadda *et al.* 2003; Boffetta, Soutar *et al.* 2004). C'est de plus un matériau très stable et biocompatible, lorsqu'il n'est pas activé (Cui, Liu *et al.* 2005). Ainsi, le titane métal est la référence actuelle pour les prothèses osseuses, car il se couvre d'une couche d'oxyde de titane. Cependant, il convient de préciser que des études montrent que les particules ultrafines de dioxyde de titane présentent une certaine cytotoxicité, à l'instar d'autres particules ultrafines (Renwick, Donaldson *et al.* 2001). C'est la raison pour laquelle l'immobilisation et la mise en forme macroscopique des nanoparticules photocatalytiques sont considérées comme des aspects primordiaux.

III 2 Applications

Le champ d'action de la photocatalyse est très vaste et ses applications très nombreuses. Citons notamment :

- Les matériaux autonettoyants

Cette application concerne principalement le verre (Puzenat et Pichat 2003; Zhao, Zhao *et al.* 2008), les ciments (Bonafous, Cassar *et al.* 2006) et les peintures. Dans cette optique, de plus en plus de travaux abordent le développement de plastiques autonettoyants destinés à être utilisés à l'extérieur (utilisation de la lumière solaire).

- Les traitements antibuée

Les propriétés superhydrophiles de certains photocatalyseurs illuminés ($E_{\lambda} > E_{\text{gap}}$) font que la buée ne se maintient pas à leur surface sous forme de gouttelettes, mais s'étale immédiatement sous forme de film transparent par modification de l'angle de contact (Chien-Sheng, Yao-Hsuan *et al.* 2006).

- La dépollution

C'est sans doute le domaine dans lequel le plus de recherches sont actuellement engagées. En effet, à part les méthodes de piégeage (sur charbon actif par exemple) ou de destruction thermique, il n'y a guère d'alternatives convaincantes à la photocatalyse, dans certains domaines de concentrations et de débits, pour traiter la pollution et les odeurs du monde moderne. Plus de mille composés ont déjà fait l'objet d'étude de dépollution par voie photocatalytique que ce soit des surfaces, de l'air ou de l'eau (Blake 1999; Pichat, Disdier *et al.* 2000). De très nombreux brevets concernent des appareils destinés à dépolluer l'air intérieur des bâtiments (Lasa et Valladares 1997) mais c'est paradoxalement le traitement de l'eau qui concentre la majorité des recherches dans ce domaine (Blake 1999).

- La décontamination au niveau biologique

Il s'agit, comme pour la dépollution au niveau chimique, d'un des domaines de la photocatalyse auquel est consacré un nombre de travaux sans cesse croissant du fait des nombreuses possibilités d'applications (Peral, Domènech *et al.* 1997). Comme mentionné précédemment, la photocatalyse présente l'intérêt de pouvoir assurer un traitement continu, en présence humaine, sans apports chimiques et quasiment sans dangers. Cela concerne le traitement de l'air, de l'eau, mais aussi celui des surfaces (sols et murs) et celui des emballages à contact alimentaire (Koide et Nonami 2007). Par ailleurs, la décontamination par photocatalyse a été largement plus approfondie et ses mécanismes plus étudiés dans le domaine du traitement de l'eau et des surfaces. On note à ce sujet une forte contradiction entre les nombreux dispositifs de décontamination commercialisés pour le traitement de l'air et le manque d'information, voire les lacunes de connaissances et de compétences en amont. En effet, on assiste dans certains cas à une démarche de commercialisation plutôt opportuniste qu'à une démarche normale d'étude, d'optimisation et de développement en laboratoire suivi d'un transfert de technologies, comme en témoignent les efficacités souvent médiocres des dispositifs que l'on trouve sur le marché.

III 3 Les réacteurs photocatalytiques

Une partie plus appliquée de mon travail de thèse a consisté à développer, optimiser et tester des réacteurs photocatalytiques destinés *in fine* à des prototypes de décontamination de l'air. Pour ce faire, il est primordial de considérer les différents paramètres et les principales limitations dans ce domaine afin d'essayer de surmonter et de lever les points durs, tout en tenant compte de la particularité des cibles que sont les microorganismes. L'efficacité de la photocatalyse sur quantité de polluants et sur nombre de microorganismes n'est plus à démontrer à l'échelle du laboratoire (Blake 1999). Néanmoins, beaucoup de chercheurs pointent du doigt la faible part des projets concernant l'étude, l'optimisation et le développement de réacteurs photocatalytiques. Citons à ce titre De Lasa, Serrano et Salaices : « ... *An important obstacle in the development of highly efficient photocatalytic reactors is the establishment of effective reactor design [...] as demanded by industrial and commercial applications* » (Lasa, Serrano *et al.* 2005).

Ceci est d'autant plus vrai que les applications de dépollution et de décontamination impliquent le traitement de débits extrêmement élevés, beaucoup plus importants qu'à l'échelle du laboratoire, ce qui induit des contraintes et des limitations supplémentaires non négligeables. Le dimensionnement de réacteurs photocatalytiques est en effet d'autant plus délicat qu'il traite de catalyse hétérogène (problèmes de diffusion, de transfert de matières et de chaleur) et que ces réacteurs incluent une source radiative dont l'utilisation et la mise en œuvre doivent être optimisées (Martin, Camera-Roda *et al.* 1999). On peut relever un certain nombre de paramètres influents que l'on peut classer en deux catégories : les paramètres inhérents aux photoréacteurs et ceux liés à leurs conditions de fonctionnement.

III 3.1 Paramètres inhérents au réacteur

Citons notamment en ce qui concerne les paramètres propres à la construction du photoréacteur :

- La masse de catalyseur

Seule la fraction irradiée sur une épaisseur optimale est photocatalytiquement active. Les couches de catalyseur non illuminées peuvent servir d'adsorbant dans le cas de dépollution chimique. Ainsi, il existe une valeur limite à partir de laquelle une augmentation de la masse

de catalyseur (toutes choses égales par ailleurs) ne résulte pas en une augmentation d'efficacité.

- Le spectre de la source lumineuse

Toute la partie du spectre de la source lumineuse inférieure à une valeur critique pour laquelle les photons ont une énergie inférieure à E_g ne permet pas d'activer directement le photocatalyseur. S'il est aisé avec une illumination artificielle de choisir un spectre adéquat, ceci peut être problématique avec des photoréacteurs solaires. Dans ce cas, seule une modification du photocatalyseur permet l'utilisation d'une plus grande part de l'énergie solaire.

- L'irradiance

L'irradiance (énergie lumineuse par unité de surface) diminuant avec le carré de la distance à la source, il est primordial de veiller à ce que le réacteur soit correctement illuminé. Une augmentation de l'irradiance à la surface du catalyseur augmente le nombre de paires électron-trou formées et de ce fait, on observe une augmentation quasi linéaire de la vitesse de réaction avec celle de l'irradiance. Néanmoins, passé une valeur estimée à 25 mW/cm² pour du TiO₂ (P25, Degussa), la vitesse de réaction devient proportionnelle à la racine carrée de l'irradiance (Herrmann 1999). Ceci peut s'expliquer par le fait qu'une plus grande densité de charges augmente la probabilité de recombinaison de celles-ci. Ainsi, il est peu avantageux de surexposer le photocatalyseur d'autant que ceci implique, soit une distance relativement courte de la surface du photocatalyseur à la source et donc une limitation au débit admissible, soit une augmentation de la consommation énergétique.

III 3.2 Paramètres inhérents aux conditions de fonctionnement

Les conditions d'utilisation du photoréacteur sont aussi déterminantes pour son efficacité : elles vont orienter en grande partie sa géométrie ainsi que la mise en forme des particules photocatalytiques et la mise en œuvre du dépôt photocatalytique. Citons comme paramètres principaux (Dhananjay, Bhatkhande *et al.* 2002) :

- La concentration et la nature du polluant

L'efficacité d'un photoréacteur est liée à la concentration en polluant(s). Puisque le nombre de particules illuminées est limité, il existe, en première approximation, un seuil au-delà duquel le réacteur ne peut plus traiter l'effluent (Pichat, Disdier *et al.* 2000).

De plus, il existe de nombreux composés dont l'oxydation passe par des intermédiaires qui désactivent le photocatalyseur ou se minéralisent en laissant des composés non gazeux. C'est notamment le cas des composés aromatiques (Cao, Gao *et al.* 2000) ou des composés contenant des hétéroatomes tels le phosphore, l'azote ou le soufre (Alberici, Canela *et al.* 2001; Kozlov, Vorontsov *et al.* 2003).

Concernant le traitement de l'air, notons que l'humidité peut jouer un rôle important, soit de manière négative en cas d'adsorption compétitive avec le polluant cible, soit de manière positive en permettant la formation de radicaux hydroxyles actifs.

- Le débit

Les débits d'eau ou encore plus d'air à traiter sont importants. Pour le traitement de l'air, la norme 62-2001 (2001) de l'ASHRAE (« American Society of Heating, Refrigerating and Air-Conditioning Engineers ») préconise un renouvellement par pièce de 0,5 fois son volume par heure. Le Conseil National de Recherches du Canada estime dans son guide « Solution constructive n° 14 » de mai 1998 que la moyenne des normes internationales concernant le renouvellement d'air se situe autour de 0,3 fois le volume d'une pièce par heure, ce qui implique pour une pièce de 5m x 5m x 2m un débit de 15 m³/h. Il est clair qu'à de tels débits, la surface active offerte par le réacteur doit compenser les temps de passage très courts dans le réacteur.

- La température

La température a une relativement faible influence au niveau purement photocatalytique dans le domaine 20 °C – 80 °C qui correspond à la gamme de températures ambiantes – températures à proximité de la lampe. C'est d'une part au niveau des équilibres adsorption-désorption que les effets de la température se font ressentir et d'autre part au niveau des recombinaisons des charges photogénérées. Fort heureusement, l'efficacité globale demeure quasi inchangée dans ce domaine thermique. Notons cependant que pour les valeurs hautes de cette gamme de température, des réactions catalytiques thermiques peuvent avoir lieu (Xianzhi, Clark *et al.* 1996).

III 3.3 Les différents types de photoréacteurs

Bien que le nombre de publications concernant les photoréacteurs reste encore faible par rapport à celui traitant des photocatalyseurs, il est en constante augmentation. Nous allons

d'abord présenter les options qui sont envisageables pour le « design » d'un réacteur puis présenter quelques réacteurs originaux qui ont pour vocation de transférer les prototypes photocatalytiques du monde de la recherche au monde applicatif.

Photocatalyseur en suspension ou supporté

- Catalyseur en suspension

C'est sans doute le type de photoréacteur le plus étudié pour le traitement de l'eau (Bahnemann, Bockelmann *et al.* 1991; Li Puma et Yue 2003). En effet, dans des conditions optimales de concentration en photocatalyseur, ces systèmes conduisent à une très bonne dispersion des grains de catalyseur, à un excellent transfert de matière et à une bonne illumination. Cependant, ce type de réacteur impose une opération post traitement de séparation qui peut s'avérer très coûteuse par ultracentrifugation puisque la centrifugation n'est pas suffisante pour récupérer les particules les plus fines.

Dans le traitement de l'air, les réacteurs à catalyseurs non immobilisés sont des réacteurs du type « lit fluidisé », qui demeurent à l'heure actuelle du domaine du laboratoire, car ils restent très coûteux en énergie en termes de fluidisation et de séparation des particules entraînées.

- Catalyseur supporté

En revanche, l'immobilisation des catalyseurs est extrêmement répandue dans le traitement de l'air, afin d'immobiliser les (nano)particules sur un substrat et ainsi de limiter considérablement leur relargage dans l'environnement et les risques potentiels qui leur sont associés. Le substrat peut être directement la surface illuminée du réacteur ou un matériau autre servant de support. Citons à titre d'exemples :

- le verre (Behnajady, Modirshahla *et al.* 2007)
 - o les billes de verre (Kobayakawa, Sato *et al.* 1998)
 - o les fibres optiques (Sun, Nakajima *et al.* 2000; Choi, Ko *et al.* 2001)
 - o la laine de verre (Zhang, Cui *et al.* 2003)
 - o les fibres de verre (Piscopo, Robert *et al.* 2000)
 - o les fibres d'aluminium (Luo, Miao *et al.* 2008)
- L'acier inoxydable (Evans et Sheel 2007)
- Le PolyTetraFluoroEthylène ou PTFE (Uchida, Katoh *et al.* 1998)

Notons que certains supports comme les fibres optiques rassemblent plusieurs fonctions : une fonction au niveau du matériau (résistance chimique...), une fonction au niveau morphologique (grand rapport surface/volume...) et une fonction au niveau optique (illumination par la fibre, palliant les problèmes d'ombrage...).

Source lumineuse

La source lumineuse (spectre, intensité, emplacement) est de première importance. Comme indiqué précédemment, la phase la plus photocatalytiquement active, l'anatase, n'est activé que pour des longueurs d'ondes inférieures à celle du proche UV ($\lambda_{\max}=388$ nm). La source lumineuse peut donc être de nature artificielle ou solaire.

- Énergie solaire

L'utilisation de la lumière solaire est évidemment préférable, voire obligatoire pour des applications du type « autonettoyant » ou de dépollution à l'extérieur (par exemple dépollution des NO_x, (Maggos, Plassais *et al.* 2008)). Cependant, seuls 5 % du rayonnement solaire est utilisable pour la photocatalyse avec du TiO₂ de structure anatase : il faut donc optimiser sa récupération (collecteurs (Bandala, Arancibia-Bulnes *et al.* 2004)) ou alors diminuer l'énergie d'activation du photocatalyseur, ce qui est un des axes de recherche en photocatalyse en pleine expansion à l'heure actuelle (Rane, Mhalsiker *et al.* 2006; Wong, Chu *et al.* 2006). Notons que le traitement d'air sous flux utilisant de l'énergie solaire ne semble pour l'instant pas avoir été développé.

- Les sources artificielles

Lorsqu'il n'est pas possible d'utiliser le rayonnement solaire, il faut utiliser une source artificielle de lumière. La grande majorité des applications se fait avec des tubes fluorescents à vapeur de mercure qui présentent l'avantage de ne consommer que peu d'énergie.

Tous les tubes à vapeur de mercure émettent dans l'UV, principalement l'UVC, avec un rendement de l'ordre de 30 % (Bolton, Safarzadeh-Amiri *et al.* 1995). C'est en fait le poudrage interne au tube qui va permettre d'obtenir par fluorescence un autre spectre d'émission. Il y a dans ce cas une perte de rendement photonique/électrique du fait de la fluorescence. Ainsi, certains auteurs préconisent l'utilisation d'UVC que ce soit pour cette raison ou pour son effet germicide (Matthews et McEvoy 1992). La figure 23 présente le spectre lumineux du tube fluorescent que nous avons utilisé lors des expériences de décontamination.

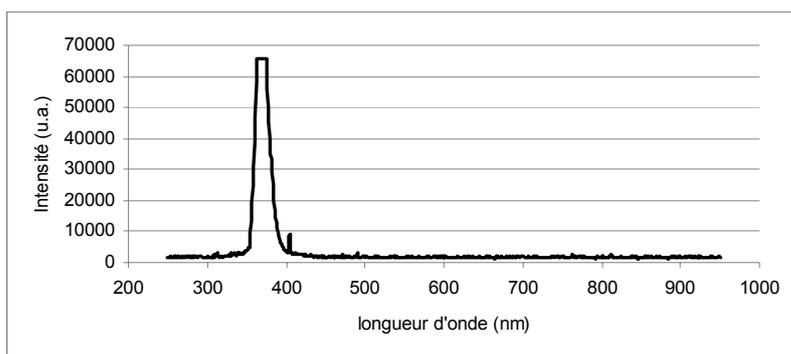


Figure 23. Spectre du tube fluorescent de type « black light » utilisé lors de nos expériences de décontamination. L'intensité est maximale pour une longueur d'onde de 370 nm.

Notons aussi que certains travaux s'intéressent aux diodes électroluminescentes (DEL) comme sources de lumière UVA (Chen, Li *et al.* 2001) ou même visible. Les DEL présentent de très nombreux avantages parmi lesquels une durée de vie très longue, une grande stabilité dans le temps de l'intensité lumineuse, un fort rendement photonique/électrique et la possibilité de les disposer à différents endroits du réacteur. Bien qu'elles soient encore onéreuses, leur prix ne cesse de chuter et il est possible qu'elles remplacent bientôt les sources lumineuses traditionnelles dans les applications photocatalytiques.

Les réacteurs à fibres optiques sont aussi un concept novateur qui présente l'avantage de pouvoir distribuer la lumière dans le volume du réacteur via la face opposée au flux, directement au niveau des grains de photocatalyseur (Sun, Nakajima *et al.* 2000; Choi, Ko *et al.* 2001). Cet aspect est extrêmement bénéfique à l'illumination du réacteur : le réacteur peut être chargé dans son volume sans craindre un effet d'ombrage. Bien évidemment, il faut veiller à une épaisseur de dépôt optimale, permettant aux molécules adsorbées d'être au contact de particules photocatalytiques activées.

III 4 Exemples de photoréacteurs

Bien que le design de photoréacteurs n'ait pas été à l'origine l'objet principal des recherches en photocatalyse (Bahnemann, Bockelmann *et al.* 1991), ce domaine s'est très fortement développé depuis le début des années 1990. Le tableau 4 présente un aperçu non exhaustif de photoréacteurs cités dans la littérature.

Type	air	eau	catalyseur suspendu	catalyseur fixé	Description
Réacteur annulaire	x	x	X	x	Consiste en deux tubes concentriques entre lesquels s'écoule l'effluent. La lampe est placée au centre. (Cassano, Martin <i>et al.</i> 1995; Belhácová, Krýsa <i>et al.</i> 1999; Nadochenko, Rincon <i>et al.</i> 2005)
Réacteur type « Vigreux »	x			x	Réacteur de type Vigreux. Les aspérités servent à créer des turbulences. Les lampes sont placées à l'extérieur. (Keller, Keller <i>et al.</i> 2005)
Réacteur ascendant ouvert		x	X		Les lampes immergées sont placées perpendiculairement à l'écoulement ascensionnel. (Alberici et Jardim 1994)
Réacteur à membrane avec système de filtration		x	X		Consiste en une unité de type réacteur annulaire et une unité de séparation avec une membrane pour ultrafiltration. (Sopajaree, Qasim <i>et al.</i> 1999)
Réacteur à écoulement tourbillonnaire		x	X		Constitué de deux disques de verre. La suspension est injectée tangentiellement sur le bord du disque, créant ainsi un tourbillon qui assure un bon mélange. L'effluent quitte le réacteur par le centre du disque supérieur. (Ray et Beenackers 1998)
Réacteur à écoulement de Taylor		x	X		Deux cylindres concentriques dont l'interne tourne, provoquant ainsi des turbulences et assurant un bon mélange. 3 fois plus efficace que l'équivalent annulaire. (Leitner, Bras <i>et al.</i> 1997)
Réacteur à film tombant		x		x	Le fluide à traiter est injecté sous forme de film sur le photocatalyseur, la lampe étant centrale. Minimise l'effet d'ombrage. (Puma et Yue 1999)
Réacteur à fibres optiques	x	x		x	Le photocatalyseur est déposé sur des fibres optiques, l'éclairage se faisant ainsi de l'intérieur. Grande efficacité. Problèmes de coûts et de rendements. (Sun, Nakajima <i>et al.</i> 2000; Choi, Ko <i>et al.</i> 2001)
Réacteur multitubulaire	x	x		x	Cylindre contenant 54 tubes recouverts sur leur extérieur du photocatalyseur. La lumière est distribuée via des réflecteurs. Grande surface active. (Mukherjee et Ray 1999)
Réacteur rempli	x	x		x	Cylindre contenant soit de la laine de verre, des billes de verre ou une grille de verre recouverte de photocatalyseurs. Problèmes de perte de charge et d'illumination. (Esterkin, Negro <i>et al.</i> 2002; Coronado, Soria <i>et al.</i> 2005; Luo, Miao <i>et al.</i> 2008)
Réacteur serpentin	x	x		x	Tube de verre enroulé autour de la lampe dans lequel circule l'effluent à traiter. Forte illumination, mais problèmes d'hydrodynamique possible. (Al-Ekabi et Serpone 1988)
Réacteur à lampes en U		x		x	Les lampes immergées sont recouvertes sur leur extérieur par le photocatalyseur. Grande surface active. Problème d'hydrodynamique. (Ray et Beenackers 1998; Mukherjee et Ray 1999)
Réacteur parabolique	x	x	X	x	Réacteur solaire concentrant la lumière. A été validé sur bactéries. (Bockelmann 1995)
Réacteur à lit fluidisé	x	x	x		Grande masse de catalyseur non actif. Problèmes d'attrition. Pertes de charge. (Kabir, Haque <i>et al.</i> 2003; Lim, Rudolph <i>et al.</i> 2008)
Réacteur monolithique	x			x	Réacteur recouvert sur la face interne en nid d'abeille. Faible perte de charge. Surface active plus grande que son équivalent tubulaire. (Sauer et Ollis 1996)

Tableau 4. Présentation de quelques photoréacteurs. D'après (Lasa, Serrano *et al.* 2005).

Certaines études relèvent qu'il est préférable d'allier la photocatalyse avec d'autres techniques soit en amont, soit en aval (Shiraishi, Toyoda *et al.* 1999). Pour le traitement de l'eau au niveau biologique, la sonolyse (Augugliaro, Litter *et al.* 2006) semble être très intéressante, car elle permet de désagréger les morceaux de biofilms mais aussi d'ouvrir les protozoaires dans lesquels les légionelles sont protégées. Pour le traitement de l'air au niveau biologique, l'ionisation semble intéressante car elle permet de charger les microorganismes négativement

et ainsi de les séparer électrostatiquement du flux porteur, la photocatalyse assurant ensuite leur inactivation (Grinshpun, Adhikari *et al.* 2007). Le couplage ozonation/photocatalyse est aussi une voie intéressante pour améliorer l'oxydation des polluants sans toutefois recourir aux quantités importantes d'ozone qui rendent ce procédé non utilisable en présence humaine (Pichat, Disdier *et al.* 2000).

IV L'INTERFACE PHOTOCATALYSE - MICROBIOLOGIE

Les trois parties précédentes ont permis de présenter les aspects microbiologiques et les techniques utilisées au cours de cette thèse ainsi que d'introduire les concepts photocatalytiques généraux largement connus dans le milieu de la photocatalyse. C'est néanmoins à l'interface entre ces deux domaines que se situent les enjeux de cette thèse, ce qui en constitue par ailleurs toute la difficulté. Ceci nécessite des connaissances, des compétences et des approches complémentaires et transversales. C'est à la frontière de la microbiologie et de la photocatalyse que vont se situer les progrès conduisant à l'étude, l'évaluation, l'optimisation et au développement de dispositifs efficaces de traitement de l'air contaminé par des agents biologiques.

IV 1 Les paramètres influençant les tests de décontamination photocatalytique.

Les études de dépollution chimique indiquent que de très nombreux paramètres liés au photocatalyseur, aux conditions expérimentales, à l'illumination et au design même du photoréacteur ont un effet crucial sur l'efficacité du procédé. Concernant les applications biologiques, il existe de nombreux autres facteurs d'importance dont certains ne sont que très difficilement contrôlables et encore moins mesurables, ce qui augmente encore la complexité de ce type d'études et qui explique peut-être aussi que le traitement de l'air contaminé biologiquement ne soit généralement abordé que qualitativement. Voici quelques paramètres

d'ordre biologique qu'il faut prendre en compte lors de travaux de décontamination par voie photocatalytique :

- L'organisme cible

Les différences de sensibilité aux méthodes de décontamination entre différents microorganismes sont bien connues et ont été indiquées précédemment (Huang, Maness *et al.* 2000; Kuhn, Chaberny *et al.* 2003; Benabbou, Derriche *et al.* 2007). L'organisme le plus étudié dans les tests photocatalytiques est incontestablement la souche K12 d'*Escherichia coli*. Il s'agit cependant d'une souche possédant 15 % de matériel génétique en moins que sa cousine pathogène, la souche O157:H7 (Hayashi, Makino *et al.* 2001). Les enzymes produites pour se protéger du stress oxydatif peuvent ainsi différer en nature comme en quantité (Semchyshyn, Lushchak *et al.* 2005) ce qui peut biaiser les résultats obtenus.

De plus, cette bactérie n'étant que rarement présente sous forme d'aérosol et étant en outre peu résistante à la dessiccation, on peut se demander si elle peut être considérée comme un organisme modèle dans les études relatives à la décontamination de l'air.

- Les conditions de culture

La résistance et la réponse des microorganismes au stress oxydatif sont évidemment une donnée clef de leur sensibilité à la décontamination photocatalytique. Celles-ci sont grandement influencées par leur vécu pendant la culture. En effet, en étant au contact de l'oxygène, les microorganismes vont synthétiser des enzymes de protection contre les radicaux des FRO (catalase, superoxyde dismutase...). Ainsi, des cultures sur agar peuvent présenter une sensibilité différente de celles qui se sont développées en milieu liquide. Cette différence de sensibilité inhérente aux conditions de culture a déjà été prouvée dans un autre domaine (résistance à l'acide) (Jarvis et Russell 2001).

La température de croissance est aussi un point important, notamment pour les tests de décontamination comme indiqué par Maness et ses collègues (Maness, Smolinski *et al.* 1999). Ceci peut être relié à des variations de la composition de la membrane qui dépend de la température de croissance (Morein, Andersson *et al.* 1996). De la même façon, l'état physiologique des cellules est important (Verran, Sandoval *et al.* 2007). Des cellules issues d'une culture en phase de croissance ayant tourné leur métabolisme vers la multiplication seront plus sensibles que des microorganismes en phase stationnaire qui sont passés à un métabolisme de « survie ». De même, ce changement d'état physiologique est corrélé à un important changement dans la composition membranaire.

Une source de variation moins évidente semble être le nombre de « repiquages » dont est issue la suspension de travail (Rincon et Pulgarin 2004). Elle peut être liée à l'accumulation de mutations dans une culture.

De même, la formation de polysaccharides extracellulaires peut inhiber les effets biocides de la photocatalyse (Liu, Li *et al.* 2007).

- Les conditions expérimentales

Comme évoqué précédemment, les conditions expérimentales peuvent directement induire des variations dans les résultats. La concentration initiale en microorganismes par exemple a une influence sur l'efficacité de traitement de l'eau (Rincon et Pulgarin 2004). Ceci est dû au fait qu'il peut se produire un effet d'ombrage accru en cas de forte densité de microorganismes. De plus, le lysat entre en compétition avec les bactéries pour ce qui est de la photodégradation.

La composition du flux porteur a déjà été évoquée, mais fait partie des points les plus importants à relever. Il en est de même avec le fluide de collection pour l'étape de collecte lorsque celle-ci s'effectue en milieu liquide. Le choc osmotique pouvant résulter de l'utilisation d'eau non minéralisée peut accroître artificiellement l'efficacité de décontamination (Sichel, Blanco *et al.* 2007). Pour les expériences portant sur les bioaérosols, une attention particulière doit être portée à l'hygrométrie qui influence non seulement la réactivité photocatalytique, mais aussi la survie des microorganismes et les caractéristiques de l'aérosol.

IV 2 Les mécanismes de la décontamination photocatalytique.

Bien que les mécanismes impliqués dans la dépollution chimique par photocatalyse soient actuellement relativement bien connus, ceux qui sont mis en jeu dans la décontamination biologique sont beaucoup moins bien connus. De nombreuses publications indiquent que ce sont majoritairement les FRO (Huang, Maness *et al.* 2000; Lu, Zhang *et al.* 2005) qui sont à l'origine de l'effet biocide de la photocatalyse, bien qu'une oxydation directe par les trous d'électrons ne soit pas à exclure (Gogniat, Thyssen *et al.* 2006). Ce sont notamment les radicaux hydroxyles OH° qui semblaient depuis longtemps être la FRO la plus impliquée dans l'effet biocide de la photocatalyse (Saito, Iwase *et al.* 1992; Cik, Priesolova *et al.* 2006).

Néanmoins, c'est seulement en 2004 que Cho et ses collègues ont mis en évidence de façon quantitative la corrélation entre la cinétique de désinfection et la quantité de radicaux hydroxyles produits à l'état stationnaire (Cho, Chung *et al.* 2004). La question demeure cependant de savoir si cet effet est d'avantage dû à des radicaux hydroxyles liés à la surface du photocatalyseur ou à des radicaux libres (Cho, Chung *et al.* 2005). Ces auteurs ont montré qu'il n'y a pas de réponse unique puisque cela dépend de l'organisme étudié. Ainsi, ils concluent que les phages MS-2 sont particulièrement sensibles aux radicaux libres en solution alors que *Escherichia coli* est inactivée par les deux types de radicaux hydroxyles. Les autres FRO cités dans le cadre de la décontamination photocatalytique sont notamment le peroxyde d'hydrogène H₂O₂ (Rajagopal, Maruthamuthu *et al.* 2006) et l'anion superoxyde O₂^{o-} (Kashige, Kakita *et al.* 2001).

Les questions en suspens portent en fait plus sur les cibles de ces FRO et sur les mécanismes biochimiques mis en jeu. Il y a cependant un consensus sur le fait que la membrane est la première cible des radicaux hydroxyles (Huang, Maness *et al.* 2000; Kuhn, Chaberny *et al.* 2003; Gogniat, Thyssen *et al.* 2006). Parallèlement, la désestérification/peroxydation des phospholipides des membranes bactériennes suite à l'action de l'anion superoxyde est un autre mode d'inactivation des microorganismes (Maness, Smolinski *et al.* 1999; Sokmen, Candan *et al.* 2001; Cheng, Chan *et al.* 2007). Une fois la membrane endommagée elle devient perméable aux radicaux libres et ceux-ci peuvent alors pénétrer dans la cellule et endommager les acides nucléiques (Wamer, Yin *et al.* 1997; Cheng, Chan *et al.* 2007) ainsi que d'autres composants internes comme les enzymes (Saito, Iwase *et al.* 1992).

H₂O₂ agit différemment, car étant électriquement neutre, il peut passer à travers les membranes intègres pour former en présence de fer des radicaux hydroxyles par la réaction de Fenton, ceux-ci agissant directement à l'intérieur de la cellule (Imlay, Chin *et al.* 1988; Imlay et Linn 1988; Hirakawa, Mori *et al.* 2004; Gogniat et Dukan 2007).

On peut noter que la plupart de ces mécanismes concernent la décontamination photocatalytique de l'eau, les études relatives à ceux impliqués dans le traitement de l'air sont à l'heure actuelle très mal connues et très peu documentées.

IV 3 Les modifications du photocatalyseur pour les applications biologiques.

En comparaison aux très nombreuses études portant sur les modifications du photocatalyseur dans le cadre de la dépollution chimique (Blake 1999), il y a nettement moins de travaux voués à l'amélioration du photocatalyseur pour des applications biologiques. Ce sont en fait le cuivre et l'argent qui sont les deux métaux les plus rencontrés dans la littérature comme ajouts ou modifications du TiO₂, l'argent étant de loin l'élément le plus utilisé. On peut citer comme autres éléments ayant aussi été testés au niveau biologique : Pd (Erkan, Bakir *et al.* 2006), N (Liu, Li *et al.* 2007), Nd (Rana, Rawat *et al.* 2006), Sn (Sayılkan, Asiltürk *et al.* 2008)...

Il convient de bien distinguer entre les modifications apportées par l'Ag et le Cu au niveau photocatalytique des effets bactéricides propres à ces éléments qui sont connus depuis très longtemps (Moore, Leonard *et al.* 1908). Au niveau photocatalytique, il a été reporté que ces deux métaux, présents en quantités optimales, jouent principalement le rôle de « piège à électrons », limitant ainsi les recombinaisons (Lee, Shen *et al.* 1993; El-Morsi, Budakowski *et al.* 2000; Morikawa, Irokawa *et al.* 2006). En revanche, en tant que métal, il est connu depuis très longtemps que ces deux éléments peuvent directement inactiver des microorganismes et de nombreuses études ont commencé au début du siècle dernier afin de mieux comprendre ces phénomènes et de les appliquer (Moore, Leonard *et al.* 1908). Le cuivre et l'argent ont des effets similaires, l'argent étant cependant plus actif :

- Dénaturation et complexation des acides nucléiques (Russell et Hugo 1994)
- Blocage des enzymes (Schreurs et Rosenberg 1982; Karlstrom et Levine 1991), notamment ceux de la chaîne respiratoire (Bragg et Rainnie 1974).
- Lyse de la cellule par peroxydation et complexation de la membrane (Clement et Jarrett 1994; Stohs et Bagchi 1995; Dibrov, Dzioba *et al.* 2002)

Il existe déjà de très nombreuses applications basées sur ces deux métaux, sous forme ionique (Goo Hwang, Katayama *et al.* 2007), à l'état massique (Keevil 2005) ou sous forme de nanoparticules (Yuranova, Rincon *et al.* 2006). Citons par exemple un dispositif de traitement de l'eau basé sur l'action de nanoparticules d'argent déposées de façon stable sur une mousse de polyuréthane qui permet avec un temps de passage de l'ordre de la seconde un abattement de 5log sur *E.coli* (Jain et Pradeep 2005). Cependant, comme pour les antibiotiques, les

microorganismes développent des stratégies de résistance (Feng, Wu *et al.* 2000; Brady, Lisay *et al.* 2003; Silver, Phung *et al.* 2006) et il convient d'en tenir compte.

II PARTIE EXPÉRIMENTALE

Ce chapitre va présenter les principaux protocoles expérimentaux. Tout d'abord, nous présenterons les modifications du TiO₂ commercial avec du cuivre et de l'argent, puis la préparation des réacteurs de décontamination photocatalytique. Ensuite, la préparation des suspensions de microorganismes sera détaillée, avant de décrire le déroulement des tests de décontamination, soit en mode « one pass », soit en mode « recirculation ». Enfin, les protocoles directs et indirects de numération des microorganismes seront précisés.

I PRÉPARATION DES CATALYSEURS

Les résultats de décontamination présentés dans ce travail de thèse ont été principalement obtenus avec un catalyseur commercial, le P25 (Degussa, Allemagne), qui aura servi de matériau de référence pour l'optimisation de la géométrie et du garnissage des photoréacteurs. Néanmoins, quelques autres matériaux photocatalytiques basés sur ce catalyseur commercial ont été testés afin d'en améliorer les propriétés biocides, notamment par l'ajout de cuivre ou d'argent.

Comme expliqué dans le chapitre précédent, le cuivre et l'argent sont des métaux permettant des modifications intéressantes du dioxyde de titane pour des applications de décontamination. Dans un souci de reproductibilité, des synthèses simples par photoréduction d'ions métalliques directement sur le support TiO₂ déjà cristallisé (P25, Degussa) ont été préférées à des méthodes plus complexes comme l'ajout d'ions métalliques lors de synthèses sol-gel. Les charges métalliques ajoutées au dioxyde de titane ont été choisies de sorte qu'elles soient suffisantes pour générer un effet biocide en l'absence de photocatalyse, cependant sans nuire à l'efficacité globale des matériaux ou des réacteurs d'un point de vue photocatalytique..

Les solutions métalliques utilisées ont été préparées à partir de sels dont l'anion est aisément éliminable par traitement thermique, comme les nitrates métalliques ou les carbonates métalliques. Néanmoins, les carbonates métalliques étant insolubles dans l'eau et pouvant contenir des ions sodium issus de leur préparation, les nitrates métalliques leur ont été préférés.

I 1 Préparation des catalyseurs au cuivre

Pour nos applications, une solution mère a été préparée en dissolvant 350 mg de nitrate de cuivre $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 2,5\text{H}_2\text{O}$ dans 2 mL d'eau distillée (H_2O d).

Pour chaque photocatalyseur testé, 0,5 g de TiO_2 a été mis en suspension dans 200 mL d'une solution H_2O d – éthanol absolu (2:1 rapport volumique) (Foster, Lancaster *et al.* 1995), à laquelle a été ajouté un volume donné de la solution mère précisé dans le tableau 5.

N°	1	2	3	4	5
Masse de TiO_2 (g)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Volume de la solution mère (μL)	50	100	200	400	750
% massique Cu	0,5%	1,0%	1,9%	3,8%	6,9%
% atomique Cu	0,6%	1,2%	2,4%	4,8%	8,6%

Tableau 5. Préparation et composition finale des photocatalyseurs obtenus par photoréduction de nitrate de cuivre sur P25 avec une solution mère 0,78 M en Cu^{2+} .

Pour l'étape de photoréduction, chaque suspension est placée pendant deux heures sous agitation magnétique à 10 cm en dessous d'une lampe UVA (60 cm, 40 W avec réflecteur OSRAM, France), avant évaporation du liquide à température ambiante sous air pendant 24 heures tout en maintenant l'agitation.

Les poudres ainsi obtenues sont alors finement broyées au mortier puis soumises à un posttraitement thermique pendant deux heures à 300 °C pour décomposer les restes éventuels de nitrate de cuivre (température de décomposition : 180 °C) et évaporer l'acide nitrique formé pendant l'étape de photoréduction (température d'ébullition de l'acide nitrique pur : 86 °C) sans toutefois modifier la structure cristallographique du P25.

Notons que la littérature relative aux applications photocatalytiques utilisant du cuivre photoréduit pour des applications chimiques indique une valeur optimale de 0,5 %m (pourcentage massique) (Sobczynski 1991).

I 2 Préparation des catalyseurs à l'argent

Dans le cas de l'argent, une solution mère a été préparée en dissolvant 97 mg de nitrate d'argent AgNO_3 dans 5 mL d'eau distillée (H_2O d).

Pour chaque photocatalyseur testé, 0,5 g de TiO_2 a été mis en suspension dans 200 mL d'une solution H_2O d – éthanol absolu (2:1 rapport volumique), à laquelle a été ajouté un volume donné de la solution mère précisé dans le tableau 6.

N°	1	2	3	4	5
Masse de TiO ₂ (g)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Volume de la solution mère (μL)	50	100	200	400	750
% massique Ag	0,1%	0,2%	0,5%	1,0%	1,8%
% atomique Ag	0,1%	0,2%	0,4%	0,7%	1,3%

Tableau 6. Préparation et composition finale des photocatalyseurs obtenus par photoréduction de nitrate d'argent sur P25 à partir d'une solution mère 0,114 M en Ag⁺.

Pour l'étape de photoréduction, chaque suspension est placée pendant deux heures sous agitation magnétique à 10cm en dessous d'une lampe UVA (60 cm, 40 W avec réflecteur OSRAM, France), avant évaporation du liquide à température ambiante sous air pendant 24 heures tout en maintenant l'agitation.

Les poudres ainsi obtenues sont alors finement broyées au mortier puis soumises à un posttraitement thermique pendant deux heures à 300 °C pour décomposer les restes éventuels de nitrate d'argent (température de décomposition : 220 °C) et évaporer l'acide nitrique formé lors de la photoréduction (température d'ébullition de l'acide nitrique pur : 86 °C) sans toutefois modifier la structure cristallographique du P25. L'élimination de ces produits est confirmée par analyse thermogravimétrique en comparant un échantillon avant, et après traitement thermique (Fig. 24). On observe une perte de masse plus importante entre 200 °C et 300 °C pour l'échantillon brut que pour l'échantillon ayant subi préalablement le posttraitement thermique à 300 °C pendant 2 h. Cette variation de masse se situe dans le domaine de températures à laquelle se produit la décomposition thermique du nitrate d'argent, et corrobore les changements de couleur observés après traitement (Fig. 25).

Notons que la littérature relative à l'ajout d'argent à du TiO₂ pour des applications de décontamination photocatalytique utilisant de l'argent photoréduit indique une valeur optimale de l'ordre de 1 %m (pourcentage massique) (Keleher, Bashant *et al.* 2002).

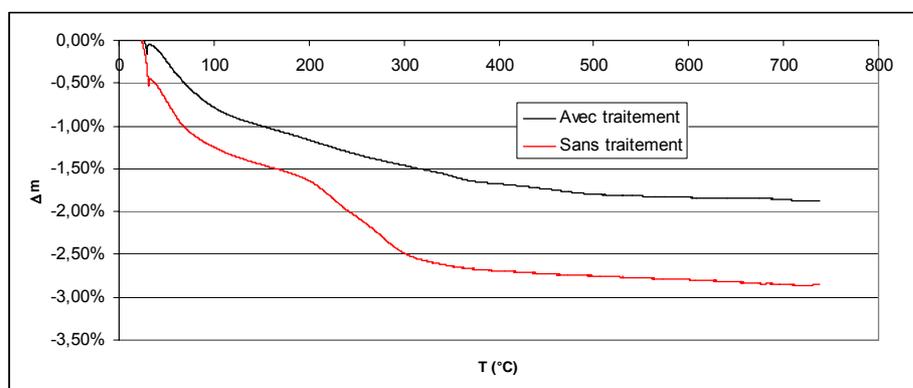


Figure 24. Analyse thermogravimétrique d'un échantillon à 1 %m en Ag (n°4), avant, puis après un traitement thermique de 2 h à 300 °C sous air.



Figure 25. Changement de couleur dû au posttraitement thermique pour les 5 échantillons (h. sans traitement, b. après traitement). Le noircissement se produit dès l'illumination de Ag/TiO_2 , du fait des propriétés photochromiques de ces solides (Ohko, Tatsuma et al. 2003).

I 3 Disques d'inhibition des photocatalyseurs au cuivre et à l'argent

L'utilisation de cuivre et d'argent est intéressante à conjuguer à l'effet photocatalytique, mais elle permet aussi de décontaminer les éventuelles zones du réacteur non ou trop faiblement éclairées, qui pourraient donner lieu à une prolifération bactérienne suite à la formation d'un biofilm.

Afin d'optimiser la quantité de métal pour perturber aussi peu que possible l'effet photocatalytique, des tests inspirés des tests d'efficacité d'inhibition, utilisés notamment pour les antibiotiques, ont été réalisés (Keleher, Bashant *et al.* 2002). Ils consistent à mesurer dans du milieu nutritif gélifié préalablement ensemencé, le diamètre de disques où ne se produit aucune prolifération bactérienne. Ces zones où la croissance a été inhibée du fait de la présence d'une substance pouvant diffuser dans de la gélose de croissance (ici les ions métalliques) sont appelées « disques d'inhibition » et leurs diamètres respectifs sont représentatifs de l'efficacité de chaque substance (Fig. 26).

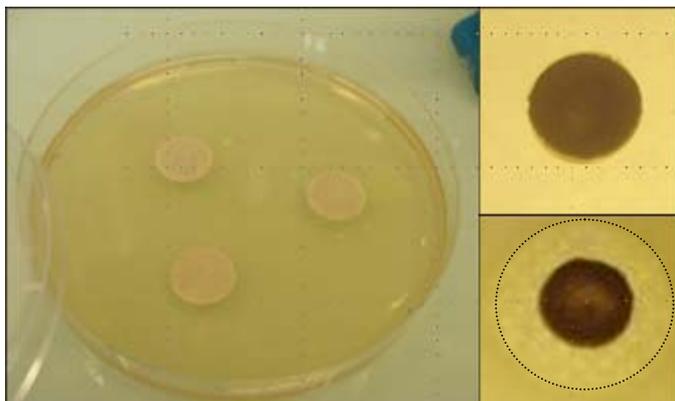


Figure 26. (g.) Boîte de pétri contenant les photocatalyseurs pris dans la gélose nutritive. (h.à.d.) Le P25 n'affecte pas la croissance de *E.coli* alors qu' $\text{Ag}(0,1\%)/\text{P25}$ inhibe la multiplication des bactéries proches (b.à.d.).

La démarche peut se résumer comme suit (Fig. 27) :

- Préparer des boîtes de pétri standard avec 10 mL de LB agar.
- Laisser la gélose figer et enlever des disques de gélose avec un emporte-pièce.
- Déposer dans les parties évidées les catalyseurs pulvérulents à tester puis quelques gouttes de LB Agar « mou » en surfusion (40 °C) et laisser l'ensemble figer. Ceci évite que les poudres soient entraînées dans l'étape de recouvrement.
- Ensemencer 50 mL de LB Agar « mou » en surfusion (40 °C) avec 300 µL d'une suspension d'*Escherichia coli* issue d'une culture liquide de 4 h à 37 °C. L'utilisation de gélose molle permet de laisser plus facilement la substance à tester diffuser et de ne pas gêner la prolifération bactérienne.
- Recouvrir rapidement la surface de la boîte avec 5 mL de la gélose molle ensemencée précédemment.
- Incuber à 37°C pendant 24h.
- Mesurer le diamètre des disques où il n'y a pas eu de prolifération bactérienne du fait d'une concentration en ions métalliques supérieure à une valeur limite (appelée Concentration Minimale d'Inhibition, CMI).

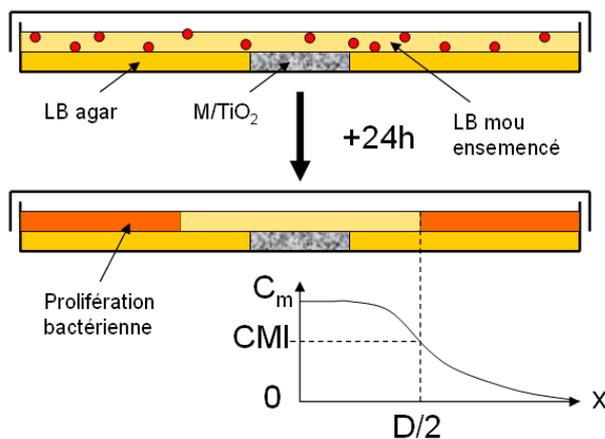


Figure 27. Représentation schématique des tests d'efficacité d'inhibition à la prolifération bactérienne. (h.) Dans du LB agar, on dispose une quantité connue du photocatalyseur chargé en métal M/TiO_2 à tester, puis on recouvre cette première couche avec du LB « mou » ensemencé par *E.coli* (points rouges). Après une période d'incubation de 24h, les ions métalliques ont pu diffuser dans la gélose et les bactéries se sont multipliées, sauf dans un disque de rayon $x=D/2$ où la concentration locale en ions métalliques $C_m(D/2)$ est supérieure à une valeur critique appelée Concentration Minimale d'Inhibition (CMI).

II CONCEPTION ET PRÉPARATION DES RÉACTEURS

Deux aspects complémentaires ont été pris en compte dans l'étude et l'optimisation de photoréacteurs destinés *in fine* à la décontamination de l'air intérieur dans des environnements réels. Il s'est agi premièrement d'**optimiser la géométrie des photoréacteurs**. Pour ce faire, trois géométries différentes ont été conçues et testées. Ensuite, **le développement d'un média consistant en un garnissage photocatalytique tridimensionnel** pouvant être inséré dans des réacteurs de géométrie différente a été entrepris.

Ces deux approches complémentaires sont nécessaires dans le sens où, pour des applications en environnements réels, les débits à traiter peuvent facilement atteindre quelques centaines voire milliers de $\text{m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$. La seule optimisation de la géométrie du réacteur peut certes améliorer les contacts entre le revêtement photocatalytique et le flux contaminant « léchant », mais n'est pas suffisante. Par conséquent, à ces débits, une des voies intéressantes est de travailler en « flux traversant » pour encore améliorer le contact. Ceci nécessite donc la mise au point d'un média ou garnissage tridimensionnel devant répondre à des contraintes sévères, brièvement décrites ci-après, et qui fait l'objet du chapitre V de ce mémoire.

Les trois configurations de réacteur décrites ci-dessous ont été conçues dans un premier temps en mode « single pass » à $5 \text{ m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$. Seul le troisième réacteur a été adapté sous forme de prototype pour une utilisation en mode « recirculation » à $140 \text{ m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$.

II 1 Réacteur « paillasson »

Le principe de ce réacteur inspiré de travaux préliminaires (Keller, Keller *et al.* 2005) est d'augmenter la surface interne du réacteur, les probabilités de rencontre microorganismes / dioxyde de titane ainsi que les turbulences induites surtout à forts débits. Ceci est rendu possible en utilisant un garnissage formé par des agrafes de 10 mm de long et de 2 mm d'épaisseur, en acier galvanisé. Les agrafes sont maintenues en place enfoncées dans un grillage fin et souple (300 mm x 120 mm), et disposées normalement au réacteur en direction de la lampe placée au centre du réacteur (lampe actinique UVA, 8 W, Philips, Pays-Bas) (Fig. 28 et 29). Une attention particulière a été portée aux conditions d'illumination de l'ensemble

du revêtement photocatalytique, c'est-à-dire au niveau de la paroi et des agrafes, afin de ne pas provoquer trop d'ombrage. Des tests précédents (non présentés) ont permis d'estimer qu'une densité d'environ 7 « piques » par cm^2 était un bon compromis entre gain de surface et illumination (NB : il y a deux « piques » par agrafe). Ainsi, cette configuration permet d'obtenir une surface de 350 cm^2 au niveau de la paroi, et une d'environ 2000 cm^2 au niveau des 1200 agrafes, ce qui représente pour ce réacteur, de 4 cm de diamètre et de 30 cm de long, un gain de 570 % en surface géométrique disponible !

Le dépôt de photocatalyseur a été réalisé par 10 imprégnations successives (« dip-coating »), consistant chacune en une immersion dans une suspension aqueuse de dioxyde de titane (100 g/L, P25, Degussa) maintenue sous très vive agitation, puis un égouttage et enfin un séchage sous air comprimé qui permet d'obtenir un dépôt adhérent entre chaque imprégnation. La densité surfacique finale en TiO_2 est estimée à $1,5 \text{ mg/cm}^2$.

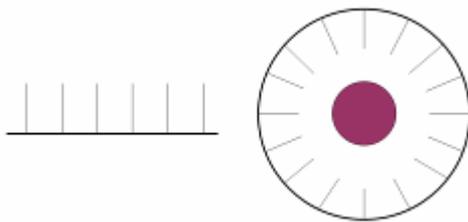


Figure 28. Les agrafes sont d'abord insérées dans un grillage souple avant de procéder au dépôt du photocatalyseur. L'ensemble est ensuite mis sous sa forme cylindrique, laquelle permet d'insérer le tube fluorescent UVA en son axe.



Figure 29. Exemple de réacteur de type paillason. Dans cet exemple, une alternance de deux tailles d'agrafes a été choisie pour optimiser l'illumination dans les zones éloignées de la lampe dans ce réacteur plus large que celui utilisé lors des tests de décontamination.

II 2 Réacteur « torsadé »

L'idée directrice de ce réacteur est d'utiliser la force centrifuge pour augmenter la probabilité de contact microorganismes / dioxyde de titane. Ceci est possible en forçant le flux à tourner dans les torsades constituées par les 8 demi-tuyaux en silicone (diamètre externe : 10 mm ; diamètre interne : 7 mm), enroulés sur un tube en pyrex central contenant la lampe (lampe

actinique UVA, 8 W, Philips, Pays-Bas) (Fig. 30). Les demi-tuyaux sont recouverts sur leur face interne de TiO_2 (P25) via 10 imprégnations successives dans une suspension aqueuse à 10 %m, avant d'être séchés à l'air comprimé puis enroulés autour du tube central. De cette façon, la section libre à l'écoulement est d'environ 6 cm^2 , pour une surface géométrique développée de 530 cm^2 qui représente un gain de 40 % en surface géométrique disponible par rapport à un réacteur tubulaire de diamètre équivalent (4 cm). Le gain est beaucoup plus faible que dans le cas du réacteur paillason, mais rien n'entrave l'illumination à la surface des demi-tuyaux. On peut donc plus facilement assimiler ce gain en surface géométrique disponible à un gain en surface photoactive que dans le cas du réacteur « paillason ».

Ainsi, les microorganismes entraînés par inertie ont une plus grande chance de rencontrer la paroi que dans un réacteur tubulaire classique. Cette géométrie permet d'augmenter efficacement la surface active du réacteur palliant par la même occasion une des principales limitations du réacteur paillason à savoir les inévitables zones d'ombre liées à la disposition, à la longueur et au nombre des agrafes.



Figure 30. (g.) Vue en coupe du réacteur torsadé. (d.) Enroulage des demi-tubes lors de la conception du réacteur. Diamètre du réacteur: 40 mm. Longueur du réacteur: 300 mm.

II 3 Réacteur « tangential »

Ce réacteur consiste en un dispositif incluant un ventilateur tangential pouvant débiter jusqu'à $70 \text{ m}^3/\text{h}$ (Fig. 31 et 32). La surface des 22 pales et celle de l'intérieur du dispositif représentent respectivement une surface de 800 cm^2 et de 240 cm^2 . Les pales en aluminium ainsi que la partie interne sont recouvertes de dioxyde de titane (densité : $1,5 \text{ mg}/\text{cm}^2$) par « dip-coating » avec une suspension à $100 \text{ g}/\text{L}$ de P25, comme décrit pour les autres réacteurs. La masse maximale de photocatalyseur perdue après de nombreuses utilisations est comprise entre 1 et 6 %m (Josset, Taranto *et al.* 2007).

La lampe (UVA, 24 W, Philips, Pays-Bas) en forme de U est située à l'extérieur du ventilateur, du côté de l'entrée du flux d'air (Fig. 31). Ce système présente l'intérêt de

pouvoir bénéficier de la dépression naturelle se formant au niveau de l'intrados des pales du ventilateur, ce qui sépare les microorganismes du flux porteur en les « collant » sur la surface photoactive, permettant ainsi d'améliorer leur inactivation et leur dégradation (Fig. 31). Lors des tests en mode « one pass » à 5 m³/h, le ventilateur est uniquement mû par le bioaérosol entrant dans le photoréacteur, de sorte que les tests puissent être réalisés à 5 m³/h, c'est-à-dire à un débit bien inférieur au débit maximal du ventilateur.

Après validation en mode « one pass » à 5 m³/h, cette configuration « tangentielle » a été testée en recirculation. La version testée en recirculation à 140 m³/h est constituée de deux ventilateurs dont les entrées d'air se font face avec la lampe insérée entre les deux de sorte que la lumière issue des deux côtés de la lampe puisse être utilisée. Les détails de ce réacteur ont été publiés (Josset, Taranto *et al.* 2007).

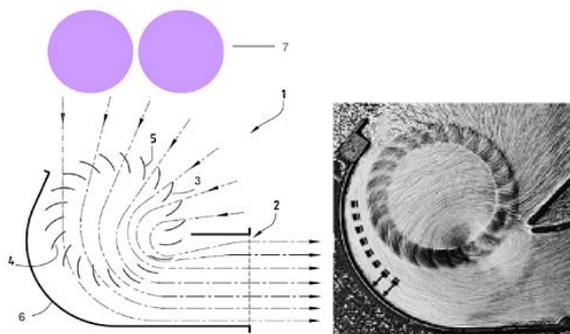


Figure 31. Description schématique en coupe du ventilateur tangential. (1) flux d'air entrant contaminé ; (2) flux d'air sortant décontaminé ; (3) pales du ventilateur ; (4) intrados de la pale ; (5) extrados de la pale ; (6) enceinte du ventilateur ; (7) lampe UVA en « U ». (Josset, Taranto *et al.* 2007). (b.) Coupe transversale du ventilateur tangential avec visualisation des lignes de courant (données constructeur).

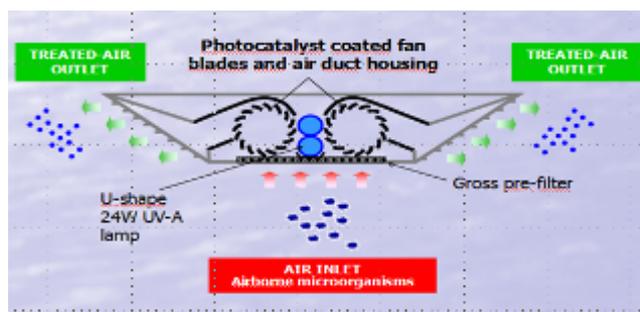


Figure 32. Vue en coupe du dispositif muni de deux ventilateurs tangentiels placés de part et d'autre d'une lampe UVA 24 W.

II 4 Média tridimensionnel à base de mousse de polyuréthane (PU)

Le traitement de l'air à fort débit engendre quelques limitations parmi lesquelles des temps de contact très courts entre le flux contaminé et le revêtement photocatalytique lorsqu'on travaille en « flux léchant » mais aussi des pertes de charge éventuellement induites lorsqu'on

travaille en « flux traversant », bien que ce dernier mode permette une amélioration notable du contact entre le flux contaminé et la surface active.

C'est dans cette optique que nous avons développé un nouveau garnissage photocatalytique à base de mousse de PU (Fig. 33), qui puisse être intégré dans des dispositifs photocatalytiques de tailles et de géométries variées. Les réacteurs basés sur l'utilisation de mousse de PU ayant une taille d'alvéoles supérieure ou égale à 4800 μm (Bulpren S32760, Recticel, Belgique, Fig. 33) comme support photocatalytique, ont pour vocation d'améliorer la probabilité de rencontre microorganisme/surface photocatalytique en augmentant la surface et la tortuosité à l'intérieur du réacteur, mais également en accroissant les turbulences.

Protection de la mousse de PU et fixation du catalyseur

La mousse organique de PU de départ doit être passivée pour être protégée de la dégradation photocatalytique. Cette passivation est obtenue via trois couches de polysiloxane à partir d'un composé précurseur commercial, le Sivo 110™ (Degussa, voir annexe IV pour les propriétés physico-chimiques), dont la polymérisation par condensation des fonctions silanols permet de former une couche composée d'un réseau tridimensionnel de polysiloxane. Une dernière couche de ce polymère permet de fixer solidement les grains de photocatalyseur sur le support grâce à des liaisons chimiques. Cette mousse tridimensionnelle passivée recouverte d'un revêtement photocatalytique constitue un nouveau média, et ses propriétés et caractéristiques seront décrites de façon détaillée dans la partie V. Des travaux en cours au LMSPC visent également à utiliser d'autres supports dérivés de la mousse alvéolaire de PU pour des applications nécessitant des contraintes physico-chimiques différentes. Il est par exemple possible d'obtenir une structure rigide de carbone, insensible à la chaleur en comparaison au PU, en carbonisant/pyrolysant lentement jusqu'à 900 °C de la mousse de PU préalablement imprégnées de résine polyphénolique (Marek et Yudichak 1975). Une autre possibilité réside dans la carburation de cette même mousse de carbone en mousse de carbure de silicium (β -SiC), qui est déjà utilisée pour d'autres applications catalytiques au LMSPC, en exploitant notamment les propriétés physico-chimiques du β -SiC sans pour autant créer de pertes de charge importantes (Lacroix, Nguyen *et al.* 2007). Le SiC a déjà fait ses preuves en temps que matériau photocatalytique pour des applications de dépollution de l'air (Keller et Garin 2003; Keller, Keller *et al.* 2004), mais il est à noter que sa préparation est très consommatrice d'énergie, ce qui impose de façon évidente d'en limiter l'utilisation à des applications où il apparaît comme nécessaire, ou particulièrement bénéfique.

Dans le cadre de cette thèse, seules les mousses de PU passivées seront décrites puisque les conditions d'utilisation sont particulièrement douces par rapport à celles rencontrées dans les réactions de chimie industrielle utilisant les mousses de β -SiC en catalyse thermique : en milieu peu agressif chimiquement et à température ambiante. De plus, les très importants volumes horaires à traiter nécessitent l'utilisation d'une quantité importante de ce garnissage, dont le coût doit donc être le plus faible possible.

Exemple de préparation d'un réacteur photocatalytique avec garnissage tridimensionnel à base de mousse de PU passivée

Un tel réacteur est constitué d'un réacteur tubulaire garni du média photocatalytique assemblé sous forme d'un empilement de treize anneaux de mousse de PU découpés à l'emporte-pièce (70 mm de diamètre extérieur et 20 mm d'épaisseur sur une longueur de 26 cm) (Fig. 33). Sur ces treize anneaux, sept d'entre eux sont évidés d'un cylindre interne de 20 mm de diamètre, six d'entre eux le sont d'un cylindre interne de 34 mm. Cette alternance de deux types d'anneaux permet d'améliorer l'illumination à l'intérieur du réacteur par rapport à un réacteur qui serait intégralement rempli de mousse de PU (Fig. 34).

Chaque anneau est préparé individuellement et tous les anneaux ne sont empilés qu'à la fin, ce qui permet un contrôle visuel du bon recouvrement de chaque anneau par le photocatalyseur.



Figure 33. (g.) Structure de la mousse de PU (taille moyenne des alvéoles $\geq 4800 \mu\text{m}$). (d.) Anneau en mousse de PU composant le réacteur (70mm-20mm).

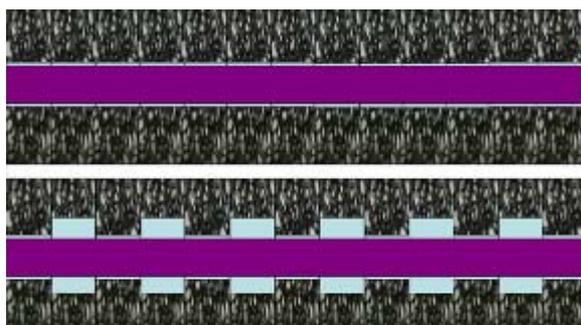


Figure 34. Vue schématique en coupe longitudinale de l'intérieur d'un réacteur entièrement garni de mousse de PU (h.) et celle du réacteur avec l'alternance de disques décrite dans le texte permettant d'améliorer l'illumination (b.). Le tube fluorescent UVA interne est symbolisé par le rectangle violet.

Ainsi, sur chaque anneau de mousse de PU, on procède à trois reprises à la série d'étapes suivantes permettant de protéger la mousse de PU d'une quelconque diffusion d'espèces chimiques :

- Immersion de chaque anneau dans une solution à 50 % volumique de Sivo 110 dans de l'éthanol.
- Ouverture des alvéoles éventuellement obstruées par un film de Sivo 110™ par bref passage à l'air comprimé.
- Polymérisation 15 min à 120 °C sous air ambiant.

Une fois ces trois séquences réalisées, on forme comme précédemment un film de Sivo 110™, mais on laisse d'abord l'éthanol s'évaporer à l'air ambiant de sorte qu'il reste un film visqueux sur les anneaux permettant au catalyseur d'y être fixé sous forme pulvérulente. Une dernière étape de 30 min de polymérisation à 150 °C sous air ambiant permet alors de former un ancrage chimique entre le catalyseur déposé sous forme pulvérulente et le support passivé (Fig. 85, Chp. V § I 4) tout en complétant éventuellement la polymérisation des couches précédentes.

Préparation de l'intérieur du tube contenant la mousse

La face interne du tube en acier contenant le garnissage tridimensionnel, et faisant office de carcasse externe du réacteur, est aussi passivée grâce à trois films de polysiloxane formés comme indiqué dans le paragraphe précédent pour la mousse de PU avec du Sivo 110™, mais la polymérisation se déroule à 180 °C, l'acier galvanisé du tube étant thermiquement plus résistant que le PU. Le photocatalyseur est déposé sous forme pulvérulente sur le film visqueux restant après l'évaporation de l'éthanol d'une quatrième couche de Sivo 110™. L'ensemble est ensuite polymérisé 30 min sous air ambiant à 180 °C.

III PRÉPARATION DES MICROORGANISMES

La préparation des microorganismes comprend à la fois la préparation des milieux de culture, l'incubation et la mise en suspension des microorganismes. Deux types de milieu de culture

ont été utilisés : des milieux liquides (« bouillons ») et des milieux solides (géluses). Les milieux liquides permettent d'obtenir de grandes quantités de bactéries. Ces derniers permettent de procéder à des isolements et au comptage par mise en culture.

III 1 Culture des microorganismes

Les compositions des milieux de culture utilisés pour la préparation des microorganismes sont données dans le tableau 7 pour 1 L de milieu (si précisé, les compléments sont à rajouter par filtration stérile (0,2 µm) à la base stérilisée par autoclavage (121 °C, 2 bar, 20 min)).

