Nancy-Université
INPL

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.
Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur au même titre que sa version papier. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.
D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite entraîne une poursuite pénale.

Contact SCD INPL: mailto:scdinpl@inpl-nancy.fr

LIENS

Code de la propriété intellectuelle. Articles L 122.4
Code de la propriété intellectuelle. Articles L 335.2 – L 335.10
http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php
http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm

**Institut National de Recherche et de Sécurité (INRS)**
Département Ingénierie des Procédés
1 rue du Morvan – CS 60027
54519 Vandoeuvre Cedex

**Institut National Polytechnique de Lorraine**
2 Avenue de la Forêt de Haye BP 3
54501 Vandoeuvre-Lès-Nancy Cedex

**Laboratoire Réactions et Génie des Procédés (LRGP)**
UPR 3349 - CNRS - 1 Rue Grandville - BP 20451
54001 Nancy Cedex

**Ecole doctorale RP2E**
Ressources Procédés Produits et Environnement

# THESE

Présentée en vue de l'obtention du grade de

**Docteur de l'INPL**

Spécialité

**Génie des Procédés et des Produits**

---

# PURIFICATION DE L'AIR AMBIANT PAR L'ACTION BACTERICIDE DE LA PHOTOCATALYSE

---

Par
**Marie FAURE**
Ingénieur ENSIC

Soutenue publiquement le 24 novembre 2010, devant le jury composé de :

| | | |
|---|---|---|
| Rapporteurs : | Chantal Guillard | Directrice de recherche, IRCELYON |
| | Laurence Le-Coq | Professeur, Ecole des Mines de Nantes |
| Examinateurs : | César Pulgarin | Maître d'enseignement et de recherche, EPF Lausanne |
| | Dominique Thomas | Professeur, Université Henri Poincaré-Nancy |
| | Fabien Gérardin | Chargé d'études, INRS |
| | Orfan Zahraa | Maître de conférences, INPL |
| Invités : | Jean-Claude André | Directeur de recherche, LRGP Nancy |
| | Marie-Noëlle Pons | Directrice de recherche, LRGP Nancy |

# REMERCIEMENTS

Cette thèse a été réalisée au sein du département Ingénierie des Procédés, laboratoire PROCédés et Epuration des Polluants, de l'Institut National de Recherche et de Sécurité (INRS) et du Laboratoire Réactions et Génie des Procédés (LRGP-UPR 3349). Je remercie donc leurs responsables respectifs, MM Michel POURQUET, Eric SILVENTE et Gabriel WILD pour m'avoir accueillie et permis de mener à bien ce travail de thèse dans un contexte privilégié.

J'adresse également mes remerciements à mes encadrants de thèse, M. Orfan ZAHRAA, Mme Marie-Noëlle PONS et particulièrement M. Jean-Claude ANDRE pour m'avoir transmis sa philosophie sur la Recherche. Un très grand merci à Fabien GERARDIN, qui a su me communiquer son savoir-faire au sein de l'INRS, me conseiller, me rassurer et me motiver dans les moments difficiles.

Je suis très reconnaissante à Mesdames Chantal GUILLARD et Laurence LE-COQ et à Messieurs César PULGARIN et Dominique THOMAS d'avoir accepté de participer à mon jury de thèse.

Un grand merci à toutes les personnes du laboratoire PROCédés et Epuration des Polluants de l'INRS pour leur soutien et leur confiance quotidienne. Je tiens également à remercier tous les membres du laboratoire Métrologie des Aérosols pour m'avoir transmis leur savoir en microbiologie et ceux du laboratoire Chimie Analytique Organique pour leur assistance technique. Une liste détaillée des personnes serait longue et non exhaustive…

Pour finir, je tiens à remercier, pour leur soutien infaillible, mes amis et ma famille : mes parents, Sidonie, ma sœur, Sébastien, mon frère, Léa et Camille, mes nièces adorées et bien évidemment mon fiancé et futur mari, Jean-Christophe.

# TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION GENERALE ..... 17

CHAPITRE I : ÉTAT DE L'ART ..... 21

I.1 Contamination biologique de l'air ..... 22

I.1.1 Rappel sur les microorganismes ..... 22
I.1.2 Bioaérosol : définition et caractéristiques ..... 24
I.1.3 Evaluation et réduction du risque biologique associé aux bioaérosols ..... 26

I.2 Traitement des bioaérosols bactériens par photocatalyse ..... 30

I.2.1 Généralités ..... 31
I.2.2 Dispositifs d'épuration expérimentaux ..... 37
I.2.3 Paramètres d'influence ..... 41
I.2.4 Modes d'action de la photocatalyse ..... 43
I.2.5 Cinétiques d'inactivation ..... 44
I.2.6 Sous-produits de dégradation et minéralisation ..... 47

I.3 Propriétés des aérosols biologiques ..... 48

I.3.1 Comportement des particules aéroportées ..... 48
I.3.2 Génération de bioaérosols ..... 51
I.3.3 Echantillonnage des bioaérosols ..... 55
I.3.4 Analyses des échantillons ..... 59
I.3.5 Optimisation de la dégradation photocatalytique de bioaérosols ..... 60

I.4 Conclusion et démarche entreprise ..... 63

CHAPITRE II : MATERIELS ET METHODES ..... 67

II.1 Inactivation d'*E.coli* en batch ..... 68

II.1.1 Préparation des bactéries ..... 68
II.1.2 Supports photocatalytiques ..... 71
II.1.3 Réacteur photocatalytique batch ..... 76
II.1.4 Flux photonique disponible pour l'inactivation ..... 77
II.1.5 Protocole expérimental ..... 78
II.1.6 Efficacité d'inactivation et cinétique ..... 81
II.1.7 Analyses complémentaires ..... 81

II.2 Minéralisation des bactéries par photocatalyse ..... 83

II.2.1 Dispositif expérimental ..... 83
II.2.2 Prélèvements et analyses ..... 84

II.2.3 Flux photonique disponible pour la minéralisation ..... 85
II.2.4 Protocole expérimental ..... 86
II.2.5 Taux de minéralisation ..... 87

II.3 Essais d'inactivation d'un bioaérosol : prérequis ..... 89

II.3.1 Génération d'un bioaérosol d'*E.coli* ..... 89
II.3.2 Réception du réacteur continu ..... 93
II.3.3 Choix des supports photocatalytiques adaptés ..... 95

CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSIONS ..... 97

III.1 Essais d'inactivation batch ..... 98

III.1.1 Extraction ..... 98
III.1.2 Flux lumineux disponible pour l'inactivation ..... 99
III.1.3 Configurations testées ..... 99
III.1.4 Effet du temps d'irradiation et influence du milieu de culture ..... 101
III.1.5 Effet du support photocatalytique ..... 103
III.1.6 Effet du $TiO_2$ ..... 105
III.1.7 Cinétique d'inactivation ..... 106
III.1.8 Flore totale : expériences ..... 108
III.1.9 Endotoxines ..... 109
III.1.10 Conclusions ..... 112

III.2 Minéralisation d'*E.coli* par photocatalyse ..... 114

III.2.1 Vérifications préalables ..... 114
III.2.2 Flux lumineux disponible pour la minéralisation ..... 115
III.2.1 Bilan carbone et taux de minéralisation ..... 115
III.2.2 Effet de la charge initiale en bactéries ..... 116
III.2.3 Effet de la configuration du support ..... 118
III.2.4 Effet de l'intensité lumineuse ..... 119
III.2.5 Effet de l'hygrométrie ..... 119
III.2.6 Discussion générale ..... 122

III.3 Prérequis à l'inactivation d'un bioaérosol ..... 125

III.3.1 Caractéristiques du bioaérosol ..... 125
III.3.2 Réception du réacteur ..... 128

III.4 Dégradation photocatalytique du bioaérosol : quelques réflexions ..... 133

III.4.1 Choix du support photocatalytique ..... 133
III.4.2 Déroulement d'un essai ..... 134

CONCLUSION ET PERSPECTIVES ..... 137

BIBLIOGRAPHIE ..... 141

ANNEXES ..... 155

Annexe 1 : Comportement et caractéristiques physiques des aérosols
Annexe 2 : Caractéristiques optiques de la lampe, des supports photocatalytiques et des autres matériaux
Annexe 3 : Analyses microbiologiques complémentaires. Protocoles expérimentaux.
Annexe 4 : Banc d'essais de dégradation photocatalytique de bioaérosols.
Annexe 5 : Inactivation d'*E.coli* sur différents supports-Configurations témoins.
Annexe 6 : Inactivation d'*E.coli* sur différents supports-Influence du milieu de culture.
Annexe 7 : Dénombrements sur EMB-Graphes récapitulatifs.
Annexe 8 : Mesure des endotoxines suite à l'inactivation d'*E.coli*.