N°	MILIEU	COMPOSITION POUR 1L	MICROORGANISME
A	Milieu liquide : Lurian Broth broth (Difco, USA)	Peptone 10,0g, Extrait de levure 5,0g, Chlorure de sodium 10,0g	<i>E. coli</i> , <i>B. subtilis</i>
B	Milieu liquide : Lurian Broth Amidonné (Difco, USA)	A + 2,0g d'amidon	<i>E. coli</i> , <i>B. subtilis</i>
C	Milieu gélifié : Lurian Broth Agar (Difco, USA)	A + 15,0g d'agar	<i>E. coli</i> , <i>B. subtilis</i>
D	Milieu gélifié : LB Agar « mou » (Difco, USA)	A + 7,5g d'agar	<i>E. coli</i> , <i>B. subtilis</i>
E	Milieu liquide : GC-FC sans NaCl (Saito et al. 1992)	<u>Base</u> : Protéose peptone 15,0g, Hydrogénophosphate de dipotassium 4,0g, Dihydrogénophosphate de potassium 1,0g, Hydrogencarbonate de sodium 0,042g, Extrait de levure 10,0g <u>Complément</u> : Pyrophosphate de fer 0,25 g Hydrochlorate de cystéine : 0,4g	<i>L. pneumophila</i>
F	Milieu gélifié : Buffered Charcoal Yeast Extract BCYE (Biomérieux, France)	<u>Base</u> : Extrait de levure 10,0 g, Charbon actif 2,0 g, Agar 15,0 g <u>Complément</u> : Pyrophosphate de fer 0,25 g, Tampon ACES (acide N-(2-Acetamido)-2-aminoethanesulfonique) 10,0g, α-cetoglutarate 1,0g, Hydrochlorate de cystéine : 0,4g	<i>L. pneumophila</i>
G	Milieu liquide : MRS Broth (Difco, USA)	Peptone de caséine 10,0g, Extrait de viande 8,0g, Extrait de levure 4,0g, D(+)-glucose 20,0g, Hydrogénophosphate de dipotassium 2,0g, Tween® 80 1,0g, Citrate di-ammoniacal 2,0g, Acétate de sodium 5,0g, Sulfate de magnésium 0,2g Sulfate de manganèse 0,04g	<i>L. lactis</i>
H	Milieu gélifié : MRS (Difco, USA)	G + 15,0g d'agar	<i>L. lactis</i>
I	Milieu liquide : Löwenstein Jensen (Biomérieux, France)	Oeufs entiers 625 mL, Asparagine 2,25g, Féculé de pomme de terre 18,75g, Glycérol 7,5 mL, Citrate de magnésium 0,375g, Vert de malachite 0,25g, Sulfate de magnésium 0,15g, Dihydrogénophosphate de potassium 1,5 g	<i>M. smegmatis</i>
J	Milieu liquide : Middlebrook 7H9 Broth (Difco, USA)	<u>Base</u> : Sulfate d'ammonium 0,5g, Acide L-glutamique 0,5g, Citrate de sodium 0,1g, Pyridoxine 1,0 mg, Biotin 0,5 mg, Hydrogénophosphate de disodium 2,5g, Dihydrogénophosphate de potassium 1,0g, Citrate Ammoniacal de fer 0,04g, Sulfate de magnésium 0,05g, Chlorure de calcium 0,5 mg, Sulfate de zinc 1,0 mg, Sulfate de cuivre 1,0 mg <u>Complément</u> : Chlorure de sodium 0,85g, Albumine bovine (Fraction V) 5,0g, Dextrose 2,0g, Catalase 0,003g	<i>M. smegmatis</i>

Tableau 7. Composition des milieux de culture et microorganismes concernés.

Les souches utilisées ainsi que leurs durées et températures optimales d'incubation sont indiquées dans le tableau 8.

Microorganisme	Souche	Température d'incubation	Durée d'incubation sur milieu solide	Durée d'incubation sur milieu liquide
<i>Legionella pneumophila</i>	GS3.11*	37°C	24h F	5j E
<i>Bacillus subtilis</i>	CIP 77.18	30°C	24h-48h B	24h A
<i>Escherichia coli</i>	BAM	37°C	12h-24h B	24h A
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	CIP 104444	37°C	48h-72h I	48h-72h J
<i>Lactococcus lactis</i>	ATCC 11454	37°C	24h-48h H	24h-48h G
<i>Bacteriophage T2</i>		37°C	12h-24h B	24h A

Tableau 8. Souche des microorganismes utilisés, températures et durées respectives d'incubation (les milieux indiqués se réfèrent au tableau 7). *(Segal et Shuman 1998)

III 2 Mise en suspension des microorganismes

Les suspensions de bactéries obtenues par culture en milieu liquide sont centrifugées à 10000 tours/minute pendant 10 min (volume centrifugé : environ 50 mL). Le surnageant est jeté et le culot remis en suspension dans de l'eau distillée stérile (volume : 40 mL). La décision d'utiliser de l'eau distillée plutôt que du sérum physiologique (solution de NaCl à 9 g/L permettant d'éviter un stress osmotique trop important) a été prise en considérant qu'il fallait absolument éviter d'introduire des paramètres supplémentaires à l'étude, et notamment des substances pouvant modifier l'activité photocatalytique. De plus, des tests préliminaires ont montré qu'il n'y avait pas de baisses de viabilité sensibles sur les durées de nos expériences (≈ 2 h), en utilisant de l'eau distillée stérile.

De la même façon, les bactéries obtenues par culture sur boîte sont mises en suspension en utilisant une dizaine de billes de verre stériles (2 mm de diamètre) déposées sur la gélose avec 2 mL d' H_2O_d , les billes de verre permettant de décoller les colonies. La suspension concentrée est alors récupérée puis diluée afin d'obtenir un volume total d'environ 40 mL.

Ensuite, dans les deux cas (bouillon ou culture sur boîte), on ajoute quelques billes de verre à la suspension puis on vortexe quelques minutes afin de désagréger les amas bactériens.

IV TESTS DE DÉCONTAMINATION PHOTOCATALYTIQUE

IV 1 La boîte à gants

Les tests sont réalisés dans une enceinte fermée de type « boîte à gants » (Jacomex, France) présentée et décrite sur la figure 35. Celle-ci est munie d'un système de dépressurisation évitant aux microorganismes de se répandre vers l'extérieur de l'enceinte en cas d'ouverture du sas ou de rupture accidentelle du confinement. En effet, bien que travaillant avec des microorganismes non pathogènes, le fait de les aérosoliser rend cette précaution nécessaire.



Figure 35. Enceinte hermétique de type « boîte à gants ». Un double sas (1) permet d'échanger du matériel entre l'intérieur et l'extérieur de la hotte tout en empêchant un contact direct des deux atmosphères. Les hublots (2) peuvent être soit condamnés, soit munis de gants (3) afin de permettre le travail stérile à l'intérieur de l'enceinte. Un système de dépressurisation (4) permet via un filtre HEPA (5) de maintenir une dépression à l'intérieur de l'enceinte pour éviter toute fuite vers l'extérieur. La repressurisation à l'atmosphère se fait elle aussi via un filtre HEPA (6) afin de maintenir une atmosphère stérile dans la boîte à gants.

L'enceinte décrite sur la figure 35 a été utilisée selon deux modes de fonctionnement qui vont être détaillés dans la section suivante :

- Le mode « one pass », qui consiste à introduire de façon continue, à l'aide d'un débitmètre massique, un flux d'air qui se charge en agents biologiques dans un circuit interne à l'enceinte, et à l'envoyer sur le réacteur photocatalytique en un passage unique, puis à l'évacuer à l'extérieur de l'enceinte.

- Le mode « recirculation », qui consiste à générer un aérosol contaminé dans l'ensemble de l'enceinte puis à le traiter par l'intermédiaire d'un photoréacteur permettant un auto-entraînement de l'air.

IV 2 Tests en mode « one pass »

IV 2.1 Description du montage

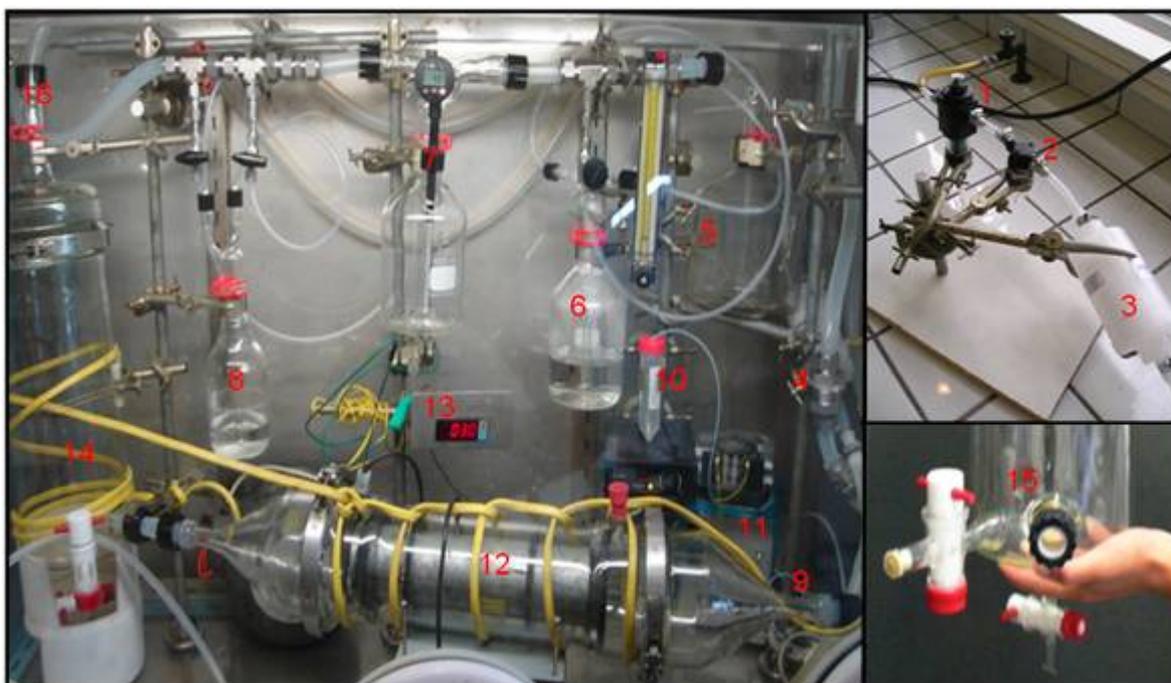


Figure 36. Montage utilisé en mode « one pass ». La description figure dans le texte ci-dessous.

Avant d'être utilisable pour les tests de décontamination, l'air issu du réseau d'air comprimé passe à travers un filtre à poussière (1), un filtre à huile (2) et un filtre Kleenpak (Kleenpak Capsules with Emflon PFR Membrane Assemblies, Pall, UK) (3) ayant un diamètre de coupure de $0,003 \mu\text{m}$ dans les gaz, et assurant ainsi la stérilité du flux entrant. Ces filtres sont situés hors de la hotte (Fig. 36, h.d.). Le débit d'air est réglé par un débitmètre massique (Brooks, gamme 0-100 m^3/h). L'air est ensuite envoyé à travers un clapet antiretour (4) (Swagelok) assurant une isolation du montage dans la hotte envers la partie amont extérieure à la hotte, même en cas de rupture de la partie amont qui est soumise aux pressions les plus élevées du montage (3-4 bar en sortie du réseau d'air comprimé). L'éventuelle dépollution de l'air entrant est assurée grâce au passage à travers une fiole de garde remplie de granulés de charbon actif (5, granulés non présents sur la figure 36, g.).

Une partie du flux peut être détournée afin de barboter dans de l'eau (6) afin de faire varier le taux d'humidité relative. La mesure de la température d'entrée du flux et de l'humidité relative est réalisée par une sonde en (7). La fiole de garde (8) contient de l'eau oxygénée vers laquelle une partie du flux peut-être détournée afin de désinfecter la partie amont du réacteur après chaque expérience. Elle est totalement isolable du reste du montage lors des manipulations.

Le flux est ensuite amené à la zone de formation du bioaérosol : il s'agit d'un rétrécissement (9) (diamètre : 0,5 cm) permettant d'augmenter brusquement la vitesse du gaz dans cette zone et ainsi d'entraîner sous forme d'aérosol les microorganismes placés sous agitation (10) et injectés via une aiguille dans le système par une pompe péristaltique (11) dans le réacteur (12).

L'effluent sortant du réacteur dont la température est mesurée en sortie de réacteur (13) est ensuite intégralement envoyé dans une « colonne à bulle » (14 et 15) contenant environ 2 L d'eau stérile et ayant pour but de récupérer les microorganismes en les séparant du flux gazeux par piégeage dans l'eau. Ce volume de collecte relativement important trouve sa justification dans le fait qu'il faut limiter les pertes de microorganismes par réaérosolisation : les débits de travail étant relativement élevés ($5 \text{ m}^3/\text{h}$), il faut réduire la concentration de microorganismes dans la colonne pour diminuer ces pertes au maximum. En effet, la quantité de microorganismes s'échappant de la colonne dans des gouttelettes entraînées par le flux gazeux sera d'autant plus faible que le liquide de collecte est faiblement concentré. De même, afin de limiter la vitesse d'entrée du flux gazeux dans le liquide ainsi que les turbulences à l'intérieur de la colonne, le tuyau de sortie du réacteur est percé latéralement et se prolonge jusqu'au centre de la colonne à bulle. Le liquide de collecte est récupéré par la sortie située sous la colonne (Fig. 36, b.d.).

Le flux de sortie de la colonne à bulle est ensuite envoyé (16) vers un second filtre Kleenpak (Kleenpak Capsules with Emflon PFR Membrane Assemblies, Pall, UK) puis rejeté via le système d'évacuation d'une hotte à extraction adjacente.

Le fil chauffant entourant l'enceinte du réacteur et la colonne à bulle permet d'élever la température des parois lors de la désinfection à la vapeur d'eau, ou à l'eau oxygénée, injectée juste avant la zone d'injection des microorganismes avant et après manipulation, ceci afin d'éviter une condensation trop importante et d'en améliorer l'efficacité.

IV 2.2 Déroulement des tests en mode « one pass »

Après avoir minutieusement nettoyé et stérilisé la colonne de récupération à la vapeur d'eau ainsi que la partie aval de la zone de formation de l'aérosol (contrôle de la température (13)), la colonne est remplie d'eau stérile et le flux ajusté à la valeur souhaitée (typiquement 5 m³/h). Les microorganismes sont placés sous agitation magnétique modérée (10) et la suspension est injectée dans le montage grâce à la pompe péristaltique à un débit de l'ordre de 10-15 mL/h.

À la fin de la durée impartie (choisie de sorte que toute la suspension n'ait pas été injectée afin d'en effectuer une titration après test), la pompe péristaltique est arrêtée et le contenu de la colonne de collecte est intégralement récupéré. L'abattement est alors obtenu par différence entre la titration de la suspension injectée et celle de la suspension de collecte.

À la fin de chaque expérience, la colonne de récupération et la partie aval de la zone de formation de l'aérosol sont stérilisées à la vapeur d'eau puis des vapeurs d'eau oxygénée sont envoyées par barbotage (8) dans le circuit. La suspension de bactéries est au même titre remplacée par de l'eau oxygénée (10) afin de stériliser les tubulures du système d'injection de la suspension servant à générer le bioaérosol.

IV 3 Tests en mode « recirculation » du réacteur tangentiel

IV 3.1 Description du montage

Lors des tests en recirculation, le montage décrit précédemment est retiré de la boîte à gants. Le réacteur tangentiel en configuration « double ventilateur » est placé au centre de la hotte. Un bioaérosol est généré par une buse et est maintenu en suspension grâce à quatre ventilateurs placés dans les coins de la hotte.

La récupération des microorganismes peut se faire selon deux principes : la récupération par impact direct sur gélose en sortie de réacteur ou par collecte par impact en milieu liquide. Notons que cette dernière méthode offre globalement des résultats plus précis et répétables d'autant que la suspension recueillie présente l'avantage de pouvoir être analysée par épifluorescence.

En effet, la récupération en phase liquide se fait via un dispositif conçu au laboratoire (Fig. 37) inspiré du Biosampler® (SKC, USA) mais offrant un plus grand volume de récupération (250 mL contre 20 mL) et un plus grand débit d'aspiration que celui-ci (50 L.min⁻¹ contre 12,5 L.min⁻¹). Le principe est d'accélérer les microorganismes en faisant passer le bioaérosol dans des buses, dont l'orifice de sortie est de l'ordre du millimètre et de les impacter dans un « mur » liquide (vortex généré par un barreau aimanté). Ce dispositif est relié à une pompe à vide assurant une dépression de l'ordre de 30mmHg.



Figure 37. (g.) Système breveté de récupération BioSampler. (m.) Système développé au laboratoire s'inspirant du BioSampler et permettant d'aspirer le flux d'air à analyser vers une pompe à vide. (d.) Celui-ci entre par le haut du système avant d'être séparé en trois flux accélérés par rétrécissement des orifices de sortie des buses de sorte que les microorganismes s'impactent dans le vortex liquide créé par l'agitation magnétique.

IV 3.2 Déroulement des tests en recirculation

Avant et après chaque expérience, la stérilisation de la hotte (paroi et air) est assurée par une lampe UVC située dans le plafonnier de la boîte à gant. De même, la hotte permet, grâce au système de dépressurisation, de stériliser l'air intérieur de la hotte par filtration en piégeant les éventuels microorganismes présents vers le filtre 3 (Fig. 36) en maintenant le filtre de repressurisation 6 (Fig. 35) légèrement ouvert afin d'assurer une circulation d'air dans l'enceinte.

Afin d'assurer une meilleure stabilité de l'aérosol et un meilleur brassage, notamment dans les zones mortes que sont par exemple les angles, des ventilateurs y sont placés et mis en fonctionnement avant que le bioaérosol ne soit formé.

Les prélèvements sont alors effectués soit en plaçant en sortie de réacteur (à 5 cm) une boîte de gélose nutritive pendant une durée déterminée qui sera incubée dans des conditions adaptées, soit en utilisant le dispositif d'impact précédemment décrit (Fig. 37).

V COMPTAGE ET NUMÉRATION DES MICROORGANISMES

Les différentes méthodes de comptage des microorganismes constituent un des enjeux de cette thèse et cet aspect de notre travail a fait l'objet d'une revue détaillée (Josset, Keller *et al.* 2008). D'une façon globale, celles-ci peuvent être séparées entre les méthodes dites « indirectes » qui reposent sur des observations liées aux conséquences de la présence de microorganismes (formation de colonies) et les méthodes « directes » qui prennent en compte l'observation de microorganismes « individualisés » (par exemple au microscope). Cette section présente donc tout d'abord le comptage par mise en culture (méthode indirecte) puis le comptage par épifluorescence (méthode directe).

V 1 Comptage par mise en culture

On dénombre deux méthodes principales, celle basée sur le comptage d'Unités Formant des Colonies (UFC) et celle utilisant le Nombre le Plus Probable (NPP).

V 1.1 Comptage d'Unités Formant des Colonies

Les comptages par mise en culture s'effectuent classiquement en utilisant des boîtes de pétri standard de 90 mm de diamètre.

Méthode par étalement (Spread Plate)

Cette méthode consiste à réaliser des dilutions en série de la suspension à étudier (typiquement 8 dilutions au $1/10^{\text{ème}}$) dont on étale un aliquot (typiquement 100 μL) à l'aide de billes de verres à la surface du milieu solidifié, suivi d'une incubation à la température et pendant la durée mentionnée au paragraphe III 1 de ce chapitre.

Méthode par immersion (Pour Plate)

De la même façon que pour la méthode par étalement, on réalise des dilutions en série de la suspension à étudier (typiquement 8 dilutions au $1/10^{\text{ème}}$) dont on mélange un aliquot (typiquement 100-500 μL) avec environ 15 mL de gélose nutritive en surfusion (40 °C max).

L'ensemble est alors rapidement coulé dans une boîte de Pétri puis incubé après solidification aux conditions précisées au paragraphe III 1.

Méthode des plages de lyse (virus)

Pour le comptage des virus (bactériophages), on réalise comme pour la méthode par étalement expliquée précédemment des dilutions en série de la suspension à étudier (typiquement 8 dilutions au $1/10^{\text{ème}}$). On étale alors un aliquot (typiquement 100 μL) de chaque dilution à l'aide de billes de verre à la surface du milieu solidifié.

La différence par rapport au comptage de bactéries réside dans le fait que les virus ne formant pas de colonies, on va devoir pour observer des plages de lyse (conséquence indirecte de la présence d'au moins un virus à cet endroit) utiliser de la gélose préalablementensemencée avec la bactérie hôte. Ainsi, on inocule 50 mL de milieu LB « mou » (voir III 1) en surfusion (40 °C) avec 100 μL d'une suspension d'*E.coli* en phase de croissance exponentielle préparée au préalable (milieu LB broth, 37°C, 2 heures, voir III 1). On recouvre alors rapidement les boîtes sur lesquelles ont été étalés les aliquots contenant les virus avec 5 mL de ce mélange avant de les incubé dans les conditions optimales de multiplication des phages (voir III 1).

Lecture des résultats

Après incubation, les colonies ou les plages de lyse sont comptées manuellement au besoin à l'aide d'une loupe. Seules les boîtes présentant un nombre de colonies ou de plages de lyse compris entre 25 et 250 sont jugées statistiquement significatives (APHA 1993). Les résultats sont ramenés à la concentration de l'échantillon initial en multipliant le nombre de colonies ou de plages de lyse observées par le facteur de dilution et en divisant par le volume de l'aliquot utilisé. Les résultats sont donnés avec deux chiffres significatifs afin de ne pas créer une illusion de précision élevée (APHA 1993).

V 1.2 Comptage par la méthode du Nombre le Plus Probable (NPP)

Cette méthode de comptage est basée sur des considérations statistiques réunissant un grand nombre d'expériences qui consistent à observer la multiplication ou non de microorganismes

dans des échantillons obtenus par dilutions de la suspension à analyser (Cochran 1950). Du fait de la binarité de la réponse (croissance ou non), la lecture des résultats est aisée et rapide.

Méthode avec plaques à 96 puits

Les préparations se font dans des plaques de 96 puits (8 x 12 puits, Sero-Wel) de 300 μL de contenance. Le plan NPP typiquement suivi consiste à réaliser huit dilutions en cascade de la suspension au $1/10^{\text{ème}}$ en général à analyser et à inoculer dix tubes de milieu nutritif avec un aliquot de chaque dilution (Fig. 38).

Pour le comptage des bactéries, le milieu utilisé est du LB broth amidonné, l'amidon servant à révéler la croissance ou non de bactéries dans chaque puits grâce à sa propriété de former à froid un complexe violet avec du Lugol (teinture d'iode). En effet, l'amidon étant un sucre, il peut être métabolisé par certaines bactéries lors de leur prolifération. Ainsi, si après une période d'incubation adéquate, l'ajout de Lugol provoque dans un puits une coloration violette, c'est qu'il n'y a pas eu consommation de l'amidon pour la croissance des bactéries. En revanche, si la coloration jaune du Lugol persiste dans un puits, c'est qu'il y a eu métabolisation de l'amidon et donc multiplication des bactéries.

Pour le comptage des bactériophages, le milieu utilisé est aussi du LB broth amidonné ensemencé pour 50 mL avec 100 μL d'une culture de *E.coli* de 2 heures à 37°C. Dans ce cas, après incubation adéquate, la formation du complexe violet amidon – Lugol traduira que les bactéries ont été lysées suite à une infection par les bactériophages, de sorte qu'elles n'ont pas utilisé l'amidon disponible. De la même façon, une coloration jaune indiquera que l'amidon a bien été consommé par les bactéries, indiquant ainsi qu'il n'y a pas eu d'infection par des bactériophages puisque les bactéries ont consommé l'amidon.

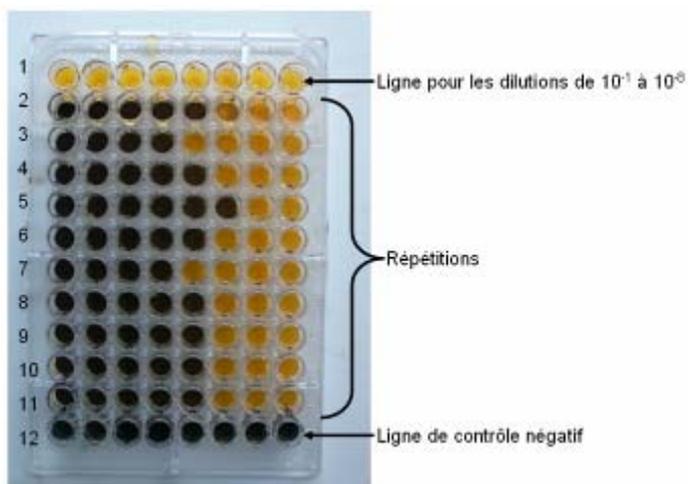


Figure 38. Exemple de plaque multipuits utilisée pour déterminer le NPP d'une suspension de bactéries. Les dilutions en cascade ($1/10^{\text{ème}}$) sont réalisées dans la première ligne, de d. à g., avec de l'eau stérile. La ligne 12 sert de contrôle négatif et contient du LB amidonné et de l'eau stérile ayant servi à réaliser les dilutions. Les répétitions sont réalisées en inoculant grâce à une pipette à huit canaux un aliquot de 20 μL de chaque puits de la première ligne dans celles de 2 à 11.

Lecture des résultats

Dans le cas d'un **comptage de bactéries**, un puits **jaune** indique une croissance bactérienne issue de la présence d'au moins une bactérie (**puits positif**). Dans le cas d'un **comptage de virus**, un puits **violet** indique qu'il n'y a pas eu de croissance du fait d'une infection virale se traduisant par la lyse des bactéries (**puits positif**).

Le « schéma de croissance » correspond, pour chaque dilution, au nombre de tubes positifs. Dans l'exemple de la figure 38, il sera noté (3,4,3,2,3,4,3,3,3). Le calcul du Nombre le Plus Probable de microorganismes est alors effectué simplement en utilisant la feuille de calcul validée par la « Food & Drugs Administration » (Garthright et Blodgett 2003). Ainsi, dans l'exemple de la figure 38, le logarithme du nombre le plus probable contenu dans l'échantillon analysé est de 5,2 avec un intervalle de confiance à 95 % de [4,9-5,5].

V 2 Comptage direct par épifluorescence

Bien que la plupart des normes actuelles en matière de contrôle microbiologique soient, pour des raisons historiques, toujours basées sur des méthodes classiques de culture, un nombre croissant de travaux se base sur l'utilisation de techniques de fluorescence. Ceci est notamment lié à la rapidité de ces techniques et au fait qu'il s'agit d'une observation directe (automatisée ou non) des microorganismes. Dans notre cas, la plupart des comptages de bactéries végétatives a été réalisée en utilisant la technique de microscopie à épifluorescence.

V 2.1 Principe de la microscopie à épifluorescence

Principe de la fluorescence

La fluorescence est le résultat d'un processus en trois étapes pouvant se produire dans certaines molécules (fluorophores), le plus souvent polyaromatiques ou comportant des hétérocycles. Les fluorophores sont choisis pour les applications biologiques en fonction de l'affinité de ceux-ci envers certaines biomolécules présentes dans la cellule (ADN, ARN etc) avec lesquelles ils interagissent. Sans cette interaction, la molécule ne doit pas présenter de fluorescence afin de ne pas gêner les observations.

1^{ère} étape : excitation. Un photon d'énergie $h\nu_{EX}$ est absorbé par la molécule faisant ainsi passer un électron à l'état de singulet S'_1 (Fig. 39).

2^{ème} étape : état excité. Cet état excité dure entre une et dix nanosecondes. Pendant ce laps de temps, la molécule peut subir de nombreux changements de conformation et peut être sujette à de très multiples interactions avec son environnement moléculaire qui peuvent être irréversibles. Ceci a deux conséquences majeures :

- Une partie de l'énergie de l'état S'_1 est dissipée, conduisant la molécule à un état relaxé S_1 . C'est cette désexcitation qui est à l'origine du phénomène de fluorescence.
- Toutes les molécules ayant atteint l'état S'_1 ne reviennent pas à l'état initial S_0 par émission de fluorescence.

3^{ème} étape : émission. Un photon d'énergie $h\nu_{EM}$ est émis permettant au fluorophore de retourner à l'état S_0 . Du fait de la dissipation d'énergie pendant l'état excité, la longueur d'onde du photon émis est supérieure à celle du photon absorbé. Cette différence est appelée le « décalage de Stokes » et caractérise la sensibilité des méthodes de fluorescence puisqu'il est d'autant plus aisé de séparer des photons avec des différences importantes de longueur d'onde.

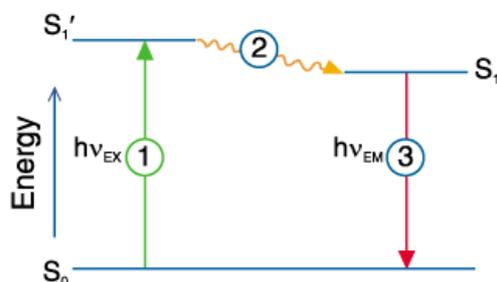


Figure 39. Représentation du phénomène de fluorescence.

La fluorescence est un phénomène cyclique qui peut à priori se reproduire indéfiniment. Cependant, lorsqu'un fluorophore est soumis à une source d'excitation intense, il peut être détruit par un procédé appelé « photoblanchiment » (photobleaching) (Song, Hennink *et al.* 1995). Ce phénomène est très étudié, car de lui dépend la durée possible d'observation de la fluorescence. Les méthodes de prévention du photoblanchiment passent notamment par la limitation de l'intensité et de la durée de l'excitation. De même, une désoxygénation du milieu peut apporter quelques bénéfices, bien que cela soit difficilement réalisable dans des cellules.

Le microscope à épifluorescence

Il existe plusieurs techniques basées sur le marquage par des fluorophores : la spectrofluorométrie, les scanners à fluorescence, la cytométrie de flux et la microscopie par (épi)fluorescence... C'est cette dernière technique qui a été utilisée lors des expériences basées sur des bactéries à l'état végétatif et que nous allons présenter.

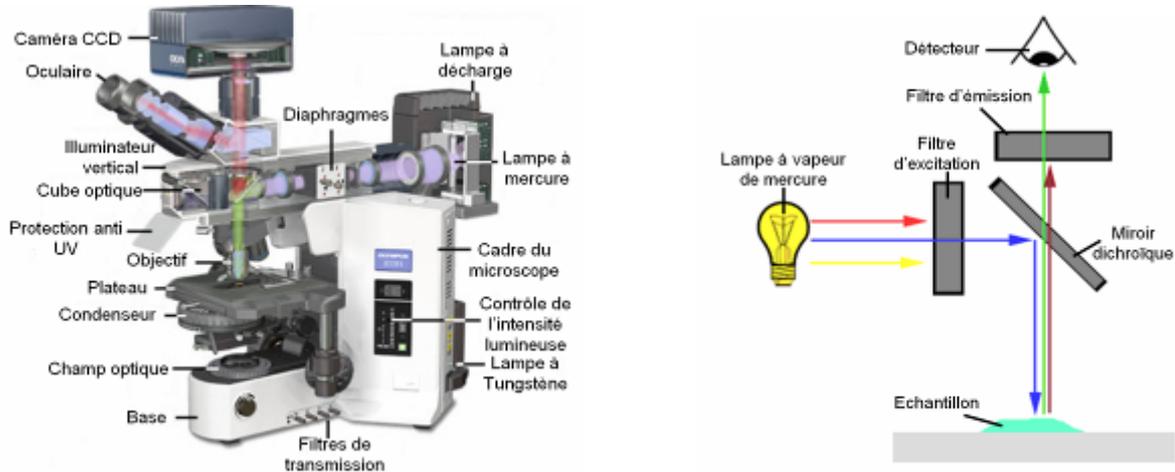


Figure 40. (g.) Schéma structurel d'un microscope à épifluorescence. (d.) Principe de fonctionnement du « cube optique » d'un microscope à épifluorescence. Le filtre d'excitation permet de sélectionner les longueurs d'onde qui seront envoyées sur l'échantillon (bleu) grâce à un miroir dichroïque, lequel les réfléchit entièrement, mais laisse passer les longueurs d'onde issues de l'échantillon par fluorescence (vert et rouge). Enfin, le filtre d'émission permet d'en sélectionner une fraction d'intérêt (rouge).

La partie d'un microscope à épifluorescence concernant les lentilles (oculaire et objectif) est des plus classiques. La différence majeure réside dans le fait que les applications biologiques de la microscopie de fluorescence utilisent le plus généralement de l'épifluorescence, à savoir que la lumière excitatrice arrive par le dessus de l'échantillon et non pas à travers comme dans un microscope classique (Fig. 40). Ainsi, seuls les photons de la lumière d'excitation réfléchis par l'échantillon sont renvoyés vers le détecteur, ce qui facilite ainsi la détection des photons de fluorescence en améliorant le rapport signal/bruit. L'excellente publication de Lichtman et Conchello permet d'approfondir la technique de microscopie par épifluorescence (Lichtman et Conchello 2005).

V 2.2 Matériel optique et protocoles de coloration

Matériel optique

Le matériel d'épifluorescence utilisé est un microscope DM 4000 D (Leica, Allemagne) muni de cubes optiques de la même marque dont les caractéristiques sont indiquées dans le tableau

9. Les courbes d'absorption et d'émission des deux fluorophores du kit BacLight® ainsi que les bandes passantes des différents filtres optiques de chaque cube optique sont représentées dans la figure 41.

Nom	Excitation	Filtre d'excitation	Miroir dichroïque	Filtre d'émission
A4	UV	BP 360/40	400	BP 470/40
I3	bleu	BP 470/20	510	LP 515
N2.1	vert	BP 537,5/22,5	580	LP 590
Y3	vert	BP 545/30	565	BP 610/75

Tableau 9. Cubes optiques utilisés. BP (bandpass) X/Y : Filtre passe-bande laissant passer les longueurs d'onde entre $X \pm Y$. LP (longpass) X : Filtre coupe-bas laissant passer les longueurs d'onde supérieures à X.

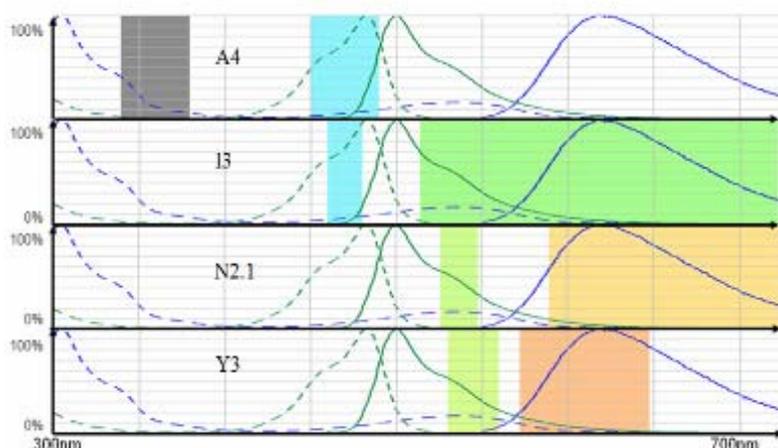


Figure 41. Intensités relatives aux maximums des courbes d'absorption (pointillé) et d'émission (trait plein) des deux fluorophores (vert : Syto 9™, bleu : IP) composant le kit BacLight™ en fonction de la longueur d'onde. Les bandes passantes des filtres d'émission (longueurs d'onde élevées) et des filtres d'excitation (longueurs d'onde courtes) des différents cubes optiques sont superposées.

Comme indiqué sur la figure 41, le cube A4 permet la visualisation des cellules colorées avec le fluorophore S9™, tandis que les cubes N2.1 et Y3 sont eux dédiés aux cellules marquées par l'IP. Le cube I3 est quant à lui particulièrement utile, car il permet d'observer simultanément les cellules colorées avec les deux fluorophores du kit BacLight™ (Fig. 42). Néanmoins, ce cube optique n'est pas parfaitement adapté pour l'observation des cellules marquées par l'IP, puisque les cellules faiblement colorées peuvent ne pas apparaître. Ainsi, il est nécessaire de toujours utiliser une combinaison de deux cubes optiques : I3 ou A4 et N2.1 ou Y3 (Fig. 42). Les détails concernant la prise des clichés microscopiques et le comptage automatisé des cellules figurent en annexe II.

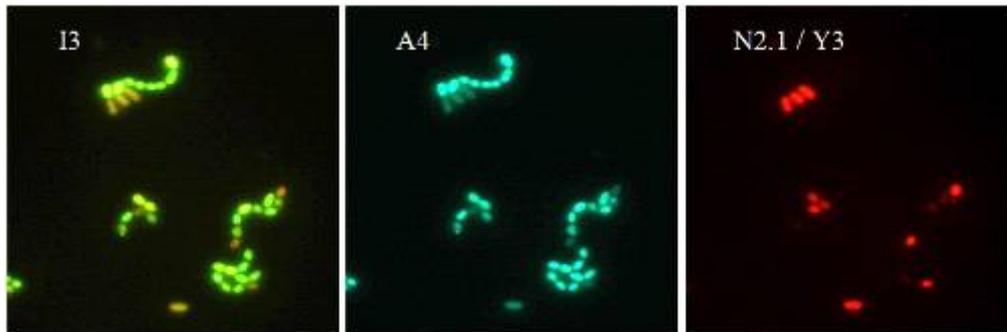


Figure 42. *L.lactis* colorées avec le kit BacLight™ et observées avec les différents cubes optiques (x1000)

Protocole de coloration avec le kit BacLight™

Comme détaillé dans la partie bibliographique (Chp. I § II 1 2), les avantages des numérations réalisées par épifluorescence sont nombreuses d'un point de vue expérimental, car cette technique représente un gain de temps et de matériel conséquent par rapport à des méthodes plus classiques. Dans notre cas cette technique s'avère quasiment incontournable pour trois raisons majeures :

- Elle permet d'estimer le nombre total de cellules « viables » et non pas seulement celui de celles « viables et cultivables » comme avec les techniques classiques. De plus, on obtient aussi le nombre de bactéries « mortes » ce qui permet de déterminer une proportion de bactéries viables dans un échantillon. Cette donnée permet de comparer des abattements entre deux expériences de façon beaucoup plus réaliste qu'en se basant uniquement sur le nombre absolu de cellules « viables et cultivables ». En effet, utiliser cette donnée absolue suppose qu'il n'est pas nécessaire de connaître le nombre de cellules mortes et que tous les phénomènes sont identiques d'une expérience à l'autre, notamment les pertes entre la zone d'injection et la zone de récupération, ce qui est discutable lors du travail en aérosol avec différents microorganismes.
- L'utilisation du kit BacLight® est possible pour toutes les bactéries testées lors de cette thèse, permettant ainsi un traitement similaire entre les échantillons issus des différentes expériences.
- Elle est insensible à la contamination. En effet, vu la dimension du système expérimental et les débits traités, une stérilité parfaite du système ne serait que très

difficilement réalisable. Or, même une très faible contamination est rédhibitoire pour les techniques de numération par mise en culture.

Préparation des colorants

Il existe chez Invitrogen trois kits différents basés sur les mêmes colorants, le Syto 9 (S9) et l'iodure de propidium (IP). Nous avons utilisé au cours de cette thèse deux kits différents :

- Kit L7012 : S9, 3.34 mM, 300 μ L dans du DMSO (diméthylsulfoxyde) + IP, 20 mM, 300 μ L dans du DMSO

Le fabricant indique d'utiliser 3 μ L d'un mélange équivolumique des deux colorants du kit par mL de suspension bactérienne. Néanmoins, l'utilisation d'un volume si faible présente un risque au niveau de la reproductibilité, mais surtout constitue un problème pour réaliser les colorations sur filtres.

Ainsi, il a été préféré de travailler avec des volumes plus importants de solutions diluées de ces colorants calculés de sorte que 120 μ L d'un mélange équivolumique des colorants dilués permettent de colorer 100 μ L de suspension bactérienne ou de recouvrir un filtre. Pour ce faire, on prépare environ 8 mL de colorant dilué de chaque sorte en mélangeant 20 μ L de chaque colorant commercial avec 8 mL d'eau distillée et filtrée sur filtre 0,2 μ m (dilution au 400^{ème}). Les deux colorants sont aliquotés au mL et stockés à -20 °C à l'abri de la lumière (indications fabricant).

- Kit L13152 : 10 pipettes de S9 + 10 pipettes d'IP, les deux sous forme de paillettes

Ce kit est pratique, car les colorants sont placés dans des pipettes en polypropylène sous forme de paillettes qu'il suffit de dissoudre chacune dans 5 mL d'eau filtrée au 0,2 μ m. Le fabricant indique qu'il faut ajouter le même volume d'un mélange équivolumique des deux solutions de colorants ainsi préparées à la suspension bactérienne. Les solutions de colorants sont aliquotées au mL et stockées à -20 °C à l'abri de la lumière (indications fabricant).

Coloration des échantillons

Les suspensions permettant de produire le bioaérosol sont suffisamment concentrées pour être directement colorées en phase liquide, puis diluées afin d'obtenir une densité convenable sur le filtre pour le comptage en épifluorescence. Par contre, les suspensions de collecte sont très diluées, si bien qu'une coloration en phase liquide nécessiterait l'utilisation d'une grande quantité de colorants afin de toujours travailler avec des concentrations constantes en fluorophores. Pour cette raison, on « concentre » dans un premier temps les microorganismes

contenus dans un volume important de liquide de collecte (≈ 50 mL) en les filtrant puis on réalise la coloration des bactéries sur le filtre.

- Coloration de suspensions

À 100 μL de suspension bactérienne, on ajoute 60 μL de chaque solution diluée au $1/400^{\text{ème}}$ comme préparée au paragraphe précédent. Les mélanges sont vigoureusement agités et laissés pendant 15 à 20 minutes à l'obscurité. La suspension est intégralement filtrée sur une membrane en polycarbonate noir Isopore de 0,4 μm de porosité et 25 mm de diamètre (Millipore, Référence HTBP02500). L'aspiration permettant le fonctionnement du système de filtration (Millipore, Référence XX1002500, surface de filtration 2,5 cm^2) est assurée par une trompe à eau (pression d'aspiration d'environ 37 mmHg). Le filtre est déposé sur une lame de microscope puis une goutte d'huile de montage fournie avec le kit est déposée entre le filtre et la lamelle.

- Coloration sur filtres

On filtre le volume désiré sur filtre en polycarbonate noir Isopore de 0,4 μm de porosité et 25mm de diamètre (Millipore, Référence HTBP02500). L'aspiration permettant le fonctionnement du système de filtration (Millipore, Référence XX1002500, surface de filtration 2,5 cm^2) est assurée par une trompe à eau (≈ 30 mmHg). Le filtre est déposé sur une lame de microscope puis recouvert avec 60 μL de chaque solution commerciale diluée au $1/400^{\text{ème}}$ comme décrit au paragraphe précédent et 100 μL d'eau distillée. La coloration dure entre 15 et 20 minutes à l'obscurité.

III RÉSULTATS ET CONSIDÉRATIONS PRÉLIMINAIRES AUX TESTS DE DÉCONTAMINATION

Les recherches bibliographiques présentées en première partie de ce mémoire ont permis de mettre en avant les nombreuses difficultés rencontrées en étudiant les bioaérosols, ce qui explique en partie la faible part des travaux dans le domaine de la photocatalyse concernée par leur traitement. De ce fait, il existe peu de références scientifiques permettant de conforter le choix d'un dispositif et d'un protocole, ce qui impose un développement et une optimisation du montage expérimental relativement long, ainsi qu'une validation méticuleuse de chaque étape impliquant des microorganismes avant de pouvoir procéder aux tests finals de décontamination.

De plus, si les techniques de comptage par mise en culture bénéficient d'un recul important permettant d'en apprécier les avantages, les inconvénients et la précision dans un panel de situations très large, les dénombrements avec le kit BacLight™ ne datent que d'une décennie et les domaines testés sont beaucoup plus restreints. De ce fait, bien que de nombreuses publications mentionnent l'obtention de résultats très satisfaisants avec cette technique de double coloration (Boulos, Prevost *et al.* 1999; Stocks 2004), il nous a paru primordial de vérifier que les conditions expérimentales associées à des tests de décontamination photocatalytique s'accordent avec l'utilisation de ce kit. En effet, l'intégrité de la membrane peut être affectée de nombreuses façons et il convient de vérifier que notamment l'aérosolisation, le contact avec le TiO₂ (sans activation UV) et le séjour dans l'eau distillée ne sont pas des facteurs influençant les mesures de viabilité ou de densité obtenues par l'utilisation de cette technique (Stephen A. Craik 2001; Berney, Hammes *et al.* 2007).

Nous allons donc tout d'abord présenter dans cette partie des résultats permettant de vérifier l'utilisation correcte de ce kit en termes de répétabilité et de linéarité sur des suspensions

aqueuses de microorganismes, ce qui permettra de plus, d'estimer la précision des résultats obtenus par la suite. Ensuite, nous présenterons les résultats obtenus lors de colorations de microorganismes avec le kit BacLight™ en présence de TiO₂, qui interagit même sans activation UVA avec la membrane du fait de l'adsorption des lipides ou des protéines membranaires sur les grains de photocatalyseur (Gogniat, Thyssen *et al.* 2006; Wickhama et Rice 2008), et adsorbe les fluorophores.

Dans une seconde partie, nous montrerons quels sont les parallèles et les différences théoriques rencontrés entre les divers types d'applications photocatalytiques (phase aqueuse/bioaérosol, réacteur ouvert/fermé) vouées à la décontamination, et les conséquences qu'impose l'utilisation de fluorophores pour la comparaison de systèmes extrêmement divers.

Enfin, nous présenterons les études faites sur les différents microorganismes utilisés afin de tester leur résistance dans le dispositif expérimental, notamment du fait de la mise en aérosol et de la collecte dans la colonne de récupération. En effet, des organismes trop sensibles aux situations de stress imposées par le dispositif expérimental ne permettraient pas d'obtenir des résultats intéressants puisque les viabilités seraient déjà très faibles.

I Validation de la technique de coloration

La validation de la technique de coloration avec le kit BacLight™ permet de s'assurer tout d'abord de son utilisation correcte au niveau interne au laboratoire puis de voir quelles peuvent être les complications liées à la présence de TiO₂ lors de cette étape cruciale.

I 1 Répétabilité et linéarité des mesures de viabilité et de densité avec le kit BacLight™

Comme indiqué en introduction de cette partie, une des étapes préliminaires à l'utilisation du kit BacLight™ a consisté en la vérification de la répétabilité des mesures de viabilité et de densité et de la linéarité par rapport au volume filtré pour les mesures de densité.

I 1 1 Répétabilité des résultats obtenus par coloration avec le kit BacLight™

Afin d'apprécier la justesse de la méthode de coloration avec le kit BacLight™, on prépare plusieurs colorations d'aliqouts issus d'une même suspension bactérienne et on réalise avec chacune une ou plusieurs filtrations (Fig.43). L'étude statistique des résultats obtenus permet de juger de la précision des résultats et, si la technique est fiable, de conclure que tous les échantillons sont bien issus d'une même suspension.

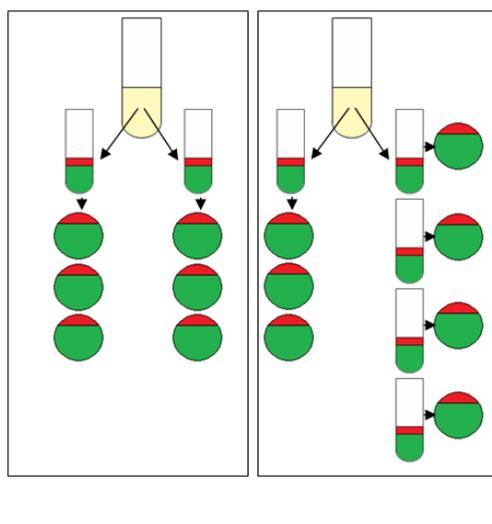


Figure 43. Schéma des expériences de validation de la répétabilité des mesures obtenues par coloration avec le kit BacLight™ pour la viabilité et la densité. (g.) La première expérience (deux colorations avec trois filtrations par coloration) permet d'apprécier la répétabilité au niveau de la filtration tandis que la seconde (d.) (cinq colorations avec trois filtrations pour un échantillon et une pour les quatre autres) permet de juger des résultats obtenus par cette technique depuis la suspension mère

- Deux colorations (α et β), trois filtrations par coloration (1,2 et 3)

On colore selon le protocole deux aliqouts d'une même suspension de *L. pneumophila* cultivée de façon standard sur milieu gélifié, et sur chaque échantillon, on prélève trois sous-échantillons de même volume que l'on filtre sur membrane selon le protocole.

Les résultats des dénombrements de cette expérience sont présentés dans le tableau 32 (Annexe I. Résultats chiffrés). Les calculs statistiques sont effectués avec le logiciel JMPin 4.0.2 et leurs résultats sont représentés sur les figures 44 et 45 (NB : les calculs statistiques intermédiaires ne seront pas présentés).

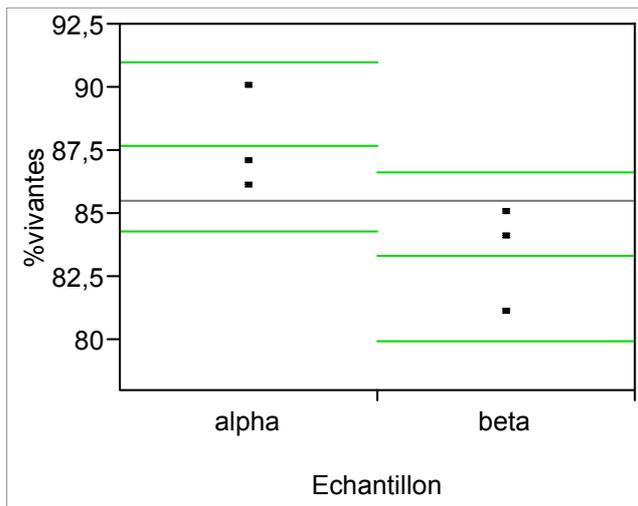


Figure 44. Représentation des résultats obtenus (tableau 32, annexe I. Résultats chiffrés) en supposant que la séparation en deux groupes est un facteur explicatif de la viabilité. La ligne verte centrale de chaque traitement correspond à la moyenne de chaque traitement, les deux autres étant les bornes de l'intervalle de confiance à 95%. La ligne noire représente la moyenne globale.

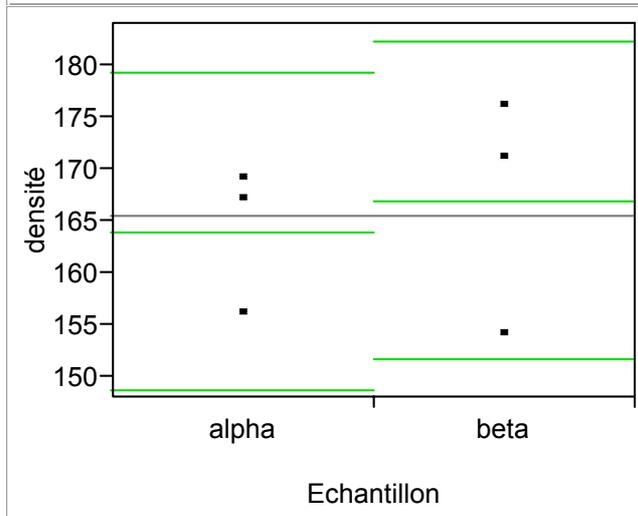


Figure 45. Représentation des résultats obtenus (tableau 32, annexe I. Résultats chiffrés) en supposant que la séparation en deux groupes est un facteur explicatif de la densité (en bactéries/cliché). La ligne verte centrale de chaque traitement correspond à la moyenne de chaque traitement, les deux autres étant les bornes de l'intervalle de confiance à 95%. La ligne noire représente la moyenne globale.

L'analyse classique de la variance des réponses en viabilité comme de celles en densité indique que la séparation des échantillons en deux groupes (α et β) ne permet pas mieux d'expliquer les résultats obtenus qu'en considérant un seul groupe. (F =rapport entre la variance expliquée et la variance non expliquée par cette séparation en deux groupes: viabilité : 6,5 et densité : 0,15 ; Probabilités respectives de dépasser F « par hasard » : $(\text{Prob}>F)=0,06$ et $(\text{Prob}>F)=0,72$; niveau de signification 95 %. On considère généralement qu'une probabilité de dépasser F supérieure à 0,05 indique qu'il n'y a pas lieu de considérer le modèle comme adéquat). On peut donc, fort heureusement, considérer les six échantillons comme issus d'un unique traitement et calculer pour les deux réponses une variance globale liée aux étapes suivant la coloration (Tab. 10).

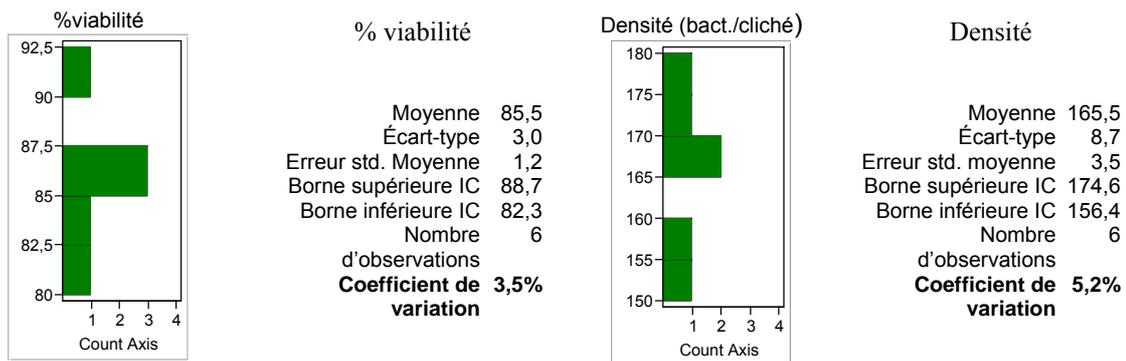


Tableau 10. Distribution des mesures de viabilité et de densité et moments associés.

On constate que les résultats des mesures de viabilité sont assez faiblement dispersés, de même que ceux issus des mesures de densité, ce qui est en faveur de l'utilisation du kit BacLight™ (Tab. 10).

Cependant, bien que l'analyse de la variance ait conduit à des résultats satisfaisants lors de l'expérience précédente, la conclusion indiquant que les viabilités mesurées pouvaient être considérées comme ayant été réalisées sur un seul et même échantillon était assez faible ($\text{Prob}>F=0,06$ alors qu'on considère que la limite est 0,05). Or ce sont justement les mesures de viabilité qui sont primordiales dans nos tests de décontamination, car comme il n'y a pas conservation du nombre de bactéries entre l'entrée et la sortie du système du fait des pertes importantes par colmatage ou autres phénomènes, on ne peut pas se baser sur des mesures absolues de quantités de microorganismes (Fig. 55).

De ce fait, l'expérience suivante va permettre de mieux juger de la répétabilité de l'ensemble de la technique, en prenant en compte cinq colorations d'aliqots issus d'une suspension mère.

- Cinq colorations (α , β , γ , δ et ϵ), trois filtrations pour α , une pour les autres.

Cette expérience permet d'inclure le plus d'erreurs possibles en utilisant le kit de coloration BacLight™ pour déterminer la viabilité et la densité d'une suspension bactérienne. En effet, chaque résultat (filtre) est entaché des erreurs dues à la technique de coloration en elle-même qui s'ajoutent à celles inhérentes aux étapes suivant la coloration (pipetage, déposition non homogène des bactéries sur le filtre, erreurs de comptage...). Les trois répétitions au niveau de α permettent d'estimer la variance de ces étapes suivant la coloration.

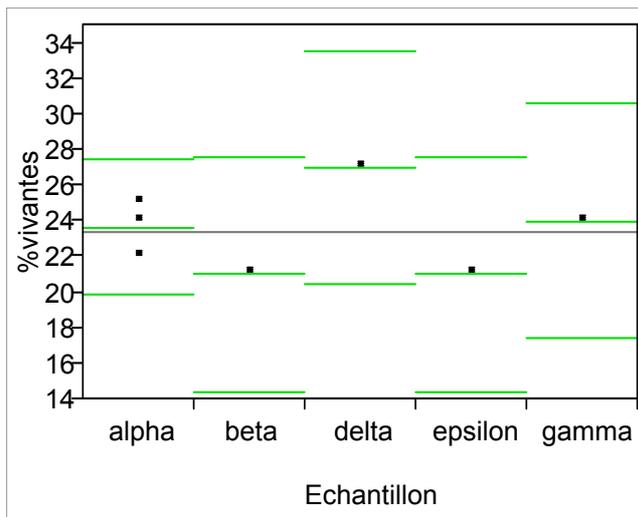


Figure 46. Représentation des résultats obtenus (tableau 33, annexe I. Résultats chiffrés) en supposant que la séparation en cinq groupes est un facteur explicatif de la viabilité. La ligne verte centrale de chaque traitement correspond à la moyenne de chaque traitement, les deux autres étant les bornes de l'intervalle de confiance à 95%. La ligne noire représente la moyenne globale.

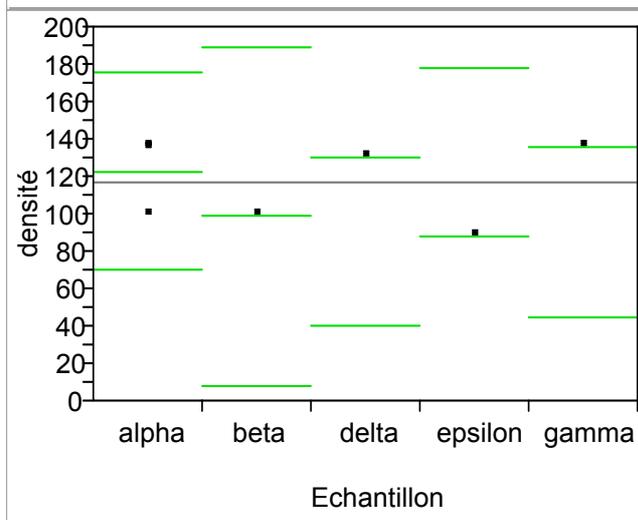


Figure 47. Représentation des résultats obtenus (tableau 33, annexe I. Résultats chiffrés) en supposant que la séparation en cinq groupes est un facteur explicatif de la densité (en bactéries/cliché). La ligne verte centrale de chaque traitement correspond à la moyenne de chaque traitement, les deux autres étant les bornes de l'intervalle de confiance à 95%. La ligne noire représente la moyenne globale.

L'analyse de la variance des réponses en viabilité et de celles en densité indique que la séparation des échantillons en cinq groupes ne permet pas mieux d'expliquer les résultats obtenus qu'en considérant un seul groupe. On peut donc comme précédemment considérer que les différences observées sont uniquement dues aux erreurs expérimentales, et donc que les échantillons sont issus d'un échantillon unique ($F = \text{rapport entre la variance expliquée et la variance non expliquée par cette séparation en cinq groupes}$: viabilité : $F=2,68$ et densité : $F=1,03$; $\text{Prob}>F = 0,29$ et $0,55$; niveau de signification 95 %).

Ainsi, on peut calculer pour chacune des réponses une variance globale permettant de juger de la variabilité des mesures obtenues par cette technique de double coloration (Tab. 11).

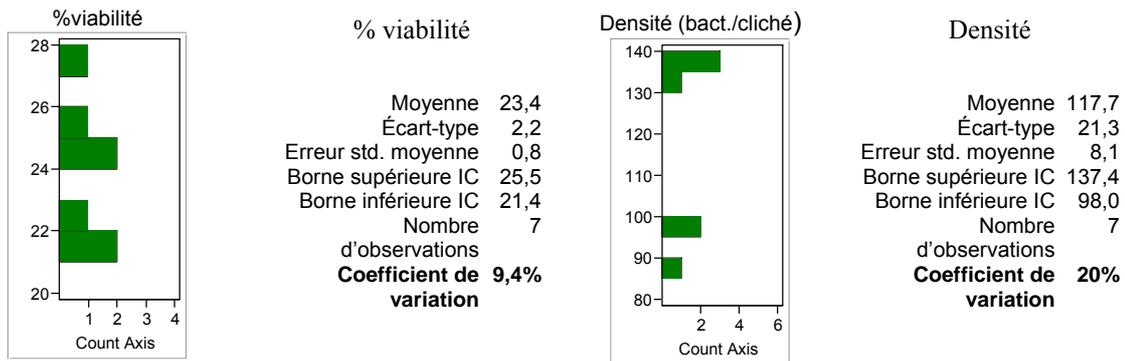


Tableau 11. Distribution des mesures de viabilité et de densité et moments associés.

Les deux expériences précédentes ont permis de montrer que les résultats obtenus par la technique de double coloration étaient au moins aussi répétables que ceux obtenus par les techniques classiques de mise en culture, que ce soit pour la détermination de la viabilité comme pour celle de la densité. En effet, une expérience préalable non présentée dans ce mémoire a montré que la détermination de la densité d'une suspension par la méthode des UFC (deux séries de dilutions en série au 1/10^{ème}, trois boîtes par dilution) conduisait à un Coefficient de Variation (CV=écart-type/moyenne) de 14,0 % alors que les valeurs obtenues pour la viabilité et la densité sont respectivement de 3,5 % et 5,2 % lors de la première expérience.

Cependant, on constate que les CV augmentent de façon assez importante lorsque les mesures sont réitérées depuis l'aliquotage précédent l'étape de coloration (seconde expérience) (Tab. 11). En effet, lors de la seconde expérience, on obtient pour la viabilité un CV de 9,4 %, ce qui permet de prendre comme règle de décision que seules des suspensions dont les écarts de viabilité sont supérieurs à 10 % peuvent être considérées comme réellement différentes. Pour la densité bactérienne, on obtient un CV de l'ordre de 20 %, ce qui correspond à des écarts d'environ $\pm 0,1$ log (à titre informatif, on considère généralement que, pour des résultats obtenus par le dénombrement des UFC, les écarts inférieurs à 0,5 log sont négligeables).

I 1 2 Linéarité des densités obtenues par coloration avec le kit BacLight™ en fonction du volume filtré

Bien que les résultats concernant les valeurs absolues des nombres de bactéries soient moins importants pour nos tests que ceux concernant les viabilités, il convient de vérifier que les

nombres totaux de bactéries sont linéairement corrélés aux volumes filtrés et, que les mesures de viabilité en sont par contre bien indépendantes. Ces deux vérifications peuvent ne pas sembler nécessaires, néanmoins, compte tenu du nombre élevé de paramètres non contrôlés, voire non identifiés, il est prudent de valider la technique de coloration de façon complète en réalisant ces tests de corrélation.

Pour ce faire, on filtre des volumes croissants d'une suspension préalablement colorée de *E.coli* obtenues de façon standard par culture en milieu liquide et on quantifie la densité de bactéries sur le filtre ainsi que la viabilité.

Résultats

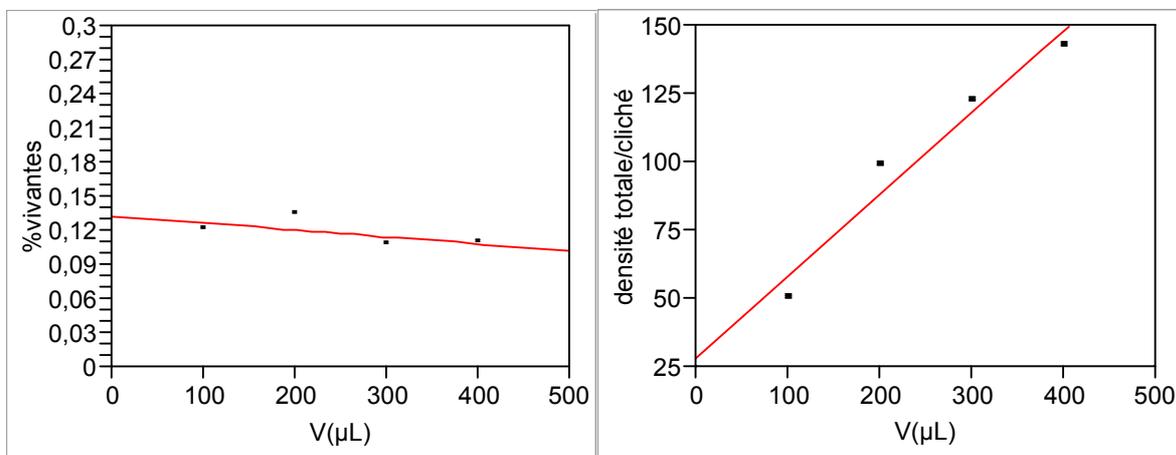


Figure 48. Représentation graphique des résultats du tableau 34 (Annexe I. Résultats chiffrés) et modèles linéaires obtenus par les moindres carrés. On obtient : $\%vivantes = 0,13 - 0,00006 V (\mu L)$ ($F = 1,44$; $Prob>F=0,3533$; niveau de signification : 95%) et $densité\ totale\ par\ cliché = 28 + 0,3 V (\mu L)$ ($F = 41,67$; $Prob>F=0,0232$; niveau de signification : 95%).

Les régressions linéaires de la viabilité et de la densité totale de bactéries par cliché en fonction du volume filtré V (Fig. 48) confirment que la viabilité est indépendante du volume filtré alors qu'on observe bien la relation de linéarité attendue entre la densité moyenne par champ microscopique et le volume filtré (niveau de signification : 95 %).

Ces conclusions permettent notamment de considérer que les quantités filtrées, variables selon les dilutions réalisées par exemple, n'affectent pas de façon sensible la précision des mesures de viabilité et de densité.

I 2 influences du TiO₂ sur la coloration

Les résultats concernant la répétabilité des mesures de viabilité et de densité confirment ceux obtenus par d'autres équipes ayant travaillé avec ce kit de coloration. Néanmoins, l'utilisation de fluorophores en présence de TiO₂ reste extrêmement sporadique (Gogniat, Thyssen *et al.* 2006; Liu, Wang *et al.* 2008) et il convient de tester quelle influence la présence de TiO₂ peut avoir sur les colorations avec le kit BacLight™. En effet, il semble que les deux colorants du kit de coloration BacLight™ s'adsorbent dans des proportions différentes sur le TiO₂ (Fig. 49), ce qui se pourrait se traduire par des baisses non proportionnelles entre leurs concentrations respectives et ainsi influencer sur les résultats. De plus, du fait des nombreuses interactions possibles des composants de la membrane bactérienne avec ce matériau (protéines et lipides), le risque que la perméabilité de la membrane soit modifiée sans que la cellule soit morte n'est pas négligeable, ce qui fausserait les résultats.

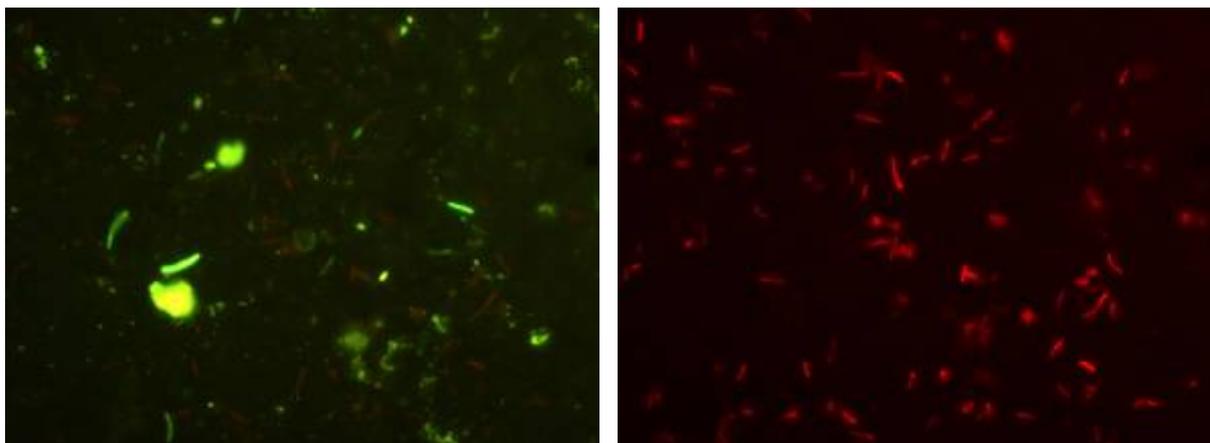


Figure 49. Clichés d'un même champ microscopique (x1000) de légionelles colorées selon le protocole standard avec le kit BacLight™ et observées avec les cubes optiques I3 (g.) et N2.1(d.). On constate que les grains de photocatalyseur présentent une forte fluorescence due au S9, alors que celle due à l'IP reste faible, ce qui peut s'expliquer par une adsorption de ces fluorophores dans des proportions différentes.

Afin d'étudier ces deux sources possibles d'erreur dues à l'interférence du TiO₂ avec les colorants, nous avons dans un premier temps étudié par spectrophotométrie UV-visible l'adsorption des deux colorants sur le TiO₂ (P25) afin de voir s'il y a une différence sensible de comportement entre le S9 et l'IP en présence de ce matériau.

Ensuite, pour juger d'un éventuel effet du TiO₂ sur la perméabilité de la membrane, des tests différentiels de sensibilité de bactéries envers quelques substances toxiques ont été réalisés : en effet, on peut supposer que s'il y a une perméabilisation de la membrane suffisante pour

laisser pénétrer une plus grande quantité d'IP à l'intérieur de la cellule, alors on doit observer une sensibilité accrue des bactéries en contact du TiO₂ envers certaines substances cytotoxiques.

I .2.1 Mesures de l'adsorption du Syto 9™ et de l'iodure de propidium sur le TiO₂ (P25)

On a suivi l'adsorption des deux fluorophores du kit BacLight™ sur le TiO₂ a été suivie par spectrophotométrie UV-visible: pour chaque colorant, on prépare un échantillon de référence (1000 µL de la dilution au 1/400^{ème} de la solution commerciale + 100 µL d'H₂O) et un échantillon sur lequel on mesurera la quantité de fluorophore restante dans le surnageant après séparation du TiO₂ par centrifugation (1000 µL de la solution au 1/400^{ème} de la solution commerciale + 100 µL d'une suspension à 100 mg/mL TiO₂, centrifugation 10 min à 13200 tours/min).

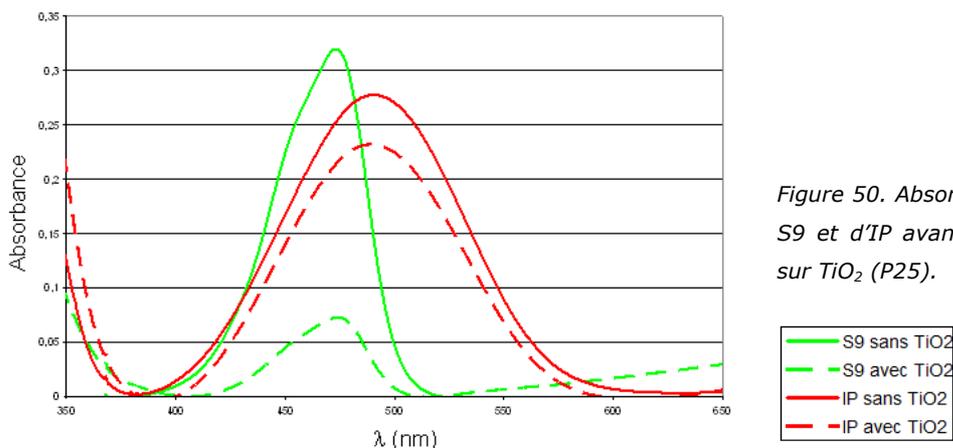


Figure 50. Absorbance de solutions de S9 et d'IP avant et après adsorption sur TiO₂ (P25).

La figure 50 présente les résultats des mesures d'absorbance en fonction de la longueur d'onde et l'on obtient aux maximums d'absorption respectifs les rapports de concentrations suivants :

$$[S9 \text{ sans TiO}_2]/[S9 \text{ avec TiO}_2] \approx 20 \%$$

$$[IP \text{ sans TiO}_2]/[IP \text{ avec TiO}_2] \approx 80 \%$$

On constate donc qu'il existe, dans les conditions de l'expérience, une différence d'adsorption très importante entre les deux fluorophores. De plus, elle confirme les observations de microscopie à épifluorescence qui montrent que les grains de TiO₂ présentent une fluorescence due au S9 beaucoup plus prononcée que la fluorescence due à l'IP (Fig. 51).

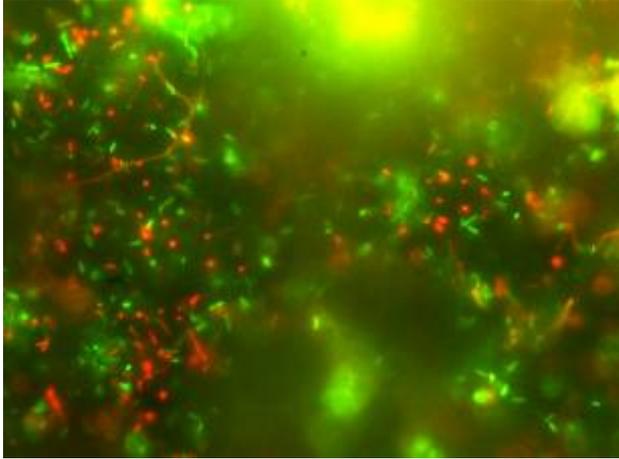


Figure 51. Superposition de clichés en épifluorescence pris avec les cubes optiques I3 et N2.1. On constate que les grains de TiO_2 (P25) présentent une coloration verte beaucoup plus marquée, traduisant l'adsorption plus importante du Syto 9™ sur leurs surfaces.

Ainsi, bien que ces résultats ne puissent pas être extrapolés de façon simple pour des systèmes plus complexes comprenant à la fois des grains de TiO_2 et des microorganismes, ils indiquent clairement que l'utilisation de fluorophores en présence d'adsorbants doit se faire de façon extrêmement prudente, notamment dans les cas où la concentration de TiO_2 est élevée (photocatalyseur suspendu).

I .2.2 Mesures différentielles de cytotoxicité en présence de TiO_2 (P25)

Les interactions de type adsorption entre le TiO_2 et des molécules biologiques comme les protéines ou les lipides sont bien documentées dans la littérature et l'implication de ce type de phénomène dans la décontamination photocatalytique ne fait plus de doute (Huang, Maness *et al.* 2000; Gogniat, Thyssen *et al.* 2006).

Cependant, cette adsorption de composants membranaires peut se traduire par une perméabilité accrue de la membrane, notamment pour l'IP, le S9 diffusant quant à lui facilement à l'intérieur des cellules, et ce, quel que soit l'état de leurs membranes.

Afin de visualiser une éventuelle variation de la perméabilité membranaire, les variations de sensibilité provoquées par le TiO_2 au contact des bactéries ont été évaluées pour différentes substances cytotoxiques.

- Technique du disque d'inhibition

Comme expliqué dans la partie expérimentale (Chp. II § I 3), la sensibilité d'une bactérie envers une substance cytotoxique peut être corrélée au diamètre des disques où il n'y a pas eu de prolifération bactérienne dans de la gélose préalablementensemencée, du fait de la présence de la substance cytotoxique à une concentration suffisante pour inhiber la multiplication des microorganismes. La différence avec le principe des tests présentés précédemment réside dans le fait que le but n'est pas de comparer plusieurs substances, mais de voir en quelle mesure la présence de TiO_2 (P25) peut modifier la CMI (concentration minimale d'inhibition).

Ainsi, pour réaliser ce test, on dépose de façon stérile sur cinq boîtes de milieu LB préalablement solidifié (10 mL), deux disques de papier Whatman chargé de nitrate d'argent ($40 \mu\text{L}$ d'une solution à $0,113 \text{ M}$ sur chacun) et l'on recouvre chaque boîte avec 5 mL de LB mouensemencé ($300 \mu\text{L}$ d'une culture de 4 h de *E.coli*/50 mL de LB mou) contenant respectivement 0-12,5-25-50 et 100 mg de TiO_2 (P25).

Les figures 52 et 53 présentent les résultats obtenus après 24 h d'incubation à 37°C .

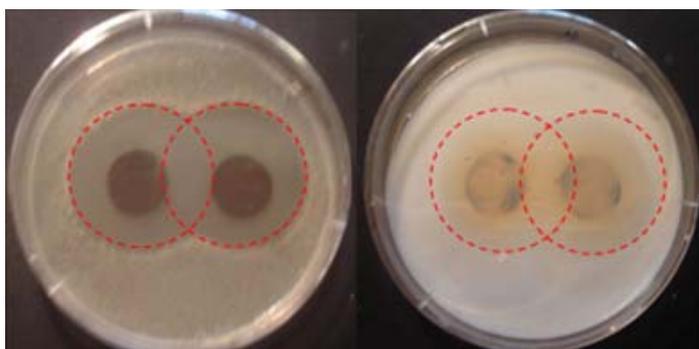


Figure 52. Disques d'inhibition à la prolifération de *E.coli* par le nitrate d'argent pour $m=0 \text{ mg}$ (g.) et $m=100 \text{ mg}$ (d.) de P25/5 mL de gélose molle. N.B. du fait de la présence de TiO_2 , il est difficile de discerner les disques d'inhibition sur l'image de droite.

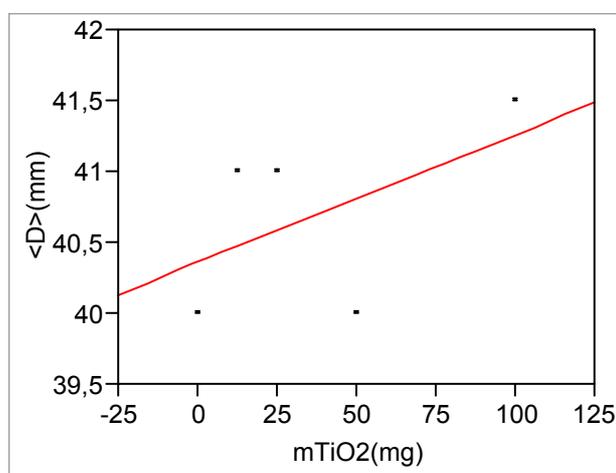


Figure 53. Tests d'inhibition du nitrate d'argent sur *E.coli* en fonction de la quantité de TiO_2 contenue dans la gélose molleensemencé (régression linéaire associée). Résultats chiffrés en annexe (Tab. 35, annexe I. Résultats chiffrés).

On constate que les différences entre les diamètres des disques d'inhibition sont infimes, et l'analyse de la variance confirme que l'on ne peut pas, à la vue de ces mesures, voir de corrélation entre le diamètre des disques d'inhibition et la quantité de TiO_2 ajoutée à la gélose ensemencée (*Rapport $F=1,17$; Prob $>F=0,36$; niveau de signification : 95 %*).

Néanmoins, cette technique de mesure de la sensibilité de *E.coli* envers le nitrate d'argent souffre de quelques lacunes pour permettre de visualiser d'éventuelles différences dues à la présence de TiO_2 :

- Le TiO_2 et les bactéries ne sont pas de façon évidente en contact intime du fait du mélange dans un milieu visqueux (LB mou). De plus, en faisant l'hypothèse qu'il existe une adsorption compétitive entre les composants de la membrane et ceux de la gélose, on peut supposer que les sites d'adsorption du TiO_2 sont principalement occupés par des composés du milieu nutritif présent en large excès, les rendant indisponibles pour interagir avec ceux de la membrane bactérienne.
- Cette technique n'exclut pas l'hypothèse qu'une augmentation de la perméabilité de la membrane bactérienne soit compensée par une baisse locale de la concentration due à l'adsorption du nitrate d'argent sur le TiO_2 .

Ainsi, dans l'optique de pallier ces limitations, nous avons effectué d'autres tests de sensibilité.

- Technique du gradient de Szybalski

Cette technique a été initialement développée pour isoler des mutants (Bryson et Szybalski 1952). Elle consiste, comme pour la technique des disques d'inhibition, à réaliser dans une boîte de pétri un gradient de concentration de la substance cytotoxique à étudier, en coulant les boîtes de milieu nutritif en deux étapes (Fig. 54) : on coule tout d'abord du milieu LB (5 mL) contenant cette substance qu'on laisse solidifier sur un plan incliné. Ensuite, on recouvre cette première couche avec du LB (non modifié) à l'horizontale. Il se forme ainsi un gradient de concentration le long du diamètre selon lequel la boîte a été initialement inclinée.

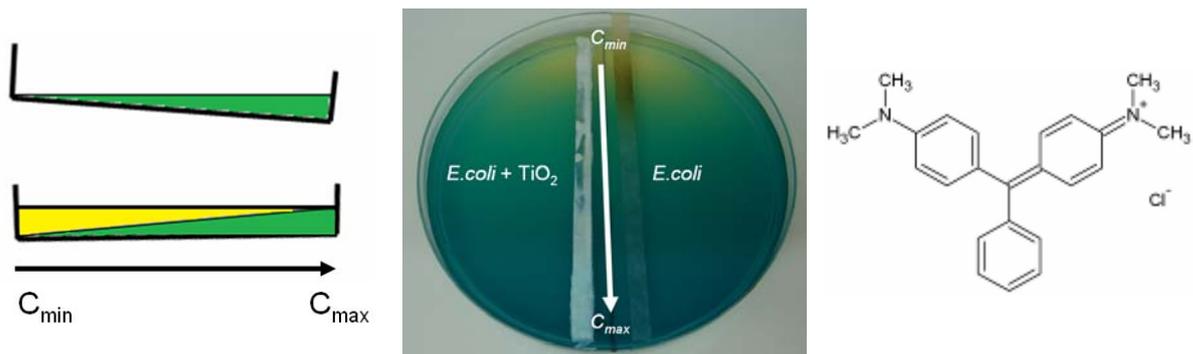


Figure 54. (g.) Schéma de la préparation d'une boîte de pétri contenant un gradient de concentration en une substance à tester (Bryson et Szybalski 1952). On coule dans un premier temps de la gélose nutritive contenant cette substance (vert), puis on laisse celle-ci se figer en pente. Ensuite, à l'horizontale, on recouvre cette couche de milieu de croissance classique afin d'obtenir après solidification un gradient le long de la plus grande pente de la première couche. (m.) Exemple de boîte préparée avec du vert de malachite (d.) sur laquelle ont été déposées deux bandelettes de papier Whatman imprégnées pour l'une d'une suspension de *E.coli* seule, pour l'autre d'un mélange de bactéries et de TiO_2 .

Après avoir préparé des boîtes selon ce protocole, on réalise deux suspensions de même titre en bactéries (*E.coli*) dont une contient du TiO_2 (100 mg.mL^{-1}). On imprègne de chaque suspension des bandelettes de papiers Whatman ($80 \text{ mm} \times 2 \text{ mm}$) que l'on dépose parallèlement, selon la ligne de plus grande pente sur les boîtes que l'on incube ensuite classiquement 24 h à $37 \text{ }^\circ\text{C}$ (Fig. 54). L'inhibition se traduira par l'absence de croissance sur la périphérie des bandelettes.

Cette technique présente l'avantage de permettre la réalisation un gradient de concentration beaucoup plus régulier qu'avec des disques d'inhibition, ce qui permet d'apprécier des différences de sensibilité plus faibles. De plus, cette façon de procéder permet de maintenir un contact intime entre les bactéries et le TiO_2 ,

Afin de déceler un éventuel effet de perméabilisation de la membrane, une série de tests a été effectuée avec plusieurs substances : le choix s'est naturellement porté sur l'IP puisque c'est précisément pour cette molécule que l'on teste si le TiO_2 perméabilise la membrane. On sait qu'effectivement, l'IP, en se liant à l'ADN, est cytotoxique, mais que ceci ne peut se produire que si ce fluorophore a pu traverser la membrane ! De plus, les tests précédents ont montré que le TiO_2 n'adsorbait qu'une quantité assez limitée d'IP, laissant ainsi *a priori* une quantité relativement importante disponible pour observer une différence. Nous avons aussi testé

l'effet de l'argent afin de pouvoir comparer les résultats ainsi obtenus avec les précédents, et le vert de malachite, molécule cytotoxique structurellement proche de celle de l'IP (Fig. 54).

Substance cytotoxique	Iodure de propidium			Nitrate d'argent			Vert de malachite		
	Concentration gélose mM	1,3E-03	1,3E-04	1,3E-05	2,9E+00	2,9E-01	2,9E-02	3,1E+00	3,1E-01
<i>E.coli</i> (% de bandelette)	100%	100%	100%	0%	70%	100%	0%	80%	100%
<i>E.coli</i> + TiO ₂ (% de bandelette)	100%	100%	100%	0%	70%	100%	0%	80%	100%

Tableau 12. Résultats de tests de cytotoxicité de l'IP, du nitrate d'argent et du vert de malachite sur *E.coli*. Les résultats indiquent la longueur de la bandelette sur laquelle on peut observer la prolifération de bactéries.

On constate que l'IP n'a pas provoqué d'inhibition à la multiplication de *E.coli*, sans doute du fait de la trop faible concentration, contrairement au nitrate d'argent et au vert de malachite. Comme pour les disques d'inhibition, ces tests n'ont donc pas permis de révéler des différences significatives entre les deux traitements (Tab. 12). Ainsi, on peut supposer que s'il y a un effet du TiO₂ sur la perméabilité de la membrane, celui-ci est minime et n'est pas une des causes majeures des différences observées entre des colorations en présence ou en absence de TiO₂.

Nous avons pu montrer, à travers ces quelques expériences, qu'il existait une différence importante entre les quantités de fluorophores adsorbées sur le dioxyde de titane de sorte que ce matériau interfère avec le processus de coloration en changeant leur rapport de concentration. Par contre, les tests mis en place pour déceler d'éventuelles variations de la perméabilité membranaire n'ont pas permis de conclure que les interactions TiO₂/membrane sont telles qu'elles représentent une source de biais des résultats de mesure de viabilité par le kit BacLight™, sans pour autant l'exclure complètement.

Ainsi, il convient d'utiliser ce kit de coloration avec prudence lorsqu'on est en présence de quantités relativement importantes de TiO₂, comme dans le cas de tests de décontamination en phase aqueuse avec une suspension du photocatalyseur.

Dans notre cas, les quantités de TiO₂ entraînées par le flux d'air et présentes lors des colorations sont minimales et n'interfèrent pas significativement avec les résultats des mesures de viabilité obtenues avec le kit BacLight™, comme le confirmeront les tests de décontamination « blancs » (présence de TiO₂ mais pas d'activation UVA) présentés dans les deux parties suivantes.

II Réduction Logarithmique en Viabilité

Comme expliqué dans la partie bibliographique, le travail avec des bioaérosols présente de très nombreuses difficultés, notamment en ce qui concerne la collecte des microorganismes. Aux problèmes d'ordre technique s'ajoute une difficulté théorique concernant l'interprétation des résultats obtenus lors de tests de décontamination de bioaérosols, l'objectif de tels tests étant de pouvoir comparer de façon objective des dispositifs pouvant être très différents.

Lors de tests de décontamination (surface ou liquide), l'abattement logarithmique (ou Réduction Logarithmique, RL) est de façon très classique l'indicateur d'efficacité associé à un procédé de décontamination. Cet indicateur compare les concentrations avant et après traitement de sorte que l'on estime l'efficacité du traitement par leur rapport, exprimé en ordre de magnitude afin de s'affranchir de la faible précision des numérations biologiques (Vries et Hamilton 1999).

Cependant, ces expériences s'effectuent le plus souvent dans des situations bien particulières, puisque très souvent il s'agit d'un système fermé, pour lequel la mesure des concentrations bactériennes à l'instant initial t_0 et à un instant t permet d'obtenir très facilement l'état de l'avancement de la « réaction » (par exemple en phase aqueuse ou en traitement de surface). Dans ce cas, on suppose que la seule quantification des bactéries vivantes s'avère nécessaire du fait de la conservation du nombre total de bactéries.

De la même façon, les expériences de décontamination en système ouvert permettent aisément d'estimer l'efficacité d'un mode de décontamination en comparant les concentrations en bactéries vivantes entre l'entrée et la sortie. Néanmoins, il est dans ce cas nécessaire de supposer que l'accumulation dans de tels systèmes est négligeable, ce qui est souvent le cas en phase aqueuse du fait de la force d'entraînement du flux porteur qui permet d'éviter une accumulation des microorganismes dans le réacteur (système en régime quasi permanent). Ceci est aisément vérifiable en réalisant des tests blancs ou en utilisant des fluorophores permettant de réaliser des comptes totaux.

Par contre, les tests de décontamination en phase gazeuse sont beaucoup plus complexes, car les seules grandeurs facilement accessibles sont les concentrations aqueuses des suspensions de départ et de celle de collecte. Or, les rapports de récupération entre le nombre de bactéries injectées et collectées sont de l'ordre de quelques centièmes, au mieux, pour des réacteurs

tubulaires (voir partie V). Il est donc impossible de considérer qu'il n'y a pas d'accumulation à l'intérieur du système qui constitue en quelque sorte une « boîte noire » (*c.-à-d.*, entre la zone de formation de l'aérosol et la zone de collecte) (Fig. 55). De plus, les valeurs des rapports de récupération sont trop variables pour pouvoir transposer des résultats obtenus sur des tests « blancs » à des expériences de décontamination.

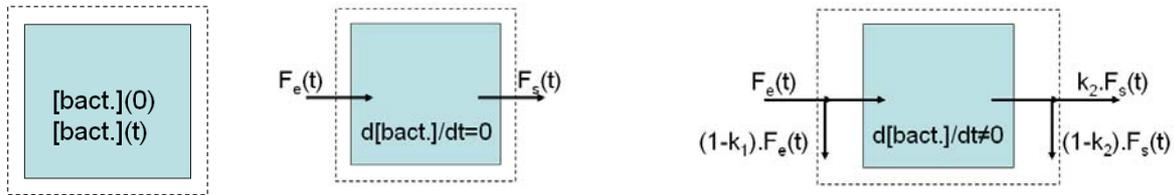


Figure 55. Représentation schématique des différentes configurations expérimentales de réacteurs (en bleu) en décontamination photocatalytique. (g.) Le réacteur fermé est de loin le plus simple et permet via la détermination des concentrations en bactéries [bact.] à l'instant initial et à un instant t de caractériser aisément l'efficacité du système. (m.) Le réacteur ouvert en régime continu ou (quasi continu) en phase liquide permet aussi de réaliser cette détermination facilement via l'estimation des flux de bactéries en entrée F_e et à la sortie F_s . (d.) Par contre, dans le cas de notre système expérimental, le volume de contrôle (pointillé) ne permet pas d'obtenir le rapport $F_s(t)/(k_1 \cdot F_e(t))$, valeur réelle de l'abattement, avec k_1 et k_2 comprises entre 0 et 1.

Fort heureusement, l'utilisation de fluorophores permet d'obtenir des comptes totaux de bactéries (vivantes + mortes). Ainsi, il est possible d'obtenir une valeur de l'efficacité du système, en faisant toutefois l'hypothèse que les accumulations et les pertes à l'intérieur du volume de contrôle (Fig. 55) sont indépendantes de la viabilité de la bactérie, c'est-à-dire qu'il y a conservation des titres de viabilité dans les zones amont et aval du réacteur. Cette hypothèse n'est pas si évidente, car on pourrait supposer que les bactéries inactivées aient une plus forte probabilité de rester sur la surface du photocatalyseur que celles restées vivantes, puisque ces dernières ont été *a priori* moins en contact avec le photocatalyseur que celles qui ont été inactivées. Cependant, les tests « blancs » sans activation UV, mais en présence de TiO_2 , montrent qu'il n'y pas de différence significative de viabilité entre l'entrée et la sortie (voir résultats des chapitres suivants), ce qui conforte le bien-fondé de cette hypothèse. On verra également dans le dernier point de ce chapitre que la collecte n'affecte ni la viabilité, ni la densité, ce qui est nécessaire pour pouvoir déterminer l'efficacité des différents systèmes.

Ainsi, on suppose que la viabilité du bioaérosol en entrée de réacteur est égale à celle de la suspension injectée, et que la viabilité du bioaérosol en sortie de réacteur est égale à celle de la suspension de collecte. Estimer l'abattement revient alors à considérer qu'une quantité

fictive N_0 de bactéries totales, de viabilité en entrée μ_e et de viabilité en sortie μ_s a traversé le réacteur, soit en exprimant cette Réduction Logarithmique de Viabilité (RLV) :

$$RLV = \log\left(\frac{N_0\mu_e}{N_0\mu_s}\right) = \log\left(\frac{\mu_e}{\mu_s}\right)$$

Cependant, bien que plaisante par sa similitude avec l'indicateur classique RL, cette définition pose un problème pratique en épifluorescence. En effet, s'il est aisé de réaliser des gammes de dilutions sur 9 ordres de magnitude pour des méthodes de comptage par mise en culture, et ainsi calculer des abattements logarithmiques pouvant aller jusqu'à 9, estimer un abattement de cette grandeur par microscopie à épifluorescence nécessiterait d'observer au minimum un milliard de bactéries, ce qui est impossible, même en automatisant le comptage, car la prise des clichés microscopiques reste quant à elle manuelle. Seule l'utilisation d'un cytomètre en flux permet d'obtenir facilement des résultats basés sur la caractérisation d'un nombre très élevé de cellules.

De plus, lorsque μ_s tend vers des « valeurs faibles », ce qui est le but en décontamination, la distribution très éparse des cellules vivantes sur les clichés microscopiques rend la détermination de la RLV très délicate puisqu'il faut alors observer un nombre extrêmement élevé de bactéries pour obtenir un résultat reflétant la réalité.

À titre d'exemple, en considérant que l'on observe en sortie un total de N bactéries, par exemple 1000, et que la viabilité réelle de l'échantillon est $\mu_s=1/k.N$ avec $k \geq 1$, par exemple avec $k=5$ et $\mu_s=1/5000$, la probabilité $P_{N,k}(v)$ d'observer v bactérie vivante parmi les N est indiquée par la loi binomiale :

$$P_{N,k}(v) = C_N^v \left(\frac{1}{kN}\right)^v \left(\frac{kN-1}{kN}\right)^{N-v} = \left(\frac{N!}{v!(N-v)!}\right) \left(\frac{1}{kN}\right)^v \left(\frac{kN-1}{kN}\right)^{N-v}$$

Ce qui se simplifie pour $v=0$ (probabilité d'en observer aucune vivante parmi N) en :

$$P_{N,k}(0) = \left(\frac{kN-1}{kN}\right)^N$$

La figure 56 représente la probabilité $P_{1000,k}(0)$ en fonction de k , de n'observer aucune bactérie viable parmi 1000, et donc de conclure que l'abattement est total, alors que la viabilité réelle est : $\mu_s=1/(1000k)$.

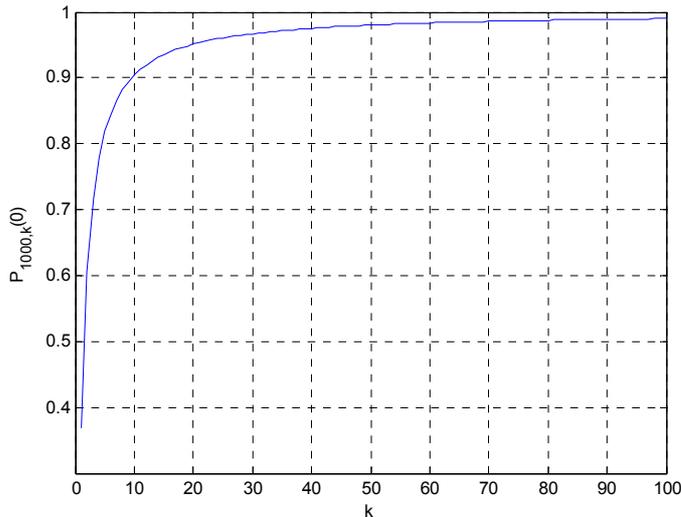


Figure 56. Probabilité $P_{1000,k}(0)$ de n'observer aucune bactérie vivante parmi 1000 en fonction de k , pour une viabilité réelle de $\mu_s=1/(1000k)$. Par exemple, l'observation d'un échantillon de 1000 bactéries issues d'une population de viabilité réelle $\mu_s=0,0001$ ($k=10$) conduira dans 90% des cas à la conclusion qu'il n'y a pas de bactéries vivantes et que le système est « idéal ».

Ainsi, avec l'exemple donné, si l'on observe une population de 1000 bactéries dont la viabilité réelle est de $1/10000$, on conclura dans 90 % des cas que l'abatement est total.

Il est possible d'introduire un indicateur supplémentaire en définissant le « maximum de la RLV pour N bactéries observées » (RLV_{max}), qui indique l'échelle des abatements mesurables :

$$RLV_{max} = \log\left(\frac{\mu_c}{\frac{1}{N}}\right)$$

Ainsi, la fraction $RLV/RLV_{max}=\%RLV_{max}$ permet d'indiquer si l'on se situe proche du maximum mesurable de l'abatement par l'observation de N bactéries, auquel cas, il faut considérer que l'on risque de ne pas pouvoir distinguer deux dispositifs :

$$\%RLV_{max} = \frac{\log\left(\frac{\mu_c}{k}\right)}{\log\left(\frac{\mu_c}{\frac{1}{N}}\right)}$$

Ainsi, les résultats des tests seront présentés avec les indicateurs suivants :

- La RLV, qui indique le rapport des viabilités entre l'entrée et la sortie du dispositif (échelle logarithmique).
- La probabilité P_v qu'a une bactérie de ressortir vivante du réacteur ($P_v = 10^{-RLV}$).
- Le $\%RLV_{max}$, qui permet d'indiquer quelle proportion du maximum observable est atteinte lors d'un test.
- N , le nombre total de bactéries observées permettant d'apprécier la signification du résultat.

III Survie des microorganismes à l'aérosolisation et à la collecte

Parmi les tests préliminaires qu'il nous a semblé important de réaliser figurent les expériences concernant la sensibilité des différents microorganismes envers la mise en aérosol ainsi qu'envers le séjour dans l'eau distillée de la colonne de récupération.

En effet, les tests de décontamination étant relativement longs à mettre en place, il faut s'assurer préalablement que les microorganismes testés sont suffisamment résistants pour qu'il n'y ait pas un abattement trop important lié uniquement au montage expérimental.

Les expériences sont réalisées selon le protocole décrit dans la partie expérimentale en mode « one pass », « en fût vide » (diamètre : 70 mm) et à $5 \text{ m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$ afin de conserver des conditions identiques à celles des tests de décontamination.

Conditions générales de l'expérience	Réacteur ; Lampe Photocatalyseur Microorganisme	fût vide;éteinte -	fût vide;éteinte -	fût vide;éteinte -	fût vide;éteinte -
		⁶ <i>B.subtilis</i>	<i>L.pneumophila</i>	<i>M.smeqmatis</i>	<i>L.lactis</i>
	¹ Conditions de culture	48h ; Liq ; 30°C	48h ; Sol ; 37°C	72h ; Liq ; 37°C	48h ; Liq ; 37°C
	durée de l'expérience (h)	3,00	2,00	2,00	2,00
	débit d'injection (mL/h)	12,1	14,3	14	13,5
	T° enceinte (°C)	23	25	26	26
	T° flux (°C)	23	26	27	27
	Humidité relative (%)	15,0	14,2	13,0	14,0
	Volume de la colonne à t=0 (L)	1,89	1,84	1,56	1,62
	² $\Delta V(t-t_0)$ (L)	7%	5%	6%	7,4
Suspension de départ	³ V. susp. départ coloré (µL)	100	100	100	100
	Facteur de dilution	10	10	10	10
	⁴ Nombre de paires de clichés	4	8	8	6
	Bactéries totales	975	1322	1023	825
	Bactéries mortes	432	739	780	624
	[bactéries totales] (bact/mL)	1,0E+09	6,9E+08	5,3E+08	5,7E+08
[bactéries vivantes] (bact/mL)	4,5E+08	3,8E+08	4,0E+08	4,3E+08	
Suspension de collecte	V. susp. colonne coloré (mL)	20	20	25	20
	⁴ Nombre de paires de clichés	8	12	10	12
	Bactéries totales	689	521	542	640
	Bactéries mortes	326	356	425	516
	[bactéries totales] (bact/mL)	1,8E+05	9,0E+04	9,0E+04	1,1E+05
[bactéries vivantes] (bact/mL)	8,5E+04	6,2E+04	7,1E+04	8,9E+04	
Résultats	⁵ % récupération/injection	0,98%	0,89%	1,0%	1,2%
	% viabilité susp. départ	55,7%	44,1%	23,8%	24,4%
	% viabilité susp. collecte	52,7%	31,7%	21,6%	19,4%
	RLV _{max}	2,6	2,4	2,1	2,2
	RLV	0,0	0,1	0,0	0,1
	P _v	95%	72%	91%	80%
	%RLV _{max}	0,9%	6,1%	2,0%	4,5%
	N	689	521	542	640

Tableau 13. Résultats des tests de survie des différents microorganismes en fût vide à 5 m³.h⁻¹. (1 Liq : milieu liquide ; Sol : milieu solide, 2 variation du volume de liquide de collecte dans la colonne entre le début et la fin de l'expérience, 3 volume de la suspension de départ coloré et filtré pour comptage, 4 une paire de clichés représente 1/41510^{ème} de la surface du filtre, 5 pourcentage du nombre de bactéries injectées récupérées dans la colonne, 6 bactéries végétatives).

Les résultats présentés dans le tableau 13 indiquent que tous les microorganismes végétatifs testés résistent au passage en aérosol ainsi qu'au séjour dans l'eau distillée de la colonne. L'ensemble de ces tests préliminaires permet donc d'être assuré que le montage expérimental ne sera pas la source d'un abattement significatif lors des tests avec des réacteurs photocatalytiques. Notons enfin que les variations du volume du liquide de collecte au cours des expériences restent faibles (<10 %).

Cette partie quelque peu technique a été l'occasion de valider l'utilisation du kit de mesure de viabilité BacLight™ puisqu'il permet d'obtenir des résultats répétables (et linéaires pour ce qui est de la densité). De même, nous avons pu montrer que les bactéries utilisées lors des tests de décontamination n'étaient pas particulièrement sensibles aux conditions expérimentales (aérosolisation et séjour dans de l'eau distillée). Néanmoins, nous avons pu mettre en évidence le fait que la présence de TiO₂ pouvait présenter des risques au niveau des résultats obtenus par épifluorescence, et donc qu'il convient de valider méticuleusement ce type de techniques lorsqu'elles sont employées dans des conditions particulières.

Enfin, nous avons ajouté un indicateur d'efficacité propre aux résultats de décontamination obtenus par épifluorescence, le %RLV_{max}, qui correspond à la fraction de l'abattement maximal observable pour un nombre donné de bactéries observées.

IV RÉSULTATS SUR LES DIFFÉRENTES GÉOMÉTRIES DE RÉACTEURS

Cette partie a pour but de présenter les résultats de décontamination obtenus avec les différentes géométries de réacteur présentées dans la partie expérimentale, à savoir : le réacteur « paillason », le réacteur « torsadé » et le réacteur « tangentiel ». Tout d'abord, ces réacteurs ont été testés en mode « one pass », à $5 \text{ m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$ sur *L.pneumophila*, en utilisant le kit de mesure de viabilité BacLight™ afin de pouvoir les comparer plus aisément comme nous l'avons décrit dans le chapitre précédent.

Dans le cadre d'une collaboration avec la société Recyclanet, nous avons développé un dispositif basé sur le réacteur « tangentiel » qui a été validé en mode « recirculation », à son débit maximal de $140 \text{ m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$, avec des bactéries, des virus et des spores bactériennes.

I Tests des réacteurs en mode « one pass »

Les tests en mode « one pass » permettent de déterminer et de comparer plus précisément les efficacités de systèmes de décontamination. Néanmoins, les expériences réalisées selon ce mode de fonctionnement sont limitées au niveau du débit du fait des pertes de charge inhérentes au montage expérimental (filtres à huile et à poussières, tubulures, changements brusques de direction, etc.). Ainsi, toutes les expériences ne comportant qu'un passage unique à travers le dispositif de décontamination se déroulent à $5 \text{ m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$, ce qui permet tout de même d'obtenir des vitesses linéaires élevées ($\approx 1 \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$) et des temps de passage courts ($< 1 \text{ s}$) et ainsi d'être le plus proche possible des conditions réelles.

De plus, l'utilisation d'un organisme cible unique, *L.pneumophila*, permet de s'affranchir dans un premier temps des variations de sensibilité inter-espèces qui compliqueraient les comparaisons de réacteurs, puisque cette série de tests est dédiée au choix du type de réacteur à développer et à optimiser, lequel sera ensuite validé sur d'autres microorganismes.

I 1 Réacteur « paillason »



Figure 57. Exemple de réacteur de type « paillason ». Dans cet exemple, une alternance de deux tailles d'agrafes a été choisie pour améliorer l'illumination dans les zones éloignées de la lampe dans ce réacteur plus large que celui utilisé lors des tests de décontamination.

Les résultats obtenus avec le réacteur de type « paillason » lors des tests de décontamination en mode « one pass » sont présentés dans le tableau 14. Ce réacteur (30 cm x 4 cm) a été conçu avec l'idée d'augmenter la surface géométrique disponible du réacteur et d'accroître les turbulences, tout en limitant les effets d'ombrages. Ceci a été réalisé grâce à des agrafes en acier galvanisé dirigées normalement à la surface interne du tube du réacteur, vers la lampe UVA 8W. La surface totale ainsi utilisable est de 2350 cm², recouverte de TiO₂ (P25) à raison de 1,5 mg/cm². Le temps de passage dans le réacteur est estimé en tenant compte de la section occupée par la lampe (diamètre #18 mm) à 0,2 s ce qui correspond à une vitesse linéaire de 1,4 m.s⁻¹.

Réacteur ; Lampe Photocatalyseur Microorganisme	Paill. ; éteinte - <i>L.pneumophila</i>	Paill. ; éteinte P25 <i>L.pneumophila</i>	Paill. ; allumée P25 <i>L.pneumophila</i>
Conditions de culture	48h ; Sol ; 37°C	48h ; Sol ; 37°C	48h ; Sol ; 37°C
durée de l'expérience (h)	0,50	0,50	0,50
débit d'injection (mL/h)	6,0	6,0	6,0
T° enceinte (°C)	29	26	31
T° flux (°C)	-	-	-
Humidité relative (%)	13,6	14,0	13,4
V. col. t=0 (L)	1,00	1,00	1,00
V. susp. départ coloré (µL)	100	100	100
Facteur de dilution	100	100	100
Nombre de paires de clichés	9	4	5
Bactéries totales	820	181	306
Bactéries mortes	439	91	163
[bactéries totales] (bact/mL)	3,8E+09	1,9E+09	2,5E+09
[bactéries mortes] (bact/mL)	2,0E+09	9,4E+08	1,4E+09
V. susp. colonne coloré (mL)	50	50	25
Nombre de paires de clichés	5	3	15

→

Réacteur ; Lampe Photocatalyseur Microorganisme	Paill. ; éteinte - <i>L.pneumophila</i>	Paill. ; éteinte P25 <i>L.pneumophila</i>	Paill. ; allumée P25 <i>L.pneumophila</i>
[bactéries totales] (bact/mL)	1,8E+05	6,8E+04	4,9E+04
[bactéries mortes] (bact/mL)	1,2E+05	3,5E+04	4,6E+04
% récupération/injection	1,6%	1,2%	0,65%
% viabilité susp. départ	46,5%	49,7%	46,7%
% viabilité susp. collecte	30,7%	48,4%	7,2%
RLV _{max}	2,7	2,1	2,3
RLV	0,2	0	0,8
P_v	66%	97%	15%
%RLV_{max}	7%	1%	35%
N	1073	246	446

Tableau 14. Résultats de décontamination obtenus avec un réacteur paillason (Paill.) à $5 \text{ m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$ sur *L.pneumophila*. Les numérations ont été réalisées avec le kit BacLight™.

On constate que les tests réalisés en absence d’UVA, que ce soit avec ou sans revêtement photocatalytique, ne révèlent pas de variations flagrantes sur le titre en légionelles vivantes en sortie de réacteur, ce qui permet d’exclure une influence intrinsèque à la géométrie du réacteur sur la viabilité des bactéries, ainsi qu’une influence du revêtement photocatalytique. Notons que le temps de passage étant extrêmement court, et la puissance du tube fluorescent UVA très faible (8 W), la seule exposition à ces radiations ne devrait pas être une source significative d’abattement car la dose d’UVA reçu est bien inférieure à celle nécessaire pour observer un abattement significatif (Hamamoto, Mori *et al.* 2007). Par souci de temps, ces tests blancs (i.e. uniquement des UVA) n’ont pas été réalisés, sauf dans le cas du réacteur tangentiel qui a fait l’objet d’une étude complète (Josset, Taranto *et al.* 2007).

Par contre, **lorsque le revêtement photocatalytique est activé, on obtient un abattement de 85 % pour un réacteur de 30 cm, à $5 \text{ m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$.**

Afin de pouvoir extrapoler ces résultats obtenus à une plus grande échelle, il est nécessaire de procéder au dimensionnement du réacteur. Pour ce faire, on doit supposer une cinétique d'ordre 1, ce qui est très souvent le cas en décontamination (« loi de Chick »(Chick 1908)), y compris par photocatalyse (Ibanez, Litter *et al.* 2003; Sunada, Watanabe *et al.* 2003). De plus, il faut admettre que l’on peut considérer le réacteur comme une suite de réacteurs en série (un empilement de « tranches » identiques). On peut donc assimiler dans un premier temps le réacteur à un réacteur de type « piston » (Fig. 58), mais les relations obtenues sont généralisables, sous quelques réserves, à des cas « non-idéaux » :

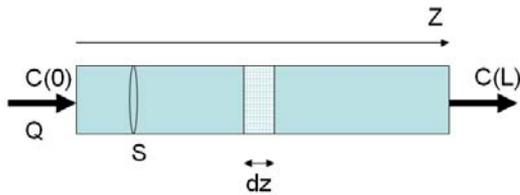


Figure 58. Réacteur de type piston, de section S et de longueur L , à travers lequel passe un bioaérosol contaminé à hauteur de $C(0)$ en entrée, au débit Q .

En faisant un bilan de matière classique, **en régime permanent**, sur une tranche de réacteur à l'abscisse z , d'épaisseur dz et de volume $S \cdot dz$, on obtient :

$$QC(z) = QC(z + dz) + Sdz \times r$$

r étant la vitesse de décontamination, en bactéries inactivées par unité de temps et de volume de réacteur, soit $r=k \cdot C$, avec k , constante cinétique. On obtient alors en intégrant sur la longueur du réacteur :

$$\int_0^L \frac{dC}{C(z)} = -\frac{kS}{Q} \int_0^L dz$$

En considérant une quantité arbitraire de bactéries C_0 (en bact/m³), on obtient en supposant toutes les bactéries vivantes en entrée $C(0)=C_0P(0)=C_0$, $C(L)=C_0P(L)$, avec $P(z)$, la viabilité à l'abscisse z .

$$\ln(P(L)) = \frac{-SkL}{Q}$$

De cette relation découle :

$$P(1) = e^{\frac{-Sk}{Q}} \quad P(L) = e^{\frac{-SkL}{Q}}$$

d'où, en utilisant par exemple le centimètre comme unité de longueur :

$$\boxed{P(1(cm)) = P(Lr(cm)) \frac{1}{Lr}}$$

Notons qu'on obtient le même résultat en considérant le réacteur paillason comme une suite de réacteurs parfaitement agités (le réacteur piston correspond à la mise en série de réacteurs parfaitement agités identiques, et de volume infiniment petit). Il est évident que nos réacteurs ne sont pas des réacteurs « idéaux », mais la relation démontrée est en fait généralisable, bien évidemment sous réserve que l'on puisse considérer le réacteur comme une mise en série de petits réacteurs semblables (par exemple des « tranches » de réacteurs). Cette relation peut aussi être obtenue en suivant des considérations probabilistes, qui supposent que toutes les bactéries sont indépendantes, c'est-à-dire qu'il n'y pas d'influence de la viabilité des unes sur les autres ou plus généralement d'interactions entre elles, ce qui se traduit « chimiquement » avec une cinétique d'ordre 1.

De cette façon, on obtient la probabilité $P(I)$ de survie d'une bactérie par unité de longueur du réacteur. La probabilité $P(L)$ de survie en sortie d'un réacteur de longueur L correspond à « P_v » :

$$P(1\text{ cm}) = P(L\text{ cm})^{\frac{1\text{ cm}}{L\text{ cm}}}$$

Pour ce réacteur de 30 cm, on obtient ainsi : $P(I) = 0,15^{1/30} = 0,9387$ qui permet facilement d'établir la probabilité d'une bactérie de traverser un réacteur de type « paillason » de longueur L ($P(L) = 0,9387^L$) (Fig. 59). Il est aussi possible de corriger les résultats obtenus par les abattements observés lors de blancs, en considérant que P_v est en fait le produit de la probabilité de survie liée au montage expérimental (P_{blanc}) par celle liée aux phénomènes photocatalytiques (P_{phot}) : $P_v = P_{blanc} P_{phot}$. Ainsi, la probabilité de survie liée uniquement aux phénomènes photocatalytiques s'exprime $P_{phot} = 10^{-(RLV - RLV(\text{blanc}))}$, soit $0,9477^L$ dans le cas précédent, en prenant $RLV_{blanc} = 0,1$.

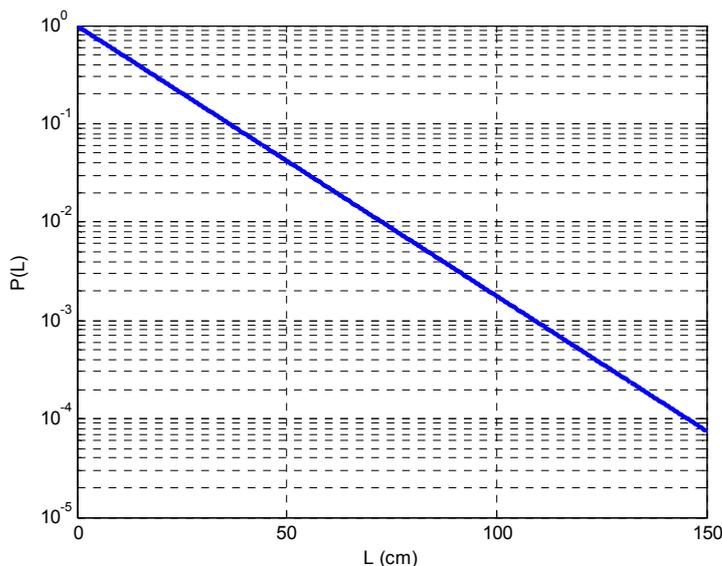


Figure 59. Probabilité $P(L)$ de survie d'une légionelle en fonction de la longueur L de réacteur de type « paillason » traversée (4 cm de diamètre, $5\text{ m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$) : $P(L) = 0,9387^L$.

Ainsi, pour atteindre un abattement de 4 log en sortie de réacteur, qui correspond à la stérilisation d'un air très vicié, il faudrait à débit égal, mettre en série 5 unités de type paillason pour former un réacteur de 1,5 m de long. Ceci nécessiterait donc une puissance électrique de 40 W, pour les lampes. À titre indicatif, un fonctionnement continu représenterait un coût journalier de 0,11 € pour obtenir un abattement de 4 log à $5\text{ m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$ (prix du kWh actuellement de 0,11 €). Notons aussi que, si l'on ne prend en compte que la quantité de bactéries effectivement récupérées dans la colonne de collecte, et que l'on considère comme valeur moyenne de la contamination de l'air 10000 bactéries vivantes par m^3 d'air, il est passé dans le réacteur en 30 min l'équivalent des bactéries contenues dans 350 m^3 .

Ces résultats sont encourageant, puisqu'on observe un abattement bien supérieur à celui obtenu avec un réacteur tubulaire (voir chapitre V), bien que ces tests aient été réalisés avec un tube de 30 cm de long, mais de 7 cm de diamètre au lieu de 4 cm. Néanmoins, il nous a paru important d'améliorer les performances du système de décontamination en essayant d'autres configurations. En fait, on peut supposer que l'optimisation de la taille des agrafes ainsi que leur implantation n'étaient pas parfaites, si bien que malgré une surface plus élevée et des turbulences accrues, l'effet d'ombrage a tout de même pu être préjudiciable à l'efficacité globale.

II 2 Réacteur « torsadé »



Figure 60. (g.) Vue en coupe du réacteur torsadé. (d.) Enroulage des demi-tubes lors de la conception du réacteur. Diamètre du réacteur: 40 mm. Longueur du réacteur: 300 mm.

C'est pour répondre à ce possible problème d'ombrage que nous avons développé le réacteur « torsadé », qui a pour but d'augmenter les turbulences du flux porteur sans pour autant utiliser d'obstacles à son écoulement, puisque ceux-ci peuvent rapidement nuire à l'illumination du fait de l'inévitable ombrage qu'ils provoquent. Ainsi, pour ce type de réacteur, c'est la torsion même du réacteur qui améliore le mélangeage du flux et les turbulences, et on peut imaginer que la force centrifuge, résultante de l'écoulement des flux à fort débit dans les tubes torsadés enroulés autour de la lampe centrale, a tendance à favoriser les impacts des microorganismes sur la paroi activée.

Le tableau 15 présente les résultats obtenus à $5 \text{ m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$ sur un bioaérosol de légionelles avec le réacteur « torsadé » (vitesse linéaire : 2,3 m/s).

Réacteur ; Lampe Photocatalyseur Microorganisme	Tors. ; éteinte P25 <i>L.pneumophila</i>	Tors. ; allumée P25 <i>L.pneumophila</i>
Conditions de culture	48h ; Sol ; 37°C	48h ; Sol ; 37°C
durée de l'expérience (h)	0,50	0,50
débit d'injection (mL/h)	6,0	6,0
T° enceinte (°C)	26	27
T° flux (°C)	28	29
Humidité relative (%)	13,3	14,1
V. col. t=0 (L)	1,00	1,00
V. susp. départ coloré (µL)	100	100
Facteur de dilution	100	100
Nombre de paires de clichés	3	3
Bactéries totales	326	380
Bactéries mortes	180	164
[bactéries totales] (bact/mL)	4,5E+09	5,3E+09
[bactéries mortes] (bact/mL)	2,5E+09	2,3E+09
V. susp. colonne coloré (mL)	40	30
Nombre de paires de clichés	3	3
Bactéries totales	396	482
Bactéries mortes	250	408
[bactéries totales] (bact/mL)	1,4E+05	2,2E+05
[bactéries mortes] (bact/mL)	8,6E+04	1,9E+05
% récupération/injection	1,0%	1,4%
% viabilité susp. départ	44,8%	56,8%
% viabilité susp. collecte	36,9%	15,4%
RLV _{max}	2,2	2,4
RLV	0,1	0,6
P_v	82%	27%
%RLV_{max}	4%	23%
N	396	482

Tableau 15. Résultats de décontamination sur un réacteur « torsadé » (Tors.) à $5 \text{ m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$ sur *L.pneumophila*. Numérations réalisées avec le kit BaCLight™.

Ainsi, on obtient un abattement de l'ordre de 73 % en un passage avec le réacteur torsadé ($10^{-(0,6-0,1)}=68 \%$ en corrigeant par le blanc). Pour ce réacteur, on obtient ainsi : $P(1) = 0,25^{1/30} = 0,9549$ qui permet facilement d'établir la probabilité d'une bactérie de traverser un réacteur de type « torsadé » de longueur L ($P(L) = 0,9549^L$ ou en corrigeant par le blanc $0,9623^L$) (Fig. 61).

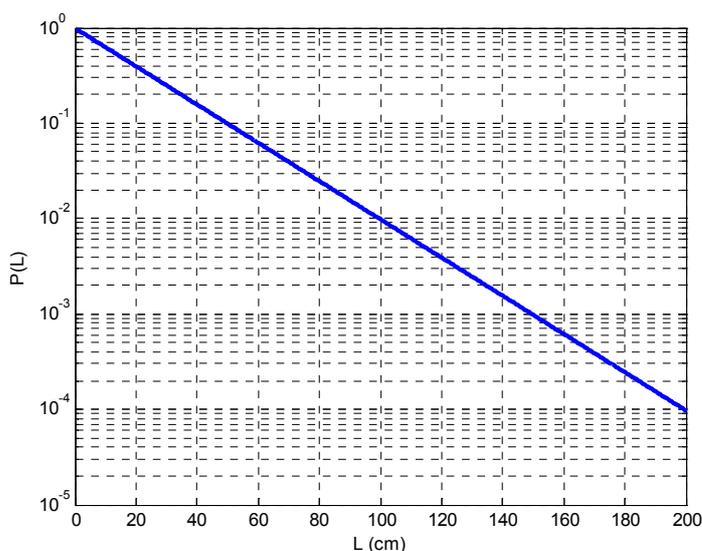


Figure 61. Probabilité $P(L)$ de survie d'une légionelle en fonction de la longueur L de réacteur de type « torsadé » traversée ($5 \text{ m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$): $P(L) = 0,9549^L$.

Ainsi, pour atteindre un abattement de 4 log en sortie de réacteur, qui correspond à la stérilisation d'un air très vicié, il faudrait à débit égal, mettre en série 6,7 unités de type

« torsadé » pour former un réacteur de 2 m de long. Ceci nécessiterait donc une puissance électrique de 54 W, pour les lampes. A titre indicatif, un fonctionnement continu représenterait dans cette configuration un coût journalier de 0,14 € pour obtenir un abattement de 4 log à $5 \text{ m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$.

On constate que ce réacteur est moins performant que le réacteur « paillason », peut être du fait de la vitesse linéaire plus élevée (2,3 m/s) qui impose un temps de passage de 0,13 s dans le dispositif (volume total des demi-tuyaux : 0,185 L). Il est donc tout à fait possible que ce réacteur ne soit pas suffisamment optimisé, notamment au niveau des dimensions des demi-tuyaux, et il faudrait s'intéresser à d'autres modes de fabrication de tels réacteurs, car les dimensions que nous avons choisies étaient en fait tributaires des possibilités de torsion, et donc d'enroulage des tuyaux en silicone autour de la lampe.

I 3 Réacteur « tangentiel »

Le réacteur tangentiel est né du besoin de disposer d'un système autonome et mobile pour pouvoir assainir l'air, notamment dans des zones ne possédant pas de propres systèmes de ventilation, ou sur lesquels ne peuvent être adaptés d'autres dispositifs. La mise au point de ce dispositif a été le fruit d'une collaboration avec la société Recyclanet, qui désirait remédier dans un premier temps à la contamination de l'air des ambulances. De ce fait, des contraintes majeures au niveau de l'encombrement ont été imposées, de même qu'il était primordial qu'aucun flux d'air ne soit directement envoyé vers le patient.

L'idée directrice de ce type de réacteur a été de mettre à profit le dispositif de propulsion d'air, puisque c'est *a priori* la partie du système qui va être le plus en contact avec le flux. On peut noter les travaux semblables de Riffat et Zhao (Riffat et Zhao 2007), mais pour des applications de dépollution de l'air au niveau chimique, puisque ceux-ci ont testé un ventilateur muni de franges souples recouvertes de photocatalyseur (« mop fan »), et ce, afin d'assainir l'air intérieur de bâtiments.

Nous avons ainsi développé un réacteur de type « tangentiel » qui présente l'avantage, par rapport à un ventilateur classique, de créer un vortex intense en son centre (Fig. 31). Celui-ci permet avec la dépression qui se forme sur l'intrados des pales de maintenir les microorganismes plus longtemps à l'intérieur du réacteur. Notons enfin que l'intégralité du

revêtement photocatalytique, c'est-à-dire les pales et la face intérieure du réacteur, se retrouve activée, mais selon plusieurs modes, comme indiqué sur la figure 62.

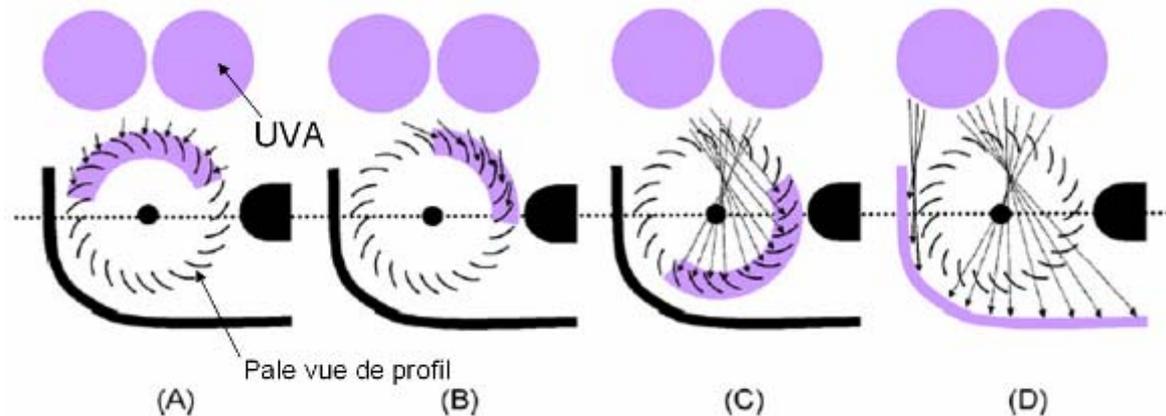


Figure 62. Différents modes d'éclairage du revêtement photocatalytique du réacteur tangentiel. (A) éclairage des extrados. (B) éclairage des intrados. (C) éclairage à travers les pales. (D) éclairage de la surface interne du réacteur (Josset, Taranto *et al.* 2007).

On peut donc considérer trois types d'illumination, c'est-à-dire l'éclairage direct et indirect des deux faces des pales, et l'illumination de la face interne du réacteur. Cette illumination intermittente, d'intensité variable, est très complexe à modéliser précisément. Il a été décrit dans différents travaux qu'un tel type d'illumination peut être bénéfique à l'efficacité photocatalytique dans le traitement de polluants chimiques en phase liquide (Foster, Koval *et al.* 1996). Sczechowski *et al.* précisent que soumettre le photocatalyseur à une illumination périodique avec une alternance allumée/éteinte de 1:10 ou 1:20 permet d'améliorer l'efficacité des procédés de dégradation de polluants organiques en phase liquide (Sczechowski, Koval *et al.* 1993; Foster, Koval *et al.* 1996). Quelques explications ont été avancées pour expliquer cette amélioration du rendement par l'intermittence de l'activation lumineuse, comme un retardement des recombinaisons électron-trou (Peill et Hoffmann 1996), ou une diminution de la fréquence de ces événements du fait de l'intensité lumineuse moindre, ce qui peut avoir pour conséquence d'abaisser la fréquence des impacts des photons à la surface du photocatalyseur (Ohko, Hashimoto *et al.* 1997). Ce dernier point conduirait à une augmentation du rendement quantique (défini par rapport à l'illumination), mais pas forcément de l'activité photocatalytique (définie par rapport aux réactifs et aux produits). Il a aussi été montré expérimentalement par Ollis qu'une activation discontinue peut augmenter la quantité d'oxygène adsorbée lors des phases d'obscurité, et/ou d'améliorer le transfert d'électron à ces molécules, ce qui favorise la formation de FRO (Upadhyya et Ollis 1997). Par contre, dans le cas du traitement de microorganismes en phase liquide, un tel type

d'illumination semble conduire à des temps nécessaires à la décontamination plus long qu'avec un éclairage continu (Rincon et Pulgarin 2003). Néanmoins, il est à noter que ces observations – peu nombreuses au demeurant – ont été réalisées en phase aqueuse, et il est donc très délicat et prématuré de transposer ces résultats au traitement des bioaérosols. Rien ne nous permet à l'heure actuelle de proposer ou d'exclure l'apport bénéfique d'une illumination périodique. Des travaux sont actuellement en cours, notamment en étudiant l'efficacité de décontamination de ce réacteur en fonction de la vitesse de rotation, même si dans ce cas, il sera inévitable en restant à débit constant que le rapport entre la vitesse des microorganismes et la vitesse du revêtement photocatalytique soit modifié.

Le tableau 16 présente les résultats obtenus en mode « one pass » sur un bioaérosol de légionelles traité par ce réacteur à raison de $5 \text{ m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$, le ventilateur étant alors uniquement mû par le flux entrant. Les détails de ces tests ont été publiés (Josset, Taranto *et al.* 2007).

Réacteur ; Lampe Photocatalyseur Microorganisme Conditions de culture	Tang. ; éteinte - L.pneumophila 48h ; Sol ; 37°C	Tang. ; allumée - L.pneumophila 48h ; Sol ; 37°C	Tang. ; éteinte P25 L.pneumophila 48h ; Sol ; 37°C	Tang. ; allumée P25 L.pneumophila 48h ; Sol ; 37°C
durée de l'expérience (h)	0,50	0,50	0,50	0,50
débit d'injection (mL/h)	6,0	6,0	6,0	6,0
T° enceinte (°C)	27	28	28	27
T° flux (°C)	-	-	-	-
Humidité relative (%)	13,2	14,0	14,1	13,6
V. col. t=0 (L)	1,00	1,00	1,00	1,00
V. susp. départ coloré (µL)	100	100	100	100
Facteur de dilution	10	10	10	10
Nombre de paires de clichés	8	11	8	5
Bactéries totales	996	1253	1126	1513
Bactéries mortes	528	500	563	598
[bactéries totales] (bact/mL)	5,2E+08	4,7E+08	5,8E+08	1,3E+09
[bactéries mortes] (bact/mL)	2,7E+08	1,9E+08	2,9E+08	5,0E+08
V. susp. colonne coloré (mL)	50	50	50	50
Nombre de paires de clichés	15	19	18	25
Bactéries totales	289	405	359	235
Bactéries mortes	200	264	248	229
[bactéries totales] (bact/mL)	1,6E+04	1,8E+04	1,7E+04	7,8E+03
[bactéries mortes] (bact/mL)	1,1E+04	1,2E+04	1,1E+04	7,6E+03
% récupération/injection	1,0%	1,2%	0,94%	0,21%
% viabilité susp. départ	47,0%	60,1%	50,0%	60,5%
% viabilité susp. collecte	30,8%	34,8%	30,9%	2,6%
RLV_{max}	2,1	2,4	2,3	2,2
RLV	0,2	0,2	0,2	1,4
P_v	66%	58%	62%	4%
%RLV_{max}	9%	10%	9%	64%
N	289	405	359	235

Tableau 16. Résultats de décontamination sur réacteur « tangentiel » (Tang.) à $5 \text{ m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$ sur *L.pneumophila*, et tests « blancs » associés.

On observe que ce type de réacteur permet d'obtenir une très bonne efficacité de décontamination, puisque l'on obtient en un seul passage une RLV de 1,4 qui

correspond à un abattement de 96 % en un seul passage (94 % avec la correction par les blancs). Les tests blancs indiquent que les bactéries sont peu sensibles aux différentes sources potentielles d'abattement.

Cependant, contrairement aux autres réacteurs, il n'est pas possible de rapporter l'abattement mesuré à une unité de longueur puisqu'il s'agit d'une « unité » de décontamination. Néanmoins, on peut rapporter la probabilité de survie d'une légionelle à son nombre de passages n dans le réacteur puisque $P(n)=P(n=1)^n$, soit $P(n)=0,04^n$ (Tab. 16), ou en corrigeant les résultats obtenus par les valeurs des tests blancs ($RLV_{\text{blancs}}=0,2$ donc $RLV_{\text{corrigé}}=1,2$), $P(n)=0,06^n$ (Fig. 63).