# TABLE DES FIGURES

*CHAPITRE I : ETAT DE L'ART*

Figure I.1-1 : Schéma d'une cellule eucaryote (gauche) et procaryote (droite) ..... 23
Figure I.1-2 : Paroi des bactéries Gram négatif et Gram positif ..... 24
Figure I.1-3 : Chaîne de transmission ..... 26
Figure I.2-1 : Principe de la photocatalyse ..... 32
Figure I.2-2 : Protocole de préparation de l'inoculum test ..... 37
Figure I.2-3 : Dispositif d'inactivation photocatalytique de bactérie en statique (Pal et al., 2007) ..... 38
Figure I.2-4 : Dispositifs d'inactivation photocatalytique de bactéries en dynamique ..... 40
Figure I.2-5 : Dispositifs d'inactivation de *Legionella* en dynamique (Josset, 2008) ..... 40
Figure I.2-6 : Schéma classique d'une réaction catalytique hétérogène ..... 41
Figure I.2-7 : Représentation schématique du contact entre les bactéries et le $TiO_2$ lors du processus d'inactivation photocatalytique (Caballero et al., 2009) ..... 43
Figure I.2-8 : Inactivation photocatalytique de bactéries ..... 45
Figure I.2-9 : Modèles cinétiques empiriques (Marugan et al., 2008) ..... 46
Figure I.3-1 : Nébuliseurs pneumatiques (Simon et al., 2009b) ..... 52
Figure I.3-2: Les systèmes de type « bulleur » (Simon et al., 2009b) ..... 53
Figure I.3-3: Générateur conventionnel (Simon et al., 2009b, d'après Reponen et al., 1997). 54
Figure I.3-4 : Générateur de type « tube-agar » , Simon et al. (2009b), d'après Reponen et al. (1997) ..... 54
Figure I.3-5: Générateur de type « flux cyclonique » (Simon et al., 2009b, d'après Reponen et al., 1997) ..... 55
Figure I.3-6: Dispositif de prélèvement d'un aérosol (Witschger, 1996) ..... 56
Figure I.3-7 : Représentation schématique de l'influence du paramètre aéraulique R et de l'inertie des particules sur le processus de captage d'un aérosol (Witschger, 1996) ..... 56
Figure I.3-8 : Collection des particules par diffusion Brownienne (Callé, 2000) ..... 61
Figure I.3-9 : Collection des particules par interception (Callé, 2000) ..... 62
Figure I.3-10: Collection des particules par impaction (Callé, 2000) ..... 62

*CHAPITRE II : MATERIELS ET METHODES*

Figure II.1-1 : Comparaison des dénombrements d'une culture liquide sur différents milieux de culture ..... 71
Figure II.1-2: Observation des supports 1045 et 1048 au MEB ..... 72
Figure II.1-3 : Protocole d'imprégnation des supports ..... 74
Figure II.1-4 : Réacteur batch ..... 76
Figure II.1-5 : Spectre d'émission de la lampe (à 8 cm) ..... 77
Figure II.1-6 : Interactions de la lumière avec un solide ..... 77
Figure II.1-7 : Algorithme du lancer de rayons par la méthode de Monte Carlo ..... 78
Figure II.1-8 : Protocole opératoire pour les essais d'inactivation batch ..... 80
Figure II.1-9 : Protocole opératoire des expérimentations en batch ..... 80
Figure II.2-1 : Réacteur fermé dédié à la minéralisation des bactéries ..... 83
Figure II.2-2 : Préparation des réacteurs avant les tests de minéralisation ..... 84
Figure II.2-3: Volume tampon pour le prélèvement et l'injection au CPG ..... 85
Figure II.2-4 : Irradiation du catalyseur pendant la minéralisation ..... 86

Figure II.2-5 : Protocole de détermination de la masse sèche d'une UFC ..... 88
Figure II.3-1 : Schéma du banc de génération et de caractérisation de bioaérosols expérimentaux (Simon et al., 2010a) ..... 90
Figure II.3-2 : Distribution granulométrique des cellules d'*E.coli* dans la suspension bactérienne (Simon et al., 2009b)..... 91
Figure II.3-3: Description du banc d'essais..... 93
Figure II.3-4 : Ecoulement en flux léchant et irradiation radiale ..... 94
Figure II.3-5 : Détermination de l'efficacité de filtration des supports photocatalytiques ..... 96

*CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSIONS*

Figure III.1-1 : Efficacité de la première extraction sur support QMA imprégné de P25 ou vierge (exemple : 40 minutes, TSA) ..... 98
Figure III.1-2 : Inactivation sur support QMA+suspension de $TiO_2$ P25 en fonction du temps d'irradiation, dénombrement sur TSA ..... 100
Figure III.1-3 : Inactivation par photolyse sur les différents supports en fonction du temps d'irradiation, dénombrements sur TSA ..... 101
Figure III.1-4 : Inactivation d'*E.coli* sur différents supports en fonction du temps d'irradiation, dénombrement sur TSA ..... 101
Figure III.1-5 : Effet du support photocatalytique sur l'inactivation d'*E.coli*, dénombrement sur TSA ..... 103
Figure III.1-6 : Contact $TiO_2$-bactéries selon les supports (échelles non respectées)..... 104
Figure III.1-7 : *E.coli* en suspension avec du $TiO_2$ ..... 105
Figure III.1-8 : Effet du type de $TiO_2$ sur l'inactivation d'*E.coli,* dénombrement sur TSA .. 106
Figure III.1-9 : Cinétique d'inactivation, en fonction des différents supports photocatalytiques, sur TSA ..... 107
Figure III.1-10 : Dénombrement des bactéries totales (culture à gauche, échantillon avec $TiO_2$ à droite) ..... 108
Figure III.1-11 : Dégradation d'une solution d'endotoxines de référence ..... 111
Figure III.2-1 : Relargage de $CO_2$ des filtres calcinés avec $TiO_2$..... 114
Figure III.2-2 : Effet de la charge initiale en bactéries sur la minéralisation d'*E.coli* par photocatalyse ..... 117
Figure III.2-3 : Effet de la configuration (suspension/imprégnation) sur la minéralisation d'*E.coli* par photocatalyse. ..... 118
Figure III.2-4 : Effet de l'intensité lumineuse sur la minéralisation d'*E.coli* par photocatalyse ..... 120
Figure III.2-5 : Effet de l'hygrométrie sur la minéralisation d'*E.coli* par photocatalyse..... 121
Figure III.3-1 : Comparaison des distributions granulométriques en nombre en fonction du diamètre optique des particules pour les particules résiduelles d'eau et pour le bioaérosol expérimental d'*E.coli* (Simon et al., 2009b) ..... 125
Figure III.3-2 : Evolution des valeurs de concentration normée en nombre de particules (dopt>0,4 µm) sur 180 minutes (Simon et al., 2010b) ..... 126
Figure III.3-3 : Evolution des valeurs de concentration normée en bactéries viables et cultivables sur 180 minutes (barres d'erreur : écart type) (Simon et al., 2010b) ..... 127
Figure III.3-4 : Evolution des concentrations en nombre de particules (dopt>0,4 µm) et en bactéries viables et cultivables en fonction du débit de génération ..... 127
Figure III.3-5: Influence de la concentration initiale en polluant (barres d'erreur : écart type) ..... 128
Figure III.3-6: Influence du nombre de lampes (barres d'erreur : écart type)..... 129

Figure III.3-7 : Influence de l'humidité (barres d'erreur : écart type) ..... 130
Figure III.3-8 : Influence du temps de passage (barres d'erreur : écart type) ..... 130
Figure III.3-9 : Détermination des constantes k et K du modèle de Langmuir Hinshelwood 132
Figure III.4-1 : Efficacité de filtration des supports photocatalytiques employés ..... 134
Figure III.4-2 : Planification des essais de dégradation photocatalytique d'un bioaérosol.... 135

# TABLE DES TABLEAUX

*CHAPITRE I : ETAT DE L'ART*

Tableau I.1-1 : Différences principales entre les eucaryotes et les procaryotes..... 23
Tableau I.1-2 : Sources de contaminants microbiens dans l'air..... 25
Tableau I.1-3 : Concentrations en bioaérosols (Unité Formant Colonie, UFC)..... 26
Tableau I.1-4: Effets des microorganismes sur la santé humaine..... 27
Tableau I.2-1 : Caractéristiques des $TiO_2$ couramment employés (Nguyen, et al., 2005)..... 33
Tableau I.2-2 : Lampes à vapeur de mercure (André, et al., 1988; CatRayon, 2000)..... 34
Tableau I.2-3 : Exemples de bactéries étudiées dans le cadre de la photocatalyse..... 36
Tableau I.3-1 : Corrélation pour le calcul des efficacités d'échantillonnage..... 57