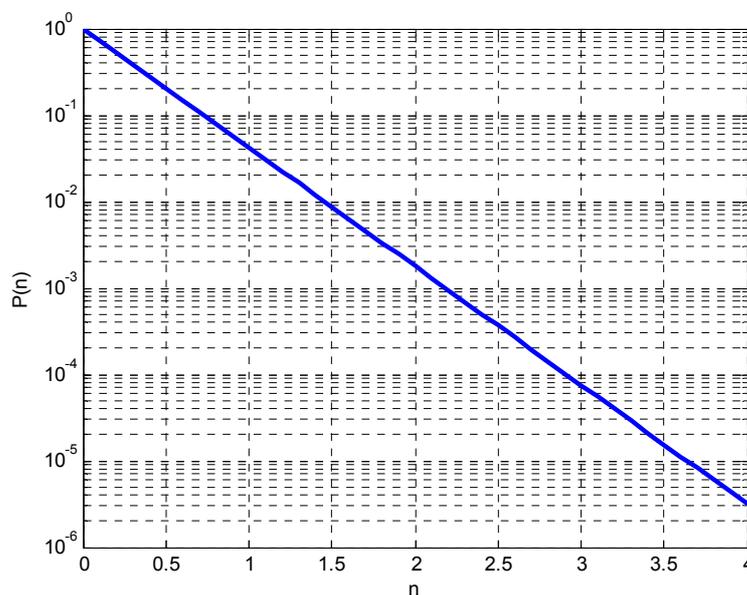


Figure 63. Probabilité $P(n)$ de survie d'une légionelle en fonction de son nombre de passages n dans le réacteur de type « tangentiel » à $5 \text{ m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$: $P(n)=0,0422^n$.

« L'objectif » d'obtenir un abattement de 4 log en sortie de réacteur est atteint théoriquement pour trois passages consécutifs dans le réacteur. Il est cependant important de préciser que ce type d'unité de décontamination photocatalytique consomme plus d'énergie que les autres réacteurs testés puisqu'il s'agit d'une unité autonome (lampe 24 W et ventilateur 8,7 W). A titre indicatif, sous cette configuration avec un seul ventilateur de débit nominal $70 \text{ m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$, le coût journalier de cette unité de décontamination est estimé à de 0,086 €, mais cette valeur n'est pas à comparer aux autres systèmes du fait des différences notables des modes de fonctionnement.

Nous avons donc choisi de développer ce type de système autonome puisque ce dernier correspondait le mieux aux exigences de taille pour pouvoir être installé dans des ambulances, selon le cahier des charges imposé dans le cadre de notre collaboration avec la société Recyclanet. Toutefois, un second ventilateur a été ajouté, ce qui permet non seulement d'augmenter le débit nominal ($140 \text{ m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$), mais aussi d'utiliser au mieux la lumière en

disposant les deux ventilateurs de part et d'autre de la lampe UVA (Fig. 32). Le chapitre suivant va donc présenter les tests de décontamination en recirculation réalisés avec le réacteur tangentiel en configuration « double-ventilateur » et auto-entraîné.

II Tests sur le réacteur tangentiel en recirculation

Les tests en recirculation doivent permettre d'évaluer les capacités du réacteur tangentiel à son débit nominal de $140 \text{ m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$, puisqu'il n'est pas possible de prévoir avec suffisamment de confiance, les effets d'une telle augmentation du débit à traiter. Nous avons donc réalisé des tests de décontamination en recirculation, selon le protocole décrit dans la partie expérimentale, sur *L.pneumophila* (activité bactéricide), *B.subtilis* (activité sporicide) et sur des bactériophages T2 (activité virocide). Ces tests nous ont également permis d'établir une cinétique d'abattement pour ces deux derniers microorganismes. Pour *L.pneumophila*, seule une expérience de validation de 30 min a été réalisée, puisque de très bons résultats ont été obtenus.

II 1 Résultats sur *L.pneumophila*

Les tests de décontamination en recirculation sur *L.pneumophila* permettent de mesurer l'effet bactéricide de l'unité de décontamination à son débit nominal, et de juger de la variation d'efficacité due à l'augmentation importante du débit à traiter, par rapport au mode « one pass ».

Deux tests ont ainsi été réalisés : un premier test avec activation UVA, le second sans activation UVA. La durée des tests étant relativement courte (30 min), il a été possible de réaliser consécutivement les deux tests de chaque série avec une même suspension de départ, en procédant bien évidemment à un nettoyage intermédiaire à la vapeur d'eau de la hotte, ainsi qu'à la filtration de son air intérieur, procédé qui a montré son efficacité lors de tests préliminaires non présentés.

Ainsi, un bioaérosol de légionelles a été généré dans la hotte confinée en aérosolisant, grâce à une buse, 5 mL d'une suspension de légionelles (moyenne : $2,4 \cdot 10^7$ bact./mL) 5 min avant le début de l'expérience. Pendant cette durée précédant le début de l'expérience, les ventilateurs de l'unité de décontamination sont en fonctionnement à $140 \text{ m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$, ainsi que 4 petits ventilateurs annexes disposés dans les coins de la hotte, le but étant évidemment de maintenir l'aérosol en suspension et d'en assurer l'homogénéité (concentration initiale du bioaérosol : $1,5 \cdot 10^8$ bact. m^{-3}).

Un prélèvement d'une durée de 1 min à $t=30$ min a été réalisé grâce au dispositif décrit dans la figure 37, l'aspiration étant assurée par une pompe à vide fonctionnant à un débit de 20 L/min. Les numérations ont été réalisées grâce au kit de viabilité BacLight™, et du fait de l'utilisation d'une même suspension bactérienne, on peut rapporter l'efficacité du test photocatalytique à celle du test sans activation UVA (Tab. 17). Ceci permet de retrancher l'abattement dû au procédé expérimental, notamment à la recirculation à très haut débit et au fait que les bactéries se retrouvent en aérosol pour une durée beaucoup plus longue que lors des tests en mode « one-pass ».

	Réacteur Photocatalyseur Microorganisme	Tangentiel P25 <i>L.pneumophila</i>
	Conditions de culture	48h ; Sol ; 37°C
	durée de l'expérience (h)	0,50
	T° enceinte (°C)	21
	Humidité relative (%)	34,0
Lampe éteinte	V. susp. collecte coloré t=30 min (mL)	50
	Nombre de paires de clichés	5
	Bactéries totales	979
	Bactéries mortes	390
	[bactéries totales] (bact/mL)	1,6E+05
	[bactéries mortes] (bact/mL)	6,5E+04
Lampe allumée	V. susp. collecte coloré t=30 min (mL)	50
	Nombre de paires de clichés	6
	Bactéries totales	1541
	Bactéries mortes	1390
	[bactéries totales] (bact/mL)	2,1E+05
	[bactéries mortes] (bact/mL)	1,9E+05
	% viabilité lampe éteinte	60,2%
	% viabilité lampe allumée	9,8%
	RLV _{max}	3,0
	RLV	0,8
	P_v	16%
	%RLV_{max}	27%
	N	1541

Tableau 17. Résultats de la décontamination d'un bioaérosol de légionelles ($1,5 \cdot 10^8$ bact. m^{-3}) avec le réacteur de type « tangentiel » en mode recirculation à $140 \text{ m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$ pendant une demi-heure. Numérations obtenues avec le kit de viabilité BacLight™.

Les résultats obtenus après 30 min de tests indiquent que malgré l'importante augmentation du débit, on atteint un abattement de 84 %.

En première approximation, on peut négliger les effets de dilution du flux de sortie du réacteur dans le volume de la hotte, et ainsi assimiler le système fermé au seul réacteur dont l'entrée et la sortie sont reliées par une conduite de volume équivalent à celui de la hotte (Fig. 64).

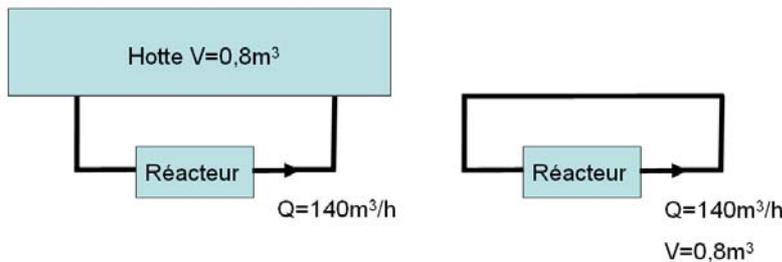


Figure 64. Approximation du système fermé composé de la hotte et du réacteur par le réacteur dont l'entrée et la sortie sont reliées par une conduite de volume égal à celui de la hotte.

Ainsi, du fait que la durée de traitement t et le nombre n de passages dans le réacteur sont liés au volume V de la hotte et au débit Q du réacteur par la relation :

$$n = \frac{tQ}{V}$$

les probabilités $P(t)$ ou $P(n)=P(n=1)^n$ pour une légionelle de traverser vivante le réacteur après une durée de traitement t (min) ou après un nombre de passages n sont liées et valent respectivement : $P(t(\text{min}))=0,9404^t$ (Fig. 65) et $P(n)=0,9793^n$.

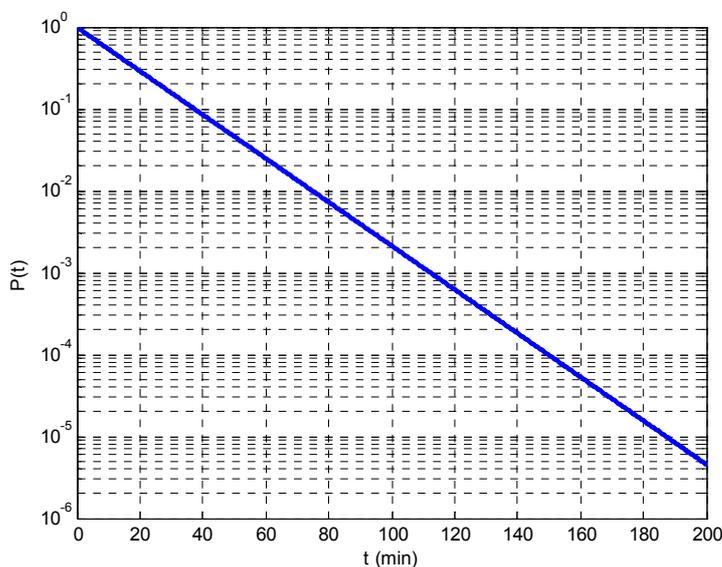


Figure 65. Probabilité pour une légionelle de traverser vivante le réacteur de type tangentiel, à $140 \text{ m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$, après une durée t (min) de traitement (configuration avec deux ventilateurs). $P(t) = 0,9404^t$

Ainsi, en éliminant les phénomènes de dilution et de mélangeage, l'objectif d'un abattement de 4 log sur légionelle en sortie de réacteur est atteint après 150 min.

II 2 Résultats sur spores de *B.subtilis*

Comme nous l'avons indiqué dans la partie bibliographique, les spores bactériennes font partie des organismes les plus résistants, et la menace qu'elles constituent en tant qu'arme biologique a été rappelée lors de l'envoi en 2001, aux États-Unis, de lettres piégées contenant de l'anthrax. De plus, la validation de l'unité de décontamination de type « tangentielle » sur des spores de *B.anthraxis* (appelé « anthrax » au U.S.A.) est intéressante, car celle-ci se rapproche de tests normés pour la désinfection par voie sèche à 180 °C (norme EN 866-2).

Bien que des publications attestent positivement de l'utilisation du kit BacLight™ pour déterminer la viabilité de spores bactériennes (après incubation au moins une heure dans un milieu propice à la germination) ou fongiques (Po-Ren Hsueh 2002; Laflamme, Lavigne *et al.* 2004), nous avons choisi de ne pas utiliser de fluorophores pour les dénombrements d'endospores. Cela tient premièrement au fait que les colorations de spores bactériennes nous ont souvent laissé apparaître les spores bicolores, phénomène qui aurait sans doute pu être évité après une optimisation de la technique de germination/coloration. De plus, le but des expériences de décontamination photocatalytique sur les spores est aussi d'établir des cinétiques de leur abattement, ce qu'il est délicat de suivre par comptage microscopique du fait du temps requis pour la coloration et la prise de clichés. Cependant, du fait de leur extrême résistance et de leur grande stabilité dans le temps elles ne sont pas sensibles aux phénomènes de stress comme les bactéries végétatives. De plus, il est possible de réaliser plusieurs expériences avec une même suspension de spores, dont nous avons vérifié la stabilité dans le temps, ce qui permet de s'affranchir des nombreuses sources de variations autant quantitatives (titre en spores, viabilité ...), que qualitatives (état général, phénotype...). Ainsi, nous avons procédé à quatre séries de deux tests (avec activation UVA/sans activation UVA), en utilisant une suspension unique de spores de *B.subtilis* fournie par l'Institut Pasteur, dont un aliquot de 5 mL a été aérosolisé par une buse de nébulisation pendant 5 min avant le début de l'expérience. Les prélèvements ont été effectués toutes les 20 min, en impactant pendant une minute, sur une boîte de Pétri contenant du milieu LB solidifié et située à 60 mm de la sortie du réacteur, les spores sortant du réacteur. Les comptages ont ensuite été réalisés après 36 à 48 heures d'incubation à 30 °C. Comme dans le cas des tests en recirculation avec *L.pneumophila*, quatre ventilateurs annexes ont permis d'améliorer le brassage de l'intérieur de la hotte ainsi que le maintien en suspension du bioaérosol.

La figure 66 présente les huit cinétiques de décontamination de spores de *B.subtilis* par le réacteur tangentiel en mode « recirculation ».

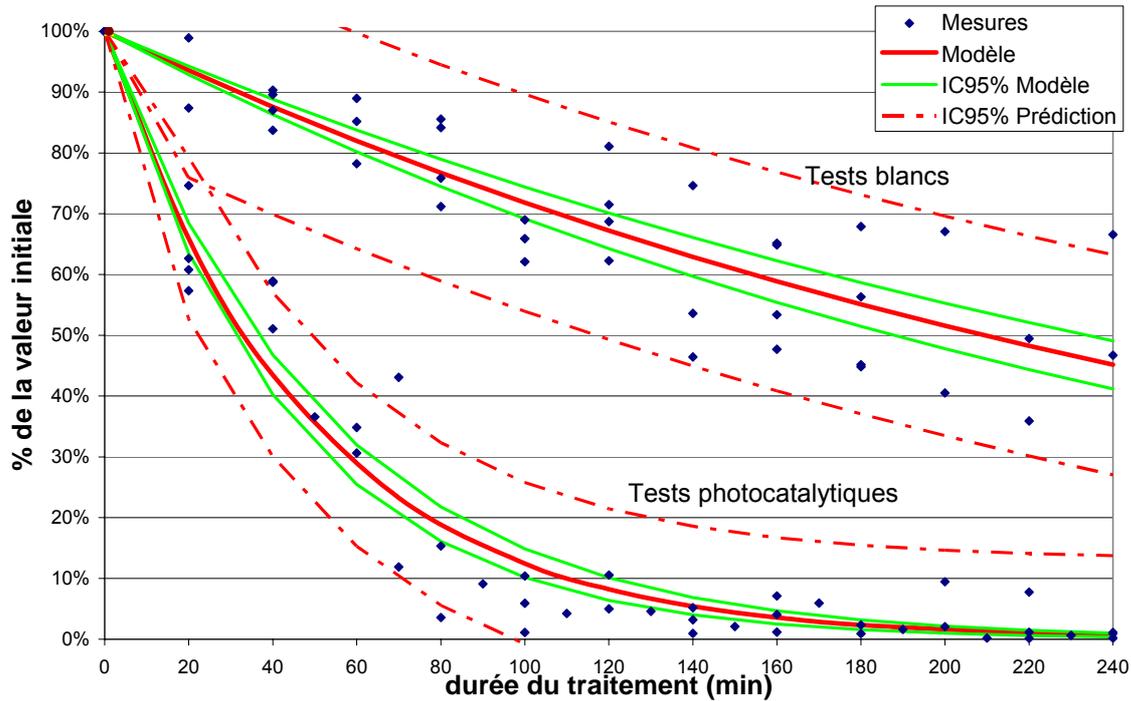


Figure 66. Inactivation photocatalytique de spores de *B.subtilis* avec le réacteur tangentiel en mode recirculation à $140 \text{ m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$ et modèles en exponentielle décroissante associés (concentration initiale $C_0 : 1,5 \cdot 10^8$ spores/ m^3 ; température : 22-24 °C ; humidité : 37-51%). Résultats chiffrés en annexe (Tab. 37).

« IC95% Modèle » correspond à l'intervalle de confiance à 95 % obtenu sur le paramètre de régression τ .

« IC95% Prédiction » correspond à l'intervalle de confiance à 95 % attendu sur une nouvelle prédiction.

Du fait que les tests ont été réalisés à partir d'une même suspension de spores de *B.subtilis*, on peut d'autant plus facilement réunir l'ensemble des mesures des tests blancs et celles des tests photocatalytiques, ce qui conduit, en utilisant des modèles d'exponentielles décroissantes du type $e^{-t/\tau}$ avec, τ , constante de temps du phénomène de décontamination en min, à :

- $\tau_{\text{sans UVA}}=302 \text{ min}$ (IC_{95%} 270-337)
- $\tau_{\text{avec UVA}}=48 \text{ min}$ (IC_{95%} : 44-52)

Les intervalles de confiance à 95 % (IC_{95%} Modèle) sur les valeurs des constantes de temps sont relativement étroits, et d'autres tests indiquent qu'on peut considérer ce paramètre comme significatif dans les deux cas. Ces intervalles sont indiqués (en trait vert) de part et d'autre de chaque modèle sur la figure 66. De plus, les intervalles de confiances sur les valeurs prédites (avec et sans activation UVA, en pointillés de part et d'autre de chaque modèle) forment deux domaines parfaitement disjoints, traduisant le fait qu'en réitérant ces

expériences, on obtiendrait quasiment toujours une différence très sensible entre les cinétiques de décontamination avec et sans photocatalyse. Ainsi, malgré la précision limitée des mesures de viabilité par mise en culture, nous avons pu obtenir des résultats significatifs en réitérant plusieurs fois ces cinétiques de décontamination, de sorte que l'erreur expérimentale puisse être mesurée.

En corrigeant les résultats obtenus par le blanc (%C₀^c : corrections par le blanc) afin de retrancher les pertes dues à d'autres phénomènes que la décontamination photocatalytique, on obtient (Fig. 67) :

$$\%C_0^c = \frac{\%C_0^{avecUVA}}{\%C_0^{sansUVA}} = e^{\left(\frac{-t}{\tau_{avecUVA}} + \frac{t}{\tau_{sansUVA}}\right)}$$

Cette correction permet de considérer l'efficacité réelle qu'aurait l'unité de décontamination photocatalytique sur un aérosol se maintenant indéfiniment en suspension et ne subissant pas de perte de viabilité au cours du temps.

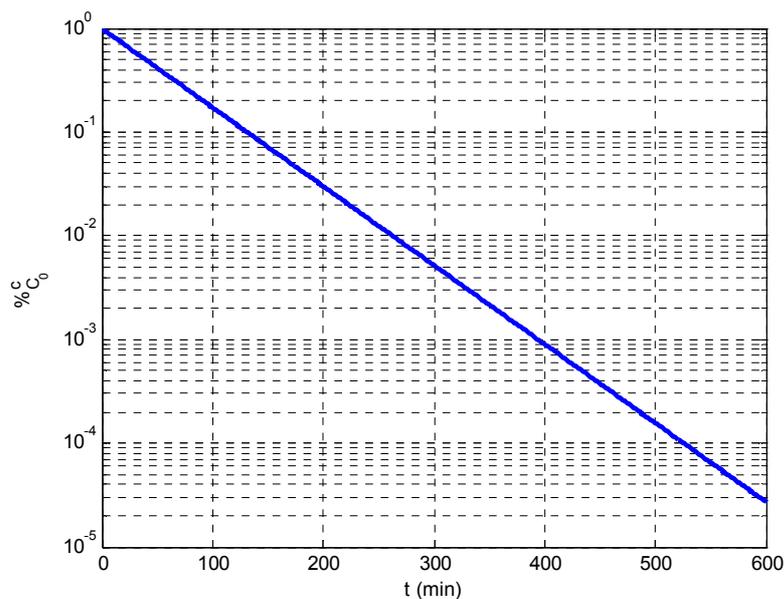


Figure 67. Abatement corrigé avec le réacteur tangentiel en recirculation à 140 m³.h⁻¹ sur spores de *B.subtilis*.

Un abatement de 4 log est atteint après une durée de 530 minutes de traitement. Il est intéressant de comparer cette valeur aux 150 min nécessaires dans le cas des légionelles ! Ceci est sans doute imputable en grande partie à la résistance plus élevée des endospores par rapport aux bactéries végétatives, puisque leurs tailles proches leur confèrent par ailleurs un comportement aérodynamique similaire.

II 3 Résultats sur bactériophages T2

De façon logique, il a fallu étendre la validation du dispositif de type « tangentiel » en mode recirculation aux virus, puisque bien que ceux-ci soient relativement fragiles, leur petite taille (#50 nm) fait qu'ils sont capables de rester très longtemps sous forme d'aérosol, et que leur comportement hydrodynamique peut s'avérer très différent de celui de particules plus massives.

Comme nous l'avons présenté dans la partie expérimentale, les bactériophages sont des virus intéressants pour les tests de décontamination, puisqu'ils n'infectent que des bactéries, qu'ils sont aisément quantifiables et qu'ils sont relativement résistants (en particulier les virus nus). De la même façon que pour l'étude de la décontamination des spores de *B.subtilis*, trois séries de deux tests (avec activation UVA/sans activation UVA) ont été réalisées en utilisant une unique suspension de virus T2 ($1,5 \cdot 10^8$ virus/mL). Avant chaque expérience, 5 mL de cette suspension sont aérosolisés, de sorte que l'on ait théoriquement $3,8 \cdot 10^7$ virus/m³. Les prélèvements sont effectués toutes les 20 min, en impactant pendant une minute, sur une boîte de Pétri contenant du milieu LB solidifié et située à 60 mm de la sortie du réacteur, les virus sortant du réacteur. Les boîtes ainsi obtenues sont ensuite recouvertes de LB mou préalablementensemencé avec *E.coli*, selon le protocole décrit dans la partie expérimentale. Les comptages ont ensuite été réalisés après 24 heures d'incubation à 37 °C. Comme pour les autres tests en recirculation, quatre ventilateurs annexes ont permis d'améliorer le brassage de l'intérieur de la hotte ainsi que le maintien en suspension du bioaérosol.

La figure 68 présente les six cinétiques de décontamination de bactériophages T2 par le réacteur tangentiel en mode « recirculation ». En suivant le même raisonnement que dans le cas de la décontamination des spores, on obtient en réunissant les mesures des tests blancs et celles des tests photocatalytiques, et en supposant un modèle d'exponentielle décroissante du type $e^{-t/\tau}$:

- $\tau_{\text{sans UVA}}=295$ min (IC_{95%} 241-374)
- $\tau_{\text{avec UVA}}=22$ min (IC_{95%} : 21-23)

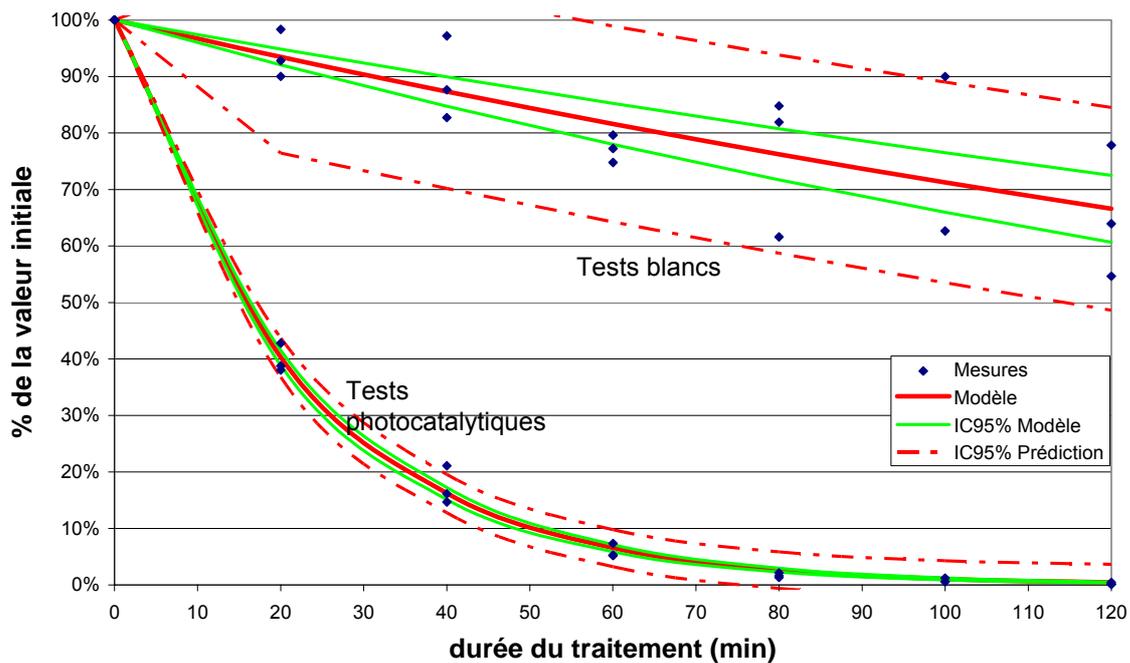


Figure 68. Inactivation photocatalytique de bactériophages T2 avec le réacteur tangentiel en mode recirculation à $140 \text{ m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$ et modèles en exponentielles décroissantes associés (concentration initiale $C_0 : 3,8 \cdot 10^7 \text{ spores/m}^3$; température : $21\text{-}25 \text{ }^\circ\text{C}$; humidité : $31\text{-}39 \%$). Résultats chiffrés en annexe (Tab. 38).

« IC95% Modèle » correspond à l'intervalle de confiance à 95 % obtenu sur le paramètre de régression τ .

« IC95% Prédiction » correspond à l'intervalle de confiance à 95 % attendu sur une nouvelle.

On constate que l'utilisation d'un modèle exponentiel pour décrire l'abattement sans activation UVA conduit à un intervalle relativement large sur la constante de temps du phénomène. Ceci peut s'expliquer par le fait qu'un modèle linéaire eut été amplement suffisant pour les tests blancs, mais on a conservé ce modèle exponentiel, puisqu'en corrigeant les valeurs obtenues lors des tests photocatalytiques ($\%C_0^c$), afin de retrancher les pertes dues à d'autres phénomènes que la décontamination photocatalytique, on obtient alors la même expression que précédemment (Fig. 69):

$$\%C_0^c = \frac{\%C_0^{\text{avec UVA}}}{\%C_0^{\text{sans UVA}}} = e^{\left(\frac{-t}{\tau_{\text{avec UVA}}} + \frac{t}{\tau_{\text{sans UVA}}}\right)}$$

Par contre, on peut observer une excellente adéquation et une précision beaucoup plus importante du modèle dans le cas où le revêtement photocatalytique est activé.

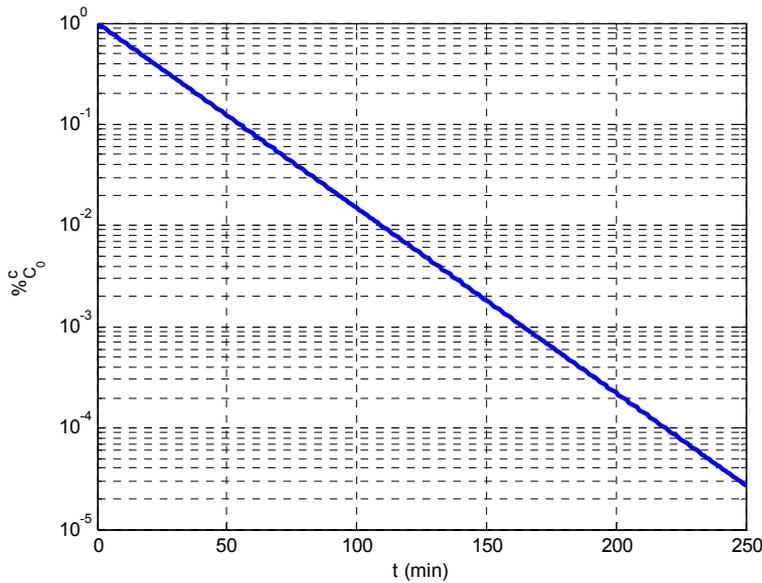


Figure 69. Abattement corrigé avec le réacteur tangentiel en recirculation à $140 \text{ m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$ sur bactériophages T2.

On constate que le temps mis pour obtenir un abattement de 4 log en sortie de réacteur avec les bactériophages est de 225 min, valeur qui peut sembler étonnante puisqu'il est admis que les virus sont plus sensibles à la photocatalyse que les autres microorganismes, mais ces résultats concernent aussi la phase aqueuse. Plusieurs hypothèses peuvent être émises pour expliquer cette observation :

- Des problèmes liés à l'aérodynamique du fait de la petite taille des virus. Ceci peut nuire à leur approche de la surface photoactive et diminuer le temps de contact effectif puisqu'ils sont peut-être réentraînés plus facilement par le flux que des bactéries.
- Une différence de nature chimique des composants de surface entre les bactéries et les virus. Les membranes des premières sont composées d'approximativement 40 %m de lipides et de 60 %m de protéines tandis que les virus nus comme les bactériophages sont principalement entourés de protéines. Cette différence de composition chimique entre ces deux microorganismes peut intervenir au niveau de l'adsorption sur le TiO_2 , et sur le plan de la sensibilité face à l'oxydation. Une affinité plus élevée pour le TiO_2 permet en effet d'augmenter le temps de contact avec la surface photocative, et favorise le transfert de charge et les attaques radicalaires.

Ainsi, nous avons pu dans cette partie faire état des tests réalisés sur trois géométries de réacteurs très variées. En première approximation, un réacteur de type « paillason » de 1,5 m de long, ou un réacteur de « type torsadé » de 2 m de long permettraient d'atteindre une probabilité de survie de 10^{-4} en sortie de réacteur (*L.pneumophila*, $5 \text{ m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$), et ce, pour un coût d'utilisation modique.

Les tests en recirculation du réacteur « tangentiel » ont montré que la durée de traitement nécessaire pour obtenir un abattement dépend fortement du microorganisme étudié. En effet, si 150 minutes suffisent en théorie à passer sous la limite d'une légionelle par m³, il faut 530 minutes pour passer sous ce seuil avec des spores de *B.subtilis* et 225 minutes avec des bactériophages.

Ces valeurs sont particulièrement intéressantes, car on remarque que les virus s'avèrent moins sensibles au procédé de décontamination photocatalytique, alors qu'ils sont généralement plus sensibles aux procédés de décontamination : ne possédant pas de métabolisme lorsqu'ils ne parasitent pas une cellule hôte, la moindre altération d'un élément nécessaire à l'infection suffit à les inactiver. Ceci montre qu'on ne peut pas transposer des résultats obtenus en phase liquide ou en surface à des procédés tributaires de phénomènes aérodynamiques, comme dans le cas du traitement des bioaérosols. Ainsi, il apparaît clairement qu'il ne suffit pas de valider un dispositif sur un microorganisme résistant et d'en déduire qu'il est au moins aussi efficace sur des organismes plus fragiles dans d'autres situations.

Les résultats obtenus avec les différents réacteurs sont tout à fait encourageants et justifient l'intérêt porté au développement et à l'optimisation des photoréacteurs ! Cependant, il nous a semblé important de pouvoir apporter un autre type de solution au problème de « pollution biologique aéroportée », en développant un média photocatalytique tridimensionnel permettant de s'adapter à un très grand nombre de situations et de géométries.

V RÉSULTATS SUR LE MÉDIA PHOTOCATALYTIQUE TRIDIMENSIONNEL

Il est très vite apparu lors de la fabrication des différents réacteurs présentés précédemment que l'une des clefs dans l'amélioration des photoréacteurs destinés à des applications de décontamination de l'air au niveau biologique consistait à utiliser au mieux l'ensemble du volume irradié, et ce, même au prix d'une diminution éventuelle de l'efficacité par unité de surface ou de masse. En effet, beaucoup de réacteurs photocatalytiques développés consiste en une mise en parallèle de réacteurs annulaires ou tubulaires, qui permettent certes le traitement de débits plus élevés, mais au prix d'une quantité importante d'énergie qui n'est pas utilisée de manière optimale (Birnie, Riffat *et al.* 2006). Ce type de réacteur est plus adapté à des études en laboratoire puisqu'il permet du fait de sa simplicité de mener des études mécanistiques et cinématiques. Cependant, son efficacité est rapidement limitée avec le débit par des problèmes de transfert de matière (Chen, Li *et al.* 2001).

Pour répondre à ce challenge, Marinangeli et Ollis ont proposé dès la fin des années 70 l'utilisation de fibres optiques, lesquelles servent à la fois de conducteur de lumière et de support au photocatalyseur (Marinangeli et Ollis 1977; Marinangeli et Ollis 1980; Marinangeli et Ollis 1982). Peill et Hoffmann ont développé, caractérisé et modélisé par la suite un réacteur à fibres optiques fonctionnant en phase aqueuse (Peill et Hoffmann 1995; Peill et Hoffmann 1996; Peill et Hoffmann 1998), qui a pu être adapté au traitement d'effluents gazeux (Choi, Ko *et al.* 2001; Wang et Ku 2003).

Néanmoins, ce type de réacteur est soumis à d'autres problèmes, notamment liés au transfert de matière, du fait des directions opposées entre la diffusion de la matière et la transmission de la lumière. Ceci peut en effet rapidement diminuer l'efficacité globale de tels systèmes si l'épaisseur du revêtement photocatalytique est trop importante (Choi, Ko *et al.* 2001). Il est à noter que ce type de réacteur photocatalytique a aussi été testé positivement sur des bactéries (Choi et Kim 2000) et qu'un nombre croissant de travaux dénote de l'intérêt porté aux

réacteurs utilisant des fibres optiques (Lin et Valsaraj 2005; Hongfei Lin 2006; Danion, Disdier *et al.* 2007).

Il existe d'autres approches pour utiliser au mieux le volume d'un réacteur, comme la fabrication de garnissages monolithiques structurés, dont la géométrie est optimisée pour développer une grande surface photoactive, tout en minimisant les effets d'ombrage (Fig. 70) (Sauer et Ollis 1994; Du, Carneiro. *et al.* 2007; Furman, Corbel *et al.* 2007).

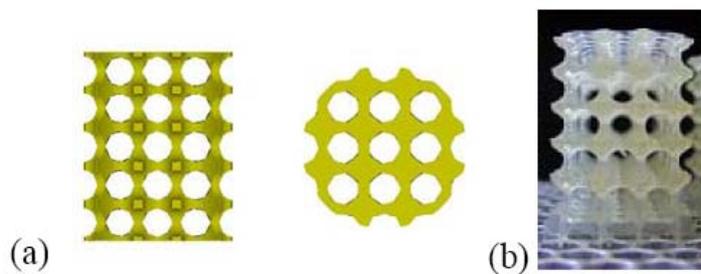


Figure 70. Exemple de monolithes photocatalytiques (25 mm x 21 mm) réalisés par stéréolithographie. (a) vues schématiques de face et de dessus. (b) cliché photographique (Furman, Corbel *et al.* 2007).

Cependant, la transmission de la lumière à travers ces monolithes reste souvent le facteur limitant à leurs efficacités, si bien que des réacteurs alliant les avantages des fibres optiques et des monolithes ont été mis au point au cours de ces dernières années (Sauer et Ollis 1994; Lin et Valsaraj 2005). Ces monolithes sont composés d'une multitude de canaux, à l'intérieur desquels passent une ou plusieurs fibres optiques. L'intérieur des canaux est muni d'un revêtement photocatalytique permettant d'utiliser les photons diffusant vers l'extérieur des fibres optiques, elles-mêmes recouvertes d'un film très fin de photocatalyseur afin de ne pas entraver le transfert de matière. Cette combinaison fibres optiques/monolithe permet donc d'utiliser au mieux l'énergie lumineuse, et semble vouée à un avenir très prometteur. Néanmoins, elle nécessite l'emploi de techniques de précision puisqu'il est primordial de pouvoir contrôler l'épaisseur du dépôt de photocatalyseur sur les fibres, faute de quoi, l'efficacité globale de tels systèmes s'en trouverait immédiatement affectée et en outre, l'usinage des monolithes doit être réalisé avec la plus grande justesse. De plus, certaines limitations existent au niveau du dimensionnement du fait de la transmission moins efficace des longueurs d'onde courtes à travers les fibres optiques.

De ce fait, une autre possibilité pour utiliser le volume du réacteur consiste à utiliser un média tridimensionnel non organisé. Il est évident que ceci se fait au prix d'une perte plus rapide de la transmission lumineuse à travers le matériau avec l'épaisseur traversée, ce qui impose aussi certaines contraintes dimensionnelles. Des substrats fibreux variés ont été utilisés, principalement le verre pour des raisons évidentes de résistance à la photocatalyse (Pichat, Disdier *et al.* 2000; Esterkin, Negro *et al.* 2002), mais aussi l'aluminium (Luo, Miao *et al.*

2008) ou synthétiques (Zhang, Wang *et al.* 2008). Nous allons présenter succinctement deux substrats commerciaux basés sur ce principe de fibres non organisées :

- Le média Ahlstrom™, composé de fibres de cellulose non tissées, sur lesquelles est déposé du TiO₂ maintenu par un liant inorganique, résistant aux UV et à la photocatalyse, et transmettant les UVA. Différentes variantes existent, le liant pouvant incorporer un adsorbant (par exemple de la zéolite), ou une couche d'adsorbant, tel que le charbon actif pouvant être inséré entre des couches de fibres. Dans les deux cas, l'adsorbant permet de faire face à des pics de pollution en stockant les polluants, puis en les relarguant progressivement pour qu'ils soient dégradés par photocatalyse (Fig. 71).
- Le substrat Quartzel®, de Saint-Gobain, composé de fibre de silice très pure, qui présente l'avantage de ne provoquer que peu de pertes de charge (≈ 100 Pa à 2 m/s pour une épaisseur de l'ordre du cm), tout en permettant une très bonne transmission de la lumière (Fig. 72). Ce média possède l'avantage de pouvoir être utilisé en flux traversant.

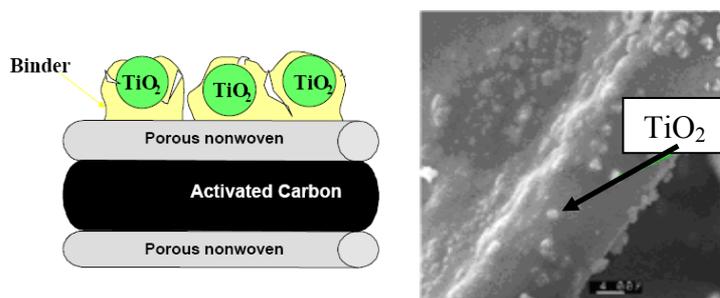


Figure 71. (g.) Exemple de média Ahlstrom. (d.) vue au MEB d'une fibre de cellulose recouvert de grains de TiO₂ du média Ahlstrom. Données Ahlstrom.

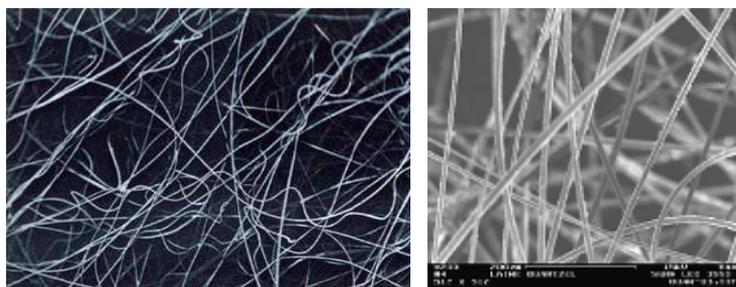


Figure 72. (g. et d.) Clichés MEB des fibres de silice composant le média Quartzel®.

Ces deux médias photocatalytiques ont été testés positivement pour la dégradation de nombreux polluants, ainsi que pour la décontamination bactérienne, mais ils souffrent tout de même de quelques limitations pour des applications biologiques. En effet, le média Ahlstrom ne permet pas d'utiliser un flux traversant ce support photocatalytique. Ainsi, il est nécessaire que les bactéries s'impactent sur ce média, ce qui devient de moins en moins probable à haut

débit puisque seule une disposition sous forme tubulaire ou plane est possible, les réacteurs fonctionnant alors plutôt en mode de « lit léchant ». Le Quartzel® possède aussi quelques limitations similaires, puisque bien que les pertes de charge soient minimales pour une faible épaisseur traversée, elles deviennent plus sensibles pour des longueurs plus importantes. De plus, bien que transmettant efficacement la lumière à l'intérieur du milieu fibreux, les dimensions d'un réacteur rempli avec ce média photocatalytique restent limitées, ce qui impose certaines contraintes sur le débit.

Ainsi, nous avons voulu développer un média original, qui se place à l'échelle intermédiaire entre une surface plane et un volume densément occupé (Quartzel® ou média Ahlstrom). Pour ce faire, nous nous sommes inspirés de travaux utilisant des mousses alvéolaires de carbure de silicium (SiC) comme support de catalyseur (Lacroix, Nguyen *et al.* 2007). Les pertes de charge générées par ce type de support sont minimales, et ces structures alvéolaires permettent de développer une surface géométrique importante, tout en améliorant le mélangeage du flux. Ces mousses de β -SiC alvéolaires sont obtenues à partir de mousses de polyuréthane (PU), selon une méthode dérivée de la synthèse à mémoire de forme (Shape Memory Synthesis, SMS) développée au laboratoire (Ledoux et Pham-Huu 2001).

Dans cette synthèse, la mousse de PU est imprégnée avec une résine phénolique et de la poudre de silicium micronisée. Après infiltrations, polymérisation et carbonisation, un traitement thermique à des températures supérieures à 1200 °C conduit à la carburation finale en β -SiC, tout en conservant la structure de type mousse alvéolaire tridimensionnelle.

Afin d'éviter l'emploi de résine polyphénolique et de supprimer le traitement thermique final, long et à haute température, notre attention s'est portée tout naturellement sur les mousses de PU, précurseurs des mousses de β -SiC. En effet, du fait des conditions particulièrement douces du procédé de traitement de l'air, il est superflu d'utiliser un matériau comme le SiC.

Il nous a donc semblé primordial de commencer par caractériser indépendamment la mousse de PU destinée à supporter le photocatalyseur avant d'envisager d'optimiser un réacteur garni de ce média. En effet, la préparation d'un réacteur, la mise en place des expériences et l'exploitation des résultats étant particulièrement longues et fastidieuses, un développement par « essais/erreurs » était complètement exclu.

Nous allons donc premièrement présenter les caractérisations du média tridimensionnel qui nous ont permis de réaliser directement des réacteurs fonctionnels en l'adaptant aux

contraintes « photocatalytiques », puis les résultats de décontamination obtenus avec différents microorganismes.

I CARACTÉRISATION DU SUPPORT TRIDIMENSIONNEL

Afin de réaliser rapidement des réacteurs fonctionnels, nous nous sommes préalablement intéressés aux paramètres suivants qui caractérisent le support tridimensionnel, et *in fine*, le média photocatalytique :

- La transmission de la lumière
- La surface géométrique de la mousse
- L'effet de « mélangeur statique » de la mousse
- La protection de la mousse face à l'oxydation
- Les pertes de charge
- Le choix du photocatalyseur

Ces différentes caractéristiques nous permettront d'apprécier l'utilisation potentielle de ces mousses alvéolaires de polyuréthane (PU) pour réaliser un média photocatalytique tridimensionnel (Fig. 73).

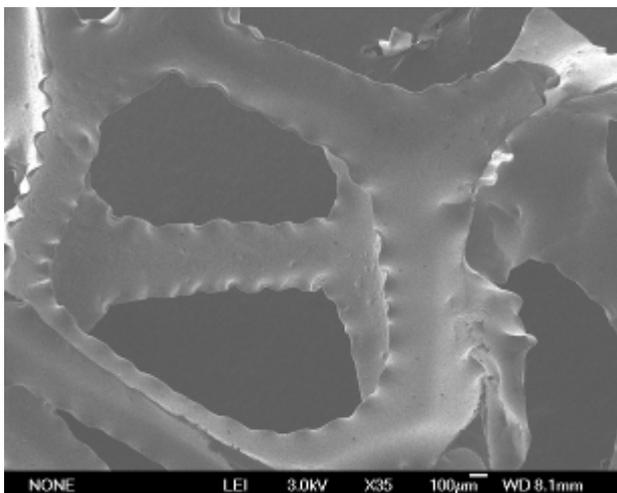


Figure 73. Cliché MEB d'un alvéole de mousse de PU (Bulpren, $\geq 4800 \mu\text{m}$).

I 1 Mesure de la transmission de la lumière

Un des désavantages de l'utilisation de supports tridimensionnels en photocatalyse est le masquage d'une partie du flux lumineux. Cette limitation peut néanmoins être surmontée en jouant sur la taille des alvéoles de la mousse de PU. Ainsi, le succès de l'utilisation des potentialités des mousses comme médias ou garnissages photocatalytiques réside dans l'optimum de la taille des alvéoles, compromis entre une taille suffisamment importante pour laisser passer un maximum de lumière et ne pas induire de pertes de charge trop élevées et une taille suffisamment petite pour créer beaucoup de turbulences et assurer un bon mélangeage afin d'améliorer le contact entre le flux contaminé et la surface active.

Afin de pouvoir dimensionner le réacteur garni par le média photocatalytique tridimensionnel sur des microorganismes, il est nécessaire d'étudier au préalable la transmission de la lumière à travers le matériau tridimensionnel. En effet, un diamètre de réacteur trop élevé se solderait par de trop nombreuses zones sous illuminées représentant autant de passages où l'air ne serait pas décontaminé, ce qui limiterait bien évidemment l'efficacité du système. À l'inverse, un diamètre peu élevé diminuerait le temps de passage dans le réacteur ce qui est préjudiciable au procédé de décontamination.

Afin de réaliser les mesures de transmission de la lumière à travers la mousse alvéolaire, nous avons quantifié l'irradiance lumineuse en fonction à la fois de la taille des alvéoles et de l'épaisseur de mousse traversée. Ceci est réalisé à l'aide d'une photodiode qui convertit l'énergie lumineuse en intensité électrique. Du fait de la variation de la réponse en intensité de la photodiode avec la longueur d'onde, il a fallu travailler avec une source quasi monochromatique suffisamment puissante (Philipps Lumileds, LUXEON III, bleu royal 455 nm, 1W électrique, angle solide d'illumination 110°). Les tailles des alvéoles des mousses de PU testées (Bulpren S28190 taille des alvéoles : 1650 μm – 2150 μm soit 1900 μm de moyenne; Bulpren S32720 ≥ 4800 μm) sont d'un ordre de grandeur proche de la surface du photodétecteur (1cm²). Ainsi, il est nécessaire de réaliser de nombreuses mesures de transmission à travers la mousse puisque celles-ci dépendent considérablement de la position de la mousse de PU par rapport à la source de lumière quasi ponctuelle. Ceci est possible en mettant en rotation rapide les disques de mousses entre la diode électroluminescente et le photodétecteur et en réalisant une moyenne dans le temps (sur 15 s) de l'intensité électrique photogénérée (Fig. 74).

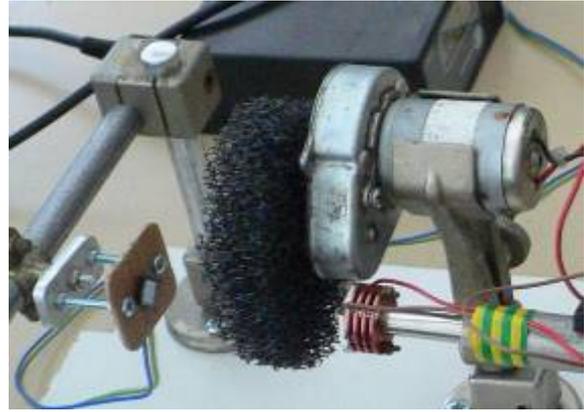
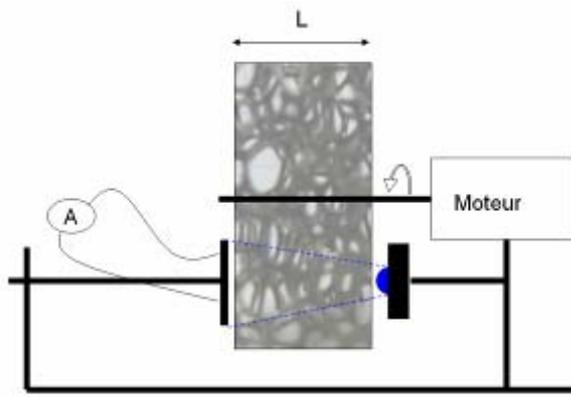


Figure 74. (g.) Schéma du banc de mesure de la transmission de la lumière d'une diode quasi monochromatique à travers une épaisseur L de mousse mise en rotation à l'aide d'un moteur. (d.) Vue du montage avec la photodiode (Hamamatsu Photonics, Référence S1337-1010BR).

Les mesures de transmission de la lumière $T(L)$ à travers une épaisseur L de mousse ont été réalisées pour deux mousses de tailles d'alvéoles différentes ($1900 \mu\text{m}$ et $\geq 4800 \mu\text{m}$). Du fait de la relation linéaire entre l'énergie lumineuse reçue par le photodétecteur et l'intensité électrique photogénérée à une longueur d'onde donnée (Photosensitivité $k_{\lambda=455\text{nm}} = 0,225 \text{ A/W}$), on obtient une expression de la transmission $T(L)$ directement reliée à la mesure du courant photogénéré :

$$T(L) = \frac{I_{\lambda}(L)}{I_{\lambda}(0)}$$

$$I(L) = k_{\lambda} \times I_{\lambda}$$

D'où :

$$T(L) = \frac{I(L)}{I(0)}$$

Avec $I_{\lambda}(L)$ énergie lumineuse transmise après la traversée d'une épaisseur L de mousse (W) à la longueur d'onde λ , $I(L)$ intensité électrique photogénérée par la photodiode (A) après la traversée d'une épaisseur L de mousse de PU entre le photodétecteur et la source.

Les deux types de matériaux présentent des transmissions moyennes qui suivent une loi de type « exponentielle décroissante » en fonction de la distance à la source L , soit $T\%m = e^{-k.L}$ (Fig. 75). On obtient par minimisation de la somme des carrés des différences les paramètres $k_1 = 3,46 \text{ cm}^{-1} \pm 0,26$ ($IC_{95\%}$) pour la mousse de PU S28190 ($1900 \mu\text{m}$) et $k_2 = 1,0 \text{ cm}^{-1} \pm 0,05$ ($IC_{95\%}$) pour la mousse de PU S32720 ($\geq 4800 \mu\text{m}$).

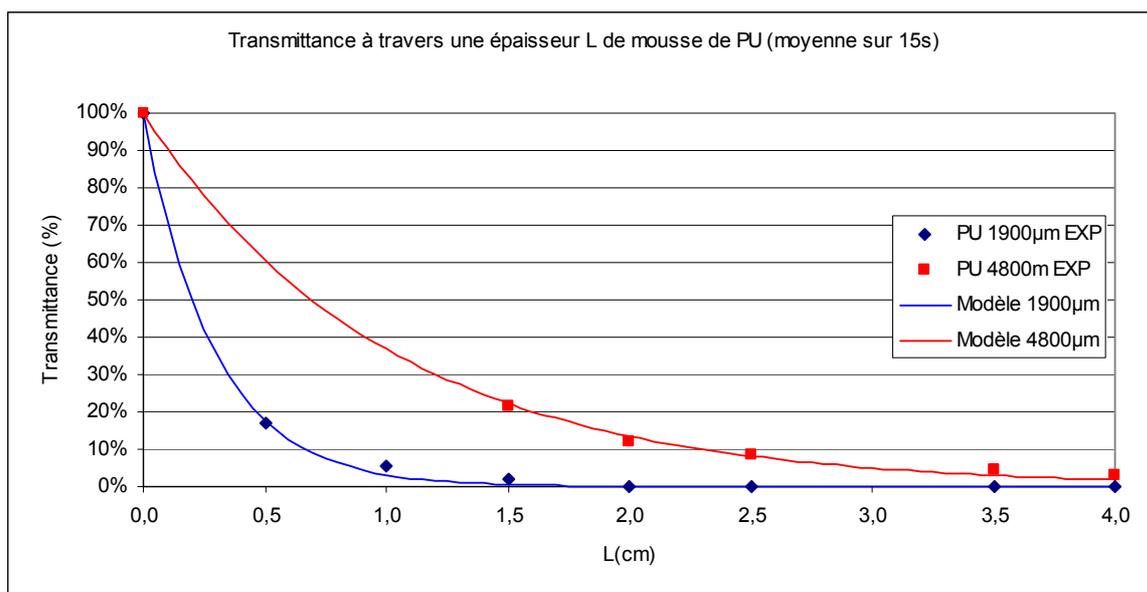


Figure 75. Transmissions (moyennes sur 15s) à travers deux mousses (tailles des alvéoles : 1900 μm et $\geq 4800 \mu\text{m}$) et modèles en décroissance exponentielle associés ($T(L)\% = e^{-k \cdot L}$, constantes $k_1 = 3,46 \pm 0,26$ et $k_2 = 1,0 \pm 0,05$). Résultats chiffrés en annexe I (Tab. 36)

De façon logique, la mousse de PU S32720 ($\geq 4800 \mu\text{m}$) autorise une bien meilleure transmission de la lumière que la mousse de PU S28190 (1900 μm) (Fig. 75). C'est donc ce type de mousse qui a été retenu pour servir de support au TiO_2 puisqu'il permet encore d'obtenir après une traversée de 2,5 cm de mousse, une transmission moyenne de l'ordre de 10 %, valeur atteinte dès 0,75 cm avec la mousse la plus dense.

Ainsi, et de manière somme toute arbitraire, nous nous sommes fixé comme limite basse de l'illumination au niveau des parois du réacteur la valeur de 10 % de transmission (soit la valeur obtenue après la traversée de 2,5 cm de mousse), ce qui permet de concevoir un réacteur de 7cm de diamètre (diamètre de la lampe # 18 mm + 25 mm en périphérie). Ceci permet d'obtenir une vitesse linéaire dans le réacteur de 0,36 m/s et un temps de passage de l'ordre de 1,5 s pour un débit nominal de $5 \text{ m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$, pour un réacteur tubulaire de 26 cm de long et de 36 cm^2 de section passante.

Cependant, afin d'améliorer l'illumination et favoriser le passage du flux à dans les zones les plus éclairées, une configuration composée de 13 cylindres de mousse, alternativement de 7 cm de diamètre et de 2 cm d'épaisseur, a été imaginée. Les cylindres sont évidés au centre, soit d'un cylindre de 2 cm, soit d'un de 3,4 cm, afin de former des anneaux. Cette configuration a été préférée à une géométrie où le réacteur serait intégralement garni de

mousse puisqu'elle permet de favoriser le passage du flux vers les zones plus éclairées, c'est-à-dire vers la lampe (Fig. 76).

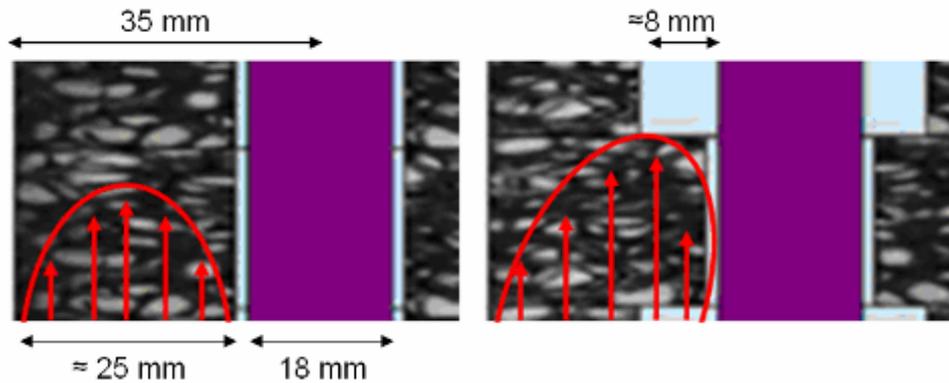


Figure 76. Vue schématique des profils de vitesse à l'intérieur d'un réacteur rempli de mousse de PU (g.) et d'un réacteur présentant des zones évidées près de la lampe (d.). Grâce à cette asymétrie, une plus grande partie du flux passe dans les zones les plus éclairées.

I 2 Mesures de la surface géométrique des mousses de PU

La détermination de la surface macroscopique des mousses de PU est une donnée essentielle puisqu'elle permet d'estimer la densité de photocatalyseur dans le réacteur et permet d'apprécier le gain de surface offert par le média tridimensionnel.

En considérant un cylindre de mousse de PU de hauteur L , on définit pour toute abscisse z (Fig. 77) :

- $P(z)$, périmètre total des intersections des ponts de la mousse de PU avec le plan d'équation $Z=z$
- $A(z)$, aire totale des intersections des ponts de la mousse de PU avec le plan d'équation $Z=z$

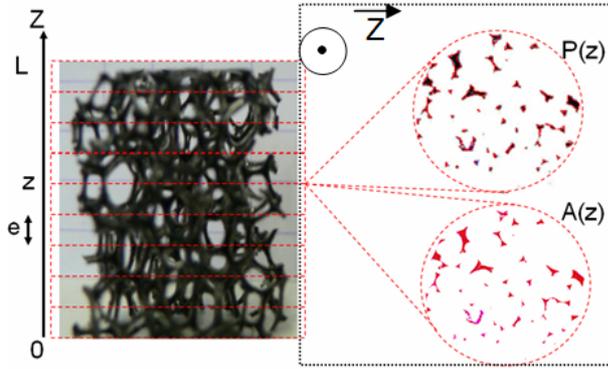


Figure 77. Vue de dessus de l'intersection du cylindre de contrôle de hauteur L et du plan normal à l'abscisse z .

(h.à.d) En rouge : périmètres des intersections.
(b.à.d) En rouge : aires des intersections.

Ainsi, la surface géométrique S de la mousse de PU et son volume V s'écrivent de façon rigoureuse :

$$S = \int_0^L P(z).dz \quad V = \int_0^L A(z).dz$$

Ou encore :

$$S = L \times \left(\frac{1}{L} \int_0^L P(z).dz \right) = L \times P_r \quad V = L \times \left(\frac{1}{L} \int_0^L A(z).dz \right) = L \times A_r$$

Avec P_r et A_r , valeurs moyennes réelles du périmètre et de l'aire de l'intersection du plan ($Z=z$) et de la mousse de PU contenue dans le cylindre de contrôle pour z variant de 0 à L . Ces deux valeurs peuvent être exprimées, en considérant une division du cylindre de contrôle en n tranches d'épaisseur égale comme suit :

$$P_r = \lim_{n \rightarrow \infty} \frac{1}{n} \sum_{k=0}^n P\left(k \frac{L}{n}\right) \quad A_r = \lim_{n \rightarrow \infty} \frac{1}{n} \sum_{k=0}^n A\left(k \frac{L}{n}\right)$$

Ainsi, la mesure de l'aire et du périmètre de N tranches (N étant un nombre fini) du cylindre de contrôle permet d'obtenir une estimation de P_r et de A_r et donc de la surface et du volume de la mousse de PU par unité de volume. Elle sera évidemment d'autant plus précise que N est grand.

Pour réaliser ces observations, un cylindre de 18 mm de diamètre et de 20 mm de hauteur a été découpé dans un bloc de mousse de PU ($\geq 4800 \mu\text{m}$) à l'aide d'un emporte-pièce. Il a ensuite été inclus dans du silicone blanc (rendu plus fluide grâce à l'ajout d'huile de silicone) injecté depuis le centre du cylindre à l'aide d'une seringue. L'ensemble est maintenu en place à l'intérieur du corps d'un tube en plastique. Après deux semaines de polymérisation à

température ambiante, l'inclusion est délicatement poussée hors du tube et découpée en tranche de 1mm d'épaisseur à l'aide d'une lame de rasoir (Fig. 78).



Figure 78. Coupes de mousse de PU incluses dans du silicone.

Les coupes sont photographiées au microscope au grossissement x10 (1 pixel sur l'image à ce grossissement = 0,0423 mm). Comme il est difficile d'éviter la formation de bulles pendant l'inclusion, celles-ci sont retouchées sur l'image (Fig. 79). Le contraste est ensuite augmenté au maximum de sorte que l'on élimine les ombres qui pourraient être considérées comme du PU. C'est ensuite un programme développé sur Matlab 7.0 qui va déterminer l'aire et le périmètre des ponts sectionnés de la mousse de polyuréthane (Fig. 80).



Figure 79. (g.) Coupe de l'inclusion de mousse de PU dans du silicone, magnifiée 10x. (m.) Les bulles sont retouchées et le contraste augmenté (d.). On obtient alors une image en noir et blanc sur laquelle les mesures d'aires et de périmètres peuvent être réalisées.

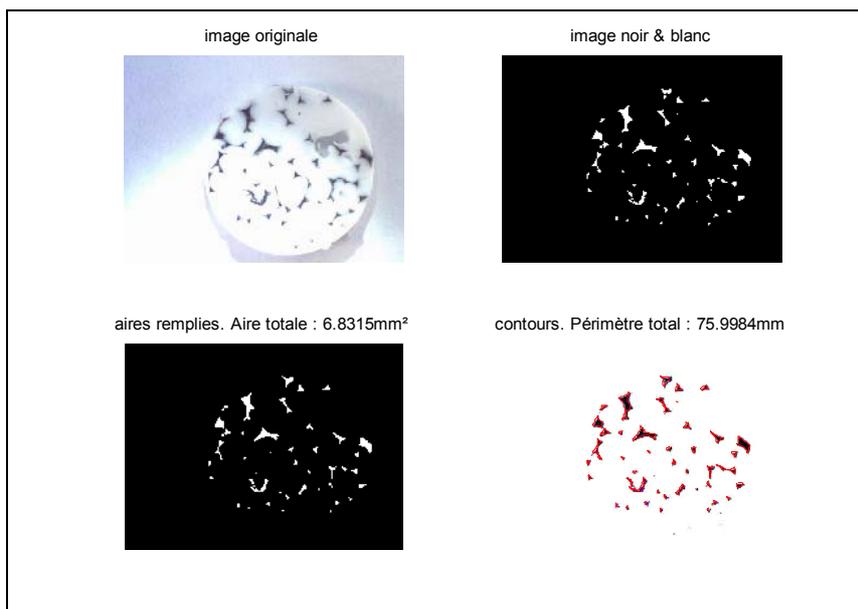


Figure 80. Traitement des coupes de mousse de PU par Matlab®. (h.à.g), image originale de la coupe de PU. (h.à.d.), image retouchée (remplissage des bulles) et inversée (noir→blanc et blanc→noir). (b.à.g.), image où les aires sont remplies, i.e. les pixels « isolés » sont effacés. (b.à.d.), Détermination des contours et mesure des périmètres. (NB : Les valeurs sont données abusivement avec 6 chiffres significatifs uniquement pour éviter d'amplifier les erreurs d'arrondi ultérieurement).

Les résultats présentés dans le tableau 18 sont ceux obtenus par l'observation de N=17 échantillons de 2,54 cm². Le traitement statistique des données est réalisé à l'aide du logiciel JMPin 4.0.2.

	aire (mm ²)	périmètre (mm)
	6,83	76,00
	8,94	80,80
	7,14	69,96
	8,75	85,99
	8,57	83,86
	7,68	79,48
	8,28	85,03
	8,11	84,08
	6,71	76,40
	6,36	66,39
	6,99	73,63
	9,08	86,46
	6,80	74,53
	9,29	91,76
	8,74	86,91
	7,09	79,56
	6,49	72,61
Moyenne	7,76	79,61
Déviatoin standard	1,01	6,89
IC _{95%} borne supérieure	8,28	83,16
IC _{95%} borne inférieure	7,24	76,07
Nombre d'observations	17	17

aire (mm ²)	périmètre (mm)
9,5	95
9	90
8,5	85
8	80
7,5	75
7	70
6,5	65
6	

Tableau 18. (g.) Résultats des mesures d'aires et de périmètres des inclusions de mousse de PU et (d.) distributions associées (section : 2,54 cm²). (IC_{95%}: intervalle de confiance à 95 %).

La section du cylindre de contrôle étant de 2,54 cm², on obtient respectivement pour le périmètre P_r et l'aire A_r des sections des ponts (pour une section de mousse 1cm²) :

$$P_r = 31,3 \text{ mm} \pm 1,4 \text{ mm} (IC_{95\%}) \quad A_r = 3,1 \text{ mm}^2 \pm 0,0(2) \text{ mm}^2 (IC_{95\%})$$

($IC_{95\%}$: intervalle de confiance à 95 %).

Ainsi, on obtient pour 1cm³ de mousse une surface géométrique et un volume de matière dense de PU (volume minimal qu'aurait l'échantillon en étant compressé) :

$$S = 3,1 \text{ cm}^2 \pm 0,1 \text{ cm}^2 (IC_{95\%}) \quad V = 0,031 \text{ cm}^3 \pm 0,0002 \text{ cm}^3 (IC_{95\%})$$

Notons que l'on obtient grâce à cette valeur du volume occupé par le PU une porosité de 97 %, valeur qui est en accord avec les 95 % obtenus en mesurant la quantité d'eau déversée en plongeant dans un récipient rempli à ras bord un échantillon de PU de volume total connu (expérience non présentée).

Ainsi, pour les réacteurs présentés sur la figure 34 (Chp. II § II 4), on obtient en comparaison avec un réacteur tubulaire de 7 cm de diamètre et 26 cm de long (volume= 1000 cm³ ; surface = 572 cm²) :

- **Réacteur intégralement rempli** : 2850 cm² de surface géométrique sur la mousse (volume du tube – volume des cylindres internes évidés pour le passage de la lampe = 919 cm³ de la mousse, à raison de 3,1cm² pour 1 cm³) + 572 cm² de surface pour la paroi, soit une surface géométrique totale d'environ 3400 cm², correspondant à un **gain de près de 500 % en surface par rapport au réacteur tubulaire !**
- **Réacteur avec alternance de cylindres** : 2629 cm² de surface géométrique sur la mousse (volume du tube – volume des cylindres internes évidés pour le passage de la lampe = 848 cm³ de la mousse, à raison de 3,1cm² pour 1 cm³) + 572 cm de surface pour la paroi, soit une surface géométrique totale d'environ 3200 cm², correspondant à un **gain de près de 460 % en surface par rapport au réacteur tubulaire.**

Il est évident que ce gain de surface géométrique ne représente pas un gain équivalent de surface active puisqu'il existe de nombreuses zones non éclairées dans le réacteur et que la transmission de la lumière à travers la mousse alvéolaire ne se fait pas sans déperdition. Néanmoins, même si seulement une fraction de cette surface est activée, l'augmentation de la tortuosité dans le réacteur ainsi que celle des turbulences se traduit par un gain d'efficacité considérable comme nous le montrerons lors des tests de décontamination.

Le paragraphe suivant va permettre de visualiser l'apport du support tridimensionnel dans l'amélioration du mélangeage du fait de l'effet de « mélangeur statique » de la mousse.

I 3 Visualisations de l'effet de « mélangeur statique » de la mousse de PU

L'un des principaux intérêts d'une structure alvéolaire de mousse comme support photocatalytique est d'assurer un meilleur mélangeage du flux porteur, d'augmenter le parcours dans le réacteur et ainsi d'accroître les probabilités de rencontre microorganisme/photocatalyseur.

Les effets d'un garnissage tridimensionnel sur le mélangeage peuvent être visualisés facilement en milieu liquide en observant et en comparant l'écoulement d'un colorant (rouge amarante) injecté doucement à l'aide d'une seringue ou d'une pompe péristaltique au centre d'un tube en verre droit, muni ou non de mousse. Bien que cette visualisation s'applique à de la phase liquide, elle peut permettre d'apprécier dans des réacteurs complexes la qualité du mélange due à la présence de mousse au fur et à mesure de la traversée du réacteur.

Les écoulements sont caractérisés par le nombre adimensionnel de Reynolds Re qui caractérise le régime de turbulence :

$$Re = \frac{\rho \cdot v \cdot L}{\eta} = \frac{v \cdot L}{\nu}$$

Avec ρ , la masse volumique du fluide ($\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$), v , la vitesse linéaire de l'écoulement ($\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$), L , la longueur caractéristique de l'écoulement (dans ce cas le diamètre) (m), η , la viscosité dynamique du fluide ($\text{kg}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-1}$) et ν , la viscosité cinématique du fluide ($\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$).

Il est nécessaire de se placer en régime laminaire ($Re \ll 1000$) afin de pouvoir observer l'effet de mélangeur statique de la mousse bien que ce régime d'écoulement ne soit pas celui des flux traités.

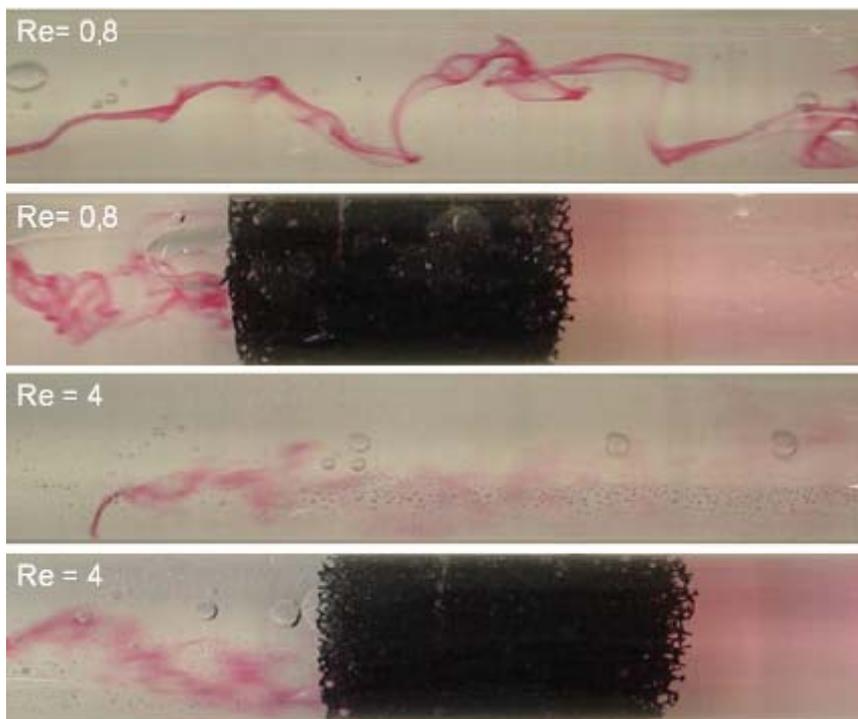


Figure 81. Exemple de la visualisation d'écoulements en régime laminaire dans une conduite de 4cm de diamètre munie ou non d'un garnissage en mousse de PU ($\geq 4800 \mu\text{m}$) de 6 cm de longueur. Les deux régimes laminaires visualisés correspondent à des nombres de Reynolds de 0,8 et 4.

On observe très clairement sur la figure 81 l'apport de la mousse de PU au niveau du mélangeage par rapport à un écoulement équivalent en fût vide et ce, même après un passage à travers une faible épaisseur de mousse de PU (Fig. 82).

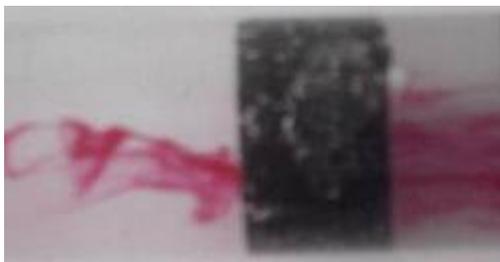


Figure 82. Visualisation d'un écoulement à $Re=0,35$ après la traversée d'une épaisseur de mousse de PU de 2 cm ($\geq 4800 \mu\text{m}$).

Ainsi, même dans des écoulements peu propices à un bon mélangeage, que ce soit du fait d'une faible vitesse du fluide, ou d'une inertie trop importante des microorganismes qui réduit les changements de trajectoires (les microorganismes étant beaucoup plus massifs que des molécules), on peut obtenir un brassage efficace à l'intérieur du réacteur au moyen de mélangeurs statiques comme la mousse de PU et ainsi augmenter considérablement l'efficacité par unité de volume de réacteur.

I 4 Estimations de l'effet protecteur de la couche de polysiloxane sur la mousse de PU

Le PU étant un polymère organique (formé par la polycondensation de diols et de diisocyanates (Fig. 83)), il est potentiellement oxydable par photocatalyse. De ce fait, il est risqué de l'utiliser tel quel comme substrat photocatalytique et il faut donc créer une barrière entre le TiO₂ et le PU. Le choix s'est tourné vers le « Sivo 110 »TM (Dynasytan, Evonik, voir annexe pour les propriétés physico-chimiques) qui forme, après polymérisation, un film de polysiloxane. Ce type de composé a été récemment utilisé pour d'autres applications photocatalytiques (Paschoalino, Kiwi *et al.* 2006; Novotna, Zita *et al.* 2008) puisqu'il est au plus oxydable sous la forme de silice tridimensionnelle SiO₂, qui ne craint pas d'être attaquée par photocatalyse. Notons qu'en plus d'une fonction protectrice, ce film peut servir de liant afin de pouvoir fixer les grains de photocatalyseurs sur différents types de substrats.

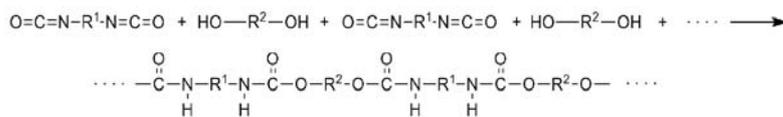


Figure 83. Synthèse d'un polyuréthane par polycondensation

Le Sivo 110TM est composé de nanoparticules de SiO₂ en suspension dans une solution colloïdale de composés comportant des fonctions silanols (Si-OH), qui le rendent particulièrement stable en phase aqueuse (Birchall, Carey *et al.* 1977), et des fonctions époxy dont la nature n'est pas mentionnée par le fabricant. La condensation des fonctions silanols permet de former un film dense de polysiloxane (Fig. 84) alors que la condensation de ces fonctions avec des hydroxyles de surface de matériaux inorganiques (TiO₂ par exemple) permet de lier chimiquement le film à ce substrat, assurant ainsi une excellente tenue mécanique. La liaison du film de polysiloxane au substrat organique de PU se fait par interaction ou réaction des groupements époxy avec ce dernier (Fig. 85).

Afin de protéger au mieux la mousse de PU, il a semblé nécessaire de réaliser plusieurs films de polysiloxane de sorte qu'une éventuelle oxydation des groupes organiques du film en contact avec le TiO₂ n'endommage pas la tenue de la couche protectrice sur le substrat organique, ou que la présence d'éventuelles craquelures ne conduise pas à mettre en contact le TiO₂ déposé et la mousse.

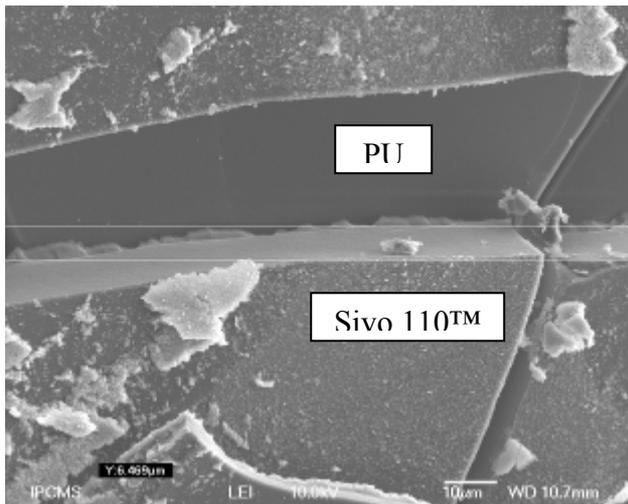


Figure 84. Film de Sivo 110™ polymérisé sur substrat en mousse de PU. On peut observer grâce à la craquelure l'épaisseur de cette triple couche ($\approx 5 \mu\text{m}$).

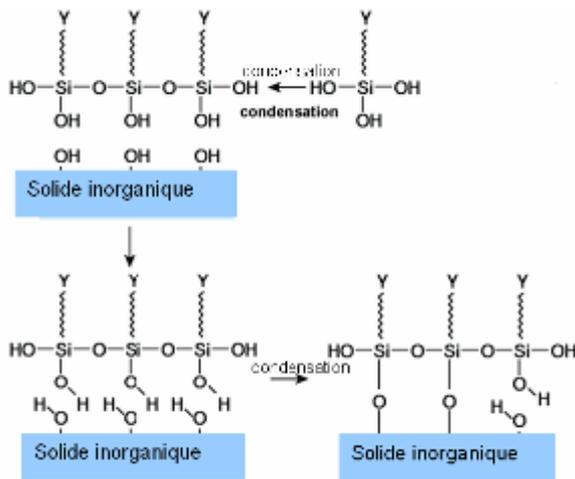


Figure 85. Schéma réactif de formation du film de polysiloxane et de sa liaison à un solide inorganique présentant des groupes hydroxyles en surface par condensation. Les groupements organiques Y (époxy dans le cas du Sivo 110™) permettent la fixation du film à un support organique (le PU dans notre cas).

Afin de mesurer l'effet de barrière diffusionnelle du polysiloxane, on a utilisé la propriété de certains solvants comme le TetraHydroFurane (THF) de dilater le PU (Fig. 86). Ainsi, en suivant l'évolution de la taille d'échantillons de PU plongés dans du THF au cours du temps, on peut estimer l'efficacité de la protection apportée, ceci en fonction du nombre de couches de protection.

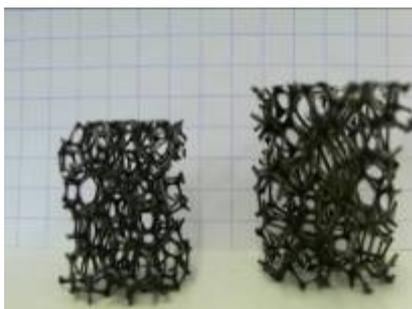


Figure 86. Échantillon de mousse de PU non passivée, avant et après dilatation par le THF (# +15% en taille après évaporation du solvant).

Dans ce but, on prépare 4 échantillons de mousse de PU de dimensions identiques (taille initiale : 17 mm de diamètre x 20 mm de hauteur) en leur faisant subir séparément un traitement protecteur de passivation différent, de sorte que l'on ait respectivement sur les 4 échantillons 0, 1, 2 ou 3 couches de protection de Sivo 110™ (Chp. II § II 4). Ensuite, on photographie toutes les 2 minutes ces échantillons de mousse de PU plongés dans du THF (Fig. 87). L'expansion des échantillons est ensuite suivie par mesure de la taille des mousses sur les clichés ($T_i(t)$ = taille en pixels de l'échantillon recouvert de i films de protection en fonction du temps (Tab. 28, en annexe I. *Résultats chiffrés*).

Afin de comparer plus aisément les tailles des différents échantillons, on introduit la variable adimensionnelle $\Theta_i(t)$ avec $T_{i,max}$ et $T_{i,min}$, correspondant respectivement à la taille maximale et à la taille minimale de l'échantillon i :

$$\Theta_i(t) = 100 \times \frac{T_{i,max} - T_i(t)}{T_{i,max} - T_{i,min}}$$

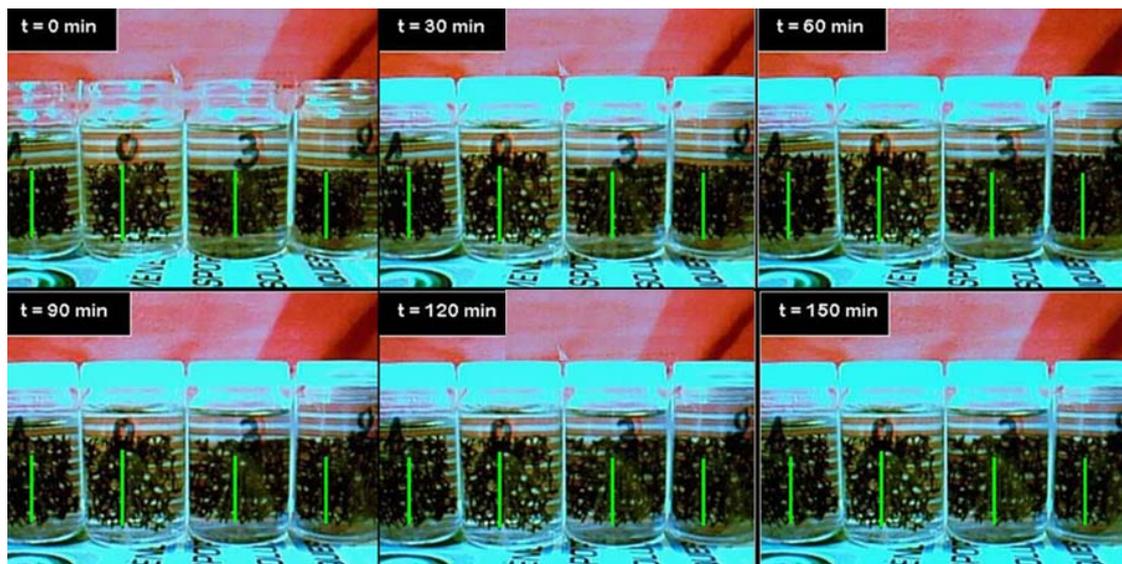


Figure 87. Clichés des échantillons de mousse de PU plongés dans du THF. Chaque échantillon est respectivement recouvert avec 1, 0, 3 et 2 couches de Sivo 110™. La barre verte représente la hauteur à l'instant initial.

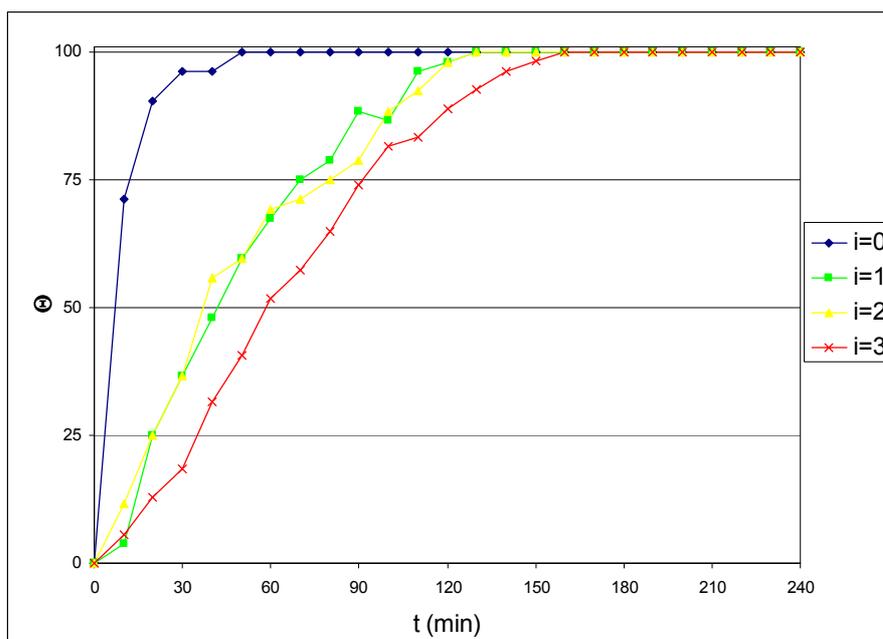


Figure 88. Taille $\phi(t)$ de chaque échantillon plongé dans du THF en fonction du temps (i : nombre de couches protectrices de Sivo 110™). Résultats chiffrés en annexe I (Tab. 28).

On observe que le film de Sivo 110™ crée une barrière diffusionnelle très efficace au THF (Fig. 88). En effet, sans protection, la mousse de PU atteint 50 % de son expansion maximale en seulement 5 min, alors qu'une unique couche de protection permet de retarder ce délai de plus d'une demi-heure. Pour trois couches de protection, ce temps est même supérieur à une heure.

La dilatation exponentielle observée pour une seule couche de protection peut s'expliquer par le fait qu'une couche de Sivo 110™ présente inévitablement des « cassures » (Fig. 89) imputables à l'étape de polymérisation (120 °C), puisque le support plastique a tendance à se dilater avant de se rétracter lors de la phase de refroidissement, créant ainsi des tensions sur le film de polysiloxane fortement lié à la mousse de PU. Le THF imprègne alors lentement le PU à travers ces irrégularités, jusqu'à ce que la tension interne au film rigide de polysiloxane soit telle qu'elle le brise, provoquant alors une diffusion massive du solvant jusqu'au polymère organique et accélérant ainsi le phénomène. L'ajout de couches de passivation supplémentaires permet en fait de « colmater » ces fissures, ce qui explique qu'au-dessus d'une couche il n'y a que peu d'amélioration et que le gain en protection soit alors moindre.

Ainsi, bien qu'une seule couche de passivation de la mousse offre déjà une protection très efficace à la diffusion d'espèces chimiques vers le PU, il nous a paru aussi important d'assurer la stabilité mécanique du garnissage tridimensionnel, en évitant aux fonctions organiques liant le film de Sivo 10™ à la mousse de PU d'une éventuelle oxydation photocatalytique. C'est la raison pour laquelle nous avons convenu de fixer à trois le nombre

de couches de passivation par le Sivo110™ des mousses de PU avant de les utiliser comme support tridimensionnel de photocatalyseur. Il permettra une bonne stabilité mécanique du revêtement, et assurera une protection largement suffisante à l'oxydation photocatalytique du substrat en PU, ainsi qu'à d'éventuels composés agressifs pouvant être présents dans le flux à traiter.

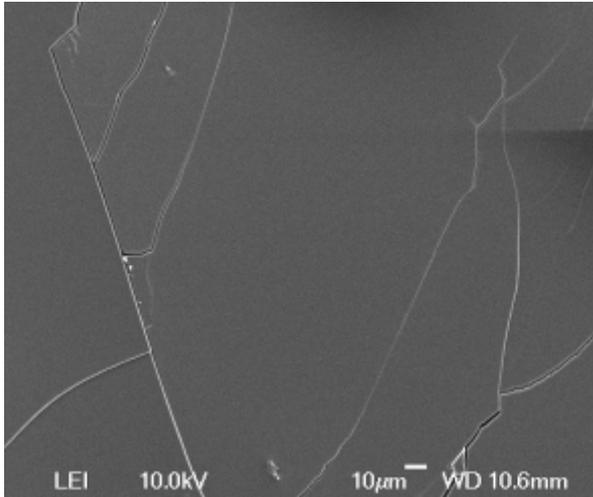


Figure 89. Cliché microscopique (MEB) de la mousse de PU passivée par une couche de Sivo 110™. On observe nettement de fines craquelures dans le film permettant au THF d'atteindre le PU.

I 5 Mesures des pertes de charge de la mousse de PU

Une des contraintes majeures dans le développement d'un média dédié à des applications environnementales, surtout à forts débits, est qu'il ne doit pas provoquer de pertes de charge excessives. En effet, les coûts de fonctionnement de tels systèmes doivent impérativement rester minimales pour pouvoir s'inscrire dans une logique de dépollution.

Les mesures de perte de charge consistent à mesurer à l'aide d'un manomètre, pour différents débits, la différence de pression entre l'amont et l'aval d'un cylindre de mousse de 2,54 cm de diamètre et 8 cm de long (Fig. 90). La vitesse linéaire de l'air passant à travers la mousse est déterminée par un anémomètre (Testo 435-1 ; 0-20 m.s⁻¹) et les pertes de charge sont déterminées par un détecteur de pression différentiel (Keller Druckmesstechnik PD-41 ; 0–200 mbar).

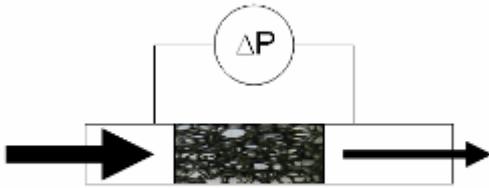


Figure 90. Principe des mesures de perte de charge. Un échantillon de mousse de longueur connue est inséré dans un tube et la mesure différentielle de pression permet de caractériser les pertes à l'écoulement dues à la présence du garnissage.

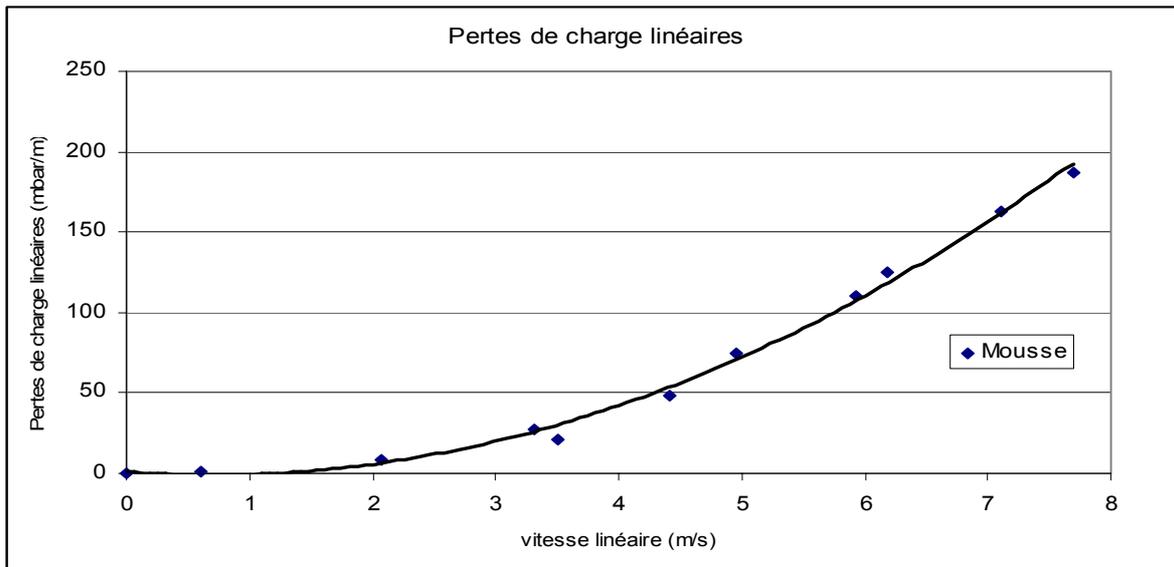


Figure 91. Résultats des mesures de pertes de charge linéaires pour la mousse de PU ($\geq 4800 \mu\text{m}$). Résultats chiffrés en annexe I (Tab. 29).

On constate que même à des vitesses linéaires très importantes, les pertes de charge inhérentes à la présence de mousse de PU restent très limitées. En effet, pour une mousse de PU de tailles d'alvéoles $\geq 4800 \mu\text{m}$, les pertes de charge à $7,7 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$ (soit $14 \text{ m}^3\cdot\text{h}^{-1}$ ou $230 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ passant dans un tube de $2,54 \text{ cm}$ de diamètre) ne sont que de $0,19 \text{ bar}\cdot\text{m}^{-1}$.

Ainsi, au débit de travail de $5 \text{ m}^3\cdot\text{h}^{-1}$ en mode « one pass » et pour un tube intégralement garni de mousse de PU (longueur : 26 cm , diamètre : 7 cm , soit une vitesse linéaire de $0,36 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$), les pertes de charge sont de l'ordre du millibar, ce qui ne pose aucun problème et laisse même envisager une utilisation de ces garnissages à des débits nettement plus élevés.

À titre comparatif, la figure 92 présente les pertes de charge créées par un filtre HVAC (filtres très courants des systèmes de ventilation, composés d'un agglomérat de fibres de 1 à $40 \mu\text{m}$ de diamètre), par un filtre grossier de type G4 (utilisé souvent comme préfiltre), par le média Quartzel®, par la mousse de PU (tailles d'alvéoles $\geq 4800 \mu\text{m}$), et, pour comparaison, par les réacteurs « paillason » et « torsadé ».

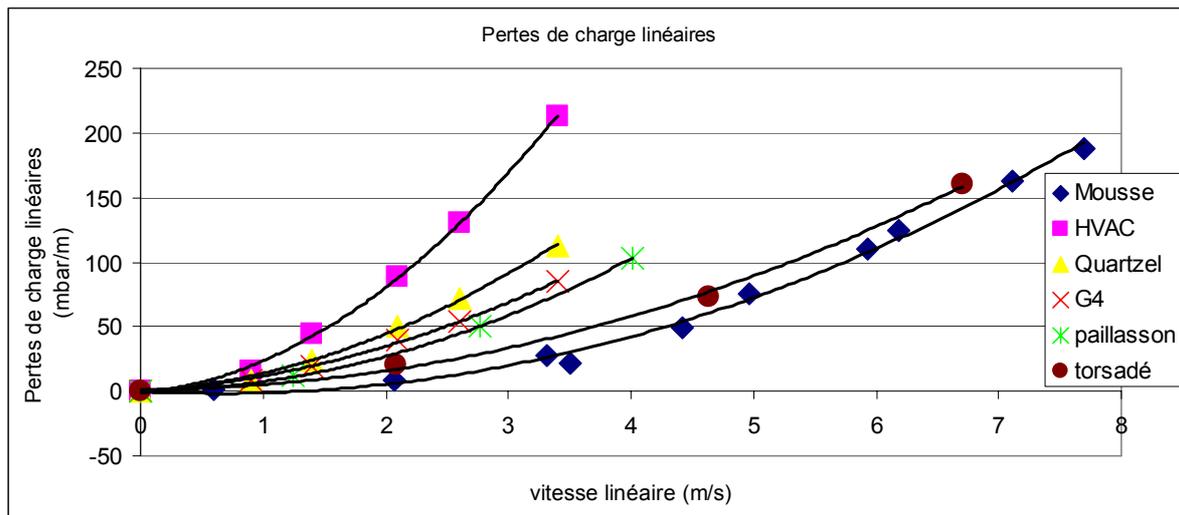


Figure 92. Pertes de charge linéaires créées par un filtre HVAC, un filtre grossier de type G4, du Quartzel®, et la mousse de PU de tailles d'alvéoles $\geq 4800 \mu\text{m}$. Données Saint-Gobain, « Quartzel Photocatalytic Felt for Air Treatment ». A titre comparatif, les pertes de charge linéaires des réacteurs paillason et torsadé sont indiquées.

On observe que le média photocatalytique basé sur la mousse alvéolaire est très intéressant, car il permet de travailler à des débits extrêmement élevés, sans provoquer de pertes de charge notables. Si l'on modélise les pertes de charge linéaires des différents substrats présentés précédemment avec des fonctions quadratiques, il faudrait, pour la mousse, travailler à une vitesse linéaire de 16,6 m/s pour obtenir un différentiel de pression de 1 bar, alors que cette valeur est atteinte dès 7,6 m/s pour un filtre HVAC, 10,7 m/s pour le Quartzel® et 12,9 m/s pour un préfiltre de type G4. De plus, le média alvéolaire présente l'avantage très important de ne pas pouvoir se colmater du fait de la taille très importante des alvéoles.

Ainsi, on peut considérer de façon imagée que le média alvéolaire est un intermédiaire entre un média de type « filtre », c'est-à-dire possédant une grande surface active, mais limité par les pertes de charge, et un réacteur tubulaire, qui présente une faible surface géométrique, mais ne provoque pas de pertes de charge.

I 6 Mesure des effets bactéricides au noir des photocatalyseurs métallisés

Comme mentionnées dans la partie bibliographique, les principales modifications des photocatalyseurs utilisés dans le cadre de la décontamination au niveau biologique mettent en

jeu le plus souvent de l'argent et dans une moindre mesure du cuivre, car ces deux métaux possèdent des propriétés biocides intrinsèques.

Bien qu'un garnissage tridimensionnel soit pour de multiples raisons hautement intéressant, il est nécessaire de pallier une lacune résultant des inévitables zones d'ombres dues à la présence de mousse de PU à l'intérieur du réacteur. En effet, à l'usage, ces zones risqueraient de devenir le siège de prolifération bactérienne puisque comme déjà évoqué, le TiO_2 non activé n'inhibe pas la croissance de microorganismes. Bien que l'intérieur d'un réacteur photocatalytique ne soit pas l'endroit le plus propice à la multiplication de bactéries ou de moisissures, le flux d'air à traiter charrie inévitablement des substances qui pourraient la favoriser.

Ainsi, il nous a semblé nécessaire d'étudier une option utilisant ces métaux et qui permettrait de résoudre ce problème. Cette solution doit répondre aux contraintes suivantes :

- Elle ne doit pas diminuer l'efficacité du processus photocatalytique, ce qui inciterait plutôt à privilégier les faibles titres métalliques afin de diminuer le risque de recouvrir de façon trop importante la surface des grains de TiO_2 et d'agir comme centres de recombinaison des charges photogénérées.
- Elle doit éviter par précaution de mettre les microorganismes en contact avec des concentrations sublétales de métaux (problèmes de résistance), ce qui favoriserait plutôt les titres élevés de métaux. En effet, suite à des modifications du génotype (mutations spontanées, échanges de matériel génétique...), les bactéries peuvent acquérir une certaine résistance face à des composés biocides. Or des expositions à des doses sublétales agissent comme pression sélective en favorisant la survie des plus résistantes. Ce phénomène est déjà bien connu pour l'argent (Silver, Phung *et al.* 2006).

Pour caractériser les photocatalyseurs modifiés (Ag ou Cu photoréduit sur du P25) d'un point de vue de leurs effets bactéricides dans le noir, nous avons réalisé des tests d'inhibition à la croissance d'*E. coli*, comme décrit dans la partie expérimentale, en plaçant 10 mg de catalyseur dans chaque puits de 8 mm de diamètre (Fig. 93) puis en recouvrant le tout de gélose nutritive préalablementensemencée par des bactéries en phase de croissance exponentielle.

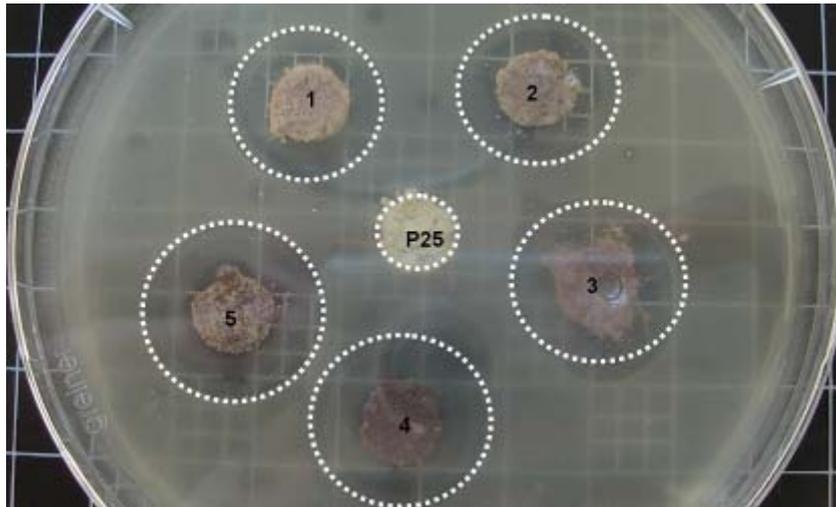


Figure 93. Tests d'inhibition, dans le noir, à la croissance de *E.coli*. 10 mg des cinq photocatalyseurs à base de TiO_2 (P25) modifiés par de l'argent photoréduit (1 : 0,1 %m ; 2 : 0,2 %m ; 3 : 0,5 %m ; 4 : 1,0 %m ; 5 : 1,8 %m) et de TiO_2 (P25) ont été placés dans les puits. On voit que le P25 seul n'inhibe pas, même faiblement, le développement des bactéries.

Les figures 94 et 95 présentent les résultats obtenus en effectuant cinq tests d'inhibition par photocatalyseur chargé en métal afin de s'assurer de la bonne répétabilité de cette expérience. Notons qu'il nous a semblé plus judicieux de comparer les pouvoirs d'inhibition des différents photocatalyseurs en les reliant à la surface où la croissance bactérienne n'est pas observée plutôt que de façon classique au diamètre des disques d'inhibition.

En effet, de façon formelle, il faudrait pour comparer deux substances influant sur la multiplication de microorganismes, comparer les deux cylindres dans lesquels la concentration en substance active est au moins égale à la concentration minimale d'inhibition (CMI). Cela revient donc à comparer leurs volumes respectifs, ce qui, pour une hauteur constante, peut se simplifier à la seule surface S du disque d'inhibition (*i.e.* l'efficacité de l'inhibition est directement proportionnelle au carré du diamètre du disque d'inhibition).

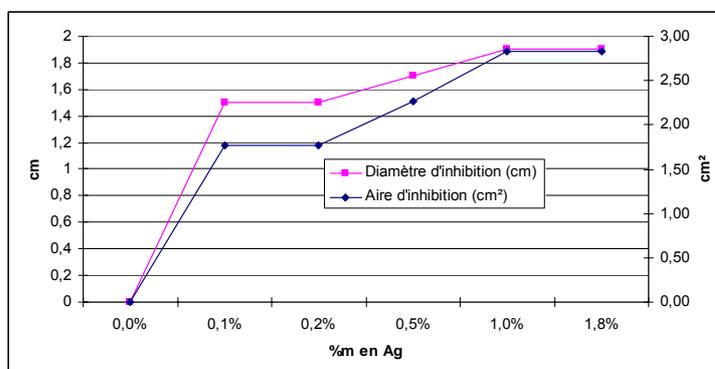


Figure 94. Diamètres et aires d'inhibition, dans le noir, à la croissance de *E.coli* par 10 mg de TiO_2 (P25) modifié par de l'Ag photoréduit (1 : 0,1 %m ; 2 : 0,2 %m ; 3 : 0,5 %m ; 4 : 1,0 %m ; 5 : 1,8 %m) et de TiO_2 (P25) (0) ont été placés dans les puits de 8mm de diamètre (5 répétitions par photocatalyseur, variations inférieures au mm pour le diamètre). Résultats chiffrés en annexe (Tab. 30).

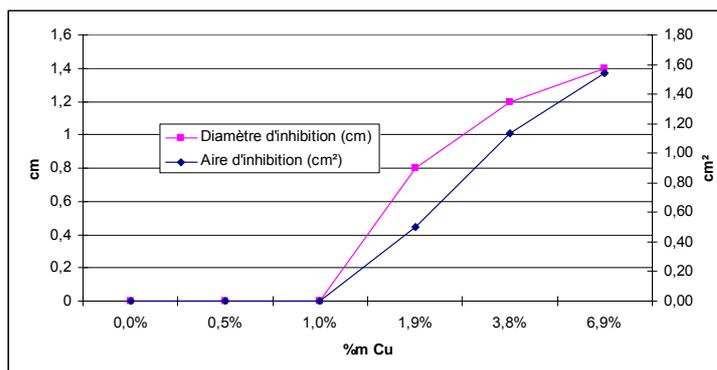


Figure 95. Diamètres et aires d'inhibition, dans le noir, à la croissance de *E.coli* par 10 mg de TiO_2 (P25) modifié par du Cu photoréduit (1 : 0,5 %m ; 2 : 1,0 %m ; 3 : 1,9 %m ; 4 : 3,8 %m ; 5 : 6,9 %m) et de TiO_2 (P25) (0) ont été placés dans les puits de 8mm de diamètre. 5 répétitions par photocatalyseur, variations inférieures au mm pour le diamètre. Résultats chiffrés en annexe (Tab. 31).

Comme présenté sur les figures 94 et 95, on constate une inhibition nulle pour le P25 non modifié, alors qu'on obtient même pour un titre très faible en argent (0,1 %m) des effets très importants sur la prolifération du tapis bactérien d'*E.coli*.

Les courbes d'aire ou de diamètre d'inhibition par le TiO_2 modifié à l'argent montre qu'il n'y a pas de différence sensible entre l'inhibition provoquée par le photocatalyseur chargé à 1 %m et celui à 1,8 %m. Ceci peut être imputable à la faible vitesse de diffusion des ions Ag^+ dans la gélose qui permet aux bactéries de se multiplier avant que la concentration en argent n'atteigne la CMI dans les zones les plus éloignées. Ainsi, cette observation peut simplement être due à une vitesse de formation du tapis bactérien supérieure à celle du front de migration des ions Ag^+ .

Néanmoins, un titre massique de 1 %m en argent semble tout à fait adapté à nos besoins et aux contraintes émises précédemment, car ce titre s'accorde avec de nombreux travaux indiquant un effet positif de cette charge pour des applications de décontamination photocatalytique (Sokmen, Candan *et al.* 2001; Pratap Reddy, Venugopal *et al.* 2007).

Les résultats sur le cuivre (Fig. 95) montrent - comme attendu - une efficacité d'inhibition à la croissance bactérienne beaucoup plus faible que celle de l'argent (Fig. 94) et ce, même pour des titres massiques plus élevés en Cu. Néanmoins, et ce, bien que nous n'ayons pas testé de façon plus approfondie ces catalyseurs, le cuivre peut se révéler intéressant à utiliser en synergie avec l'argent, car une telle association peut permettre d'améliorer significativement l'efficacité biocide globale par rapport à celui de photocatalyseurs modifiés par du Cu ou de l'Ag seuls (Ruparelia, Chatterjee *et al.* 2008; Yu, Lee *et al.* 2008).

Par la suite, les résultats des effets bactéricides dans le noir ayant montré qu'un ajout d'argent à hauteur de 1 %m est parfaitement suffisant pour rendre le TiO_2 ainsi modifié impropre à la prolifération bactérienne, nous avons gardé cette teneur en métal pour les tests de

décontamination photocatalytique sur le média tridimensionnel. Ainsi, nous avons testé les mousses de PU comme support du TiO_2 (P25) (standard) et du TiO_2 (P25) dont 10 %m est constitué de TiO_2 (P25) chargé en argent à hauteur de 1 %m. Ceci permet dans l'hypothèse, même peu vraisemblable, où la présence d'argent à une teneur de 1 %m annihilerait l'efficacité photocatalytique au niveau microbiologique, de limiter à hauteur de 10 % cette baisse, tout en permettant de rendre les zones non éclairées non propices à la multiplication de microorganismes.

Nous allons donc maintenant présenter les résultats de décontamination obtenus sur différents microorganismes grâce ces photoréacteurs garnis de média tridimensionnel.

II RESULTATS DE DECONTAMINATION DU MEDIA PHOTOCATALYTIQUE TRIDIMENSIONNEL

Grâce aux expériences préliminaires précédentes, relativement simples à mettre en œuvre, mais très enrichissantes, il a été possible de réaliser des séries de tests sur des réacteurs garnis d'un média tridimensionnel immédiatement fonctionnels et présentant une très grande efficacité de décontamination au niveau biologique.

Il est évident qu'un tel garnissage photocatalytique doit prouver ses avantages par rapport à un réacteur tubulaire (de dimensions égales), car sa mise en place est plus contraignante. Ainsi, après avoir présenté les tests de décontamination photocatalytique vis-à-vis de différentes bactéries obtenus sur des réacteurs tubulaires, nous détaillerons ceux obtenus avec des médias tridimensionnels utilisant soit du TiO_2 (P25), soit le mélange mécanique 10 %m ($\text{Ag}(1\% \text{m})/\text{TiO}_2(\text{P25})$)-90 %m($\text{TiO}_2(\text{P25})$).

II 1 Tests de décontamination en réacteur tubulaire

Afin de valider les médias tridimensionnels, il est important de réaliser des tests de comparaison de décontamination avec un réacteur de type « tubulaire », et ce, dans des conditions identiques à celles souhaitées pour tester le média tridimensionnel (diamètre du réacteur : 7 cm ; débit : 5 m³/h ; vitesse linéaire : 0,4 m/s). Ceci permet d'avoir une référence à ces débits, inhabituels en photocatalyse à l'échelle du laboratoire, et ainsi de juger concrètement de l'apport d'un garnissage interne, d'autant qu'il existe des systèmes commerciaux basés sur des géométries tubulaires et fonctionnant à des débits encore plus élevés.

Comme détaillé dans la partie expérimentale, le principe de ces expériences est de générer un bioaérosol et de l'envoyer à travers un réacteur tubulaire dont la surface interne est recouverte de 2 g de TiO₂ (P25) (densité : 3,5 mg/cm²) et ce, sous activation UVA ou non afin de distinguer l'abatement photocatalytique de celui inhérent au procédé (notamment l'aérosolisation). Fort heureusement pour nos tests, *L.pneumophila* est particulièrement peu sensible à l'aérosolisation comme nous l'avons montré dans la partie III concernant la validation du système, ce qui en fait un organisme intéressant pour ce genre d'études, car ainsi l'abatement observé est en majeure partie imputable au procédé de décontamination.

Réacteur ; Lampe Photocatalyseur Microorganisme	Tub. ; allumée P25 <i>L. pneumophila</i>	Tub. ; éteinte P25 <i>L. pneumophila</i>	Tub. ; allumée P25 <i>L. pneumophila</i>	Tub. ; éteinte P25 <i>L. pneumophila</i>
Conditions de culture	48h ; Agar ; 37°C			
durée de l'expérience (h)	1,67	2,17	2,08	2,00
débit d'injection (mL/h)	10,2	11,8	12,1	14,1
T° enceinte (°C)	26	24	24	27
T° flux (°C)	27	22	23,9	26
Humidité relative (%)	10,2	12,7	11,9	12,0
V. col. t=0 (L)	1,86	1,72	1,81	1,43
$\Delta V(t_f-t_0)$ (L)	-0,10	-0,12	-0,11	-0,13
V. susp. départ coloré (µL)	100	20	100	100
Facteur de dilution	10	1	10	10
Nombre de paires de clichés	23	7	14	14
Bactéries totales	509	1488	900	257
Bactéries mortes	412	1344	504	114
[bactéries totales] (bact/mL)	9,2E+07	4,4E+08	2,7E+08	7,6E+07
[bactéries mortes] (bact/mL)	7,4E+07	4,0E+08	1,5E+08	3,4E+07
V. susp. colonne coloré (mL)	130	50	50	100
Nombre de paires de clichés	24	10	17	23
Bactéries totales	1931	988	1367	1584
Bactéries mortes	1631	828	979	780
[bactéries totales] (bact/mL)	2,6E+04	8,2E+04	6,7E+04	2,9E+04
[bactéries mortes] (bact/mL)	2,2E+04	6,9E+04	4,8E+04	1,4E+04
% récupération/injection	2,9E-02	1,2E-02	1,7E-02	1,7E-02
% viabilité susp. départ	19,1%	9,7%	44,0%	55,6%
% viabilité susp. collecte	15,5%	16,2%	28,4%	50,8%
RLV _{max}	2,6	2,0	2,8	2,9



Réacteur ; Lampe Photocatalyseur Microorganisme	Tub. ; allumée P25 <i>L. pneumophila</i>	Tub. ; éteinte P25 <i>L. pneumophila</i>	Tub. ; allumée P25 <i>L. pneumophila</i>	Tub. ; éteinte P25 <i>L. pneumophila</i>
RLV	0,1	-0,2	0,2	0,0
P _v	82%	167%	65%	91%
%RLV _{max}	4%	-11%	7%	1 %
N	1931	988	1367	1584

Tableau 19. Résultats obtenus avec un réacteur tubulaire (Tub.) (3,5 mg P25/cm²) sur légionelles avec ou sans activation UVA à 5 m³/h. Numérations réalisées avec le kit BaLight™.

Le tableau 19 présente les deux séries de résultats de décontamination obtenus sur légionelles avec le réacteur tubulaire présenté auparavant, et ce, sur une durée d'environ deux heures à un débit de 5 m³/h. On constate que l'efficacité d'un tel réacteur est quasi nulle dans ces conditions, et ce, avec ou sans UVA. Il est clair que le temps de passage très court (moins d'une seconde) combiné à une faible surface, même très active, ne permet pas un contact suffisant entre le photocatalyseur activé et les microorganismes. Ainsi, on observe des réductions logarithmiques en viabilité très proches de zéro dont la variabilité est imputable aux erreurs de mesures de viabilité par épifluorescence (ceci explique la valeur négative « aberrante » du RLV= -0,2).

Quelques précisions sont à donner afin de mieux comprendre les résultats : du fait de la croissance sur milieu gélifié, le taux de viabilité des suspensions injectées lors des deux premières expériences est assez peu élevé (colonnes de gauche, 19 % et 10 %). Pour éviter ce phénomène dû au simple fait que les bactéries situées au centre des colonies meurent par défaut de nutriments, les cultures des légionelles ont ensuite été réalisées en deux temps : premièrement, on procède à un étalement classique de type « isolement » afin de vérifier, dès 24h, l'absence de contamination sur la boîte. Le cas échéant, on réétable l'ensemble des colonies sur toute la gélose et on incube à nouveau pendant 24h. Ceci a permis d'augmenter considérablement le taux de viabilité des suspensions bactériennes injectées (colonnes de droite, 44 % et 56 %) ce qui permet d'apprécier plus correctement l'abattement.

Ensuite, on constate que le rapport entre les bactéries injectées et les bactéries récupérées dans la colonne est très faible, de l'ordre de 1 %. Il est difficile de déterminer précisément la localisation de ces pertes, mais il semble que la zone de formation de l'aérosol soit un endroit particulièrement critique (coloration en fin de manipulation indiquant une accumulation de microorganismes au niveau de la buse d'injection). Ceci peut s'expliquer par le fait que les particules du bioaérosol sont encore très « humides » dans cette zone, ce qui pourrait favoriser leur adhésion dans la tubulure.

Ainsi, cette géométrie de réacteur, uniquement avec un revêtement ou dépôt photocatalytiques sur les parois n'offre pas de résultats probants à des débits élevés. Bien que ce type de réacteur soit intéressant, car il est aisé de le caractériser et d'en faire varier les paramètres, il ne se présente pas au niveau applicatif comme solution efficace à la décontamination concrète des bioaérosols.

Nous allons maintenant présenter les résultats obtenus sur un réacteur de mêmes dimensions, mais garni d'un média tridimensionnel.

II 2 Tests de décontamination en réacteur garni

Le matériau alvéolaire en mousse de PU, passivée par une multicouche de polysiloxane semble permettre de remplir les contraintes du cahier des charges tacite que nous nous sommes imposées. Il convient cependant de vérifier au préalable que ce support ne n'affecte pas la viabilité des bactéries et que les bactéries mortes observées lors d'une expérience ne proviennent pas en réalité des bactéries accumulées dans le système lors des expériences précédentes ! Ensuite, nous verrons quel mode de dépôt du photocatalyseur, sur le substrat tridimensionnel, est le plus avantageux (dépôt sous forme pulvérulente ou au moyen d'une suspension aqueuse).

Au final, nous présenterons les résultats obtenus en utilisant du P25 standard puis un mélange mécanique de 90 %m de P25 et de 10 %m de P25 chargé par photoréduction à hauteur de 1,0 %m en argent (soit au global 0,1 %m d'argent) qui a pour but premier de rendre les zones non illuminées du réacteur impropre à la prolifération bactérienne, voire d'améliorer l'efficacité générale du dispositif.

II 1 Tests préliminaires

- Innocuité du support de PU passivé

Bien que la littérature ne fasse pas mention d'effets biocides voire toxique du PU ou du Sivo 110™, il est apparu important pour l'interprétation des résultats de vérifier que le support était neutre pour les bactéries. Cette expérience s'est déroulée sans illumination UVA afin de ne conserver qu'un effet potentiel du support.

Les résultats indiquent que l'on peut considérer que le support ne possède pas d'effets biocides sensibles (les valeurs négatives sont liées à l'imprécision des numérations par

épifluorescence) (Tab. 20). De ce fait, les résultats de décontamination obtenus par la suite peuvent être attribués au seul photocatalyseur.

Réacteur ; Lampe Photocatalyseur Microorganisme	PU ;éteinte - <i>L. pneumophila</i>
Conditions de culture	48h Agar 37°C
durée de l'expérience (h)	2,25
débit d'injection (mL/h)	14,5
T° enceinte (°C)	24
T° flux (°C)	24
Humidité relative (%)	10,0
V. col. t=0 (L)	1,96
$\Delta V(t_r-t_0)$ (L)	-0,19
V. susp. départ coloré (μ L)	100
Facteur de dilution	100
Nombre de paires de clichés	17
Bactéries totales	303
Bactéries mortes	154
[bactéries totales] (bact/mL)	7,4E+08
[bactéries mortes] (bact/mL)	3,8E+08
V. susp. colonne coloré (mL)	200
Nombre de paires de clichés	23
Bactéries totales	2449
Bactéries mortes	1023
[bactéries totales] (bact/mL)	2,2E+04
[bactéries mortes] (bact/mL)	9,2E+03
% récupération/injection	1,6E-03
% viabilité susp. départ	49,2%
% viabilité susp. collecte	58,2%
RLV _{max}	3,1
RLV	-0,1
P_v	118%
%RLV_{max}	-2%
N	2449

Tableau 20. Résultats obtenus sur un bioaérosol de *L. pneumophila* passant à travers un réacteur garni de mousse de PU passivé par une triple couche de Sivo 110™ à un débit de 5 m³/h. Numérations réalisées avec le kit BacLight™.

De façon logique, on constate que la fraction de bactéries récupérées est encore plus faible que lors des tests en réacteur tubulaire, ce qui justifie d'autant plus l'utilisation de la RLV comme indicateur d'efficacité. Ceci peut présenter un intérêt, car cela montre que le support présente une capacité de « rétention » des microorganismes, augmentant ainsi fortement leur temps de passage dans le réacteur en comparaison à celui du flux porteur. Ceci pourrait s'avérer problématique, car nous utilisons le même réacteur pour chaque série de tests par souci d'économie de temps, mais surtout afin d'être assuré d'avoir la même densité surfacique de photocatalyseur et exactement la même géométrie, y compris à petite échelle, c'est-à-dire au niveau des réseaux de connexion interalvéolaires. Il serait en effet concevable que du fait de cette accumulation, on observe une baisse d'efficacité d'une expérience à l'autre, mais ceci n'est pas observé (Tab. 23). Néanmoins, il faut aussi vérifier que ces bactéries (mortes) ne sont pas relarguées lors des expériences suivantes, car cela biaiserait les résultats.

- Absence de relargage de bactéries

Pour vérifier que les bactéries accumulées lors d'une expérience dans le réacteur ne sont pas relarguées lors d'expériences suivantes, nous avons suivi le protocole expérimental habituel, mais sans injecter de bactéries dans l'expérience suivante, et ce, sur une durée de 2,75 h (avec le réacteur présenté au tableau 21, réacteur pulvérulent).

La filtration de 100 mL du liquide de collecte n'a pas permis de déceler la présence de bactéries vivantes ou mortes, indiquant que les bactéries observées lors des expériences proviennent bien de la suspension injectée et non de bactéries issues d'expériences précédentes.

- Mode de dépôt du photocatalyseur

Le mode de dépôt du photocatalyseur sur le support tridimensionnel est aussi particulièrement important. Bien qu'en photocatalyse appliquée à la dépollution chimique, le mode de dépôt classique d'un photocatalyseur sous forme pulvérulente utilise une suspension du photocatalyseur, il nous a paru intéressant de tester un autre mode de dépôt, principalement dans le but d'obtenir une bonne tenue mécanique. Cette alternative a consisté à former, par simple évaporation de l'éthanol, un film visqueux de Sivo 110™ non polymérisé sur le substrat tridimensionnel préalablement passivé par les trois couches de Sivo 110™ polymérisés (Chp. II § II 4), puis à y déposer directement le catalyseur pulvérulent, suivi d'une dernière étape de polymérisation du Sivo 110™ qui se lie alors chimiquement aux grains de photocatalyseur.

Afin de comparer les deux modes de dépôt, deux tests de décontamination sur *L.pneumophila*, à $5 \text{ m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$ ont été réalisés (Tab. 21).

Réacteur ; Lampe Photocatalyseur Microorganisme	susp.aq. ; allumé P25 <i>L. pneumophila</i>	pulv. ; allumée P25 <i>L. pneumophila</i>
Conditions de culture	48h ; Liq ; 37°C	48h ; Liq ; 37°C
durée de l'expérience (h)	2,75	2,75
débit d'injection (mL/h)	9,8	9,8
T° enceinte (°C)	22	26
T° flux (°C)	24	24
Humidité relative (%)	12,0	9,4
V. col. t=0 (L)	1,93	1,9
$\Delta V(t-t_0)$ (L)	-0,31	-0,12
V. susp. départ coloré (µL)	100	100
Facteur de dilution	100	100
Nombre de paires de clichés	29	20
Bactéries totales	3984	2940
Bactéries mortes	2956	1739
[bactéries totales] (bact/mL)	5,7E+09	6,1E+09
[bactéries mortes] (bact/mL)	4,2E+09	3,6E+09
V. susp. colonne coloré (mL)	300	300
Nombre de paires de clichés	29	20
Bactéries totales	6012	3285
Bactéries mortes	5856	3210

Tableau 21. Résultats de décontamination obtenus par des réacteurs garnis de mousse de PU passivée, mais dont le photocatalyseur a été déposé soit en phase aqueuse (g., 4 g de P25, soit environ $1,5 \text{ mg/cm}^2$), soit par dépôt sous forme pulvérulente (d., 12 g de P25, soit environ $4,5 \text{ mg/cm}^2$). Numérations réalisées avec le kit BacLight™. →

Réacteur ; Lampe Photocatalyseur Microorganisme	susp.aq. ; allumé P25 <i>L. pneumophila</i>	pulv. ; allumée P25 <i>L. pneumophila</i>
[bactéries totales] (bact/mL)	2,9E+04	2,3E+04
[bactéries mortes] (bact/mL)	2,8E+04	2,2E+04
% récupération/injection	3,0E-04	2,5E-04
% viabilité susp. départ	25,8%	40,9%
% viabilité susp. collecte	2,6%	2,3%
RLV _{max}	3,2	3,1
RLV	1,0	1,3
P_v	10%	6%
%RLV_{max}	31%	40%
N	6012	3285

On remarque que le dépôt du photocatalyseur sous forme pulvérulente conduit à des résultats de décontamination légèrement meilleurs que le dépôt réalisé avec une suspension aqueuse ($P_v = 10\%$ pour le dépôt en phase aqueuse, et $P_v = 6\%$ pour le dépôt sous forme pulvérulente), et ce, pour des nombres d'observations élevés. Ceci peut s'expliquer en partie par la quantité beaucoup plus importante de photocatalyseur déposée sous forme pulvérulente ($4,5 \text{ mg/cm}^2$) que celle obtenue à partir d'une suspension aqueuse ($1,5 \text{ mg/cm}^2$). On peut en effet observer sur les clichés de MEB de mousse passivée et recouverte de TiO_2 à partir d'une suspension aqueuse que le dépôt photocatalytique est très mince, mais surtout qu'il ne recouvre que très partiellement la surface disponible (Fig. 96).

Une autre raison que l'on peut avancer peut être la rugosité du dépôt obtenu directement avec le photocatalyseur sous forme pulvérulente, qui permet d'améliorer la séparation des bactéries du flux porteur en les retenant plus longtemps grâce aux nombreuses anfractuosités (Fig. 97). Ceci peut avoir pour effet bénéfique d'accroître le temps de séjour effectif des microorganismes dans le réacteur. Notons enfin que les rapports de récupération après tests photocatalytiques sont proches, bien que de deux ordres de magnitude inférieurs à ceux des expériences réalisées en réacteur tubulaire. On peut donc raisonnablement exclure le fait qu'il y ait une accumulation plus importante dans le réacteur où le photocatalyseur a été déposé sous forme pulvérulente. Ainsi, la rugosité induite par le TiO_2 sous forme pulvérulente peut permettre de mieux « accrocher » les microorganismes sur le revêtement photocatalytique, sans pour autant les laisser s'y accumuler à la façon d'un filtre.

Bien sûr, vu la faible précision des mesures de viabilité, il serait aussi justifié de considérer qu'il n'y pas de différence majeure entre les deux modes de dépôt. Néanmoins, ce mode de dépôt du photocatalyseur présente indéniablement des avantages au niveau de la tenue mécanique, car il y a formation d'une liaison chimique entre le support et les grains de photocatalyseur, et de la quantité de photocatalyseur que l'on peut déposer (Fig. 85).

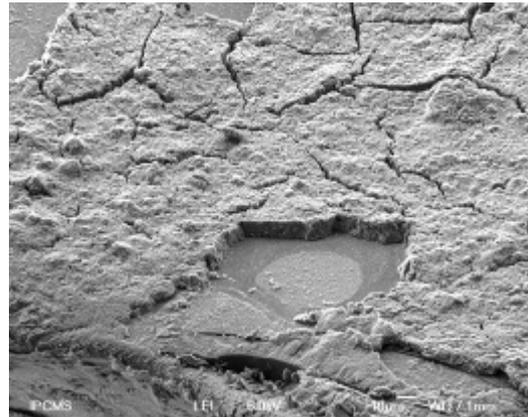
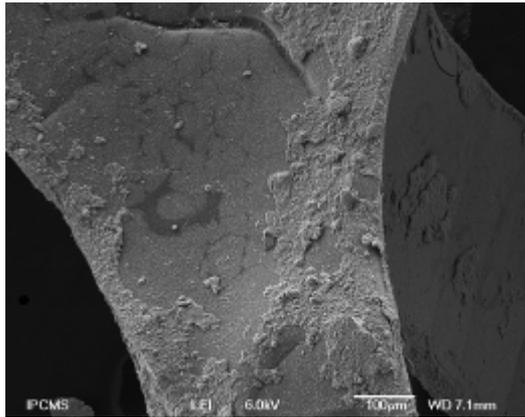


Figure 96. Clichés MEB de mousse de PU passivée par trois couches de Sivo 110™ sur laquelle a été réalisé un dépôt de TiO₂ (P25) depuis une suspension aqueuse. On constate que le dépôt ne recouvre que très partiellement la surface de la mousse (g.) et que sa tenue n'est pas optimale puisqu'il se détache facilement du support, comme on peut l'observer lors des filtrations pour réaliser les numérations (d.).

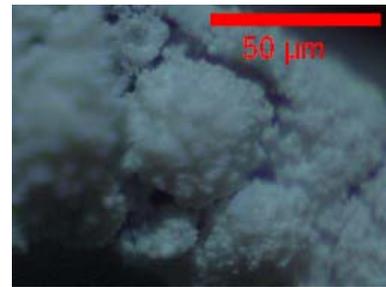
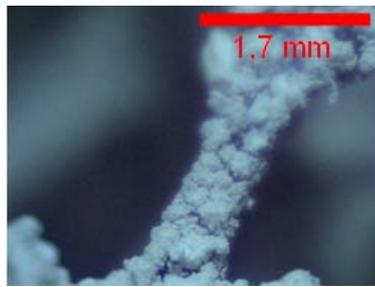
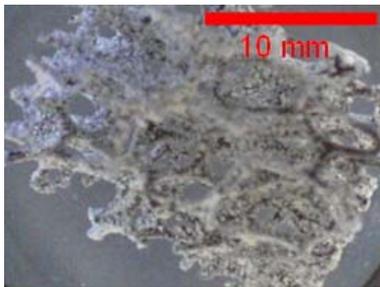


Figure 97. Catalyseur pulvérulent fixé chimiquement par le Sivo 110™ sur le support de PU préalablement passivé. (de g. à d. : x10, x60, x200, microscope optique).

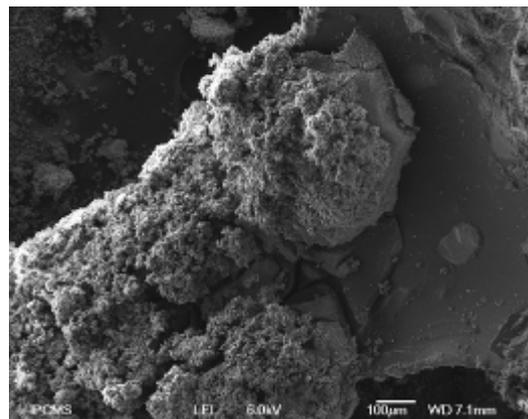
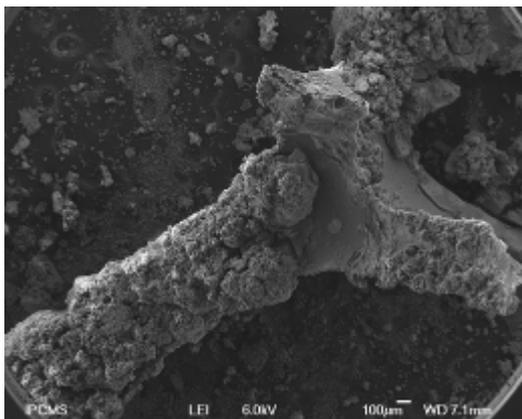


Figure 98. Clichés MEB de mousse de PU passivée par trois couches de Sivo 110™ sur laquelle a été réalisé un dépôt de TiO₂ (P25) sous forme pulvérulente, lequel est fixé chimiquement au support après polymérisation du film visqueux. On constate qu'à certains endroits, le dépôt ne recouvre que partiellement la surface de la mousse, mais avec une épaisseur beaucoup plus importante que dans le cas d'un dépôt à partir d'une suspension aqueuse, et sur une surface plus conséquente (g.).