*CHAPITRE II : MATERIELS ET METHODES*

Tableau II.1-1 : Observation des supports QMA vierge et imprégné au MEB..... 74
Tableau II.1-2 : Observation des supports QMA vierge et avec ajout d'une suspension de $TiO_2$ au MEB..... 75
Tableau II.1-3 : Configurations de travail pour les différents supports..... 79
Tableau II.2-1 : Conditions analytiques pour l'analyse du $CO_2$ en CPG..... 85
Tableau II.2-2 : Vérifications préalables aux essais de minéralisation de bactéries..... 86
Tableau II.2-3 : Configuration testées pour la minéralisation de bactéries..... 87
Tableau II.3-1 : Conditions analytiques pour l'analyse de l'éthanol par CPG..... 94
Tableau II.3-2 : Configurations à tester pour la dégradation photocatalytique d'éthanol..... 95

*CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION*

Tableau III.1-1 : Flux lumineux disponible pour l'inactivation..... 99
Tableau III.1-2 : Récapitulatif des efficacités d'inactivation..... 102
Tableau III.1-3 : Caractéristiques des supports contenant du $TiO_2$ PC500..... 104
Tableau III.1-4 : Constantes cinétiques et temps de retard associés aux modèles d'inactivation de Chick-Watson..... 107
Tableau III.1-5 : Quantité d'endotoxines dans une culture liquide..... 110
Tableau III.1-6 : Trouble des solutions d'extraction des différents supports..... 111
Tableau III.2-1 : Flux lumineux disponible pour la minéralisation (flux absorbé par le $TiO_2$ sur chacun des supports)..... 115
Tableau III.2-2 : Taux de minéralisation atteint après 72 h pour les différentes configurations testées..... 116
Tableau III.2-3 : Différences observées pour les deux types de supports..... 118
Tableau III.2-4 : Charge en bactéries sur les filtres, pour deux situations de travail..... 123

# NOMENCLATURE

***Lettres latines***

- a : accélération mécanique
- $A_p$ : maître couple d'une particule
- C : concentration
- $C_A$ : coefficient d'accélération
- $C_B$ : coefficient de Basset
- $C_E$ : coefficient de masse virtuelle
- $C_{X0}$ : coefficient de traînée
- d : diamètre
- $d_{ae}$: diamètre aérodynamique
- dil : taux de dilution
- $d_v$: diamètre équivalent en volume
- D : coefficient de diffusion
- $D_m$ : coefficient de diffusion moléculaire
- $e^-$ : électron
- E : efficacité
- $E_a$ : efficacité d'aspiration
- $E_C$ : efficacité de captage
- $E_D$ : efficacité de dépôt
- $E_E$ : efficacité d'échantillonnage
- $E_S$ : efficacité de sélection
- $E_T$ : efficacité de transmission, transport
- $E_0$ : permittivité du vide
- $F_A$ : poussée d'Archimède
- $F_B$ : force de Basset
- $F_E$ : force de masse virtuelle
- $F_S$ : force de surface
- $F_V$ : force de volume
- $F_I$ : force d'inertie
- g : accélération de la pesanteur
- $h^+$ : trou positif
- H : hauteur
- k, k', k'' : constantes cinétiques
- K : constante d'adsorption
- m : masse
- n : ordre de la réaction
- P : perméance
- $P_0$ : force de portance
- q : charge électrique
- Q : débit
- r : vitesse réactionnelle
- S : surface
- t : temps
- T : température
- $T_0$ : force de traînée
- U, u : vitesse
- $U_S$ : vitesse dans un orifice de captage
- $U_f$ : vitesse de filtration
- V : volume
- $V_m$ : volume molaire
- W : vitesse en amont d'un orifice de captage
- Z : épaisseur d'un filtre

***Lettres grecques***

- $\alpha$ : compacité d'un filtre
- $\delta$ : diamètre d'une sonde de prélèvement
- $\Delta$ : intervalle de confiance
- $\varepsilon$ : constante diélectrique
- $\gamma$ : cisaillement
- $\dot{\gamma}$ : vitesse de cisaillement
- $\eta$ : efficacité de collection d'une fibre
- $\eta_D$ : efficacité de collection par diffusion
- $\eta_G$ : efficacité de collection par gravitation
- $\eta_I$ : efficacité de collection par impaction inertielle
- $\eta_q$ : efficacité de collection par attraction électrostatique
- $\eta_R$ : efficacité de collection par interception
- $\eta_T$ : efficacité de collection totale d'un filtre
- $\phi$ : rendement quantique
- $\varphi_g$ : angle de la sonde de prélèvement
- $\lambda$ : longueur d'onde
- $\lambda_m$ : libre parcours moyen
- $\mu$ : viscosité dynamique
- $\rho$ : masse volumique
- $\sigma$ : écart-type
- $\tau$ : temps de passage
- $\Psi_s$ : coefficient de sphéricité de Wadell