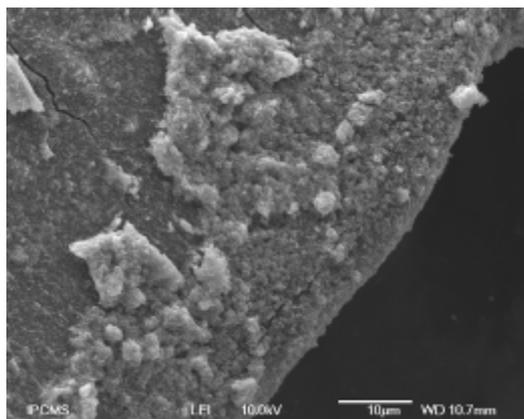
La technique de dépôt à partir d'une suspension aqueuse du catalyseur pose en effet des problèmes de tenue dus au fait que le Sivo 110™ forme un film hydrophobe qui conduit ainsi à une mauvaise tenue mécanique, comme on peut le constater par la quantité importante de grains de photocatalyseurs dans la suspension de collecte.

Ainsi, nous avons conservé le mode de dépôt du photocatalyseur sous forme pulvérulente qui permet, pour une efficacité au moins équivalente, d'éviter l'entraînement de grains de TiO₂ dans la colonne de récupération, car ces derniers limitent la quantité de liquide de collecte filtrable (et donc le nombre d'observations possibles) et gênent considérablement les dénombrements sur clichés microscopiques (Fig. 51). De plus, pour des applications de décontamination voire de dépollution, ceci permet de mieux répondre aux soucis posés par le relargage de nanoparticules.

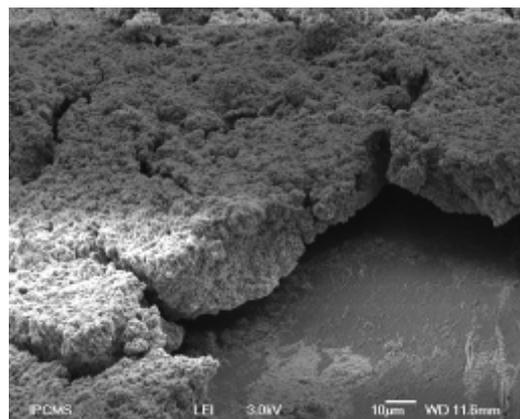
Notons enfin que des études en cours au LMSPC visent à obtenir et à optimiser des méthodes de dépôt en phase liquide en utilisant des solvants apolaires ou des mélanges de solvants. En effet, si le traitement photocatalytique d'aérosols est particulièrement tributaire de la capacité qu'a un réacteur à séparer les microorganismes du flux porteur pour augmenter le temps de contact, les opérations de dépollution photocatalytique ont quant à elles un rendement dépendant beaucoup plus fortement de la qualité de l'illumination. Ainsi, on privilégiera un dépôt lisse et homogène, voire plus mince, pour les applications de traitement de l'air au niveau chimique, alors que l'efficacité du traitement des bioaérosols semble favorisée par un revêtement irrégulier permettant d'augmenter le temps de séjour effectif des microorganismes dans le réacteur.

Les travaux visant à l'obtention de dépôts réguliers cherchent notamment à optimiser la composition de la suspension contenant le photocatalyseur, ainsi que les conditions du séchage ; à titre d'exemple, la figure 99 montre quelques résultats obtenus en réalisant des dépôts de TiO₂ à partir de suspension dans divers solvants (eau, éthanol ou acétone et mélanges de ces solvants), et séchés à 20 °C ou à 5 °C.

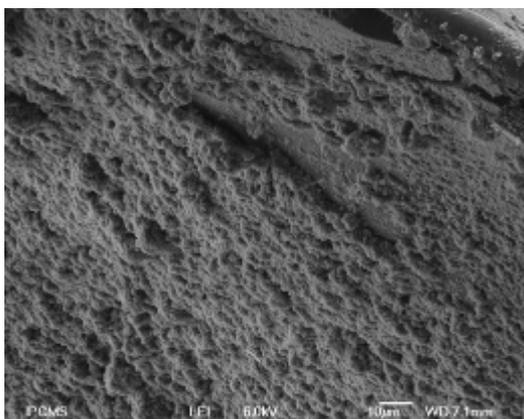
À l'heure actuelle, l'utilisation d'un solvant apolaire comme l'acétone permet un ancrage plus homogène avec une meilleure tenue mécanique, et une température de séchage basse (5 °C) conduit aux meilleurs résultats, notamment en évitant les phénomènes de rétractation trop rapide du dépôt de photocatalyseur, dus à l'évaporation trop rapide du solvant.



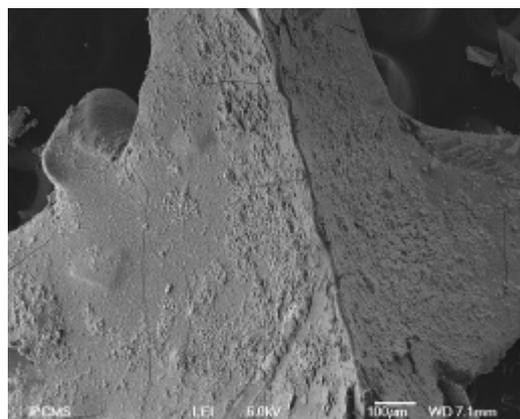
Solvant : eau – éthanol (50%v), T=20°C



Solvant : acétone-éthanol (10%v), T=20°C



Solvant : acétone, T=5°C



Solvant : acétone, T=5°C

Figure 99. Clichés au MEB de dépôts obtenus par dip-coating du support tridimensionnel de PU passivé dans des suspensions de TiO₂ dans différents solvants et à deux températures de séchage.

II 2 Tests avec du TiO₂ (P25) commercial

Afin de pouvoir comparer les résultats obtenus avec le garnissage photocatalytique tridimensionnel et ceux obtenus avec un réacteur tubulaire, nous avons tout d'abord réalisé les tests sur le média tridimensionnel avec un dépôt de TiO₂ commercial non modifié (P25).

Il est important de noter que les efficacités respectives de ces deux types de réacteur ne peuvent pas être rapportées à la masse de photocatalyseur employée, puisqu'elles sont très différentes, mais les densités surfaciques de photocatalyseurs sont très proches (réacteur tubulaire : 2 g soit 3,5 mg/cm² ; réacteur garni : 12 g soit 3,8 mg/cm²).

Le tableau 22 présente les abattements obtenus à $5 \text{ m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$ sur un bioaérosol de légionelles avec un réacteur garni de média photocatalytique dont le TiO_2 a été déposé sous forme pulvérulente.

Réacteur ; Lampe Photocatalyseur Microorganisme	pulv. ; éteinte P25 <i>L. pneumophila</i>	pulv. ; allumée P25 <i>L. pneumophila</i>
Conditions de culture	48h ; Liq ; 37°C	48h ; Liq ; 37°C
durée de l'expérience (h)	2,00	2,75
débit d'injection (mL/h)	11,2	9,8
T° enceinte (°C)	26	26
T° flux (°C)	24	24
Humidité relative (%)	11,5	9,4
V. col. t=0 (L)	1,9	1,9
$\Delta V(t_r-t_0)$ (L)	-0,10	-0,12
V. susp. départ coloré (μL)	100	100
Facteur de dilution	10	100
Nombre de paires de clichés	10	20
Bactéries totales	1523	2940
Bactéries mortes	856	1739
[bactéries totales] (bact/mL)	6,3E+08	6,1E+09
[bactéries mortes] (bact/mL)	3,6E+08	3,6E+09
V. susp. colonne coloré (mL)	110	300
Nombre de paires de clichés	20	20
Bactéries totales	1864	3285
Bactéries mortes	1150	3210
[bactéries totales] (bact/mL)	3,5E+04	2,3E+04
[bactéries mortes] (bact/mL)	2,2E+04	2,2E+04
% récupération/injection	4,5E-03	2,5E-04
% viabilité susp. départ	43,8%	40,9%
% viabilité susp. collecte	38,3%	2,3%
RLV_{max}	2,9	3,1
RLV	0,1	1,3
P_v	87%	6%
%RLV_{max}	2%	40%
N	1864	3285

Tableau 22. Tests de décontamination avec un réacteur garni de média photocatalytique dont le TiO_2 a été déposé sous forme pulvérulente.

Longueur = 26 cm. Numérations réalisées avec le kit BacLight™.

On constate que ce réacteur permet d'obtenir un abattement conséquent lorsque le garnissage est activé par des UVA, puisqu'en incluant les pertes dues au montage, seuls 6 % des bactéries en ressortiront vivantes, et ce, malgré un temps de passage extrêmement court (1,4 s). Il est à noter que le réacteur tubulaire équivalent ne permettait pas de déceler une diminution significative de la contamination de l'aérosol, de même que s'il n'y a pas d'activation UVA (Tab. 22).

Grâce à ce test, la probabilité de survie d'une bactérie par unité de longueur du réacteur (avec l'alternance des deux types d'anneaux) s'obtient aisément, comme nous l'avons montré précédemment, avec $P(L) = P_v$, probabilité de survie obtenue avec un réacteur de longueur L :

$$P(1(\text{cm})) = P(Lr(\text{cm}))^{\frac{1}{Lr}}$$

Ainsi, on obtient pour le réacteur décrit précédemment une probabilité de survie d'environ 90% ($=0,06^{1/26}$) par centimètre de réacteur ce qui permet de prévoir l'efficacité du système grâce à sa longueur (Fig. 100) :

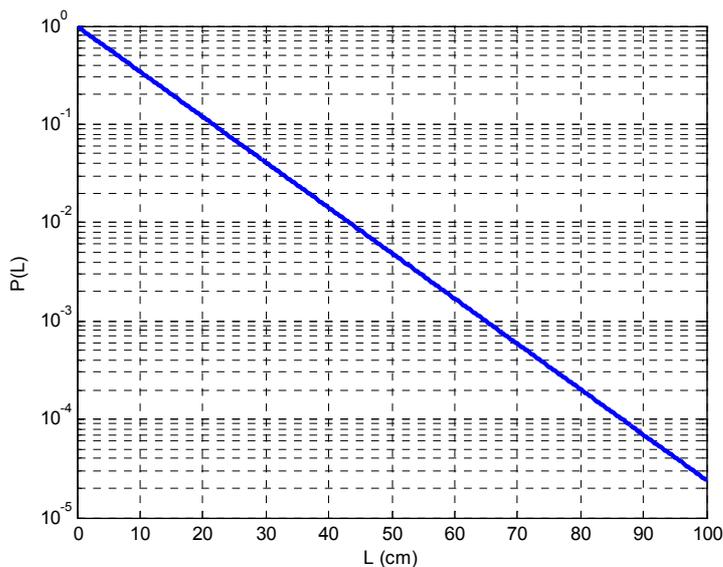


Figure 100. Probabilité $P(L)$ de survie d'une légionelle en fonction de la longueur de réacteur traversée L (cm) : $P(L)=0,8992^L$. (Réacteur garni du média tridimensionnel recouvert de TiO_2 (P25) sous forme pulvérulente à $5 \text{ m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$).

Ainsi, on peut estimer de manière approximative qu'un réacteur de 85 cm de long - soit l'équivalent en série de quatre réacteurs comme celui testé - permettrait d'obtenir à $5 \text{ m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$ une désinfection, en sortie de réacteur, de l'ordre de $4 \log$ pour une consommation électrique de 32W et une perte de charge inférieure à quelques millibars !

Néanmoins, le test sans activation UVA ainsi que l'absence d'inhibition à la prolifération bactérienne du TiO_2 (P25) laissent entrevoir un risque majeur de formation d'un biofilm dans les zones sous illuminées, ce qui n'est bien sûr pas tolérable, car un tel réacteur risquerait alors de devenir source de bioaérosols ! Pour cette raison, nous avons décidé d'utiliser les propriétés biocides de l'argent photoréduit sur du TiO_2 afin de rendre autant que possible le réacteur impropre à une quelconque prolifération microbienne.

II 3 Tests avec le catalyseur modifié

L'utilisation de l'argent pour ses propriétés biocides a été présentée dans la partie bibliographique et il existe de nombreuses applications basées sur ces effets. Néanmoins, il a été mis en évidence que comme pour les antibiotiques, les bactéries peuvent développer une résistance à l'argent (Silver, Phung *et al.* 2006). Il est important de noter que le développement d'un caractère résistant chez une bactérie est le résultat d'une sélection naturelle qui a lieu lorsque les bactéries sont soumises de façon prolongée à des doses sublétales d'une substance.

Dans le cas de nos réacteurs, les temps de passage sont tellement courts qu'il ne peut y avoir adaptation des microorganismes qui les traversent. Par contre, on peut supposer qu'une adaptation à l'argent pourrait avoir lieu pour des séjours prolongés à l'intérieur du réacteur si les « concentrations en argent » effectives sont trop faibles. Ainsi, on aurait tendance à favoriser l'emploi de photocatalyseurs fortement chargés en argent afin de s'assurer d'être largement au dessus de la CMI. Or les métaux peuvent jouer le rôle de centre de recombinaison de charges en photocatalyse et diminuer grandement l'efficacité d'un photocatalyseur d'autant plus qu'ils sont en excès.

Ainsi, il a fallu établir un compromis au niveau du choix du photocatalyseur pour le développement d'un dispositif de décontamination photocatalytique. Celui-ci doit en effet posséder un rendement de décontamination élevé, mais il est par contre absolument exclu que l'utilisation d'un tel dispositif présente un risque – même minime - de devenir lui-même source de contamination ou de favoriser l'apparition de résistances.

Nous avons déduit du paragraphe I 6 de ce chapitre relatif aux effets bactéricides des catalyseurs modifiés à l'argent qu'une teneur de 1 %m semblait tout à fait convenir pour maximiser l'efficacité dans le noir. Néanmoins, il existe toujours un risque que cette teneur en métal nuise à l'efficacité photocatalytique. C'est la raison pour laquelle nous avons décidé d'utiliser un mélange mécanique de 90 %m de catalyseur commercial TiO₂ (P25) et de 10 %m de TiO₂ (P25) chargé à hauteur de 1 %m en argent photoréduit. En effet, cette composition nous semble être un bon compromis pour obtenir des effets bactéricides maximaux dans le noir, tout en ne subissant qu'au plus une perte d'efficacité photocatalytique éventuelle de 10 %. En effet, dans le cas, peu vraisemblable, où la présence d'argent inhiberait complètement l'activité photocatalytique, la perte d'efficacité globale serait limitée à 10 %. D'autre part, même si seulement 10 % du matériau total développe des propriétés bactéricides dans le noir, la diffusion des ions argent devrait suffire à empêcher le développement d'un biofilm dans ces zones sous-illuminées. D'une façon plus générale, cette teneur minimale en argent permet aussi de limiter les coûts pour des applications à plus grande échelle (%m en Ag sur l'ensemble du mélange : 0,1 %m).

Les tableaux 23 et 24 présentent les résultats obtenus à 5 m³.h⁻¹ avec différents microorganismes : *L.pneumophila*, *L.lactis* et *M.smegmatis*. Le réacteur de test est un réacteur garni du média tridimensionnel recouvert du mélange mécanique des deux photocatalyseurs (15 g soit 4,7 mg/cm²) :

Réacteur ; Lampe Photocatalyseur Microorganisme	pulv. ; allumée P25 Ag <i>L. pneumophila</i>	pulv. ; éteinte P25 Ag <i>L. pneumophila</i>	pulv. ; allumée P25 Ag <i>L. pneumophila</i>	pulv. ; éteinte P25 Ag <i>L. pneumophila</i>
Conditions de culture	48h ; Liq ; 37°C			
durée de l'expérience (h)	1,33	1,33	1,25	1,15
débit d'injection (mL/h)	15,2	14,1	14,0	13,8
T° enceinte (°C)	26	25	25	25
T° flux (°C)	24	24	24	25
Humidité relative (%)	12,0	12,0	11,0	15,0
V. col. t=0 (L)	1,66	1,83	1,89	1,92
$\Delta V(t_f-t_0)$ (L)	-0,07	-0,12	-0,12	-0,16
V. susp. départ coloré (µL)	100	100	50	100
Facteur de dilution	10	10	10	10
Nombre de paires de clichés	6	8	25	29
Bactéries totales	496	674	3522	3025
Bactéries mortes	375	137	2076	2076
[bactéries totales] (bact/mL)	3,4E+08	3,5E+08	1,2E+09	4,3E+08
[bactéries mortes] (bact/mL)	2,6E+08	7,1E+07	6,9E+08	3,0E+08
V. susp. colonne coloré (mL)	100	200	100	90
Nombre de paires de clichés	24	15	55	16
Bactéries totales	813	566	1062	2026
Bactéries mortes	799	452	1046	1726
[bactéries totales] (bact/mL)	1,4E+04	7,8E+03	8,0E+03	5,8E+04
[bactéries mortes] (bact/mL)	1,4E+04	6,3E+03	7,9E+03	5,0E+04
% récupération/injection	3,2E-03	2,0E-03	6,7E-04	1,5E-02
% viabilité susp. départ	24,4%	79,7%	41,1%	31,4%
% viabilité susp. collecte	1,7%	20,1%	1,5%	14,8%
RLV _{max}	2,3	2,7	2,6	2,8
RLV	1,2	0,6	1,4	0,3
P _v	7%	25%	4%	47%
%RLV _{max}	50%	23%	54%	12%
N	813	566	1062	2026

Tableaux 23 (h.) et 24 (b.). Résultats des tests de décontamination de bioaérosols de légionelles (Tab. 23), de *L.lactis* et de *M.smegmatis* (Tab. 24) avec un réacteur muni d'un garnissage tridimensionnel recouvert avec 15 g du mélange mécanique de catalyseurs (90%*m* de TiO₂ (P25) et 10%*m* de Ag(1%*m*)/TiO₂ (P25)).

Réacteur ; Lampe Photocatalyseur Microorganisme	pulv. ; allumée P25 Ag <i>L.lactis</i>	pulv. ; éteinte P25 Ag <i>L.lactis</i>	pulv. ; allumée P25 Ag <i>M.smegmatis</i>	pulv. ; éteinte P25 Ag <i>M.smegmatis</i>
Conditions de culture	48h ; Liq ; 30°C	48h ; Liq ; 30°C	72h ; Liq ; 37°C	48h ; Liq ; 37°C
durée de l'expérience (h)	1,50	1,50	1,50	1,50
débit d'injection (mL/h)	10,9	10,9	12,9	11,9
T° enceinte (°C)	22	24	26	26
T° flux (°C)	22	22	26	26
Humidité relative (%)	12,0	11,5	15,0	14,6
V. col. t=0 (L)	1,77	1,77	1,8	1,78
$\Delta V(t_f-t_0)$ (L)	-0,13	-0,12	-0,20	-0,21
V. susp. départ coloré(µL)	100	100	100	100
Facteur de dilution	10	10	10	10
Nombre de paires de clichés	14	14	9	8
Bactéries totales	529	383	463	354
Bactéries mortes	268	178	238	154
[bactéries totales] (bact/mL)	1,6E+08	1,1E+08	2,1E+08	1,8E+08
[bactéries mortes] (bact/mL)	7,9E+07	5,3E+07	1,1E+08	8,0E+07
V. susp. colonne coloré (mL)	50	50	50	80
Nombre de paires de clichés	25	25	12	9
Bactéries totales	1549	909	689	483
Bactéries mortes	1490	771	639	362
[bactéries totales] (bact/mL)	5,1E+04	3,0E+04	4,8E+04	2,8E+04
[bactéries mortes] (bact/mL)	4,9E+04	2,6E+04	4,4E+04	2,1E+04
% récupération/injection	3,3E-02	2,7E-02	1,8E-02	1,3E-02
% viabilité susp. départ	49,3%	53,5%	48,6%	56,5%
% viabilité susp. collecte	3,8%	15,2%	7,3%	25,1%
RLV _{max}	2,9	2,7	2,5	2,4
RLV	1,1	0,5	0,8	0,4
P _v	8%	28%	15%	44%
%RLV _{max}	39%	20%	33%	15%
N	1549	909	689	483

On constate que, sous activation UVA, l'utilisation du mélange de photocatalyseurs ne modifie pas sensiblement l'efficacité de décontamination sur *L.pneumophila* puisqu'on obtient aussi des P_v de l'ordre de 6 %. Par contre, on note une différence significative entre les tests effectués sans activation lumineuse : les effets biocides de l'argent ont donc un impact positif sur les zones sous-illuminées puisque, même sans activité photocatalytique, la présence d'argent permet de réduire de 50 % à 75% la probabilité des légionelles de ressortir vivantes du réacteur. On serait donc en droit de se demander s'il ne serait pas plus simple d'utiliser ce substrat tridimensionnel sans activation UVA puisqu'on s'affranchirait alors des problèmes d'illumination tout en économisant les dépenses énergétiques, d'autant que nous avons déjà mentionné l'existence d'un tel procédé pour la désinfection de l'eau. En fait, l'eau permet déjà aux ions argent de diffuser facilement jusqu'aux bactéries, tout en assurant un nettoyage de la surface en continu alors que dans le cas du traitement de l'air, un tel type de réacteur risquerait de voir son efficacité diminuer très rapidement avec le dépôt de poussières ou la formation d'un film gras qui limiteraient la diffusion. Ainsi, il faut bien considérer que l'ajout d'argent dans notre réacteur n'a pas pour but de décontaminer l'air, mais uniquement de rendre impropre à la prolifération de microorganismes dans les zones faiblement actives photocatalytiquement.

Remarquons qu'il peut sembler paradoxal que l'efficacité globale sous activation UVA ne soit pas supérieure du fait de la présence d'argent. En effet, ce phénomène peut indiquer que le principal facteur limitant l'efficacité du procédé de décontamination est le transfert de matière, et pas la capacité du photocatalyseur à inactiver les microorganismes, comme le confirment les tests effectués sur *L.lactis* (Gram+) qui conduisent à des abattements similaires. Ceci peut justifier *a posteriori* le choix d'axer le développement du dispositif de décontamination sur la géométrie du réacteur plus que sur le photocatalyseur.

Les expériences portant sur *M.smegmatis* (mycobactéries) dénotent un abattement moins important que pour les autres microorganismes étudiés ($P_v = 15$ %). On peut y voir une sensibilité moindre à la photocatalyse des mycobactéries qui possèdent effectivement une membrane particulièrement résistante (Carson, Petersen *et al.* 1978). De plus, on peut attribuer en partie cette efficacité moins élevée au fait qu'il est particulièrement difficile d'obtenir des suspensions homogènes avec *M.smegmatis*, car ce microorganisme se multiplie en formant des amas. Ceux-ci traversent plus facilement le réacteur, les bactéries situées au centre étant protégées. On pourrait considérer que ceci pourrait s'avérer problématique en situation réelle, comme c'est le cas avec les légionelles qui sont parfois protégées à l'intérieur

d'amibes. Cependant, ce genre de situation n'est pas très problématique dans le cas du traitement de l'air, car les amas lourds ne se maintiennent pas longtemps en suspension, et ne représentent donc pas un risque infectieux important.

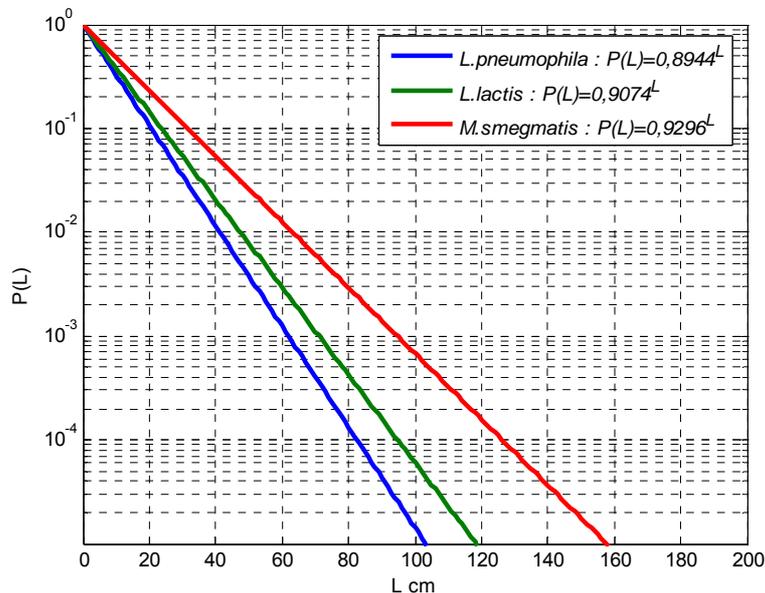


Figure 101. Probabilité $P(L)$ de survie des différents microorganismes en fonction de la longueur de réacteur traversée L . (Réacteur garni du média tridimensionnel recouvert du mélange mécanique $Ag (1 \%m) /TiO_2 - 90 \%m(TiO_2)$ de catalyseurs sous forme pulvérulente à $5 m^3.h^{-1}$).

La figure 101 montre en effet que bien que les mycobactéries semblent moins affectées par le procédé photocatalytique, il est aussi possible d'obtenir un très bon niveau de décontamination en adaptant la longueur du réacteur garni. Ainsi, pour *M.smegmatis*, une longueur de réacteur de 1,2 m est en théorie suffisante pour obtenir un abattement de 4 log en sortie de réacteur, alors qu'il suffit d'une longueur de 80 cm pour *L.pneumophila* et d'un peu moins d'un mètre pour *L.lactis* pour atteindre la même valeur en un passage.

Cette partie a donc pu montrer la façon dont nous avons mis au point un garnissage tridimensionnel photocatalytique très efficace, permettant d'augmenter la surface interne d'un réacteur à raison de $3 cm^2/cm^3$. Cette mousse photocatalytique est de plus aisément dimensionnable et relativement peu onéreuse, à la fabrication comme à l'utilisation (pour un réacteur de 100 cm consommant 32 W, le coût journalier en fonctionnement continu n'est que de 0,085 €, avec un prix du kWh de 0,11 €). De plus, elle possède une très bonne tenue mécanique et ne provoque des pertes de charge que de quelques millibars.

Enfin, nous avons aussi pris en compte le fait que le vieillissement de ce média en conditions réelles pouvait comporter le risque de voir notre solution se transformer en problème. Ainsi, l'ajout d'argent permettrait d'éviter l'établissement d'une flore bactérienne à l'intérieur même du réacteur à long terme.

VI TRANSFERT ET APPLICABILITÉ EN CONDITIONS RÉELLES

Les travaux présentés lors de cette thèse ont conduit à la mise au point de systèmes de décontamination photocatalytique efficaces, mais de caractéristiques très variées, rendant leurs comparaisons délicates. En effet, il a été nécessaire de faire varier simultanément plusieurs paramètres (dimensions, débit, quantité de photocatalyseur, mode de dépôt, mode de fonctionnement, énergie consommée...), et ce, dans le but d'obtenir très rapidement des dispositifs efficaces, puisqu'il n'était pas envisageable de procéder à des optimisations paramétriques successives, beaucoup trop coûteuses en temps à la vue de la lourdeur des tests photocatalytiques impliquant des microorganismes aérosolisés. Cependant, il est nécessaire de pouvoir premièrement réaliser ces comparaisons d'efficacité entre les différents dispositifs, et bien sûr, de pouvoir prévoir leurs efficacités en utilisation dans des conditions réelles, c'est-à-dire soit dans le cas du traitement d'un effluent en un passage unique, à haut débit, soit en mode « recirculation », dans des volumes importants, ce qui sera l'objet de la première partie de ce chapitre.

Nous allons ainsi essayer, dans la suite de ce chapitre, de dégager les paramètres de comparaison les plus appropriés afin de pouvoir comparer au mieux les résultats issus de réacteurs de types très différents.

I Comparaison des différents systèmes en recirculation

Cette partie va s'attacher à extrapoler les efficacités et les performances des différents dispositifs en conditions réelles d'utilisation. Pour ce faire, nous allons commencer par considérer le mode de fonctionnement en recirculation, en utilisant un modèle simpliste qui consiste à ne tenir compte que du nombre de passages horaires dans le réacteur. Ensuite, nous tiendrons compte de l'effet de dilution en système fermé, lequel devient évidemment d'autant

plus significatif que le volume à traiter est important (Fig. 102). Enfin, nous traiterons le cas - plus simple - de l'utilisation en fonctionnement continu, c'est à dire en un passage unique, des différents réacteurs développés, ce qui correspond par exemple à l'insertion d'un système dans une ventilation préexistante.

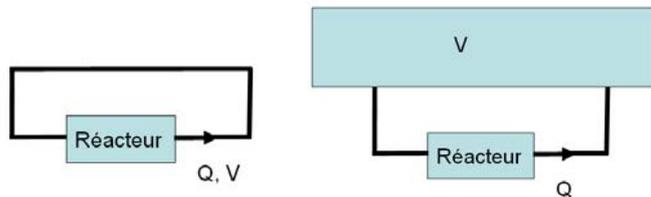


Figure 102. Modèles de complexité croissante utilisés pour extrapoler les performances des différents dispositifs (en mode « recirculation ») en conditions réelles.

N.B. Les valeurs numériques sont indiquées abusivement avec 4 chiffres significatifs afin de permettre le suivi des calculs.

I 1 Performances en recirculation sans effet de dilution

La partie bibliographique faisant état de l'art concernant les dispositifs de traitement de l'air a permis de montrer qu'il existe déjà de nombreuses techniques, validées et utilisées de façon courante. Ainsi, bien que la photocatalyse possède de nombreux avantages par rapport à ces dispositifs, l'utilisation massive de dispositifs basés sur cette technologie ne pourra réellement commencer que s'ils sont économiquement concurrentiels et s'inscrivent dans une logique d'écoprocédé ! En effet, si certaines applications ont comme objectif premier un air de très haute qualité microbiologique, et ce, sans considération pécuniaire majeure (« salles blanches », salles d'opération...), la plupart des utilisations de dispositifs « d'assainissement d'air » bénéficient d'un budget limité. De plus, s'agissant d'une technologie se voulant « écologique », les dispositifs doivent utiliser l'énergie de façon optimale.

Réacteurs « linéaires »

Concernant les réacteurs linéaires, deux approches complémentaires sont possibles à leurs utilisations :

- un dimensionnement dans la longueur, qui revient à considérer la **mise en série de plusieurs réacteurs**, et ce, afin d'obtenir un abattement très élevé, mais pour un débit limité (i.e. $5 \text{ m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$).

- une **mise en parallèle de réacteurs**, chacun fonctionnant à son débit nominal (i.e. $5 \text{ m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$), assurant ainsi un débit total plus élevé.

Bien évidemment, une combinaison série-parallèle est tout à fait intéressante puisque cela permet d'ajuster efficacité et débit, ce dernier devant être, selon le Conseil National de Recherches du Canada, d'au moins 0,5 fois le volume de la pièce par heure (CRNC « Solution constructive n° 14 », 1998).

Nous avons déjà montré que les réacteurs « linéaires » étaient très facilement dimensionnables, en ajustant simplement la longueur de ces réacteurs (réacteur « paillason », réacteur « torsadé », réacteur « garni » du média tridimensionnel). En effet, on peut obtenir à partir de la probabilité de survie mesurée lors des expériences avec un réacteur de longueur L_r , la probabilité $P(l)$ de survie d'une bactérie après la traversée d'une unité de longueur de réacteur :

$$P(l(\text{cm})) = P(L_r) \frac{l(\text{cm})}{L_r(\text{cm})}$$

Cette donnée permet alors de dimensionner facilement le réacteur en longueur L exprimée ici en cm, en fonction des besoins (les autres paramètres dimensionnels demeurant évidemment inchangés) (Tab. 25) :

$$P(L(\text{cm})) = P(l(\text{cm})) \frac{L(\text{cm})}{l(\text{cm})} = P(L_r(\text{cm})) \frac{L(\text{cm})}{L_r(\text{cm})}$$

On obtient donc pour les trois réacteurs « linéaires » la probabilité de survie après avoir traversé un réacteur de longueur L (cm) (Fig. 103) :

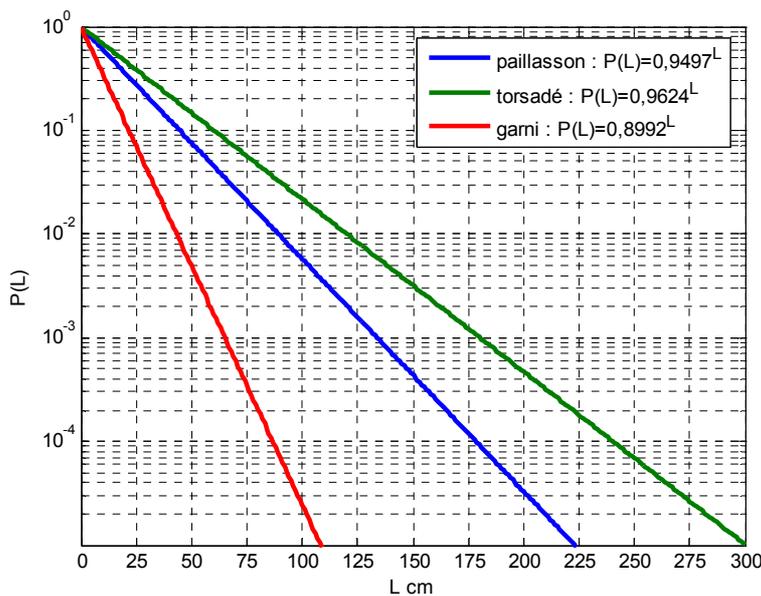


Figure 103. Probabilité $P(L)$ de survie d'une légionelle en fonction de la longueur L (cm), et du type de réacteur traversé, à $5 \text{ m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$.

Par contre, ce type de dimensionnement n'est pas possible pour le réacteur de type « tangentiel », puisque celui-ci constitue une unité de décontamination qui ne possède pas de dimension caractéristique. Ainsi, afin de faciliter leur comparaison, nous avons décidé de placer tous les dispositifs à consommation énergétique équivalente à celle du « réacteur tangentiel » en configuration « double ventilateur », soit 41,4 W. Pour ce faire, nous avons rapporté la puissance d'énergie consommée (8 W) à la longueur respective de chaque réacteur linéaire (Tab. 25).

Il s'agit en quelque sorte d'une correspondance longueur-puissance, mais pas d'une normalisation en puissance pour une même longueur. Il faut donc bien voir que l'on considère des tranches identiques de réacteurs, lesquelles sont activées avec une irradiance égale à celle des expériences. Ceci permet simplement d'obtenir des réacteurs de même puissance électrique, c'est-à-dire représentant le même coût énergétique.

Réacteur « tangentiel »

Une autre difficulté à la comparaison des différents réacteurs vient du fait que certains ont été testés en mode « one pass », alors que le réacteur « tangentiel » en configuration « double ventilateur » a été testé en mode « recirculation ». Il est donc nécessaire d'établir la probabilité de survie d'une légionelle en sortie de réacteur après un seul passage. On peut approcher cette valeur, comme nous l'avons déjà montré (Fig. 64, Chp. IV § II), en considérant qu'à un débit Q donné, le nombre de passages n d'une bactérie à travers le réacteur est lié au volume V à décontaminer, et à la durée du traitement t :

$$n = \frac{tQ}{V}$$

Ainsi, puisque nous avons obtenu une probabilité de survie de 16 % après 30 min de traitement du bioaérosol de légionelles à $140 \text{ m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$ dans une hotte de 800 L (Tab. 17, Chp. IV § II 1), on obtient pour un unique passage une probabilité de survie de $P(n=1)=0,9793$.

Notons aussi que pour tenir compte du fait que le réacteur tangentiel en configuration « simple ventilateur » ne consomme que 32,7 W, nous avons ajusté la probabilité de survie en sortie de ce réacteur P à :

$$P(41,4W) = P(32,7W) \left(\frac{41,4W}{32,7W} \right)$$

Ceci revient **conceptuellement** à considérer que ce réacteur est dimensionnable par unité de puissance électrique, à l'instar de la longueur pour les réacteurs linéaires. Ceci est

évidemment discutable, mais permet de placer tous les réacteurs testés à même échelle de consommation électrique.

Comparaison des dispositifs (ajustement des réacteurs linéaires en longueur)

Réacteur	Débit (m ³ /h)	Longueur du réacteur de test L _r (cm)	Puissance électrique (W)	Probabilité de survie en sortie Ps pour un passage lors des tests	Probabilité de survie Ps(1) par unité de longueur L	Longueur équivalente L (cm) pour 41,4W	Probabilité de survie Ps(41,4W)
Paillason	5	30	8/30 par cm	0,1995	0,9497	155	2,389E-04
Torsadé	5	30	8/30 par cm	0,3162	0,9624	155	2,606E-03
Garni	5	26	8/26 par cm	0,0631	0,8992	135	6,185E-07
Tangentiel (1)	5	-	32,7 par réacteur	0,0631	-	-	3,025E-02
Tangentiel (2)	140	-	41,4 par réacteur	0,9793	-	-	9,793E-01

Tableau 25. Comparatif des performances sur *L.pneumophila* des différents dispositifs testés, selon les conditions des tests, après ajustement à une puissance électrique de 41,4 W. Les réacteurs « linéaires » ont été dimensionnés selon une optique d'abattement élevé, i.e. en série.

On constate que pour une même dépense énergétique, le réacteur muni du garnissage tridimensionnel est de loin le plus efficace en un passage, le réacteur tangentiel fonctionnant à son débit maximal présentant l'abattement en un passage le plus faible (Tab. 25). Cependant, il ne faut pas oublier que ces valeurs sont des extrapolations, ce qui impose de s'attarder plus sur les **tendances relatives** dégagées par ces calculs que sur les valeurs numériques. De même, il convient de voir que dans le cas du réacteur tangentiel, près de la moitié de la puissance électrique est dédiée à la mise en mouvement du flux. De ce fait, il est aussi possible et justifié de placer les différents systèmes à même échelle, en ne tenant compte que de la consommation électrique vouée à la production de lumière, soit 24 W, après recalcul des longueurs équivalentes à cette puissance (Tab. 26).

Réacteur	Longueur L (cm) pour 24W	Probabilité de survie pour Ps(24W)
Paillason	90	7,950E-03
Torsadé	90	3,177E-02
Garni	78	2,516E-04
Tangentiel (1)	-	6,310E-02
Tangentiel (2)	-	9,793E-01

Tableau 26. Comparatif des performances sur *L.pneumophila* des différents dispositifs testés, selon les conditions des tests, après ajustement à une puissance électrique de 24 W, avec une disposition en série.

Néanmoins, cet ajustement à 24 W ne modifie pas les tendances générales puisqu'on observe aussi que le réacteur muni du garnissage photocatalytique possède le meilleur abattement en un passage, et ce, pour une longueur légèrement inférieure.

Ainsi, en supposant **un déplacement en « paquet » des bactéries**, il est possible de déterminer la probabilité de survie d'une légionelle en fonction de la durée de traitement, des

caractéristiques du réacteur, et du volume à traiter. Les figures 104 et 105 présentent un exemple des résultats attendus, selon ce **modèle simpliste**, pour un volume de 10 m^3 , traités soit avec les réacteurs tels que nous les avons testés (mêmes dimensions, même débit), soit en tenant compte de leurs consommations énergétiques respectives. Les figures 106 à 108 présentent les résultats obtenus pour une gamme de volume à traiter variant de 2 à 20 m^3 , sans puis avec ajustement en puissance électrique :

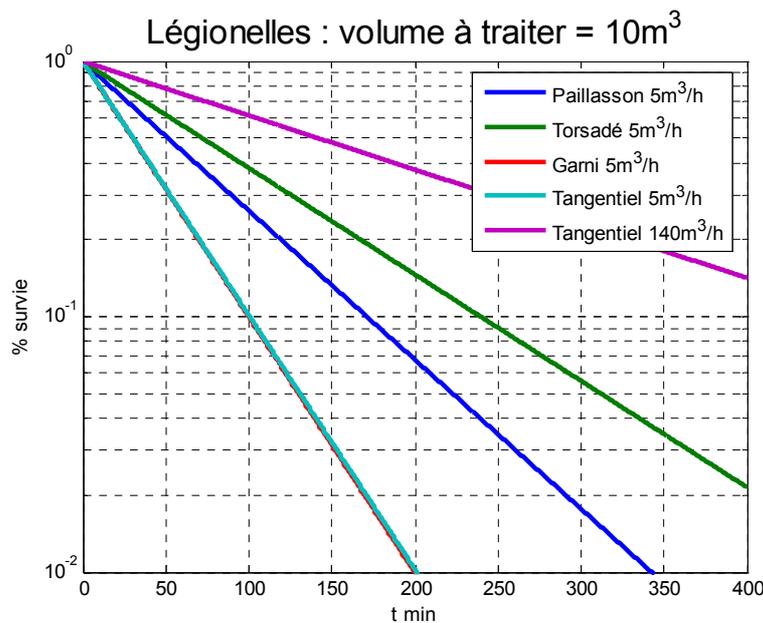


Figure 104. Probabilité de survie d'une légionelle en fonction du temps et du type de réacteur sans ajustement. Le volume considéré est arbitrairement de 10 m^3 . (N.B. les courbes pour les réacteurs garni et tangentiel à $5\text{ m}^3\cdot\text{h}^{-1}$ sont confondues).

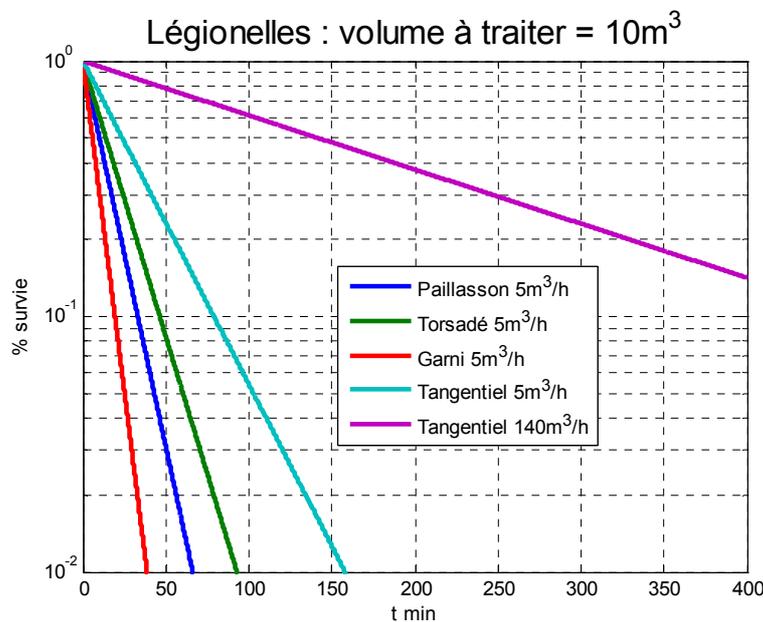


Figure 105. Probabilité de survie d'une légionelle en fonction du temps et du type de réacteur (ajustement à une puissance de 41,4 W, en série ou en parallèle*). Le volume considéré est arbitrairement de 10 m^3 .

*Il est intéressant de remarquer qu'en négligeant les phénomènes de dilutions, la disposition de K réacteurs en série ou en parallèle n'a pas d'influence sur le temps mis pour décontaminer un même volume V , sous réserve que l'efficacité pour une configuration en parallèle, bien qu'inférieure à celle obtenue avec la mise en série des K réacteurs, soit compensée par un débit plus élevé. En effet :

- la mise en **série** de K réacteurs de longueur unitaire L_r conduit à une probabilité de survie en sortie, après n passages à $Q=5 \text{ m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$, à la relation :

$P(n, L=(KL_r))=P(n, L=1)^{KL_r}=P(n=1, L=1)^{n(KL_r)}$. Du fait que $n=tQ/V$, on obtient :

$$P(n, L=KL_r) = P(n=1, L=1)^{tQKL_r/V}$$

- la mise en **parallèle** de K réacteurs de longueur L_r conduit à une probabilité de survie en sortie de réacteur, et après n passages à $Q'=KQ=K \times 5 \text{ m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$, à la relation :

$P(n, L=L_r)=P(n, L=1)^{L_r}=P(n=1, L=1)^{nL_r}$. Comme $n=t(KQ)/V$, on arrive aussi à l'équation :

$$P(n, L=L_r)=P(n=1, L=1)^{tKQL_r/V}$$

Probabilité de survie d'une légionelle en fonction du temps, du type de réacteur et du volume à traiter (sans ajustement)

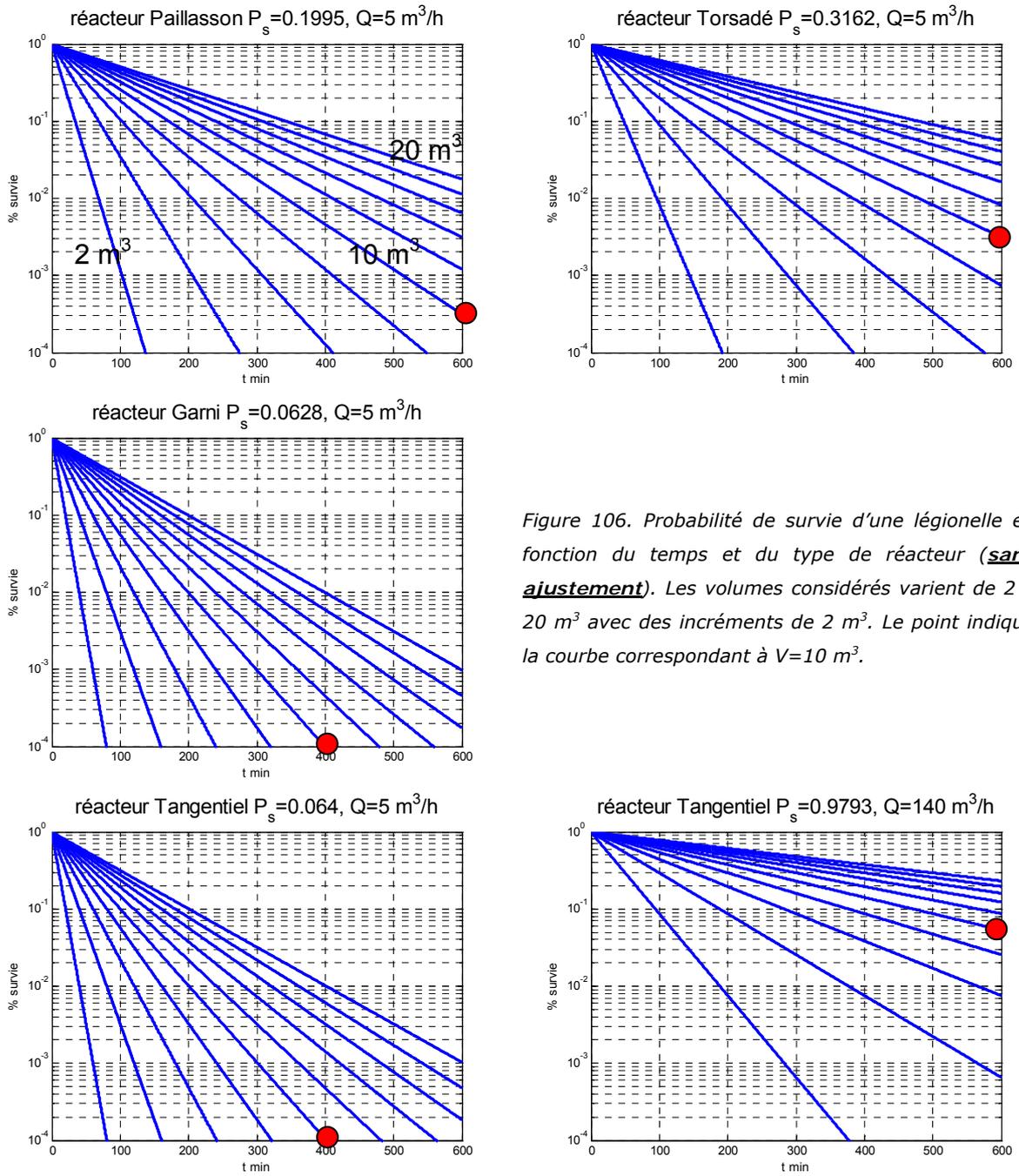


Figure 106. Probabilité de survie d'une légionelle en fonction du temps et du type de réacteur (sans ajustement). Les volumes considérés varient de 2 à 20 m^3 avec des incréments de 2 m^3 . Le point indique la courbe correspondant à $V = 10 \text{ m}^3$.

Probabilité de survie d'une légionelle en fonction du temps, du type de réacteur, et du volume à traiter (ajustement à une puissance de 41,4 W, en série ou en parallèle)

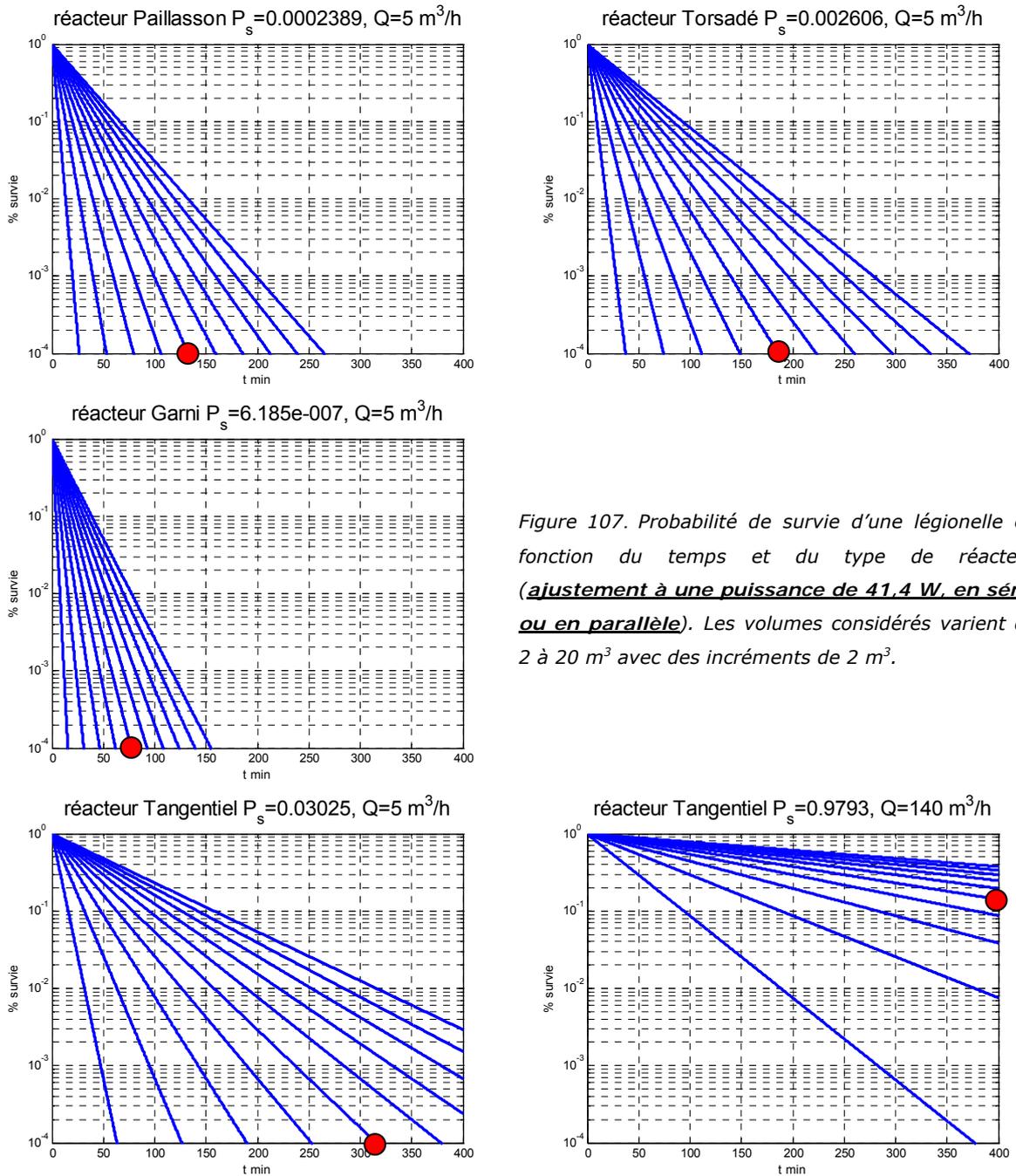


Figure 107. Probabilité de survie d'une légionelle en fonction du temps et du type de réacteur (ajustement à une puissance de 41,4 W, en série ou en parallèle). Les volumes considérés varient de 2 à 20 m³ avec des incréments de 2 m³.

Probabilité de survie d'une légionelle en fonction du temps, du type de réacteur et du volume à traiter (ajustement à une puissance de 24 W, en série ou en parallèle)

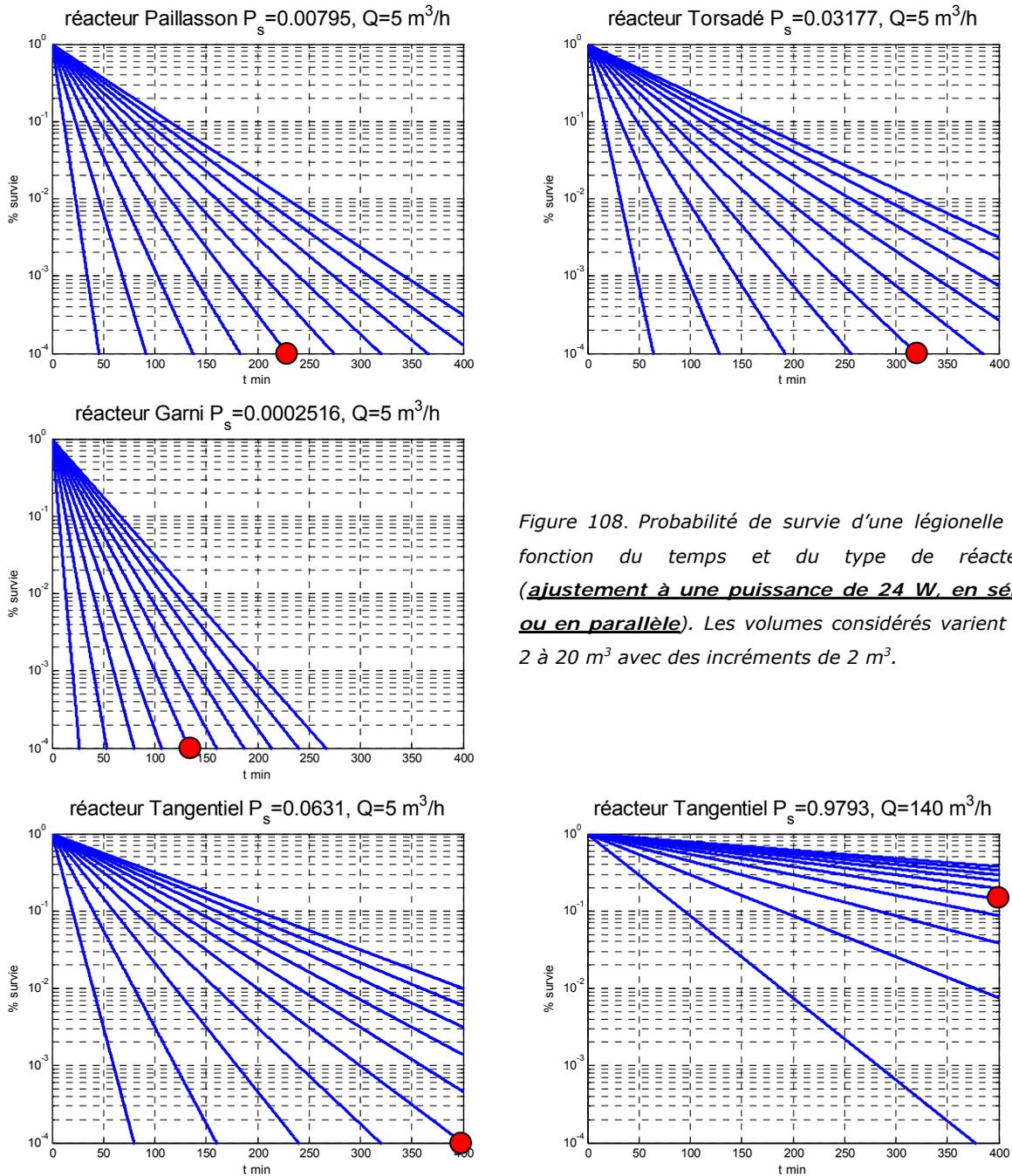


Figure 108. Probabilité de survie d'une légionelle en fonction du temps et du type de réacteur (ajustement à une puissance de 24 W, en série ou en parallèle). Les volumes considérés varient de 2 à 20 m³ avec des incréments de 2 m³.

On constate que si l'on ne prend pas en compte les considérations énergétiques, les deux réacteurs qui se distinguent par leur rapidité de décontamination sur *L.pneumophila* sont le réacteur garni, et le réacteur tangentiel. Par contre, ce dernier présente selon cette modélisation simpliste une efficacité moindre lorsqu'il fonctionne en configuration « double

ventilateur » à son débit maximal ($140 \text{ m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$). Ainsi, en considérant les résultats obtenus (Fig. 107), il peut sembler paradoxal que le réacteur « tangentiel » ait été développé plutôt que les autres. Il est donc nécessaire de préciser que les travaux consacrés à la mise au point de ce dispositif ont eu pour but de mettre au point un système de décontamination auto-entraîné de l'air à l'intérieur d'ambulances et fonctionnant à très haut débit. De ce fait, d'autres contraintes ont dû être prises en compte. Tout d'abord, l'espace disponible étant extrêmement restreint, seul un dispositif de taille restreinte est envisageable (volume maximal=8 L, longueur maximale=20 cm, largeur maximale=30 cm, épaisseur maximale=15 cm). De plus, le fait que le flux de sortie doive impérativement être dirigé vers les parois de l'ambulance, et non pas vers le patient, nous a fait privilégier une aspiration ascendante. Enfin, du fait de l'ouverture fréquente des portes, il nous a paru préférable d'avoir un fort débit d'aspiration au dessus du patient afin d'y créer une zone protectrice dans laquelle les microorganismes recirculent et sont inactivés. Notons que des travaux sont en cours sur la modélisation des flux dans des volumes fermés et semi-fermés. Pour ces raisons, ce réacteur autonome et à débit variable répond à un cahier des charges bien particulier, et sera donc traité séparément des autres réacteurs, lesquels sont plus destinés à être insérés dans des systèmes de ventilation existants.

Cependant, tous les calculs présentés dans ce paragraphe ne tiennent compte ni des phénomènes de dilution du flux de sortie du réacteur dans la zone à traiter, ni de considérations sur le transport de matière. Nous allons donc présenter dans le paragraphe suivant un modèle un peu plus complexe incluant les phénomènes de dilution, lesquels prennent d'autant plus d'importance que le volume à traiter est grand.

II 2 Performances en recirculation avec effet de dilution

Les résultats présentés au paragraphe précédent ont été établis en supposant que toutes les bactéries passaient un même nombre de fois à travers le réacteur. Il est évident que cette hypothèse simpliste ne reflète pas les conditions réelles d'utilisation. Nous allons donc tenir compte dans cette partie du volume de la pièce à traiter, en ajoutant au modèle précédent les phénomènes de dilution (Fig. 109).

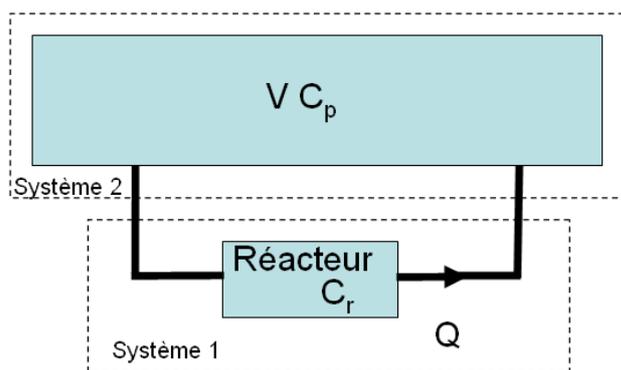


Figure 109. Schéma du modèle employé pour tenir compte des effets de dilutions lors de la décontamination d'un volume V . Le bilan de matière sur les bactéries vivantes s'écrit de façon générale dans chaque système :

Bactéries vivantes entrant dans le système = Bactéries vivantes sortant du système + Bactéries inactivées + Variation de la quantité de bactéries vivantes présentes dans le système

Afin de pouvoir tenir compte de ces phénomènes de dilution, nous supposons par la suite que **les concentrations en bactéries vivantes sont homogènes à l'intérieur de chaque système** (« réacteur parfaitement agité »). Si cette hypothèse peut être facilement admise pour un système soumis à un brassage intensif comme c'est le cas avec le réacteur tangentiel, elle devient moins évidente dans le cas des réacteurs « linéaires » pour lesquels on attendrait *a priori* un comportement plus proche d'un réacteur de type « piston », c'est-à-dire dans lequel la concentration diminue au fur et à mesure de la traversée du réacteur. Cependant, du fait de la **recirculation intégrale** du flux, un réacteur piston « idéal » est équivalent à un réacteur de type « parfaitement agité » (Villermaux 1994). Ainsi, moyennant cette hypothèse d'homogénéité, on peut établir les bilans de matière sur les bactéries vivantes pendant un instant dt (Fig. 109) :

- pour le réacteur : $QC_p \cdot dt = QC_r \cdot dt + dn_r + R_r \cdot dt$
- pour la pièce à décontaminer : $QC_r \cdot dt = QC_p \cdot dt + dn_p + R_p \cdot dt$

Avec :

- C_r et C_p , les concentrations en bactéries vivantes à l'intérieur du réacteur et dans la pièce à décontaminer.
- n_r et n_p , les quantités instantanées de bactéries vivantes présentes à l'intérieur du réacteur et dans la pièce à décontaminer ($n = CV$, donc $dn = VdC + CdV$, soit en fait $dn = VdC$ car on est à volume réactionnel constant).
- V_r et V_p , les volumes du réacteur et de la pièce à décontaminer.
- R_r et R_p , les vitesses d'abattement à l'intérieur du réacteur et dans la pièce à décontaminer.
- Q , le débit du réacteur.

- P_s , la probabilité de survie d'une bactérie en sortie de réacteur après un seul passage.

On peut exprimer les vitesses de décontamination avec une cinétique du premier ordre (par rapport aux bactéries vivantes) :

- $R_r = V_r k_r C_r$ et $R_p = V_p k_p C_p$, avec k_r et k_p les constantes cinétiques de la décontamination à l'intérieur du réacteur et dans la zone à traiter.

L'abattement dans le volume à traiter correspond à la baisse naturelle de la viabilité, due notamment à la dessiccation. En toute rigueur, ce phénomène se produit aussi à l'intérieur du réacteur, mais il est clair qu'il est négligeable devant la décontamination photocatalytique et nous ne l'avons pas pris en compte non plus dans la pièce à traiter puisque nous avons corrigé les probabilités de survie en sortie de réacteur avec les valeurs obtenues lors des tests blancs (*i.e.* $k_p = 0 \cdot \text{h}^{-1}$ dans la pièce à traiter).

La vitesse de décontamination photocatalytique peut aussi s'exprimer directement avec P_s , en remarquant que la quantité de bactéries inactivées est alors proportionnelle à C_p , et non pas à C_r comme dans le cas d'une approche cinétique pour laquelle on considère que la réaction se produit à l'intérieur du réacteur. En effet, l'approche statistique utilisant P_s relie directement la proportion de bactéries vivantes entre l'entrée et la sortie du réacteur. Ainsi :

$$R_r = V_r k_r C_r = Q(1 - P_s) C_p$$

En nommant τ_r et τ_p les temps de passage respectifs dans le réacteur et dans la pièce à traiter, les bilans de matière s'écrivent finalement :

- pour le réacteur : $1/\tau_r (C_r - P_s C_p) = d C_r / dt$
- pour la pièce à décontaminer : $1/\tau_p (C_r - C_p) = d C_p / dt$

Ce système d'équations différentielles ne présentant pas de solutions littérales simples du fait de la non-permanence du régime, les solutions vont être présentées uniquement graphiquement (logiciel Matlab 7.0).

Les conditions initiales sont $C_p(0) = C_r(0) = I$, et les variables nécessaires à la résolution du système sont : Q , P_s , V_p et V_r . En fait, le volume du réacteur influe très peu sur les résultats obtenus puisqu'il est largement inférieur à celui de la pièce à traiter, c'est-à-dire que la quantité de bactéries présente dans le réacteur est toujours très faible en comparaison à celle contenue dans les deux systèmes. Ainsi, que l'on pose, par exemple, $V_r = 1 \text{ L}$ ou $V_r = 100 \text{ L}$, les résultats ne diffèrent que très faiblement (pour la suite, on pose $V_r = 1 \text{ L}$).

Les figures 110 à 111 présentent les abattements obtenus avec cette modélisation, et ce, en fonction de la durée du traitement et des différentes configurations possibles décrites au paragraphe précédent. Les volumes à traiter varient de 2 à 20 m³, avec des incréments de 2 m³ (valeurs de Q et de P_s : Tab. 27).

Dans un premier temps, nous allons montrer quels sont les résultats obtenus avec les réacteurs expérimentaux (Fig. 110), puis en ajustant les réacteurs à même puissance (41,4 W), soit en série (Fig. 111), soit en parallèle (Fig. 112). Contrairement au modèle précédent, le fait d'inclure les phénomènes de dilution nous oblige à distinguer le cas d'une disposition en série de celui d'une disposition en parallèle. En effet, dans le cas d'une mise en série, on considère un débit de 5 m³.h⁻¹, et ce, quel que soit le nombre de réacteurs mis en série, puisque nous ne pouvons pas extrapoler les abattements obtenus à 5 m³.h⁻¹ à des débits plus élevés. Par contre, pour une mise en parallèle, on considère que chaque réacteur fonctionne à son débit nominal de 5 m³.h⁻¹, de sorte que le débit total du groupe de réacteurs est augmenté (Tab. 27).

Réacteur	Débit (m ³ /h)	Longueur du réacteur Lr (cm)	Probabilité de survie en sortie Ps(Lr)	Consommation électrique par réacteur (W)	Nombre de réacteurs pour 41,4W	Débit traité (m ³ /h) pour 41,4W
Paillason	5	30	0,1995	8	5,175	25,9
Torsadé	5	30	0,3162	8	5,175	25,9
Garni	5	26	0,0631	8	5,175	25,9
Tangentiel (1)	5	-	0,0631	32,7	1,266	6,3
Tangentiel (2)	140	-	0,9793	41,4	1	140,0

Tableau 27. Caractéristiques des réacteurs pour un ajustement à même puissance avec une disposition en **parallèle** des réacteurs « linéaires », chaque réacteur pouvant traiter un débit de 5 m³.h⁻¹.

Probabilités de survie d'une légionelle, en fonction de la durée de traitement et du volume de la pièce, avec les mêmes réacteurs et aux mêmes débits que lors des tests (i.e. sans ajustement), en tenant compte des effets de dilution

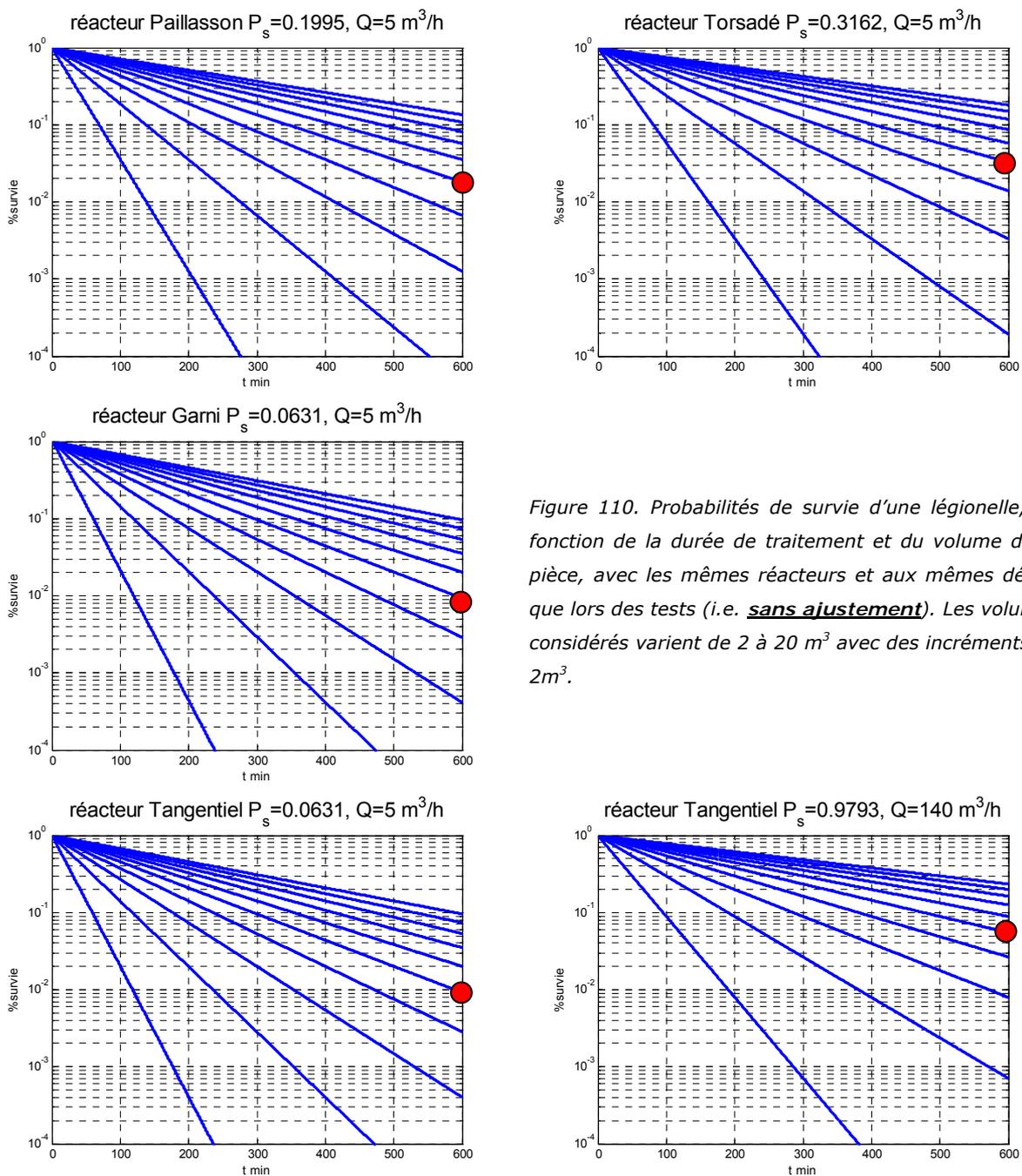


Figure 110. Probabilités de survie d'une légionelle, en fonction de la durée de traitement et du volume de la pièce, avec les mêmes réacteurs et aux mêmes débits que lors des tests (i.e. sans ajustement). Les volumes considérés varient de 2 à 20 m³ avec des incréments de 2m³.

La figure 110 présente les abattements obtenus - sans ajustement - en fonction de la durée de traitement, en extrapolant simplement les résultats obtenus avec chaque réacteur, mais en tenant compte de l'effet de dilution. Il apparaît que les différences sont très faibles, même

pour un volume à traiter très faible (2 m^3), et ce, malgré les différences importantes d'efficacité entre les différents dispositifs. En fait, ceci est dû aux phénomènes de dilution qui limitent le procédé de décontamination, et ce, d'autant plus que le volume à traiter est important.

Probabilités de survie d'une légionelle, en fonction de la durée de traitement et du volume de la pièce, avec ajustement à 41,4 W (disposition en série, pour les réacteurs linéaires), en tenant compte des effets de dilution.

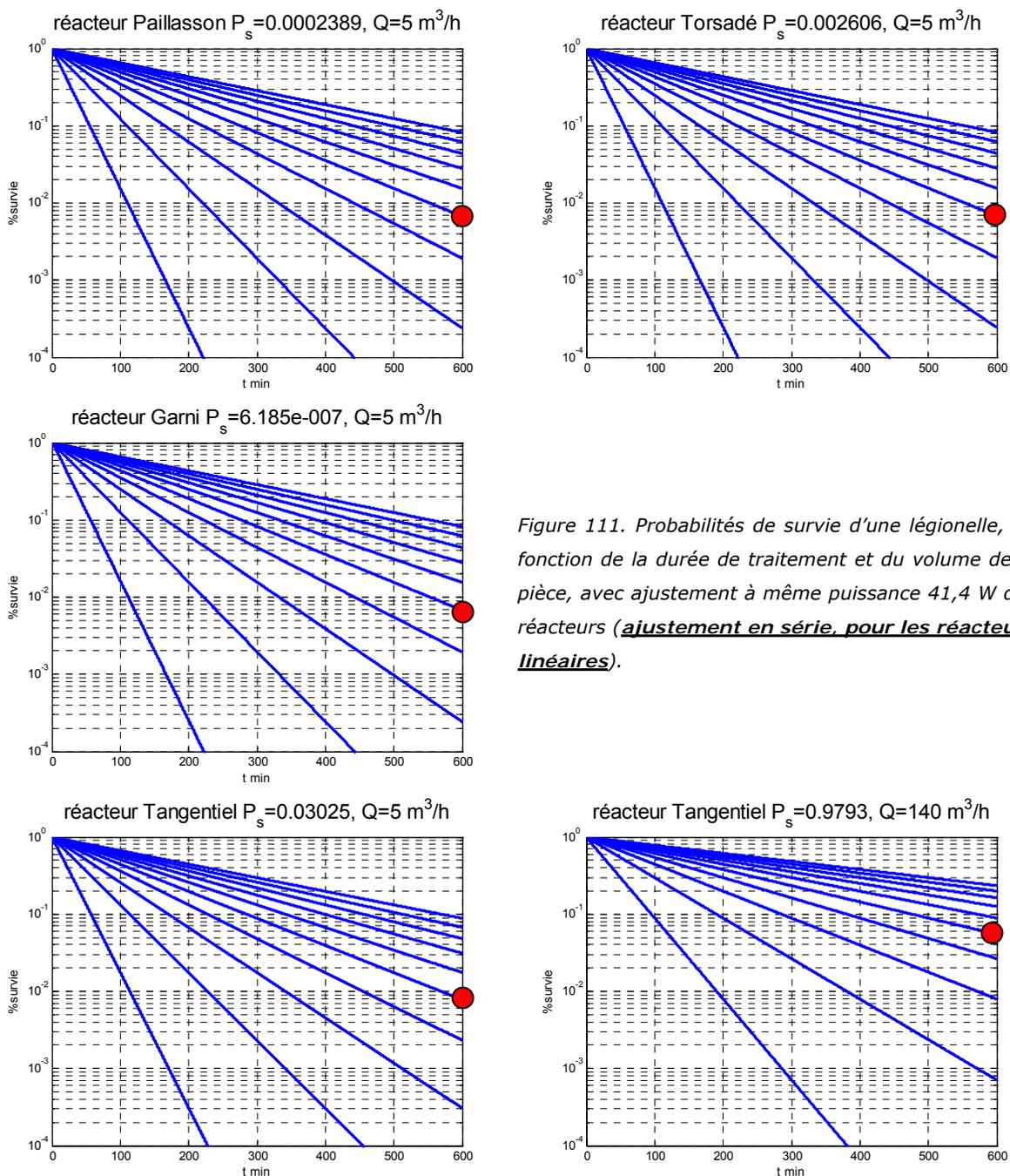


Figure 111. Probabilités de survie d'une légionelle, en fonction de la durée de traitement et du volume de la pièce, avec ajustement à même puissance 41,4 W des réacteurs (ajustement en série, pour les réacteurs linéaires).

On constate de nouveau que l'ajustement des réacteurs linéaires en longueur afin d'obtenir une puissance de 41,4 W n'entraîne pas d'amélioration notable de la vitesse de décontamination, c'est à dire de la variation instantanée de la probabilité de survie d'une légionelle (Fig. 111). De la même façon, on ne constate pas de différences notables entre les divers types de réacteur. Comme évoqué précédemment, le facteur limitant n'est pas l'efficacité du réacteur, mais son débit : même avec une probabilité de survie nulle en sortie de réacteur (i.e. le maximum théorique), on n'obtiendrait pas de décontamination plus rapide, puisque la mise en série de réacteurs revient à purger un volume important en introduisant un flux quasi stérile, mais à un débit très faible ! La figure 112 présente les résultats obtenus en disposant les réacteurs en parallèle de sorte que chacun fonctionne à un débit de $5 \text{ m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$, à même puissance totale de 41,4 W. Le débit du réacteur tangentiel en configuration « simple ventilateur » a été ajusté arbitrairement de façon linéaire avec la puissance à $6,3 \text{ m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$.

Probabilités de survie d'une légionelle, en fonction de la durée de traitement et du volume de la pièce, avec ajustement à 41,4 W (ajustement en parallèle, pour les réacteurs linéaires), en tenant compte des effets de dilution

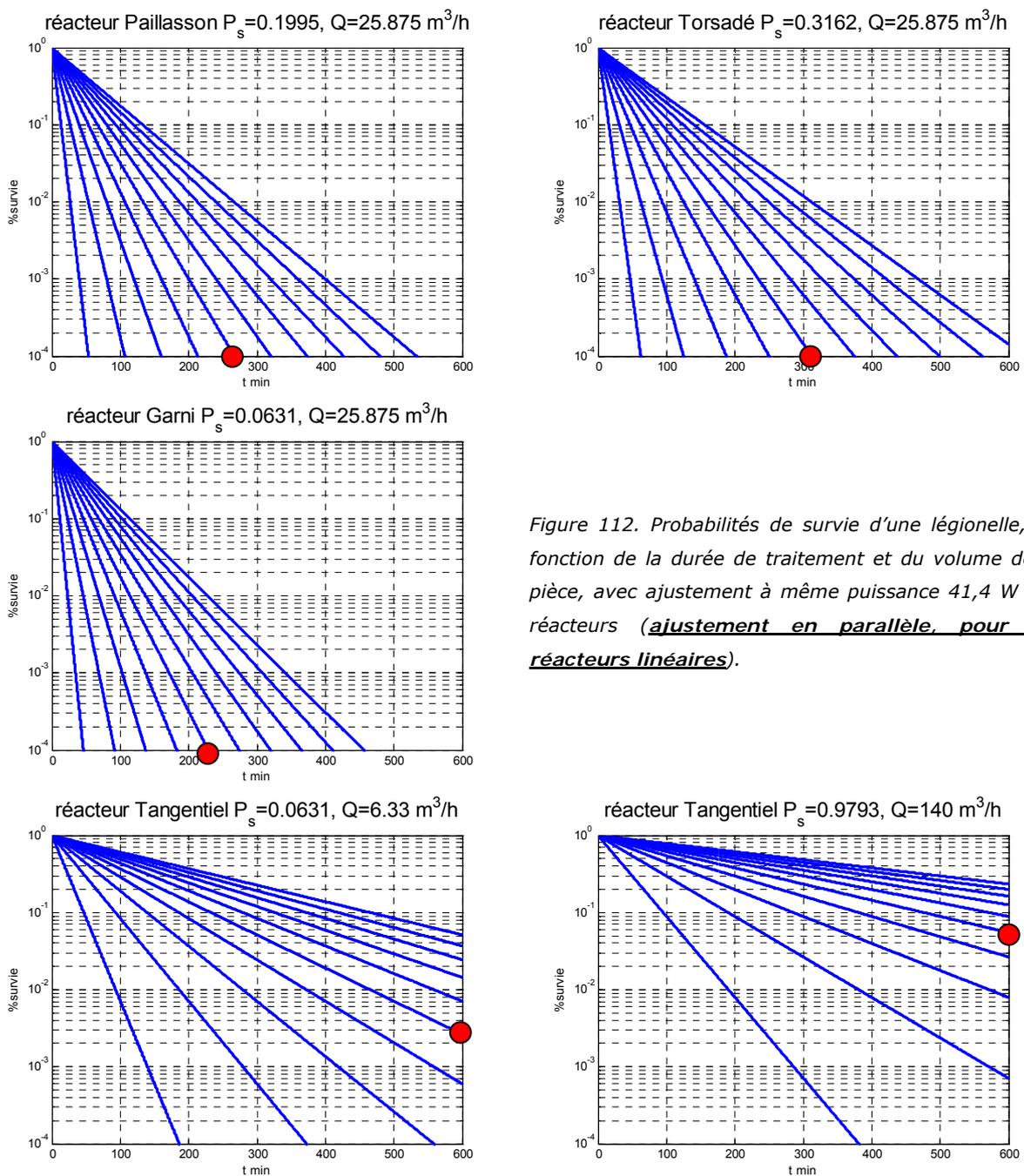


Figure 112. Probabilités de survie d'une légionelle, en fonction de la durée de traitement et du volume de la pièce, avec ajustement à même puissance 41,4 W des réacteurs (ajustement en parallèle, pour les réacteurs linéaires).

On voit donc que si l'on dispose les réacteurs en parallèle, les vitesses de décontamination sont immédiatement beaucoup plus importantes, et les différences entre les valeurs des abattements en un passage reprennent toutes leurs significations (Fig. 112).

Ainsi, cette modélisation simple, mais beaucoup plus réaliste, du comportement des différents systèmes de décontamination a permis de montrer qu'il existe une configuration optimale série/parallèle pour atteindre des performances élevées. Ainsi, il est strictement inutile de vouloir décontaminer efficacement un volume important avec un dispositif, même très efficace du point de vue de la décontamination en un passage, si celui-ci n'assure qu'une faible recirculation. À l'inverse, et de façon plus évidente, il est tout aussi vain de vouloir assainir une pièce avec un dispositif assurant certes une très bonne recirculation, mais possédant une très faible efficacité. Ainsi, pour une même dépense énergétique, la durée nécessaire pour obtenir un abattement de 1 log peut être réduite jusqu'à un facteur 4 en les disposant en parallèle (Fig. 113).

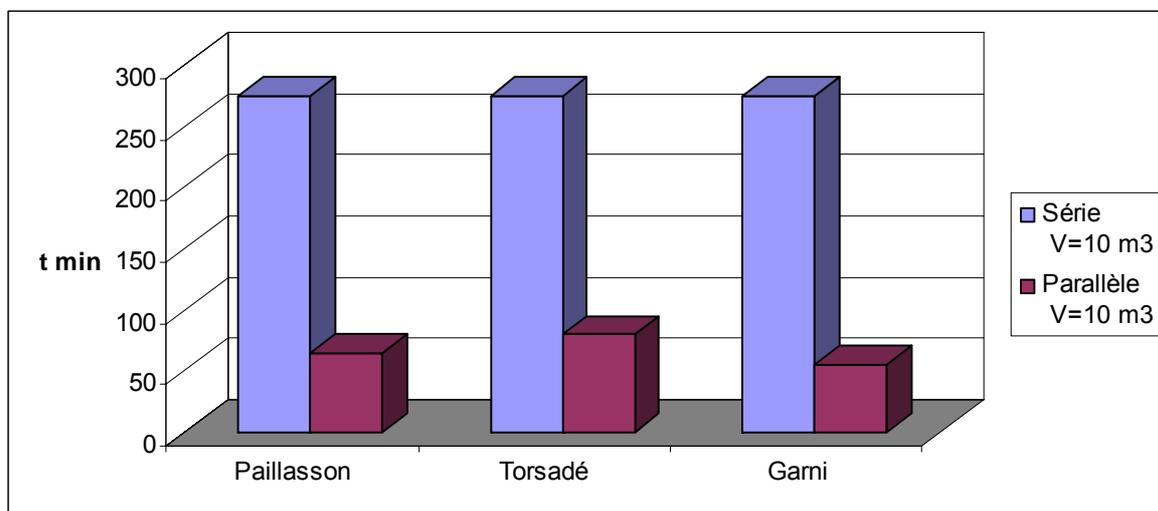


Figure 113. Durée nécessaire pour diviser le niveau de contamination par 10 dans un volume de 10 m³, avec les différents types de réacteurs linéaires. Les puissances ont été ajustées à 41,4 W et le dimensionnement a été fait soit en « série », soit en « parallèle ».

On constate que la disposition des réacteurs en parallèle fait resurgir les différences d'abattement des différents réacteurs qui étaient masquées par les effets de dilution, **le réacteur muni du garnissage tridimensionnel s'avérant être le plus efficace pour traiter un bioaérosol.**

D'un point de vue conceptuel, si l'on considère qu'une puissance électrique globale P_{el} est équivalente à une certaine longueur de réacteur L_{tot} qu'il est possible de répartir en K réacteurs de même longueur $L=L_{tot}/K$, on peut résoudre comme précédemment le système d'équation différentielle, mais en ajoutant le paramètre « disposition en K réacteurs » (Fig. 114). Ainsi,

on obtient le panel des configurations possibles entre un réacteur unique de longueur $L=L_{tot}$ (« série », $K=1$) fonctionnant à faible débit Q , mais très performant, et un réacteur « utopique » ($K=\infty$), composé d'une infinité de réacteurs de longueur $L=L_{tot}/K$ et de débit total $Q'=KQ$, assurant donc un débit très élevé, mais une décontamination peu efficace en un passage. On s'aperçoit que d'une façon générale, en recirculation, il est préférable de compenser les phénomènes de dilution par une recirculation à débit très important plutôt que d'obtenir une grande efficacité en un passage (Fig. 114). Bien sûr, le dimensionnement d'un dispositif est aussi soumis à d'autres contraintes techniques telles que la taille des tubes fluorescents, le débit maximal admissible, etc., et il existe donc en fait une gamme limitée de conformations possibles, parmi laquelle il y a un optimum à établir.

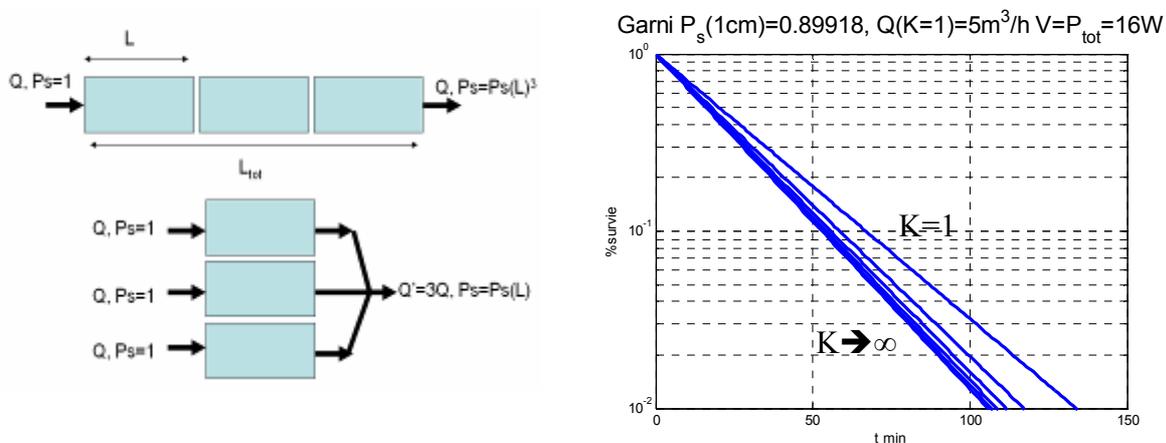


Figure 114. Exemple d'application dans le cas du réacteur garni en considérant un volume à traiter de 10 m^3 et une puissance électrique disponible de 16 W , permettant le fonctionnement d'une longueur totale L_{tot} de réacteur garni. Celle-ci peut être répartie entre K réacteur de longueur L_{tot}/K (g. exemple avec $K=3$). Ainsi, on obtient le panel des configurations possibles entre un réacteur unique (« série », $K=1$) fonctionnant à faible débit, mais très performant, et un réacteur « utopique » ($K=\infty$), composé d'une infinité de réacteurs de longueur infinitésimale, assurant donc un débit très élevé, mais une efficacité de décontamination en un passage faible. On constate que l'on tend rapidement vers une limite, mais on observe notamment qu'il est favorable de favoriser la recirculation plutôt qu'un abattement important en un passage.

Ces conclusions vont d'ailleurs dans le même sens que les observations faites lors des tests réalisés avec l'ajout de photocatalyseur modifié avec de l'argent. En effet, nous avons vu que l'abattement en un passage, sous activation UVA, ne s'en trouvait pas sensiblement amélioré, bien que les tests sans illumination montrent qu'il y a un effet bactéricide notable dû à la présence d'argent. Ceci nous a permis de considérer que l'abattement en un passage n'était pas limité par le potentiel biocide du photocatalyseur ($\text{TiO}_2\text{ P25}$), mais bien par le transfert de matière. Ceci a d'ailleurs été aussi conforté par la cinétique apparente de décontamination des

bactériophages en recirculation dans la hotte, puisque ceux-ci se sont avérés moins sensibles au procédé de décontamination que des bactéries, et ce, alors que de nombreux travaux en phase liquide indiquent le contraire (Chp. IV § II 3).

On s'aperçoit qu'il n'existe pas de solution « miracle » à la décontamination d'une pièce en recirculation et qu'il est important de bien prendre en compte, lors du dimensionnement d'un dispositif, le niveau de décontamination à atteindre, le volume à traiter, le coût énergétique, mais aussi la rapidité de la « réponse » du dispositif de décontamination à l'ajout ponctuel de biocontaminants, par exemple lors de l'ouverture d'une porte (Fig. 115). Cette réponse peut se déduire des courbes de décontamination présentées dans les différentes configurations par simples translations, sous réserve de connaître la valeur de la contamination après l'ajout de contamination venue de l'extérieur du système, ce qu'il est difficile de mesurer, mais qui peut être estimé.

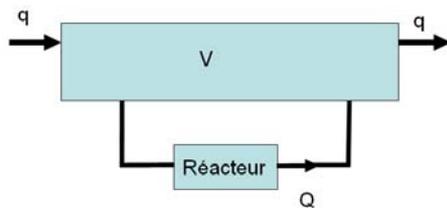


Figure 115. Schéma du système ouvert incluant des ajouts ponctuels de biocontaminants.

Enfin, on constate que, parmi les différents réacteurs testés, celui muni du garnissage permet d'obtenir les meilleures efficacités en terme de vitesse de décontamination en recirculation, et ce, rappelons-le, pour des pertes de charge minimales. Comme la mousse photocatalytique est de plus facilement dimensionnable et adaptable, il existe de nombreuses utilisations possibles, laissant ainsi le champ libre à la mise au point d'autres réacteurs originaux ! On peut de plus supposer que les pertes d'efficacité de ce garnissage liées à la diminution du temps de passage dans le réacteur seront moindres du fait de l'utilisation quasi intégrale de son volume présentant une importante surface photocatalytique, et du très bon mélangeage. La détermination expérimentale de ces pertes en fonction de la vitesse linéaire constitue la suite logique de la caractérisation de ce matériau.

Nous allons maintenant présenter les cas où les réacteurs sont utilisés en un passage, par exemple en étant inclus dans un système de ventilation préexistant.

II Comparaison des différents systèmes en un passage

La partie précédente a permis de comparer les différents dispositifs mis au point lors d'une utilisation en système fermé. Néanmoins, il peut aussi être envisagé d'utiliser un système de ventilation existant, puisque nous avons vu que les pertes de charge sont minimales pour la mousse et restent modérées pour les autres réacteurs « linéaires ».

Le dimensionnement de réacteurs fonctionnant en régime continu, c'est-à-dire où le temps n'intervient plus, est de loin plus simple que celui de réacteurs fonctionnant en régime non permanent, comme c'est le cas en mode de fonctionnement « recirculation ». En fait, nous ne traiterons ici que le cas des réacteurs linéaires, le réacteur tangentiel étant destiné à une utilisation en recirculation et, bien que les tests en un passage aient montré de bons résultats, le dispositif en configuration « simple ventilateur » reste assez différent de celui muni de deux ventilateurs.

Notons que ce mode d'assainissement de l'air d'une pièce revient à la purger avec un flux préalablement décontaminé, de sorte qu'on puisse considérer qu'il s'agit d'une décontamination « indirecte ». Comme dans le mode recirculation, on peut aussi considérer une mise en parallèle de plusieurs réacteurs ou une mise en série. Le dimensionnement est alors assez simple, puisque pour travailler à un débit Q , il suffit de mettre en parallèle K réacteurs fonctionnant chacun au débit du test ($5 \text{ m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$). L'efficacité atteinte est alors modulable en faisant simplement varier la longueur des réacteurs (Fig. 103).

Il est évident que là aussi, plus le volume à traiter va être grand, plus le temps mis pour atteindre un niveau de décontamination donné va être important. En effet, on est dans ce cas aussi limité par les phénomènes de dilution, puisque, contrairement au réacteur, la pièce à décontaminer met beaucoup plus de temps à atteindre un régime permanent (Fig. 116).

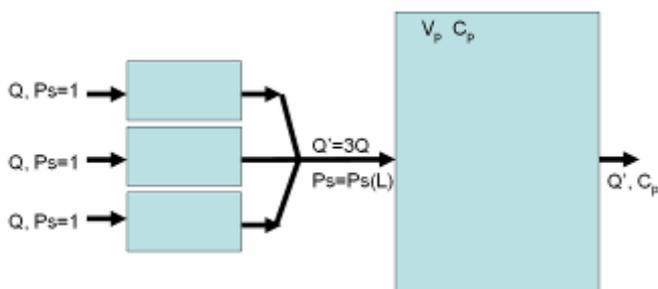


Figure 116. Schéma de la décontamination d'une pièce par l'utilisation de K réacteurs en parallèle, chacun de même longueur L ($K=3$).

Ainsi, avec les mêmes notations que précédemment, on obtient en décontaminant une pièce de volume V_p avec K réacteurs en parallèle de longueur individuelle L :

- pour la pièce à décontaminer : $1/\tau_p (C_r - C_p) = dC_p/dt$ et $\tau_p = V_p/(KQ)$
- pour le réacteur fonctionnant en régime permanent : $C_r = P_s(L)C_0$, C_0 étant la valeur de la contamination en entrée de réacteur (équivalente à 1 u.a. de bactéries par m^3).

Ainsi, on obtient facilement selon le même raisonnement que précédemment : $C_p = P_s(L)C_0 + (1 - P_s(L)C_0)e^{-t/\tau_p}$ avec $P_s(L) = P_s(1)^L$.

La figure 117 présente les résultats obtenus pour 41,4 W en traitant une pièce de 10 m^3 , avec soit une configuration en série, soit une configuration en parallèle de réacteurs :

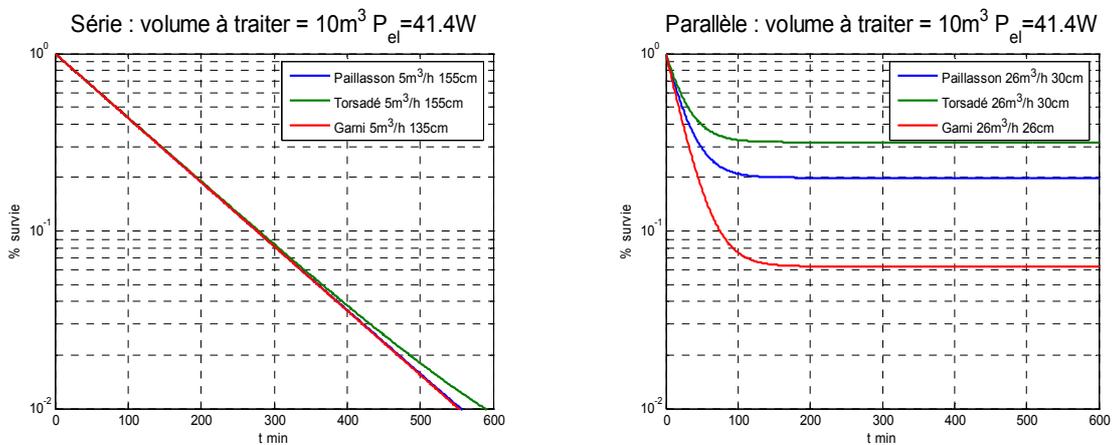


Figure 117. Décontamination d'une pièce de 10 m^3 avec les différents réacteurs linéaires. La puissance totale du dispositif est de 41,4 W et selon les deux configurations (g. en série, d. en parallèle).

On constate que la mise en série des réacteurs permet d'atteindre des concentrations limites beaucoup plus faibles, mais en un temps beaucoup plus élevé. Ainsi, la réponse à l'introduction de microorganismes issus de l'extérieur sera aussi très lente. Par contre, la configuration en parallèle permet d'atteindre rapidement la valeur limite correspondant à la concentration en sortie de réacteur, laquelle est bien sûr supérieure à celle en sortie d'un réacteur plus long ! Mais, la réponse de ce dispositif sera bien plus rapide face à un pic de contamination, ce qui peut être très intéressant dans un système qui y est fréquemment soumis.

Ainsi, nous avons pu voir que, bien que les efficacités des différents réacteurs soient très différentes dans certains cas, cela n'est pas le seul facteur limitant. En effet, du fait du volume important à traiter, le temps de passage dans la pièce à traiter est relativement long, ce qui fait

qu'un réacteur même très efficace est d'intérêt très limité s'il ne débite pas suffisamment, et ce, qu'importe le mode de fonctionnement (recirculation/un passage). **Il faut donc toujours considérer précisément les conditions d'utilisation afin d'adapter les paramètres de fonctionnement d'un dispositif de décontamination !**

Néanmoins, nous avons vu que nous pouvons obtenir des efficacités de décontamination très élevées, qui plus est sans provoquer de pertes de charge significatives. Notons enfin que le garnissage tridimensionnel, qui a fourni les meilleurs résultats à faible débit, semble très prometteur même à haut débit, puisque les probabilités d'impact avec la surface photocatalytiquement active restent élevées du fait de sa tortuosité importante et du rapport surface/volume élevé.

Rappelons que les extrapolations présentées dans cette partie restent théoriques, et qu'elles sont basées sur des hypothèses de mélange parfait qui ne sont pas toujours représentatives des cas réels. En effet, il est important de considérer les limitations au transfert de matière dues à la présence par exemple de mobilier dans la pièce à traiter, ce qui implique de bien choisir l'emplacement d'un tel dispositif. Néanmoins, ce chapitre a permis de mettre en évidence le fait qu'il ne suffit pas d'obtenir un abattement conséquent en un passage unique pour pouvoir décontaminer efficacement une pièce. Ainsi, il est important de considérer une mise en parallèle de plusieurs réacteurs, voire d'envisager la combinaison recirculation/traitement en mode « one pass » afin de pouvoir répondre à des variations brusques du taux de contamination de l'air d'une pièce.

Ce chapitre a surtout permis de mettre l'accent sur l'importance du choix des paramètres de comparaison de l'efficacité de différents types de dispositifs de décontamination de l'air au niveau biologique.

De plus, nous avons pu mettre en avant le fait qu'il n'y a pas de dispositif unique et miracle pour pouvoir traiter l'air de façon efficace. Il faut en effet préalablement définir précisément les conditions d'utilisation, comme le volume à traiter, l'abattement souhaité en fonction du temps de traitement, la rapidité de réponse à l'ajout de biocontaminants... Ceci permet de dimensionner un système efficace pouvant prétendre répondre aux contraintes d'un tel cahier des charges.

CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

Les travaux réalisés au cours de cette thèse ont tout d'abord permis la mise au point d'un dispositif expérimental et d'une méthodologie aussi rigoureuse que possible, permettant le développement et la comparaison de systèmes de décontamination de bioaérosols par voie photocatalytique, à des débits plus importants que ceux couramment rencontrés en laboratoire, et ce, selon les deux modes de fonctionnement envisageables pour l'utilisation de tels systèmes, à savoir en mode « recirculation » ou en mode « one pass ». De plus, ces travaux ont montré que la photocatalyse était une option réellement efficace pour remédier aux problèmes liés à des aérosols chargés de biocontaminants divers, tels que des bactéries (Gram +/-), des mycobactéries, des endospores ou des virus.

De plus, l'utilisation de techniques récentes de mesure de la viabilité par microscopie en épifluorescence a été une amélioration conséquente pour des tests de décontamination de l'air par voie photocatalytique, puisque les comptages finals étaient réalisés jusque-là quasi exclusivement par des méthodes de mise en culture. Ces dernières peuvent en effet conduire à une surestimation de l'efficacité d'un dispositif, du fait d'une perte momentanée de cultivabilité de certaines bactéries, comme nous l'avons souvent rappelé. Cependant, nous avons aussi montré qu'il fallait faire preuve d'une grande prudence lors de l'utilisation de fluorophores, puisque les résultats d'abattement obtenus par ces techniques peuvent être facilement biaisés, notamment par la présence de TiO_2 , qui adsorbe les deux colorants du kit de viabilité BacLight™ de façon très différente, pouvant ainsi modifier leurs concentrations respectives.

Dans cette optique, lorsque nous avons dû émettre des hypothèses afin de pouvoir établir les performances respectives des différents systèmes, nous avons essayé de choisir celles qui les minimiseraient. En effet, vu la précision limitée des mesures de viabilité, et comme un très grand nombre de paramètres - parfois inconnus ou non mesurables - peuvent influencer de façon importante sur les résultats de décontamination, il convient de rester toujours très prudent.

Le dernier chapitre a permis de transposer les résultats obtenus à « petite échelle », à des conditions réelles où l'effluent en sortie de réacteur est dilué dans le volume de la pièce à traiter, ce qui ajoute un paramètre pouvant considérablement limiter l'efficacité. Ainsi, pour caractériser un réacteur de décontamination il faut considérer l'abatement en sortie de réacteur, mais aussi le débit auquel celui-ci est obtenu. Contrairement au cas du traitement de l'eau, il n'est pas possible en effet d'isoler et de traiter un volume d'air avant de l'utiliser, ce qui complique grandement la mise au point et l'évaluation de dispositifs photocatalytiques de traitement de l'air. Ceux-ci doivent pouvoir traiter des débits très importants de façon efficace, afin de pouvoir répondre rapidement aux inévitables ajouts de biocontaminants.

Il est clair que le développement et l'optimisation futurs des différents systèmes de décontamination doivent se faire à des débits plus élevés, car ceci permettrait de dimensionner des réacteurs de façon encore plus souple que ce qui a été présenté précédemment. Il serait d'ailleurs bénéfique d'utiliser la conception assistée par ordinateur (CAO) pour tenir compte à la fois des phénomènes liés la mécanique des fluides, à l'illumination et à la photocatalyse (Taghipour et Mohseni 2005). En effet, le développement d'un réacteur de décontamination photocatalytique par « essais-erreurs » requiert beaucoup de temps en raison de la mise en œuvre des tests avec les bioaérosols, et il serait souhaitable de réaliser un travail informatique préalable à la démarche expérimentale.

D'un point de vue plus fondamental, nous avons vu que les bactériophages T2 (virus nus) étaient, de façon quelque peu surprenante, moins sensibles au procédé de décontamination photocatalytique que *L.pneumophila*. S'il semble indéniable que le facteur aérodynamique peut jouer un rôle important, une autre hypothèse intéressante réside dans la nature chimique des composants externes de ces microorganismes, première barrière à leur inactivation. Les membranes bactériennes sont en effet, en première approximation, composées de 40 %m de lipides et de 60 %m de protéines, tandis que l'extérieur des virus nus est principalement constitué de protéines de toute autre nature cependant que les protéines bactériennes. Cette différence peut jouer tant au niveau de l'adsorption qu'au niveau de la réactivité chimique.

Des travaux réalisés au laboratoire avec le Dr Florence Chollet ont eu pour but d'étudier plus précisément les effets de la photocatalyse en milieu aérien sur des protéines, afin de mieux comprendre les conséquences d'une telle oxydation sur ces biomolécules, constituants essentiels des microorganismes. À titre indicatif, une cellule de *E.coli* possède uniquement quelques centaines de protéines en surface, dont les rôles sont bien spécifiques (annexe III). Il

est envisageable qu'une oxydation, même très partielle de quelques-unes de ces protéines, suffise à les dénaturer, et conduite à la mort de la cellule.

La figure 118 présente un exemple des résultats obtenus par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium (SDS) lors de l'oxydation photocatalytique de lysat d'*E.coli*, préalablement déposé sur du TiO_2 (P25) puis séché à l'air ambiant (N.B. le lysat est une **solution** des composants de la bactérie). De façon très succincte, cette technique analytique permet de faire migrer les protéines contenues dans un échantillon sous l'action d'un champ électrique et de les séparer en fonction de leurs poids moléculaires respectifs. Le SDS est un agent dénaturant qui se lie aux protéines et permet de s'affranchir de leurs structures secondaires, tout en leur conférant une charge nette négative permettant la migration (N.B. du fait de la liaison d'une molécule de SDS pour deux acides aminés, les protéines sont en fait séparées selon leurs **poids moléculaires apparents**). Les protéines sont colorées après migration par du bleu de Coomassie, et l'intensité de couleur est proportionnelle à la concentration en protéines.

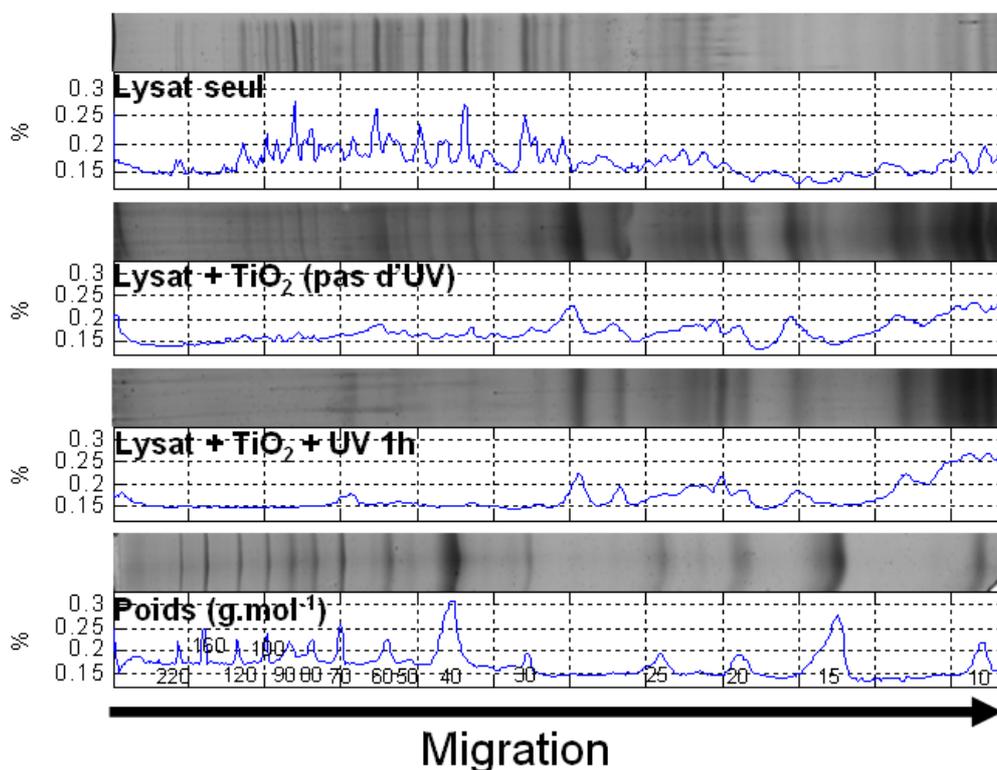


Figure 118. Quantification en % de l'intensité totale des protéines, en fonction de leurs poids moléculaires apparents indiqués (b.). Le gel du haut correspond à la migration du lysat brut. Le second gel correspond à la migration des protéines après que l'échantillon a été mis en présence du TiO_2 pendant une heure à l'obscurité. La troisième bande correspond à la migration des protéines après que l'échantillon a été mis en présence du TiO_2 pendant une heure sous activation UVA.

Cette expérience permet notamment de mettre en évidence un des problèmes majeurs liés à l'étude des protéines en présence de TiO₂, à savoir la très forte adsorption des protéines, notamment celles de haut poids. On peut supposer d'ailleurs que ces protéines de haut poids moléculaire sont de ce fait d'autant plus facilement dégradées par photocatalyse puisqu'il suffit de les dénaturer pour les rendre non fonctionnelles, ce qui est d'autant plus aisé qu'elles ont une taille importante et sont liées au photocatalyseur. Les travaux ayant trait à cette étude de la dégradation de protéines par photocatalyse feront l'objet d'une publication ultérieurement.

Dans la même optique de compréhension des phénomènes entrant en jeu lors de l'inactivation photocatalytique des microorganismes, des études sur l'oxydation des lipides vont être entreprises.

Ainsi, les travaux présentés dans ce mémoire sont très encourageants et incitent à continuer la recherche dans le domaine du traitement de l'air au niveau biologique par photocatalyse, et ce, malgré les très nombreuses difficultés, notamment d'ordre technique et d'interprétation. La décontamination de l'air par voie photocatalytique n'en est qu'à ses prémices et la mise au point de réacteurs très efficaces sera la clef de leurs utilisations massives pour remédier aux problèmes croissants de santé publique liés aux bioaérosols.

De plus, ces travaux ont pu mettre en avant la nécessité croissante d'utiliser des critères communs de comparaison entre différents dispositifs, c'est-à-dire de normes, que ce soit dans le cas du traitement de l'air au niveau chimique comme au niveau biologique.

« ... An important obstacle in the development of highly efficient photocatalytic reactors is the establishment of effective reactor design [...] as demanded by industrial and commercial applications » (Lasa, Serrano et al. 2005).

ANNEXES

I Résultats chiffrés

t(min)	T _i (t)(pixel)				Θ _i (t)			
	i=0	i=1	i=2	i=3	i=0	i=1	i=2	i=3
0	185	181	174	170	0	0	0	0
10	222	183	180	173	71	4	12	6
20	232	194	187	177	90	25	25	13
30	235	200	193	180	96	37	37	19
40	235	206	203	187	96	48	56	31
50	237	212	205	192	100	60	60	41
60	237	216	210	198	100	67	69	52
70	237	220	211	201	100	75	71	57
80	237	222	213	205	100	79	75	65
90	237	227	215	210	100	88	79	74
100	237	226	220	214	100	87	88	81
110	237	231	222	215	100	96	92	83
120	237	232	225	218	100	98	98	89

t(min)	T _i (t)(pixel)				Θ _i (t)			
	i=0	i=1	i=2	i=3	i=0	i=1	i=2	i=3
130	237	233	226	220	100	100	100	93
140	237	233	226	222	100	100	100	96
150	237	233	226	223	100	100	100	98
160	237	233	226	224	100	100	100	100
170	237	233	226	224	100	100	100	100
180	237	233	226	224	100	100	100	100
190	237	233	226	224	100	100	100	100
200	237	233	226	224	100	100	100	100
210	237	233	226	224	100	100	100	100
220	237	233	226	224	100	100	100	100
230	237	233	226	224	100	100	100	100
240	237	233	226	224	100	100	100	100

Tableau 28. Taille en pixels T_i(t) et taille adimensionnelle Θ_i(t) de chaque échantillon de mousse de PU plongé dans du THF en fonction du temps (i : nombre de couches protectrices de Sivo 110™)

Vitesse gaz (m.s ⁻¹)	Perte de charge (mBar)	Pertes de charge linéaires (mbar.m ⁻¹)
0,0	0	0
0,6	0	1
2,1	1	9
3,5	2	21
3,3	2	28
4,4	4	49
5,0	6	75
5,9	9	110
6,2	10	125
7,1	13	163
7,7	15	188

Tableau 29. Résultats des mesures de pertes de charge linéaires pour la mousse de PU (≥4800 μm).

TiO ₂ Ag n°	0	1	2	3	4	5
%m Ag	0,0%	0,1%	0,2%	0,5%	1,0%	1,8%
%at Ag	0,0%	0,1%	0,2%	0,4%	0,7%	1,3%
Diamètre d'inhibition (cm)	0,0	1,5	1,5	1,7	1,9	1,9
Aire d'inhibition (cm ²)	0,00	1,8	1,8	2,3	2,8	2,8

Tableau 30. Résultats des tests d'inhibition, dans le noir, à la prolifération de E.coli par l'argent photoréduit sur TiO₂ (P25).

TiO ₂ Cu n°	0	1	2	3	4	5
%m Cu	0,0%	0,5%	1,0%	1,9%	3,8%	6,9%
%at Cu	0,0%	0,6%	1,2%	2,4%	4,8%	8,6%
Diamètre d'inhibition (cm)	0,0	0,0	0,0	0,8	1,2	1,4
Aire d'inhibition (cm ²)	0,0	0,0	0,0	0,5	1,1	1,5

Tableau 31. Résultats des tests d'inhibition, dans le noir, à la prolifération de E.coli par le cuivre photoréduit sur TiO₂ P25.

		Totales bact.	Mortes bact.	Vivantes bact.	%mortes	%vivantes	Nombre de clichés	Densité totale bact./cliché	Densité totale bact./filtre*
α	1	3670	364	3306	10	90	22	167	6,9 ^E +06
	2	3591	509	3082	14	86	23	156	6,5 ^E +06
	3	4066	547	3519	13	87	24	169	7,0 ^E +06
β	1	3698	670	3028	19	81	24	154	6,4 ^E +06
	2	4269	645	3614	15	85	25	171	7,1 ^E +06
	3	4042	652	3381	16	84	23	176	7,3 ^E +06

Tableau 32. Résultats obtenus pour le dénombrement de trois répliques de deux colorations α et β avec le kit Baclight™. (Bact. : nombre de bactéries. *Surface d'un cliché microscopique = 1/41510 des 2,5 cm² de la surface de filtration)

		Totales bact.	Mortes bact.	Vivantes bact.	%mortes	%vivantes	Nombre de clichés	Densité totale bact./cliché	Densité totale bact./filtre*
α	1	2177	532	1645	76	24	16	136	5,6E+06
	2	1590	393	1197	75	25	16	99	4,1E+06
	3	1895	411	1484	78	22	14	135	5,6E+06
β	1	1492	314	1178	79	21	15	99	4,1E+06
γ	1	2042	491	1551	76	24	15	136	5,7E+06
δ	1	1966	528	1438	73	27	15	131	5,4E+06
ε	1	1325	278	1047	79	21	15	88	3,7E+06

Tableau 33. Résultats obtenus pour le dénombrement de cinq colorations (α , β , γ , δ et ε) avec le kit Baclight™. (Bact. : nombre de bactéries. *Surface d'un cliché microscopique = 1/41510 des 2,5 cm² de la surface de filtration)

Volume filtré μ L	Totales bact.	Mortes bact.	Vivantes bact.	%mortes	%vivantes	Nombre de clichés	Densité totale bact./cliché	Densité totale bact./filtre*
100	1143	1005	138	88	12	23	50	2,1E+06
200	2264	1962	302	87	13	23	98	4,1E+06
300	2795	2495	300	89	11	23	122	5,0E+06
400	3273	2915	358	89	11	23	142	5,9E+06

Tableau 34. Résultats obtenus par le dénombrement de bactéries préalablement colorées avec le kit Baclight™, contenues dans des échantillons de volumes croissants. (Bact. : nombre de bactéries. *Surface d'un cliché microscopique = 1/41510 des 2,5cm² de la surface de filtration)

mTiO ₂ (mg)/5 mL	Diamètres (mm)
0,0	40 ;40
12,5	40 ;42
25,0	42 ;40
50,0	38 ;42
100,0	43 ;40

Tableau 35. Résultats de l'inhibition à la prolifération de E.coli par l'argent, en fonction de la quantité de TiO₂ (P25) ajoutée à la gélose nutritive.

	MESURES		MESURES (%I(0))		MODELES	
	S28190 (1900 μ m)	S32720 (\geq 4800 μ m)	S28190 (1900 μ m)	S32720 (\geq 4800 μ m)	S28190 (1900 μ m)	S32720 (\geq 4800 μ m)
R(cm)	I(L) (u.a.)	I(L) (u.a.)	T(L)%	T(L)%	T(L)%m	T(L)%m
0,0	139	122	100%	100%	100%	100%
0,5	23,3	-	17%	-	17%	-
1,0	7,7	-	6%	-	3%	-
1,5	2,5	26,5	2%	22%	1%	22%
2,0	-	14,7	-	12%	-	14%
2,5	-	10,1	-	8%	-	8%
3,5	-	5,4	-	4%	-	3%
4,0	-	3,5	-	3%	-	2%

Tableau 36. Intensités électriques photogénérées (moyennes sur 15 s) à travers deux mousses de PU (tailles des alvéoles : 1900 μ m et \geq 4800 μ m) et modèles en décroissance exponentielle associés ($T(L)\%m=C_0e^{-t/\tau}$).

n°1	C ₀ = 7130 τ= 293	n°2	C ₀ = 7278 τ= 320	n°3	C ₀ = 6546 τ= 312	n°4	C ₀ = 6069 τ= 353
t (min)	Exp. Model.						
0	7130 7130	0	7278 7278	0	6546 6546	0	6069 6069
20	5320 6660	20	7200 6836	20	5720 6140	40	5280 5418
40	6440 6220	40	6520 6422	40	5480 5760	60	5400 5120
60	7200 5810	60	6200 6032	60	5120 5402	80	4320 4837
80	6000 5426	80	5520 5666	80	5600 5067	100	4000 4571
100	4920 5068	100	4520 5322	100	6480 4753	120	4920 4319
120	4440 4734	120	5000 4999	120	4680 4458	140	5640 4081
140	5320 4421	140	3900 4696	140	3040 4182	160	3240 3856
160	3400 4130	160	4720 4411	160	4264 3922	180	4120 3643
180	3220 3857	180	4100 4144	180	2934 3679	200	2460 3442
		200	4880 3892			220	2180 3252
		220	3600 3656			240	4040 3073
		240	3400 3434				
n°5	C ₀ = 10216 τ= 57	n°6	C ₀ = 11164 τ= 43	n°7	C ₀ = 11100 τ= 26	n°8	C ₀ = 10663 τ= 51
t (min)	Exp. Model.						
0	10216 10216	0	11164 11164	0	11100 11100	0	10663 10663
20	6400 7173	20	6400 7036	50	4060 3912	20	6480 7228
40	6000 5037	40	5700 4434	70	1320 1798	40	6280 4899
70	4400 2964	60	3420 2794	90	1010 827	60	3714 3321
100	113 1744	80	400 1761	110	470 380	80	1633 2251
120	1080 1224	100	660 1110	130	510 175	100	1109 1526
140	530 860	140	356 441	150	230 80	120	533 1034
160	120 604	160	450 278	170	660 37	140	101 701
180	240 424	180	103 175	190	180 17	160	758 475
220	790 209	200	231 110	210	22 8	200	1006 218
240	98 147	220	13 70	230	71 4	220	120 148
		240	21 44			240	118 100

Tableau 37. Résultats en UFC/boîte pour l'inactivation de spores de *B.subtilis* (concentration initiale : $1,5.10^8$ spores/m³) avec le réacteur tangentiel en mode recirculation à $140 \text{ m}^3.\text{h}^{-1}$ et modèles individuels associés en exponentielle décroissante ($C_0e^{-t/\tau}$). Tests blancs : 1 à 4 / Tests photocatalytiques : 5 à 8.

n°1	C ₀ = 1768 τ= 196	n°2	C ₀ = 1223 τ= 497	n°3	C ₀ = 1410 τ= 309
t (min)	Exp. Model.	t (min)	Exp. Model.	t (min)	Exp. Model.
0	1768 1768	0	1223 1223	0	1410 1410
20	1592 1597	20	1203 1175	20	1309 1322
40	1463 1442	40	1189 1129	40	1236 1239
60	1322 1302	60	945 1084	60	1123 1161
80	1089 1176	80	1002 1042	80	1196 1088
100	1108 1062	100	1101 1001	120	902 956
120	966 959	120	952 961		
n°4	C ₀ = 2104 τ= 21	n°5	C ₀ = 1608 τ= 24	n°6	C ₀ = 1866 τ= 21
t (min)	Exp. Model.	t (min)	Exp. Model.	t (min)	Exp. Model.
0	2104 2104	0	1608 1608	0	1866 1866
20	800 801	20	688 698	20	723 727
40	309 305	40	339 303	40	301 283
60	111 116	60	118 131	60	97 110
80	45 44	80	26 57	80	25 43
100	12 17	100	9 25	100	22 17
120	9 6	120	1 11	120	3 7

Tableau 38. Résultats en plages de lyse/boîte pour l'inactivation de bactériophages T2 (concentration initiale : $3,8.10^7$ virus/m³) avec le réacteur tangentiel en mode recirculation à $140 \text{ m}^3.\text{h}^{-1}$ et modèles individuels associés en exponentielle décroissante ($C_0e^{-t/\tau}$). Tests blancs : 1 à 3 / Tests photocatalytiques : 4 à 6.

II Prise et analyse des clichés microscopiques en épifluorescence

Les clichés sont pris préférentiellement au grossissement x1000 plutôt qu'au x400. Ce dernier grossissement permet certes de comptabiliser un plus grand nombre de bactéries par champ, mais possède le désavantage de ne pas pouvoir faire la distinction entre bactéries et sédiments (grains de TiO₂). Les paramètres d'intensité lumineuse, de temps d'exposition, de gain, d'ajustement des contrastes et autres sont à adapter à l'échantillon de sorte que les clichés présentent des microorganismes avec des contours nets, qui ne soient pas trop éblouissants.

Pour chaque champ microscopique, on prend deux clichés : un premier soit avec le cube A4 (S9) soit avec le cube I3 (S9 + IP) et un second avec les cubes N2.1 (IP) ou Y3 (IP). Le nombre total de clichés à prendre dépend de la densité des microorganismes. Il est conseillé d'observer au moins 400 bactéries (Kepner Jr et Pratt 1994).

Comptage manuel

C'est de loin le type de comptage le plus fastidieux mais ceci peut s'avérer nécessaire notamment dans le cas d'un échantillon présentant des sédiments, ou de mauvaise qualité graphique (fluorescence du fond).

Un programme d'aide au comptage manuel a été développé en Visual Basic 6.0. Ce programme permet de charger simultanément les deux clichés (après conversion au format bitmap) et ensuite de marquer d'un clic de souris avec une « cible » de couleur adaptée les différentes bactéries (vert, jaune et rouge ; voir figure 119). Les quantités de chaque type de membrane sont incrémentées automatiquement et les calculs de concentration sont fait automatiquement après avoir indiqué la surface de filtration, la quantité filtrée et la surface de chaque champs microscopique.

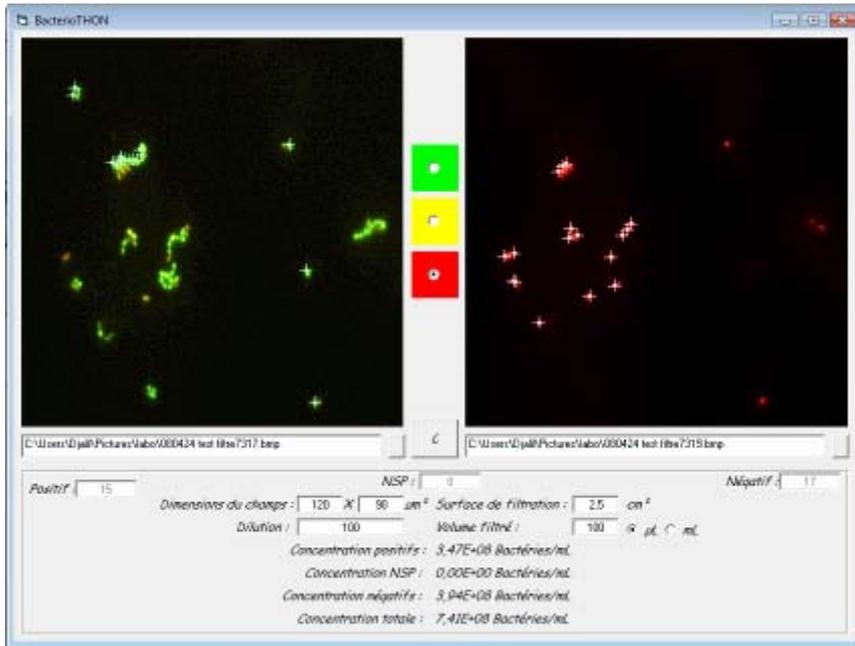


Figure 119. Exemple de comptage manuel sur une paire de clichés réalisés sur un même champ avec deux cubes optiques différents.

Comptage automatique

Il permet de réaliser des comptages sur de très grandes quantités de clichés, sans perte de temps, augmentant de plus la signification des résultats. Néanmoins, ceci n'est possible que pour des échantillons avec une faible fluorescence du fond, une densité limitée de bactéries, des bactéries non agrégées et une très faible proportion de sédiments. Dans tous les cas un contrôle visuel posttraitement est impératif.

Un premier programme additionne les paires de clichés sur un même cliché qui contient donc l'ensemble des bactéries. Ceci est particulièrement utile par exemple pour les clichés ayant été réalisés avec le cube I3 pour lesquels l'IP n'est pas excité à son maximum ce qui pourrait résulter en des erreurs de comptage (voir figure 120).

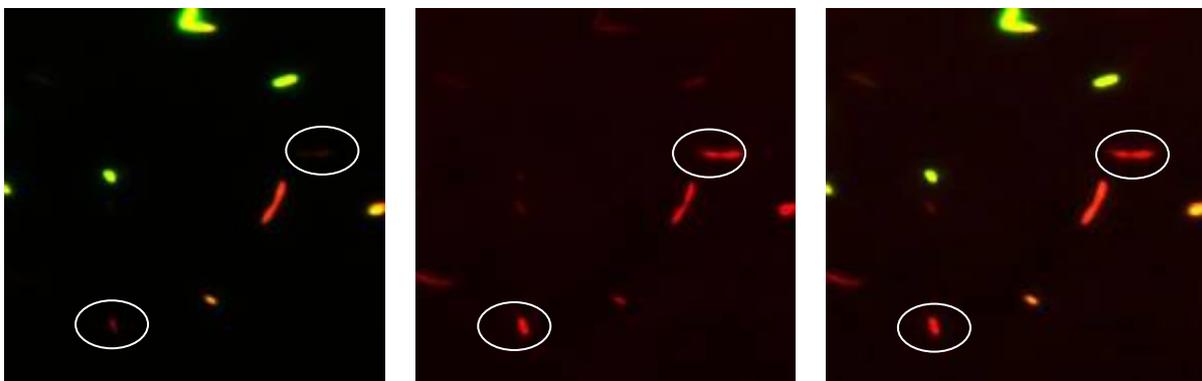


Figure 120. Clichés du même champ pris avec les cubes optiques I3, N2.1 puis la somme de ces deux clichés sur lequel le comptage des deux types peut être effectué car les deux fluorophores sont virtuellement excités à leurs maxima.

Un second programme va ensuite déterminer le nombre total de bactéries sur le premier cliché, puis sur le second le nombre de bactéries mortes, de sorte que l'on obtienne par simple retranchement la quantité de bactéries « vivantes ». Afin de permettre un contrôle visuel par l'utilisateur, le programme va créer une image en noir et blanc de chaque cliché indiquant la position des bactéries détectées (Fig. 121). Il fournit de plus un tableau récapitulatif des l'ensemble des clichés ayant été traités ensemble.

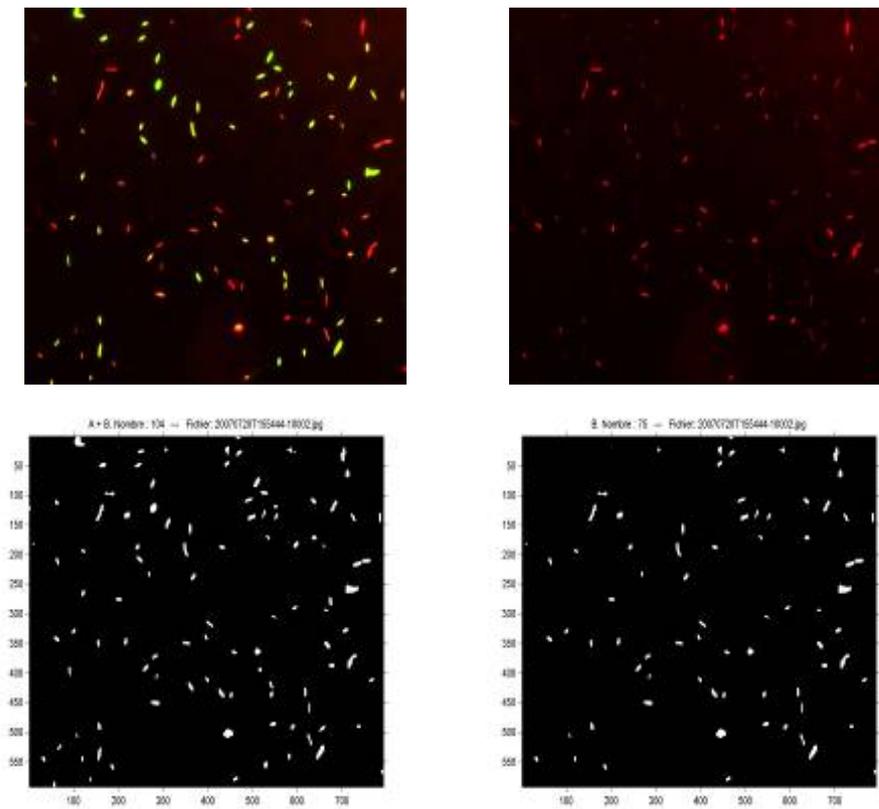


Figure 121. Exemple d'analyse automatique d'une paire de clichés avec le programme développé sur Matlab 7.0

III Statistiques sur *E. coli*

Statistiques générales d'une cellule		%Volume occupé par les ribosomes	8%
Longueur	2 μm	%Volume occupé par les lipides	3%
Diamètre	0.8 μm	%Volume occupé par les LPS	1%
Volume	1×10^{-15} L	%Volume occupé par la muréine	1%
Volume aqueux	7×10^{-16} L	%Volume occupé par le glycogène	1%
Surface	6×10^{-12} m ²	%Volume occupé par les ions	0.3%
Poids humide	1×10^{-15} kg	%Volume occupé par les petites mol.	1%
Poids sec	3.0×10^{-16} kg		
Volume périplasmique	6.5×10^{-17} L		
Volume cytoplasmique	6.7×10^{-16} L	Nombre de molécules/cellule	
Volume de l'enveloppe	1.6×10^{-16} L	Nbr. de chromosomes/cell.	2.3 (mid-log phase)
Volume ADN + Protéines	1.6×10^{-16} L	Nbr. de mRNA/cell.	4000
Épaisseur membrane interne	8×10^{-9} m	Nbr. de rRNA/cell.	18000
Épaisseur membrane externe	8×10^{-9} - 15×10^{-9} m	Nbr. de tRNA/cell.	200000
Épaisseur périplasme	1×10^{-8} m	Nbr. de all RNA/cell.	222000
Taille moy. des protéines	360 résidus	Nbr. de polysaccharides/cell.	39000
Diamètre moy. des protéines	5 nm	Nbr. de molécules de muréine /cell.	240000-700000
Masse molaire moy. des protéines	40 kD	Nbr. de LPS/cell.	600000
Oligomérisation moy. des protéines.	4 protéines/complexe	Nbr. de lipides/cell.	25000000
Poids molaire moy. des protéines	160 kD	Nbr. de LPS (MM = 10kD)	600
Taille moy. mRNA	1100 bases	%Bicouche lipidique=lipides	40%
Longueur moy. mRNA	370 nm	%Bicouche lipidique=protéines	60%
Poids molaire moy. RNAs	400 kD	Nbr. de protéines membrane externe	300000
Poids molaire moy. DNA(ss)	3.0×10^6 kD	Nbr. de porines mbr. externe	60000
Poids molaire moy. DNA	7×10^6 kD	Nbr. de lipoprotéines mbr. externe	240000
Longueur moy. DNA (chrom.)	1.55 mm	Nbr. de protéines de la mbr. interne	200000
Diamètre moy. d'un chrom.	490 μm	Nbr. de protéines nucléaires	100000
Diamètre moy. d'un chrom. condensé	17 μm	Nbr. de protéines cytoplasmiques	1000000
Espace moy. entre petites molécules	3.6 nm/molécule	Nbr. de protéines ribosomales	900000
Espace moy. entre ions	2.1 nm/molécule	Nbr. de protéines périplasmiques	80000
Espace moy. entre protéines	7 nm/molécule	Nbr. de protéines cellulaires	2600000
Espace moy. entre entités protéiques	9 nm/molécule	Nbr. de protéines externes (flag./pilis)	1000000
Concentration en protéines	200-320 mg/ mL (5-8 mM)	Nbr. total de protéines	3600000
%Volume occupé par l'eau	70%		
%Volume occupé par les protéines	17%		
%Volume occupé par les RNA	6%		

Tableau 39. Statistiques sur la composition de *E. coli*.

Références dont sont issues les données du tableau:

- 1) <http://old.jccc.net/~pdecellule/celluleresp/whyatp.ht ml>
- 2) Garrett, R.H., and Grisham, C.M. *Biochemistry*, 2nd Edition (2002), pg. 32
- 3) <http://microvet.arizona.edu/Courses/MIC328/328%20Topic%201%20notes.ht ml>
- 4) Goodsell, D.S. (1991) *Inside a Living Cellule*, Trends Biochem Sci. 16, 203-206
- 5) Neidhardt, F.C. et al. (1987) *Escherichia coli and Salmonella typhimurium: Cellular and Molecular Biology Vol. 1. American Society for Microbiology.*

- 6) Nanninga N., ed. (1985) *Molecular Cytology of Escherichia coli*, Academic Press
- 7) Ingraham, J.L., Maaloe, O. and Neidhardt, F.C. (1983) *Growth of the Bacterial Cellule*, Sinauer Association
- 8) Albe, K.R., Butler, M.H. and Wright, B.E. (1990) *J. Theor. Biol.* 143, 163-195.
- 9) Rohwer, J.M. et al. (2000) *Understanding Glucose Transport*, *J. Biol. Chem.* 275, 34909-34921.
- 10) Elowitz, M.B. et al. (1999) *Protein Mobility in the Cytoplasm of E. coli*, *J. Bacteriol* 181, 197-203.
- 11) Chassagnole, C. et al. (2001) *Control of the Threonine Synthesis Pathway in E. coli*, *Biochem. J.* 356, 433-444.
- 12) Zimmereman, S.B. and Trach, S.O. (1991) *Estimation of Macromolecular Concentrations in E. coli*, *J. Mol. Biol.* 222, 599-620.
- 13) <http://www.bact.wisc.edu/MicrotextBook/BacterialStructure/introduction.html>

IV Propriétés du Sivo 110

Dynasylan® SIVO 110

SIVO® SOL Technology for coating systems

Description

Dynasylan® SIVO 110 resembles a multifunctional, basically VOC-free, water-borne sol-gel system. It is composed of a silica sol, modified with organofunctional silanes.

Dynasylan® SIVO 110 is an opaque to milky, colorless to slightly yellow, low viscous liquid. **Dynasylan®** SIVO 110 can be diluted in water and a variety of common organic solvents. Besides reactive silanol groups it also contains organic functionalities based on Si-bonded epoxy groups.

Dynasylan® SIVO 110 is predominantly suited as a binder for temperature curing sol-gel coatings and for sol-gel - based hybrid coatings.

Featured specific advantages:

- water-borne
- VOC-free
- forms very thin layers (< 2 µm)
- resistant against boiling water
- exceptional hardness
- thermally stable up to approx. 220 °C

Dynasylan® SIVO 110 resembles a water-borne sol-gel system which does not contain organic solvents. It does not release alcohols upon hydrolysis contrary to standard functional alkoxy-silanes. **Dynasylan®** SIVO 110 contains a high concentration of active silanol functions. Consequently it can chemically bond to surfaces of suited substrates and achieves a high degree of crosslinking by formation of 2- and 3-dimensional siloxane networks. During curing functionalized SiO₂ sol-particles align into a densely packed structure and are covalently incorporated into the siloxane network. This phenomenon serves as an explanation why exceptional hardness and scratch resistance can be achieved with **Dynasylan®** SIVO 110. Additionally a high degree of flexibility is obtained at a considerably low thickness for the formed layers.

Properties

Dynasylan® SIVO 110 is suited as binder component in temperature crosslinking sol-gel coatings and sol-gel - based hybrid coatings. **Dynasylan®** SIVO 110 coatings boast of:

- high hardness (pencil hardness up to 5H, depending on formulation)
- excellent scratch and mar resistance
- superior stability in boiling water (Gt0 upon 2 h treatment in water at 100 °C)
- very good adhesion on various substrates
- very good adhesion towards organic top coats (e.g. epoxies)
- sound flexibility (mandrel bending test according to DIN EN ISO 1519: 2 mm)
- very low thickness of formed layers (recommendation: dry layer of < 2 µm)
- excellent resistance against solvents and other chemicals

Recommended areas of application:

- corrosion resistant primer systems
- transparent sol-gel top coats which exhibit a temperature resistance of up to 220 °C
- coatings comprising high hardness, which can be additionally improved by introduction of up to 20 wt.-% silica sol
- transparent easy-to-clean sol-gel - top coats upon adding **Dynasylan®** SIVO 112

Figure 122. Données fabricant sur le Sivo 110™ (Evonik Degussa, Dynasilan)

LISTE DES TRAVAUX

PUBLICATIONS DANS DES JOURNAUX A COMITE DE LECTURE

Josset, S., Taranto, J., Keller, N., Keller, V., Lett, M.-C., Ledoux, M.J., et al. (2007).

UV-A Photocatalytic treatment of high flow rate air contaminated with *Legionella pneumophila*.

Catalysis Today, 129 (1-2), 215-222.

Josset, S., Keller, N., Keller, V., Lett., M.C., (2008)

Numeration methods for targeting photoactive materials in the UV-A photocatalytic removal of microorganisms. A review.

Royal Chemical Society Review, 37, 744-755.

Goulhen, F., Josset, S., Keller, N., Keller, V., Lett., M.C (2008).

A first step towards the understanding of the UV-A photocatalytic attack mechanisms over *Escherichia coli* and *Legionella pneumophila* Bacteria through proteins analysis.

Chemical Communication, soumise en septembre 2008.

BREVETS

S. Josset, J. Taranto, M.C. Lett, M.J. Ledoux, N. Keller, V. Keller.

Décontamination d'un milieu gazeux par un semi-conducteur photoactivé.

Demande de dépôt N° 06/08533 effectuée le 28/09/2006

S. Josset, M. Grandcolas, S. Hajesmaili, N. Keller, V. Keller, C. Pham-Huu, M.J. Ledoux

Photocatalyseurs à base de mousses tridimensionnelles structurées en carbone et matériau carboné.

Demande de dépôt effectué en septembre 2008.

COMMUNICATIONS ORALES A DES CONGRES, SYMPOSIUM, WORK-SHOP

JFP2CE (Journées Francophones de Photochimie, Photocatalyse et Catalyse Environnementale), Saint-Avold (France), mai 2007.

S. Josset, M.C. Lett, N. Keller, V. Keller

Conception d'une méthode standardisée de criblage de photocatalyseurs. Application à l'élimination de micro-organismes sous une illumination UVA

EuropaCat VIII, Turku (Finlande), août 2007

S. Josset, J. Taranto, M.C. Lett, N. Keller, V. Keller.

UV-A photocatalytic oxidation as a global process for air decontamination. Bactericidal, sporicidal and virucidal properties

ULP-JSPS Joint Forum on "Frontiers in Biology/Chemistry/Physics", 150th anniversary of the France-Japan Relationship, mai 2008.

S. Josset, F. Goulhen, J. Taranto, N. Keller, V. Keller, M.C. Lett

UV-A photocatalysis as a global process for air chemical depollution and biological decontamination. At the frontier between catalysis and biology

SPEA 5 (5th european meeting on Solar Chemistry and Photocatalysis: Environmental applications), Palerme (Sicile), octobre 2008.

S. Josset, F. Goulhen, N. Keller, V., Keller, M.C. Lett

A first step towards the understanding of the UV-A photocatalytic attack mechanisms over Escherichia coli and Legionella pneumophila bacteria through proteins analysis.

REFERENCES

- AFFSET (2006). Evaluation des risques sanitaires liés aux proliférations de *Legionella* dans l'eau des tours aéroréfrigérantes des centres nucléaires de production électrique d'EDF.
- Al-Ekabi et Serpone (1988). "Kinetic studies in heterogeneous photocatalysis. Photocatalytic degradation of chlorinated phenols in aerated aqueous solutions over TiO₂ supported on a glass matrix." *J. Phys. Chem.*(92): 5726-5731.
- Alberici, Canela, Eberlin et Jardim (2001). "Catalyst deactivation in the gas phase destruction of nitrogen-containing organic compounds using TiO₂/UV-VIS." *Applied Catalysis B: Environmental* **30**(3-4): 389-397.
- Alberici et Jardim (1994). "Photocatalytic degradation of phenol and chlorinated phenols using Ag/TiO₂ in a slurry reactor." *Water Research* **28**(8): 1845-1849.
- Alonso, Mascellaro, Moreno, Ferrus et Hernandez (2002). "Double-Staining Method for Differentiation of Morphological Changes and Membrane Integrity of *Campylobacter coli* Cells." *Appl. Environ. Microbiol.* **68**(10): 5151-5154.
- Andersen (1958). "New sampler for the collection, sizing and enumeration of viable airborne particles." *J. Bacteriol.* **76**(5): 471-484.
- Antopol et Ellner (1979). "Susceptibility of *Legionella pneumophila* to ultraviolet radiation." *Appl Environ Microbiol* **38**(2): 347-8.
- APHA (1993). *Standard Methods for the Examination of Dairy Products* 16th Ed. Washington, DC, USA.
- Atrih et Foster (2002). "Bacterial endospores the ultimate survivors." *International Dairy Journal* **12**(2-3): 217-223.
- Augugliaro, Litter, Palmisano et Soria (2006). "The combination of heterogeneous photocatalysis with chemical and physical operations: A tool for improving the photoprocess performance." *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews* **7**(4): 127-144.
- Awad (2002). "Environnemental study in subway metro stations in Cairo, Egypt." *Journal of Occupational Health* **44**: 112-118.
- Bahnemann, Bockelmann et Goslich (1991). "Mechanistic studies of water detoxification in illuminated TiO₂ suspensions." *Solar Energy Materials* **24**(1-4): 564-583.
- Bandala, Arancibia-Bulnes, Orozco et Estrada (2004). "Solar photoreactors comparison based on oxalic acid photocatalytic degradation." *Solar Energy* **77**(5): 503-512.
- Barbaree, Gorman, Martin, Fields et Morrill (1987). "Protocol for sampling environmental sites for *legionellae*." *Appl. Environ. Microbiol.* **53**(7): 1454-1458.
- Beggs, Noakes, Sleight, Fletcher et Kerr (2006). "Methodology for determining the susceptibility of airborne microorganisms to irradiation by an upper-room UVGI system." *Journal of Aerosol Science* **37**(7): 885-902.
- Behnajady, Modirshahla, Daneshvar et Rabbani (2007). "Photocatalytic degradation of an azo dye in a tubular continuous-flow photoreactor with immobilized TiO₂ on glass plates." *Chemical Engineering Journal* **127**(1-3): 167-176.
- Belhácová, Krýsa, Geryk et Jirkovský (1999). "Inactivation of microorganisms in a flow-through photoreactor with an immobilized TiO₂ layer." *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* **74**(2): 149-154.
- Benabbou, Derriche, Felix, Lejeune et Guillard (2007). "Photocatalytic inactivation of *Escherichia coli*. Effect of concentration of TiO₂ and microorganism, nature and intensity of UV irradiation." *Applied Catalysis B: Environmental* **76**(3-4): 257-263.
- Berbecar (1997). "Legionellosis: clinical and epidemiological data." *Bacteriol Virusol Parazitol Epidemiol* **42**(1-2): 103-6.
- Bergogne-Berezin et Towner (1996). "*Acinetobacter spp.* as nosocomial pathogens: microbiological, clinical, and epidemiological features." *Clin. Microbiol. Rev.* **9**(2): 148-165.
- Berney, Hammes, Bosshard, Weilenmann et Egli (2007). "Assessment and Interpretation of Bacterial Viability by Using the LIVE/DEAD BacLight Kit in Combination with Flow Cytometry." *Appl. Environ. Microbiol.* **73**(10): 3283-3290.
- Besnard, Federighi et Cappelier (2000). "Development of a direct viable count procedure for the investigation of VBNC state in *Listeria monocytogenes*." *Letters in Applied Microbiology* **31**(1): 77-81.
- Birchall, Carey et Howard (1977). "Silane triols of high stability in aqueous solution." *Nature* **266**(5598): 154-156.
- Birnie, Riffat et Gillott (2006). "Photocatalytic reactors: design for effective air purification." *International Journal of Low Carbon Technologies* **1**: 47-58.
- Blake (1999). Bibliography of Work on the Heterogeneous Photocatalytic Removal of Hazardous Compounds from Water and Air. *National Technical Information Service*. Golden, Colorado, National Renewable Energy Laboratory.
- Blume (2002). Wastewater Disinfection using Ultrasound and UV Light. *Ultrasound in Environmental Engineering II*. Engineering, Hamburg, Germany, TUHH.
- Bockelmann (1995). "Concentrating versus non-concentrating reactors for solar water detoxification." *Fuel and Energy Abstracts* **36**: 439-439.
- Boelter et Davidson (1997). "Ozone Generation by Indoor, Electrostatic Air Cleaners." *Aerosol Science and Technology* **27**(6): 689 - 708.
- Boffetta, Soutar, Cherrie, Granath, Andersen, Anttila, Blettner, Gaborieau, Klug, Langard, Luce, Merletti, Miller, Mirabelli, Pukkala, Adami et Weiderpass (2004). "Mortality among workers employed in the titanium dioxide production industry in Europe." *Cancer Causes Control* **15**(7): 697-706.
- Bollin, Plouffe, Para et Hackman (1985). "Aerosols containing *Legionella pneumophila* generated by shower heads and hot-water faucets." *Appl Environ Microbiol* **50**(5): 1128-31.
- Bolton, Safarzadeh-Amiri et Cater (1995). *Alternative Fuels and the Environment The Detoxification of Wastewater Streams Using Solar and Artificial UV Light Sources*. Boca Raton, Florida, USA.

- Bonafous, Cassar, Cassat, Colombet et Guillot (2006). Granular photocatalytic mixture for mortar or concrete and its use. **European Patent EP1405835**.
- Borazjani, May, Noble, Avery et Ahearn (2000). "Flow cytometry for determination of the efficacy of contact lens disinfecting solutions against *Acanthamoeba spp.*" *Appl Environ Microbiol* **66**(3): 1057-61.
- Boulos, Prevost, Barbeau, Coallier et Desjardins (1999). "LIVE/DEAD® BacLight™: application of a new rapid staining method for direct enumeration of viable and total bacteria in drinking water." *Journal of Microbiological Methods* **37**(1): 77-86.
- Brady, Lisay, Yurkovetskiy et Sawan (2003). "Persistent silver disinfectant for the environmental control of pathogenic bacteria." *American Journal of Infection Control* **31**(4): 208-214.
- Bragg et Rainnie (1974). "The effect of silver ions on the respiratory chain of *Escherichia coli*." *Can J Microbiol* **20**(6): 883-9.
- Brown et Lerner (1998). "Community-acquired pneumonia." *Lancet* **352**(9136): 1295-302.
- Bryson et Szybalski (1952). "Microbial selection." *Science* **115**(3003): 45-51.
- Cai, Kubota, Shuin, Sakai, Hashimoto et Fujishima (1992). "Induction of Cytotoxicity by Photoexcited TiO₂ Particles." *Cancer Res* **52**(8): 2346-2348.
- Call, Kenning, Call, Birmingham et Hammerstrom (2001). Impact particulate collector using a rotary impeller for collecting particulates and moving a fluid. **US Patent 6267016**.
- Cao, Gao, Suib, Obee, Hay et Freihaut (2000). "Photocatalytic Oxidation of Toluene on Nanoscale TiO₂ Catalysts: Studies of Deactivation and Regeneration." *Journal of Catalysis* **196**: 253-261.
- Capita et Alonso-Calleja (2003). "Comparison of Different Most-Probable-Number Methods for Enumeration of *Listeria* in Poultry." *Journal of Food Protection* **66**: 65-71.
- Carson, Petersen, Favero et Aguero (1978). "Growth characteristics of atypical mycobacteria in water and their comparative resistance to disinfectants." *Appl. Environ. Microbiol.* **36**(6): 839-846.
- Cassano, Martin, Brandi et Alfano (1995). "Photoreactor Analysis and Design: Fundamentals and Applications." *Ind. Eng. Chem. Res.* **34**(7): 2155-2201.
- CDC (1996). "National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System report, data summary from October 1986 through April 1996, issued May 1996." *American Journal of Infection Control* **24**(380-388).
- Chang, Hwang, Grinshpun, Macher et Willeke (1994). "Evaluation of counting error due to colony masking in bioaerosol sampling." *Appl Environ Microbiol* **60**(10): 3732-8.
- Chen, Lei, Ji, Ma, Zhao, Hidaka et Serpone (2004). "Photocatalysis by titanium dioxide and polyoxometalate/TiO₂ cocatalysts. Intermediates and mechanistic study." *Environ Sci Technol* **38**(1): 329-37.
- Chen, Li et Ray (2001). "External and internal mass transfer effect on photocatalytic degradation." *Catalysis Today* **66**(2-4): 475-485.
- Cheng, Chan et Wong (2007). "Disinfection of *Legionella pneumophila* by photocatalytic oxidation." *Water Research* **41**(4): 842-852.
- Chéron (2006). *Maîtriser le risque légionelles*, Editions Johonet.
- Chick (1908). "An investigation into the laws of disinfection." *Journal of Hygiene* **8**: 92-158.
- Chien-Sheng, Yao-Hsuan et Yuan-Yao (2006). "Wettability and Superhydrophilic TiO₂ Film Formed by Chemical Vapor Deposition." *Chemistry Letters* **35**(4): 356-357.
- Cho, Chung, Choi et Yoon (2004). "Linear correlation between inactivation of *E. coli* and OH radical concentration in TiO₂ photocatalytic disinfection." *Water Res* **38**(4): 1069-77.
- Cho, Chung, Choi et Yoon (2005). "Different inactivation behaviors of MS-2 phage and *Escherichia coli* in TiO₂ photocatalytic disinfection." *Appl Environ Microbiol* **71**(1): 270-5.
- Choi et Kim (2000). "Photocatalytic disinfection of *E. coli* in a UV/TiO₂-immobilised optical-fibre reactor." *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* **75**(12): 1145-1150.
- Choi, Ko, Park et Chung (2001). "Investigation on TiO₂-coated optical fibers for gas-phase photocatalytic oxidation of acetone." *Applied Catalysis B: Environmental* **31**(3): 209-220.
- Cik, Priesolova, Bujdakova, Sersen, Potheoova et Kristin (2006). "Inactivation of bacteria G+ *S. aureus* and G- *E. coli* by phototoxic polythiophene incorporated in ZSM-5 zeolite." *Chemosphere* **63**(9): 1419-1426.
- Clement et Jarrett (1994). "Antibacterial Silver." *Metal-Based Drugs* **1**(5-6): 467-482.
- Cochran (1950). "Estimation of Bacterial Densities by Means of the "Most Probable Number" " *Biometrics* **6**(2): 105-116.
- Coronado, Soria, Conesa, Bellod, Adan, Yamaoka, Loddo et Augugliaro (2005). "Photocatalytic Inactivation of *Legionella pneumophila* and an Aerobic Bacteria Consortium in Water over TiO₂/SiO₂ Fibres in a Continuous Reactor." *Topics in Catalysis* **35**: 279-286.
- Cui, Liu, Li, Sun, Wang, Liu et Greer (2005). "Fabrication and biocompatibility of nano-TiO₂/titanium alloys biomaterials." *Materials Letters* **59**(24-25): 3144-3148.
- Danion, Disdier, Guillard et Jaffrezic-Renault (2007). "Malic acid photocatalytic degradation using a TiO₂-coated optical fiber reactor." *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* **190**(5): 135-140.
- Deasy, Kuster et Timoney (1970). "Resistance of *Bacillus subtilis* Spores to Inactivation by Gamma Irradiation and Heating in the Presence of a Bactericide: I. Suitability of Viable Count Procedures." *Appl. Environ. Microbiol.* **20**(3): 455-460.
- Deloge-Abarkan, Ha, Robine, Zmirou-Navier et Mathieu (2007). "Detection of airborne *Legionella* while showering using liquid impingement and fluorescent in situ hybridization (FISH)." *J Environ Monit* **9**(1): 91-7.
- Dhananjay, Bhatkhande, Vishwas, Pangarkar et Beenackers (2002). "Photocatalytic degradation for environmental applications - a review." *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* **77**(1): 102-116.
- Dibrov, Dzioba, Gosink et Hase (2002). "Chemiosmotic mechanism of antimicrobial activity of Ag(+) in *Vibrio cholerae*." *Antimicrob Agents Chemother* **46**(8): 2668-70.
- Draper et Fox (1990). "Titanium dioxide photosensitized reactions studied by diffuse reflectance flash photolysis in aqueous suspensions of TiO₂ powder." *Langmuir* **6**(8): 1396-1402.

- Du, Carneiro., Moulijn et Mul (2007). "A Novel Photocatalytic Monolith reactor for Multiphase Heterogeneous Photocatalysis." *Applied Catalysis A: General* **334**(1-2): 119-128.
- Durmaz, Kiremitci, Akgun, Oz, Kasifoglu, Aybey et Kiraz (2005). "The relationship between airborne colonization and nosocomial infections in intensive care units." *Journal of Chemotherapy* **39**(4): 465-471.
- Eickhoff (1994). "Airborne nosocomial infection: a contemporary perspective." *Infect Control Hosp Epidemiol* **15**(10): 663-72.
- El-Morsi, Budakowski, Abd-El-Aziz et Friesen (2000). "Photocatalytic Degradation of 1,10-Dichlorodecane in Aqueous Suspensions of TiO₂: A Reaction of Adsorbed Chlorinated Alkane with Surface Hydroxyl Radicals." *Environ. Sci. Technol.* **34**(6): 1018-1022.
- Erkan, Bakir et Karakas (2006). "Photocatalytic microbial inactivation over Pd doped SnO₂ and TiO₂ thin films." *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* **184**(3): 313-321.
- Esterkin, Negro, Alfano et Cassano (2002). "Radiation field inside a reactor of glass-fiber meshes coated with TiO₂." *AIChE Journal* **48**(4): 832-845.
- Evans et Sheel (2007). "Photoactive and antibacterial TiO₂ thin films on stainless steel." *Surface and Coatings Technology* **201**(22-23): 9319-9324.
- Evgenidou, Konstantinou, Fytianos, Poullos et Albanis (2007). "Photocatalytic oxidation of methyl parathion over TiO₂ and ZnO suspensions." *Catalysis Today* **124**(3-4): 156-162.
- Feng, Wu, Chen, Cui, Kim et Kim (2000). "A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*." *Journal of Biomedical Materials Research* **52**(4): 662-668.
- Fields (1996). "The molecular ecology of *legionellae*." *Trends Microbiol* **4**(7): 286-90.
- Fields, Benson et Besser (2002). "Legionella and Legionnaires' Disease: 25 Years of Investigation." *Clin. Microbiol. Rev.* **15**(3): 506-526.
- Foster, Koval, Sczechowski et Noble (1996). "Investigation of controlled periodic illumination effects on photo-oxidation processes at titanium dioxide films using rotating ring disk photoelectrochemistry." *Journal of Electroanalytical Chemistry* **406**(1-2): 213-217.
- Foster, Lancaster, Noble et Koval (1995). "Effect of Organics on the Photodeposition of Copper in Titanium Dioxide Aqueous Suspensions." *Ind. Eng. Chem. Res.* **34**(11): 3865-3871.
- Fraser, Tsai, Orenstein, Parkin, Beecham, Sharrar, Harris, Mallison, Martin, McDade, Shepard et Brachman (1977). "Legionnaires' disease: description of an epidemic of pneumonia." *The New England journal of medicine* **297**(22): 1189-1197.
- Fritze et Pukall (2001). "Reclassification of bioindicator strains *Bacillus subtilis* DSM 675 and *Bacillus subtilis* DSM 2277 as *Bacillus atrophaeus*." *Int J Syst Evol Microbiol* **51**(1): 35-37.
- Fryzek, Chadda, Marano, White, Schweitzer, McLaughlin et Blot (2003). "A cohort mortality study among titanium dioxide manufacturing workers in the United States." *J Occup Environ Med* **45**(4): 400-409.
- Fujishima et Honda (1972). "Electrochemical Photolysis of Water at a Semiconductor Electrode." *Nature* **238**(5358): 37-38.
- Furman, Corbel, Galla, Zahraa et Bouchy (2007). "Influence of the geometry of a monolithic support on the efficiency of photocatalyst for air cleaning." *Chemical Engineering Science* **62**(18-20): 5312-5316.
- Garthright et Blodgett (2003). "FDA's preferred MPN methods for standard, large or unusual tests, with a spreadsheet." *Food Microbiology* **20**(4): 439-445.
- Gilchrist, Campbell, Donnelly, Peeler et Delaney (1973). "Spiral Plate Method for Bacterial Determination." *Appl. Envir. Microbiol.* **25**(2): 244-252.
- Gogniat et Dukan (2007). "TiO₂ photocatalysis causes DNA damage via fenton reaction-generated hydroxyl radicals during the recovery period." *Appl Environ Microbiol* **73**(23): 7740-3.
- Gogniat, Thyssen, Denis, Pulgarin et Dukan (2006). "The bactericidal effect of TiO₂ photocatalysis involves adsorption onto catalyst and the loss of membrane integrity." *FEMS Microbiol Lett* **258**(1): 18-24.
- Gogniat, Thyssen, Denis, Pulgarin et Dukan (2006). "The bactericidal effect of TiO₂ photocatalysis involves adsorption onto catalysts and loss of membrane integrity." *FEMS Microbiology Letters* **258**(1): 18-24.
- Goo Hwang, Katayama et Ohgaki (2007). "Inactivation of *Legionella pneumophila* and *Pseudomonas aeruginosa*: Evaluation of the bactericidal ability of silver cations." *Water Research* **41**(18): 4097-4104.
- Gorner, Fabries, Duquenne, Witschger et Wrobel (2006). "Bioaerosol sampling by a personal rotating cup sampler CIP 10-M." *Journal of Environmental Monitoring* **8**(1): 43-48.
- Goswami (1999). Photocatalytic air disinfection. **US Patent 5933702**.
- Gratzel (2001). "Photoelectrochemical cells." *Nature* **414**(6861): 338-344.
- Greene, Vesley, Bond et Michaelsen (1962). "Microbiological contamination of hospital air. I. Quantitative studies." *Appl Microbiol* **10**: 561-6.
- Greene, Vesley, Bond et Michaelsen (1962). "Microbiological contamination of hospital air. II. Qualitative studies." *Appl Microbiol* **10**: 567-71.
- Griffiths et DeCosemo (1994). "The assessment of bioaerosols: A critical review." *Journal of Aerosol Science* **25**(8): 1425-1458.
- Griffiths, Stewart, Futter, Upton et Mark (1996). "The development of sampling methods for the assessment of indoor bioaerosols." *Journal of Aerosol Science* **27**(Supplement 1): 235-236.
- Griffiths, Stewart, Futter, Upton et Mark (1997). "The development of sampling methods for the assessment of indoor bioaerosols." *Journal of Aerosol Science* **28**(3): 437-457.
- Grinshpun, Adhikari, Honda, Kim, Toivola, RamchanderRao et Reponen (2007). "Control of Aerosol Contaminants in Indoor Air: Combining the Particle Concentration Reduction with Microbial Inactivation." *Environ. Sci. Technol.* **41**(2): 606-612.
- Gutting, Channel, Berger, Gearhart, Andrews, Sherwood et Nichols (2008). "Mathematically Modeling Inhalational Anthrax." *Microbe* **3**(2): 78-85.
- Hager (2000). Method for disinfecting air. **European Patent EP0970706**.
- Hamamoto, Mori, Takahashi, Nakano, Wakikawa, Akutagawa, Ikehara, Nakaya et Kinouchi (2007). "New water disinfection system using UVA light-emitting diodes." *Journal of Applied Microbiology* **103**: 2291-2298.

- Hayashi, Makino, Ohnishi, Kurokawa, Ishii, Yokoyama, Han, Ohtsubo, Nakayama, Murata, Tanaka, Tobe, Iida, Takami, Honda, Sasakawa, Ogasawara, Yasunaga, Kuhara, Shiba, Hattori et Shinagawa (2001). "Complete Genome Sequence of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and Genomic Comparison with a Laboratory Strain K-12." *DNA Res* **8**(1): 11-22.
- Hecker, Meier, Thevenin et Hartberger (1983). "Comparative studies of gelatin and cellulose ester membrane filters for their suitability in determining the microorganism count in the air." *Zentralbl Bakteriell Mikrobiol Hyg [B]* **177**(5): 375-93.
- Heidelberg, Shahamat, Levin, Rahman, Stelma, Grim et Colwell (1997). "Effect of aerosolization on culturability and viability of gram negative bacteria." *Appl. Environ. Microbiol.* **63**(9): 3585-3588.
- Herrmann (1999). "Heterogeneous photocatalysis: fundamentals and applications to the removal of various types of aqueous pollutants." *Catalysis Today* **53**(1): 115-129.
- Hierholzer, Suggs et Hall (1969). "Standardized Viral Hemagglutination and Hemagglutination-Inhibition Tests. II. Description and Statistical Evaluation." *Appl. Environ. Microbiol.* **18**(5): 824-833.
- Hilbrich et Strugger (1942). "Bakterienzellen mit Hilfe der Akridinorange-Färbung." *Deutsche tierärztliche Wochenschrift* **50**: 121-130.
- Hinds (1999). *Aerosol Technology Properties, Behavior, and Measurement of Airborne Particles*. New York, Wiley.
- Hirakawa, Mori, Yoshida, Oikawa et Kawanishi (2004). "Photo-irradiated Titanium Dioxide Catalyzes Site Specific DNA Damage via Generation of Hydrogen Peroxide." *Free Radical Research* **38**(5): 439 - 447.
- Hirata, Grant et Draper (1969). "Factors Affecting the Passive Hemagglutination Titration: Dilution Loops, Titration Trays, Vibration, Diluents." *Appl. Environ. Microbiol.* **17**(4): 563-567.
- Holcatova, Bencko et Binek (1993). *Indoor air microbial contamination in the operating theatre and intensive care units of the surgery clinic*. Proceedings of Indoor Air, Helsinki, Finland.
- Hongfei Lin (2006). "An optical fiber monolith reactor for photocatalytic wastewater treatment." *AIChE Journal* **52**(6): 2271-2280.
- Horneck (2006). Bacterial Spores Survive Simulated Meteorite Impact. *Biological Processes Associated with Impact Events*: 41-53.
- Huang, Maness, Blake, Wolfrum, Smolinski et Jacoby (2000). "Bactericidal mode of titanium dioxide photocatalysis." *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* **130**(2-3): 163-170.
- Hui, Wong, Mui et Law (2007). "Survey of Unsatisfactory Levels of Airborne Bacteria in Air-conditioned Offices." *Indoor and Built Environment* **16**(2): 130-138.
- Hunsinger (2005). *Comparison of the spread plate technique and the MPN-technique for the determination of viable colony counts in quantitative suspension tests to evaluate bactericidal and fungicidal activity of chemical disinfectants*. International Society for Animal Hygiene 2005, Warsaw, Poland.
- Ibanez, Litter et Pizarro (2003). "Photocatalytic bactericidal effect of TiO₂ on *Enterobacter cloacae*: Comparative study with other Gram (-) bacteria." *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* **157**(1): 81-85.
- Imlay, Chin et Linn (1988). "Toxic DNA damage by hydrogen peroxide through the Fenton reaction in vivo and in vitro." *Science* **240**(4852): 640-2.
- Imlay et Linn (1988). "DNA damage and oxygen radical toxicity." *Science* **240**(4857): 1302-9.
- Jain et Pradeep (2005). "Potential of silver nanoparticle-coated polyurethane foam as an antibacterial water filter." *Biotechnology and Bioengineering* **90**(1): 59-63.
- Jarvis et Russell (2001). "Differences in *Escherichia coli* Culture Conditions Can Have a Large Impact on the Induction of Extreme Acid Resistance." *Current Microbiology* **43**(3): 215-219.
- Jensen, Todd, Davis et Scarpino (1992). "Evaluation of eight bioaerosol samplers challenged with aerosols of free bacteria." *Am Ind Hyg Assoc J* **53**(10): 660-7.
- Josset, Keller, Keller et Lett (2008). "Numeration methods for targeting photoactive materials in the UV-A photocatalytic removal of microorganisms. A review." *Royal Society of Chemistry* **37**: 744-755.
- Josset, Taranto, Keller, Keller, Lett, Ledoux, Bonnet et Rougeau (2007). "UV-A photocatalytic treatment of high flow rate air contaminated with *Legionella pneumophila*." *Catalysis Today* **129**(1-2): 215-222.
- Kabir, Haque, Vaisman, Langford et Kantzas (2003). "Disinfecting *E.coli* Bacteria In Drinking Water Using A Novel Fluidized Bed Reactor." *Chemical Reactor Engineering* **1**(A39).
- Karlstrom et Levine (1991). "Copper Inhibits the Protease from Human Immunodeficiency Virus 1 by Both Cysteine-Dependent and Cysteine-Independent Mechanisms." *Proceedings of the National Academy of Sciences* **88**(13): 5552-5556.
- Kashige, Kakita, Nakashima, Miake et Watanabe (2001). "Mechanism of the Photocatalytic Inactivation of *Lactobacillus casei* Phage PL-1 by Titania Thin Film." *Current Microbiology* **42**(3): 184-189.
- Keevil (2005). *Copper Alloys for Human Infectious Disease Control*. Materials Science and Technology Conference,, Pittsburgh.
- Keleher, Bashant, Heldt, Johnson et Li (2002). "Photocatalytic preparation of silver-coated TiO₂ particles for antibacterial applications." *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **18**: 133-139.
- Keller et Garin (2003). "Photocatalytic behavior of a new composite ternary system: WO₃/SiC-TiO₂. Effect of the coupling of semiconductors and oxides in photocatalytic oxidation of methylethylketone in the gas phase." *Catalysis Communications* **4**(8): 377-383.
- Keller, Keller, Barraud, Garin et Ledoux (2004). "Synthesis and characterization of a new medium surface area TiO₂-β-SiC material for use as photocatalyst." *Journal of Materials Chemistry* **14**: 1887-1895.
- Keller, Keller, Ledoux et Lett (2005). "Biological agent inactivation in a flowing air stream by photocatalysis." *Chemical Communications* **23**: 2918-2920.
- Kepner Jr et Pratt (1994). "Use of fluorochromes for direct enumeration of total bacteria in environmental samples: past and present." *Microbiol Rev* **58**(4): 603-15.
- Kim, Anderson, Mueller, Gaines et Kendall (2002). "Literature review : efficacy of various disinfectants against *Legionella* in water systems." *Water Res* **36**(18): 4433-44.
- Knudson (1985). "Photoreactivation of UV-irradiated *Legionella pneumophila* and other *Legionella species*." *Appl. Environ. Microbiol.* **49**(4): 975-980.

- Kobayakawa, Sato, Sato et Fujishima (1998). "Continuous-flow photoreactor packed with titanium dioxide immobilized on large silica gel beads to decompose oxalic acid in excess water." *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* **118**(1): 65-69.
- Kogure, Simidu et Taga (1979). "A tentative direct microscopic method for counting living marine bacteria." *Can J Microbiol* **25**(3): 415-20.
- Koide et Nonami (2007). "Disinfecting efficacy of a plastic container covered with photocatalyst for postharvest." *Food Control* **18**(1): 1-4.
- Kott (1966). "Estimation of Low Numbers of *Escherichia coli* Bacteriophage by Use of the Most Probable Number Method." *Appl. Environ. Microbiol.* **14**(2): 141-144.
- Kowalski (2007). "Air-Treatment Systems for Controlling Hospital-Acquired Infections." *Heating, Pipiping, Air Conditioning Engineering*.
- Kozlov, Vorontsov, Smirniotis et Savinov (2003). "Gas-phase photocatalytic oxidation of diethyl sulfide over TiO₂: kinetic investigations and catalyst deactivation." *Applied Catalysis B: Environmental* **42**(15): 77-87.
- Kuhn, Chaberny, Massholder, Stickler, Benz, Sonntag et Erdinger (2003). "Disinfection of surfaces by photocatalytic oxidation with titanium dioxide and UVA light." *Chemosphere* **53**(1): 71-77.
- Lacroix, Nguyen, Schweich, Pham Huu, Savin-Poncet et Edouard (2007). "Pressure drop measurements and modeling on SiC foams." *Chemical Engineering Science* **62**(12): 3259-3267.
- Laflamme, Lavigne, Ho et Duchaine (2004). "Assessment of bacterial endospore viability with fluorescent dyes." *Journal of Applied Microbiology* **96**: 684-692.
- Lasa, Serrano et Salices (2005). Novel Photocatalytic Reactors for Water and Air Treatment. *Photocatalytic Reaction Engineering*: 17-47.
- Lasa et Valladares (1997). Photocatalytic reactor. **US Patent 5683589**.
- Ledoux et Pham-Huu (2001). "Silicon carbide: a novel catalyst support for heterogeneous catalysis." *CATTECH* **5**: 226-246.
- Lee, Shen, Dwight et Wold (1993). "Effect of Silver on the Photocatalytic Activity of TiO₂." *Journal of Solid State Chemistry* **106**(2): 288-294.
- Leitner, Bras, Foucault et Bousgarbie (1997). "A new photochemical reactor design for the treatment of absorbing solutions." *Water Science and Technology* **35**(4): 215-222.
- Li et Lin (2001). "Storage effects on bacterial concentration: determination of impinger and filter samples." *The Science of The Total Environment* **278**(1-3): 231-237.
- Li Puma et Yue (2003). "Modelling and design of thin-film slurry photocatalytic reactors for water purification." *Chemical Engineering Science* **58**(11): 2269-2281.
- Lichtman et Conchello (2005). "Fluorescence microscopy." *Nature Methods* **2**: 910-919.
- Lim, Rudolph, Anpo et Lu (2008). "Fluidized-bed photocatalytic degradation of airborne styrene." *Catalysis Today* **131**(1-4): 548-552.
- Lin, Reponen, Willeke, Grinshpun, Foarde et Ensor (1999). "Long-term sampling of airborne bacteria and fungi into a non-evaporating liquid." *Atmospheric Environment* **33**(26): 4291-4298.
- Lin et Valsaraj (2005). "Development of an optical fiber monolith reactor for photocatalytic wastewater Treatment." *Journal of Applied Electrochemistry* **35**(7): 699-708.
- Liu, John, Yeung et Si (2007). "Non-UV based germicidal activity of metal-doped TiO₂ coating on solid surfaces." *Journal of Environmental Sciences* **19**(6): 745-750.
- Liu, Li, Qiu et Burda (2007). "Bactericidal Activity of Nitrogen-doped Metal Oxides Nanocatalysts and Influence of Bacterial Extracellular Polymeric Substances (EPS)." *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* **1**(5): 94-100.
- Liu, Wang, Yang et Yang (2008). "Excellent antimicrobial properties of mesoporous anatase TiO₂ and Ag/TiO₂ composite films." *Microporous and Mesoporous Materials* **114**(1-3): 431-439.
- Lu, Zhang, Zhang, Xie, Tian, Chen, Huang et Pang (2005). "Core/shell quantum-dot-photosensitized nano-TiO₂ films: fabrication and application to the damage of cells and DNA." *J Phys Chem B* **109**(47): 22663-6.
- Luo, Miao, Tanemura et Tanemura (2008). "Photocatalytic sterilization of TiO₂ films coated on Al fiber." *Materials Science and Engineering: B* **148**(1-3): 183-186.
- Maggos, Plassais, Bartzis, Vasilakos, Moussiopoulos et Bonafous (2008). "Photocatalytic degradation of NO_x in a pilot street canyon configuration using TiO₂-mortar panels." *Environmental Monitoring and Assessment* **136**(1): 35-44.
- Manahan et Steck (1997). "The viable but nonculturable state in *Agrobacterium tumefaciens* and *Rhizobium meliloti*." *FEMS Microbiology Ecology* **22**(1): 29-37.
- Maness, Smolinski, Blake, Huang, Wolfrum et Jacoby (1999). "Bactericidal Activity of Photocatalytic TiO₂ Reaction: toward an Understanding of Its Killing Mechanism." *Appl. Environ. Microbiol.* **65**(9): 4094-4098.
- Marek et Yudichak (1975). Foam carbonization and resulting foam structures. **US Patent 3922334**.
- Marinangeli et Ollis (1977). "Photoassisted heterogeneous catalysis with optical fibers: I. Isolated single fiber." *AIChE Journal* **23**(4): 415-426.
- Marinangeli et Ollis (1980). "Photo-assisted heterogeneous catalysis with optical fibers II. Nonisothermal single fiber and fiber bundle." *AIChE Journal* **26**(6): 1000-1008.
- Marinangeli et Ollis (1982). "Photo-assisted heterogeneous catalysis with optical fibers. Part III: Photoelectrodes." *AIChE Journal* **28**(6): 945-955.
- Martin, Camera-Roda et Santarelli (1999). "Effective design of photocatalytic reactors: influence of radiative transfer on their performance." *Catalysis Today* **48**(1-4): 307-313.
- Masaoka, Kubota, Namiuchi, Takubo, Ueda, Shibata, Nakamura, Yoshitake, Yamayoshi, Doi et Kamiki (1982). "Ozone decontamination of biocean rooms." *Appl. Environ. Microbiol.* **43**(3): 509-513.
- Mastorides, Oehler, Greene, Sinnott, Kranik et Sandin (1999). "The Detection of Airborne *Mycobacterium tuberculosis* Using Micropore Membrane Air Sampling and Polymerase Chain Reaction." *Chest* **115**(1): 19-25.
- Matsunaga, Tomoda, Nakajima et Wake (1985). "Photoelectrochemical sterilization of microbial cells by semiconductor powders." *FEMS Microbiology Letters* **29**(1-2): 211-214.

- Matthews et McEvoy (1992). "A comparison of 254 nm and 350 nm excitation of TiO₂ in simple photocatalytic reactors." Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry **66**(3): 355-366.
- Mendez-Hermida, Castro-Hermida, Ares-Mazas, Kehoe et McGuigan (2005). "Effect of Batch-Process Solar Disinfection on Survival of *Cryptosporidium parvum* Oocysts in Drinking Water." Appl. Environ. Microbiol. **71**(3): 1653-1654.
- Mills et Hoffmann (1993). "Photocatalytic degradation of pentachlorophenol on titanium dioxide particles: identification of intermediates and mechanism of reaction." Environ. Sci. Technol. **27**(8): 1681-1689.
- Moore, Leonard et Hawkes (1908). "An investigation of the toxic actions of dilute solutions of the salts of certain heavy metals (viz : copper, iron, nickel, cobalt, manganese, zinc, silver and lead) upon *Bacillus typhosis*, with a view to practical application in the purification of shell-fish." BIO-CHEMICAL JOURNAL: 313.
- Moorer (2003). "Antiviral activity of alcohol for surface disinfection." International Journal of Dental Hygiene **1**(3): 138-142.
- Morein, Andersson, Rilfors et Lindblom (1996). "Wild-type *Escherichia coli* Cells Regulate the Membrane Lipid Composition in a "Window" between Gel and Non-lamellar Structures." J. Biol. Chem. **271**(12): 6801-6809.
- Morikawa, Irokawa et Ohwaki (2006). "Enhanced photocatalytic activity of TiO_{2-x}N_x loaded with copper ions under visible light irradiation." Applied Catalysis A: General **314**(1): 123-127.
- Mouchtouri, Velonakis et Hadjichristodoulou (2007). "Thermal disinfection of hotels, hospitals, and athletic venues hot water distribution systems contaminated by Legionella species." American Journal of Infection Control **35**(9): 623-627.
- Müller et Zahn (2007). "Air Pollution Control by Non-Thermal Plasma." Contributions to Plasma Physics **47**(7): 520-529.
- Mukherjee et Ray (1999). "Major Challenges in the Design of a Large-Scale Photocatalytic Reactor for Water Treatment." Chemical Engineering & Technology **22**(3): 253-260.
- Muraca, Stout et Yu (1987). "Comparative assessment of chlorine, heat, ozone, and UV light for killing *Legionella pneumophila* within a model plumbing system." Appl Environ Microbiol **53**(2): 447-53.
- Nadtochenko, Rincon, Stanca et Kiwi (2005). "Dynamics of *E. coli* membrane cell peroxidation during TiO₂ photocatalysis studied by ATR-FTIR spectroscopy and AFM microscopy." Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry **169**(2): 131-137.
- Nagel (1989). "Ein Computer-Programm zur quantitativen Bestimmung der Keimzahl mittels der Most-Probable-Number (MPN)-Methode." Acta Hydrochimica et Hydrobiologica **17**(2): 143-152.
- Negron-Alvira, Perez-Suarez et Hazen (1988). "*Legionella spp.* in Puerto Rico cooling towers." Appl. Environ. Microbiol. **54**(10): 2331-2334.
- Nesa, Lortholary, Bouakline, Bordes, Chandenier, Derouin et Gangneux (2001). "Comparative performance of impactor air samplers for quantification of fungal contamination." Journal of Hospital Infection **47**(2): 149-155.
- Nguyen, Ilef, Jarraud, Rouil, Campese, Che, Haeghebaert, Ganiayre, Marcel, Etienne et Desenclos (2006). "A community-wide outbreak of legionnaires disease linked to industrial cooling towers--how far can contaminated aerosols spread?" J Infect Dis **193**(1): 102-111.
- Nicholson et Galeano (2003). "UV Resistance of *Bacillus anthracis* Spores Revisited: Validation of *Bacillus subtilis* Spores as UV Surrogates for Spores of *B. anthracis* Sterne." Appl. Environ. Microbiol. **69**(2): 1327-1330.
- Nocker, Sossa et Camper (2007). "Molecular monitoring of disinfection efficacy using propidium monoazide in combination with quantitative PCR." Journal of Microbiological Methods **70**(2): 252-260.
- Novotna, Zita, Krysa, Kalousek et Rathousky (2008). "Two-component transparent TiO₂/SiO₂ and TiO₂/PDMS films as efficient photocatalysts for environmental cleaning." Applied Catalysis B: Environmental **79**(2): 179-185.
- Obbard et Fang (2003). "Airborne Concentrations of Bacteria in a Hospital Environment in Singapore." Water, Air, & Soil Pollution **144**(1): 333-341.
- Ohko, Hashimoto et Fujishima (1997). "Kinetics of Photocatalytic Reactions under Extremely Low-Intensity UV Illumination on Titanium Dioxide Thin Films." J. Phys. Chem. A **101**(43): 8057-8062.
- Ohko, Tatsuma, Fujii, Naoi, Niwa, Kubota et Fujishima (2003). "Multicolour photochromism of TiO₂ films loaded with silver nanoparticles." Nat Mater **2**(1): 29-31.
- Paschoalino, Kiwi et Jardim (2006). "Gas-phase photocatalytic decontamination using polymer supported TiO₂." Applied Catalysis B: Environmental **68**(1-2): 68-73.
- Peake, James, Susman, Kennedy, Singleton et Schuenke (1996). Medical Microbiology 4th edition.
- Peill et Hoffmann (1995). "Development and Optimization of a TiO₂-Coated Fiber-Optic Cable Reactor: Photocatalytic Degradation of 4-Chlorophenol." Environ. Sci. Technol. **29**(12): 2974-2981.
- Peill et Hoffmann (1996). "Chemical and Physical Characterization of a TiO₂-Coated Fiber Optic Cable Reactor." Environ. Sci. Technol. **30**(9): 2806-2812.
- Peill et Hoffmann (1998). "Mathematical Model of a Photocatalytic Fiber-Optic Cable Reactor for Heterogeneous Photocatalysis." Environ. Sci. Technol. **32**(3): 398-404.
- Peral, Domènech et Ollis (1997). "Heterogeneous Photocatalysis for Purification, Decontamination and Deodorization of Air." Journal of Chemical Technology & Biotechnology **70**(2): 117-140.
- Pichat, Didier, Hoang-Van, Mas, Goutailler et Gaysse (2000). "Purification/deodorization of indoor air and gaseous effluents by TiO₂ photocatalysis." Catalysis Today **63**(2-4): 363-369.
- Pichat, Guillard, Amalric, Renard et Plaidy (1995). "Assessment of the importance of the role of H₂O₂ and O₂^{•-} in the photocatalytic degradation of 1,2-dimethoxybenzene." Solar Energy Materials and Solar Cells **38**(1-4): 391-399.
- Pigments (2007). "Japan's TiO₂ production hovers at around 250,000 tonnes/y." Focus on Pigments **2007**(1): 4-5.
- Piscopo, Robert, Marzolin et Weber (2000). "TiO₂ supported on glass fiber for the photocatalytic degradation of benzamide." Journal of Materials Science Letters **19**(8): 683-684.
- Po-Ren Hsueh (2002). "Pandrug-Resistant *Acinetobacter baumannii* Causing Nosocomial Infections in a University Hospital, Taiwan." Taiwan. Emerg Infect Dis.
- Pratap Reddy, Venugopal et Subrahmanyam (2007). "Hydroxyapatite-supported Ag/TiO₂ as *Escherichia coli* disinfection photocatalyst." Water Research **41**(2): 379-386.

- Puma et Yue (1999). "Comparison of the effectiveness of photon-based oxidation processes in a pilot falling film photoreactor." Environmental science & technology **33**(18): 3210-3216.
- Puzenat et Pichat (2003). "Studying TiO₂ coatings on silica-covered glass by O₂ photosorption measurements and FTIR-ATR spectrometry: Correlation with the self-cleaning efficacy." Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry **160**(1-2): 127-133.
- Rajagopal, Maruthamuthu, Mohanan et Palaniswamy (2006). "Biocidal effects of photocatalytic semiconductor TiO₂." Colloids and Surfaces B: Biointerfaces **51**(2): 107-111.
- Rana, Rawat, Sorensson et Misra (2006). "Antimicrobial function of Nd³⁺-doped anatase titania-coated nickel ferrite composite nanoparticles: A biomaterial system." Acta Biomaterialia **2**(4): 421-432.
- Rane, Mhalsiker, Yin, Sato, Cho, Dunbar et Biswas (2006). "Visible light-sensitive yellow TiO_{2-x}N_x and Fe-N co-doped Ti_{1-y}Fe_yO_{2-x}N_x anatase photocatalysts." Journal of Solid State Chemistry **179**(10): 3033-3044.
- Ray et Beenackers (1998). "Development of a new photocatalytic reactor for water purification." Catalysis Today **40**(1): 73-83.
- Renwick, Donaldson et Clouter (2001). "Impairment of alveolar macrophage phagocytosis by ultrafine particles." Toxicol Appl Pharmacol **172**(2): 119-27.
- Ricketts et Joseph (2007). "Legionnaires disease in Europe: 2005-2006." Euro Surveill **12**(12): E7-8.
- Riffat et Zhao (2007). "Preliminary study of the performance and operating characteristics of a mop-fan air cleaning system for buildings." Building and Environment **42**(9): 3241-3252.
- Rincon et Pulgarin (2003). "Photocatalytical inactivation of *E. coli*: effect of (continuous-intermittent) light intensity and of (suspended-fixed) TiO₂ concentration." Applied Catalysis B: Environmental **44**(3): 263-284.
- Rincon et Pulgarin (2004). "Bactericidal action of illuminated TiO₂ on pure *Escherichia coli* and natural bacterial consortia: post-irradiation events in the dark and assessment of the effective disinfection time." Applied Catalysis B: Environmental **49**(2): 99-112.
- Roszak et Colwell (1987). "Metabolic activity of bacterial cells enumerated by direct viable count." Appl. Environ. Microbiol. **53**(12): 2889-2893.
- Roth (2005). "Potential Industrial Applications of the One Atmosphere Uniform Glow Discharge Plasma Operating in Ambient Air." Physics of Plasmas **12**(5).
- Ruparelia, Chatterjee, Duttgupta et Mukherji (2008). "Strain specificity in antimicrobial activity of silver and copper nanoparticles." Acta Biomaterialia **4**(3): 707-716.
- Russell et Hugo (1994). "Antimicrobial activity and action of silver." Prog Med Chem **31**: 351-70.
- Saito, Iwase, Horie et Morioka (1992). "Mode of photocatalytic bactericidal action of powdered semiconductor TiO₂ on mutans *streptococci*." Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology **14**(4): 369-379.
- Sauer et Ollis (1994). "Acetone Oxidation in a Photocatalytic Monolith Reactor." Journal of Catalysis **149**(1): 81-91.
- Sauer et Ollis (1996). "Catalyst Deactivation in Gas-Solid Photocatalysis." Journal of Catalysis **163**: 215-217.
- Sayilkan, Asiltürk, Kiraz, Burunkaya, Arpaç et Sayilkan (2008). "Photocatalytic antibacterial performance of Sn⁴⁺-doped TiO₂ thin films on glass substrate." Journal of Hazardous Materials Article in Press, Accepted Manuscript.
- Schaule, Flemming et Ridgway (1993). "Use of 5-cyano-2,3-ditolyl tetrazolium chloride for quantifying planktonic and sessile respiring bacteria in drinking water." Appl. Environ. Microbiol. **59**(11): 3850-3857.
- Schiavello (1985). Proceedings of the NATO Advanced Study Institute on Fundamentals and Developments of Photocatalytic and Photoelectrochemical Processes. Erice, Trapani, Italy, Kluwer.
- Schillinger, Vu et Bellin (1999). "Airborne Fungi and Bacteria: Background Levels in Office Buildings." Journal of Environmental Health **62**.
- Schreurs et Rosenberg (1982). "Effect of silver ions on transport and retention of phosphate by *Escherichia coli*." J. Bacteriol. **152**(1): 7-13.
- Sczechowski, Koval et Noble (1993). "Evidence of Optimal Illumination and Dark Recovery Times for Increasing the Quantum Yield in Aqueous Heterogeneous Photocatalysis." J. Photochem. Photobiol. A **74**: 273-278.
- Segal et Shuman (1998). "Intracellular multiplication and human macrophage killing by *Legionella pneumophila* are inhibited by conjugal components of IncQ plasmid RSF1010." Molecular Microbiology **30**: 197-208.
- Seligman et Mickey (1964). "Estimation of the number of infectious bacterial or viral particles by the dilution method." J. Bacteriol. **88**(1): 31-36.
- Semchyshyn, Lushchak et Storey (2005). "Possible Reasons for Difference in Sensitivity to Oxygen of Two *Escherichia coli* Strains." Biochemistry (Moscow) **70**: 424-431.
- Shin'ichiro et Naoki (2006). "Field Works on Airborne Viable Particle in Five Houses (part 2)." Kuki Seijo to Kontamineshyon Kontoruru Kenkyu Taikai Yokoshu **24**: 72-73.
- Shiraishi, Toyoda, Fukinbara, Obuchi et Nakano (1999). "Photolytic and photocatalytic treatment of an aqueous solution containing microbial cells and organic compounds in an annular-flow reactor." Chemical Engineering Science International symposium on multifunctional reactors **54**(10): 1547-1552.
- Sichel, Blanco, Malato et Fernandez-Ibanez (2007). "Effects of experimental conditions on *E. coli* survival during solar photocatalytic water disinfection." Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry **189**(2-3): 239-246.
- Silver, Phung et Silver (2006). "Silver as biocides in burn and wound dressings and bacterial resistance to silver compounds." Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology **33**(7): 627-634.
- Sobczynski (1991). "Hydrogen photoproduction from water-methanol on titania covered with copper." Monatshefte für Chemie / Chemical Monthly **122**(8): 645-652.
- Sokmen, Candan et Sumer (2001). "Disinfection of *E. coli* by the Ag/TiO₂/UV system: lipidperoxidation." Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry **143**(2-3): 241-244.
- Song, Hennink, Young et Tanke (1995). "Photobleaching kinetics of fluorescein in quantitative fluorescence microscopy." Biophys J **68**(6): 2588-600.

- Sopajaree, Qasim, Basak et Rajeshwar (1999). "An integrated flow reactor-membrane filtration system for heterogeneous photocatalysis. Part I: Experiments and modelling of a batch-recirculated photoreactor." *Journal of Applied Electrochemistry* **29**(5): 533-539.
- Stearman (1955). "Statistical concepts in microbiology." *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **19**(3): 160-215.
- Stephen A. Craik (2001). "Inactivation of cryptosporidium parvum oocysts using medium- and low-pressure ultraviolet radiation." *Water Research* **35**(6): 1387-1398.
- Stocks (2004). "Mechanism and use of the commercially available viability stain, BacLight." *Cytometry Part A* **61A**(2): 189-195.
- Stohs et Bagchi (1995). "Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions." *Free Radical Biology and Medicine* **18**: 321-336.
- Sun, Nakajima, Watanabe, Watanabe et Hashimoto (2000). "TiO₂-coated optical fiber bundles used as a photocatalytic filter for decomposition of gaseous organic compounds." *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* **136**(1-2): 111-116.
- Sunada, Watanabe et Hashimoto (2003). "Studies on photokilling of bacteria on TiO₂ thin film." *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* **156**: 227-233.
- Taghipour et Mohseni (2005). "CFD simulation of UV photocatalytic reactors for air treatment." *AIChE Journal* **51**(11): 3039-3047.
- Tang, Li, Eames, Chan et Ridgway (2006). "Factors involved in the aerosol transmission of infection and control of ventilation in healthcare premises." *Journal of Hospital Infection* **64**(2): 100-114.
- Taylor et Kuennen (2005). Non therma plasma air treatment system. **EP1539256**.
- Taylor, Laub, Parker, Christianson, Snyder et McKinney (2005). Electro-kinetic air transporter and conditioner device with enhanced anti-microorganism capability. **US Patent 6974560**.
- Tomita (1967). "Fluorescence-excitation spectra of acridine orange-DNA and -RNA systems." *Radiation and Environmental Biophysics* **4**(1): 23-29.
- Tormo, Gonzalo, Munoz et Silva (2002). "Pollen and spores in the air of a hospital out-patient ward. ." *Allergologia et Immunopathologia* **30**: 232-238.
- Tsai et Macher (2005). "Concentrations of airborne culturable bacteria in 100 large US office buildings from the BASE study." *Indoor Air* **15**(s9): 71-81.
- Uchida, Katoh et Watanabe (1998). "Photocatalytic degradation of trichlorobenzene using immobilized TiO₂ films containing poly(tetrafluoroethylene) and platinum metal catalyst." *Electrochimica Acta* **43**: 2111-2116.
- Ullrich (1999). "Is the CTC dye technique an adequate approach for estimating active bacterial cells?" *Aquatic Microbiology Ecology* **17**: 207-209.
- Upadhyya et Ollis (1997). "Simple Photocatalysis Model for Photoefficiency Enhancement via Controlled, Periodic Illumination." *J. Phys. Chem. B* **101**(14): 2625-2631.
- Verran, Sandoval, Allen, Edge et Stratton (2007). "Variables affecting the antibacterial properties of nano and pigmentary titania particles in suspension." *Dyes and Pigments* **73**(3): 298-304.
- Villiermaux (1994). *Réacteurs chimiques : principes*.
- Vollertsen, Jahn, Lund Nielsen, Hvitved-Jacobsen et Halkjaer Nielsen (2001). "Comparison of methods for determination of microbial biomass in wastewater." *Water Research* **35**(7): 1649-1658.
- Vries et Hamilton (1999). "Estimating the Antimicrobial Log Reduction: Part 1. Quantitative Assays." *Quantitative Microbiology* **1**(1): 29-45.
- Vulliet, Emmelin, Chovelon, Guillard et Herrmann (2002). "Photocatalytic degradation of sulfonylurea herbicides in aqueous TiO₂." *Applied Catalysis B: Environmental* **38**(2): 127-137.
- Wagner, Amann, Lemmer et Schleifer (1993). "Probing activated sludge with oligonucleotides specific for proteobacteria: inadequacy of culture-dependent methods for describing microbial community structure." *Appl. Environ. Microbiol.* **59**(5): 1520-1525.
- Wagner et Macher (2003). "Comparison of a passive aerosol sampler to size-selective pump samplers in indoor environments." *AIHA J (Fairfax, Va)* **64**(5): 630-9.
- Wamer, Yin et Wei (1997). "Oxidative damage to nucleic acids photosensitized by titanium dioxide." *Free Radic Biol Med* **23**(6): 851-8.
- Wang et Ku (2003). "Photocatalytic degradation of gaseous benzene in air streams by using an optical fiber photoreactor." *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* **159**: 47-59.
- Washam, Black, Sandine et Elliker (1966). "Evaluation of filters for removal of bacteriophages from air." *Appl Microbiol* **14**(4): 497-505.
- Watanabe, Kitamura, Kojima, Hashimoto et Fujishima (1999). Photocatalytic air treatment process under room light. **US Patent 5874701**.
- Wen, Ortmann et Suttle (2004). "Accurate Estimation of Viral Abundance by Epifluorescence Microscopy." *Appl. Environ. Microbiol.* **70**(7): 3862-3867.
- WHO. (2007). "Fact sheet N°104."
- Wickhama et Rice (2008). "Solid-state NMR studies of bacterial lipoteichoic acid adsorption on different surfaces." *Solid State Nuclear Magnetic Resonance* **Article in Press, Accepted Manuscript**.
- Willeke, Lin et Grinshpun (1999). Swirling aerosol collector. **US Patent 5902385**.
- Wong, Chu, Sun, Huang, Chen, Tsai, Lin, Yu, Hsu, Wang et Chang (2006). "Visible-Light-Induced Bactericidal Activity of a Nitrogen-Doped Titanium Photocatalyst against Human Pathogens." *Appl. Environ. Microbiol.* **72**(9): 6111-6116.
- Xianzhi, Clark, Zeltner et Anderson (1996). "Effects of reaction temperature and water vapor content on the heterogeneous photocatalytic oxidation of ethylene." *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* **97**: 181-186.
- Yildiz et Fitnat (2007). "Processes controlling the transmission of bacterial pathogens in the environment." *Research in Microbiology* **158**(3): 195-202.
- Yu, Lee, Lin et Huang (2008). "Removal of bioaerosols by the combination of a photocatalytic filter and negative air ions." *Journal of Aerosol Science* **39**(5): 377-392.
- Yuranova, Rincon, Pulgarin, Laub, Xantopoulos, Mathieu et Kiwi (2006). "Performance and characterization of Ag-cotton and Ag/TiO₂ loaded textiles during the abatement of *E. coli*." *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* **181**(2-3): 363-369.

- Zhang, Cui, Huang, Lin, Tan, Xu, Yang, Zhang, Zhang, Li, Zheng, Chen, Yan, Zheng, Wan et Huang (2003). "Morphology and morphogenesis of severe acute respiratory syndrome (SARS)-associated virus." Sheng Wu Hua Xue Yu Sheng Wu Wu Li Xue Bao (Shanghai) **35**(6): 587-91.
- Zhang, Wang, Liu et Su (2008). "Low temperature deposition of TiO₂ thin films on polyvinyl alcohol fibers with photocatalytical and antibacterial activities." Applied Surface Science **254**(6): 1771-1774.
- Zhao, Zhao, Yu et Liu (2008). "Development of multifunctional photoactive self-cleaning glasses." Journal of Non-Crystalline Solids **354**(12-13): 1424-1430.