***Indices***

- ads : adsorbé
- BC : bande de conduction
- BV : bande de valence
- C : phase continue
- D : phase dispersée
- E : entraînement
- f : fibre
- G : génération
- L : liquide
- p : particule

***Abréviations***

- AC : Air Comprimé
- COV : Composé Organique Volatil
- COVM : Composé Organique Volatil Microbien
- CPG : Chromatographie en Phase Gazeuse
- DAPI : 4'-6'-diaminido-2-phenylindole
- DEL : diode électroluminescente
- DO : Densité Optique
- EMB : Eosin Methylen Blue
- HA : Humidité Absolue
- HEPA : High Efficiency Particulate Air
- HR : Humidité Relative
- LB : bouillon lactosé
- ppi : pour préparation injectable
- PSM : Poste de Sécurité Microbiologique
- RDM : Régulateur de Débit Massique
- TSA : Tryptone Soja Agar
- TS : Tryptone Sel
- UE : Unité d'Endotoxine
- ULPA : Ultra Low Penetration Air
- UFC : Unité Formant Colonie
- UV : ultraviolet
- VBNC : Viable But not Cultivable
- VLCT : Valeur Limite d'exposition à Court Terme
- VLEP : Valeur Limite d'Exposition Professionnelle

***Constantes***

- c : vitesse de la lumière ($3.10^8$ m.s$^{-1}$)
- h : constante de Planck ($6{,}626.10^{-34}$ J.s$^{-1}$)
- $k_B$ : constante de Boltzmann ($1{,}38.10^{-23}$ J.K$^{-1}$)

***Nombres adimensionnels et autres***

- $Ar = \frac{\rho_C g \Delta\rho {d_P}^3}{{\mu_C}^2}$ : poussée d'Archimède
- $C_c$ : facteur de Cunningham
- $Kn = \frac{2\lambda_m}{d_p}$ : nombre de Knudsen
- $Ku = \frac{-\ln\alpha}{2} - \frac{3}{4} - \frac{\alpha^2}{4}$ : nombre de Kuwabara
- $Pe = \frac{Ud}{D}$ : nombre de Péclet
- $R = \frac{W}{U_s}$ : rapport d'isocinétisme
- $R_d = \frac{d_p}{d_f}$
- $\mathrm{Re} = \frac{\rho U d}{\mu}$ : nombre de Reynolds
- $R_g = \frac{{d_{ae}}^2 \rho_D g}{18\mu_C U_s}$
- $Sk = \frac{\rho_D {d_P}^2 u_C}{18\mu_C d_P}$ : nombre de Stokes
- $G = \frac{\rho_D {d_p}^2 C_c g}{18\mu_C U_f}$

# INTRODUCTION GENERALE

La santé des travailleurs est en partie conditionnée par leur environnement de travail et par la qualité de l'air qu'ils respirent. En plus des polluants chimiques fréquemment incriminés dans les maladies professionnelles, certaines espèces biologiques (moisissures, bactéries, virus, ou produits métaboliques) peuvent présenter des effets pathogènes.

L'évaluation du risque biologique en situation de travail demeure délicate d'autant plus qu'il n'existe pas, à ce jour, de valeurs limites d'exposition biologiques sur lesquelles s'appuyer. Toutefois, le principe général de prévention du risque qui consiste à rompre la chaîne de transmission le plus en amont possible, reste applicable. Ainsi, la mise en place de procédés d'assainissement de l'air semble concevable.

La photocatalyse, associée aux systèmes de ventilation, est une technique qui peut, théoriquement, diminuer les teneurs en polluants chimiques et biologiques. Cette technologie est basée sur l'excitation d'un semi-conducteur par un rayonnement le plus généralement ultraviolet. Les modifications électroniques ainsi engendrées permettent de réduire ou d'oxyder les polluants de l'environnement à traiter, initialement adsorbés sur le semi-conducteur. L'attractivité de cette méthode réside dans sa non sélectivité envers les espèces à éliminer et dans la possibilité de les transformer progressivement en dioxyde de carbone, eau, azote et autres espèces minérales. Cependant, si les conditions opératoires ne sont pas parfaitement maîtrisées, des sous-produits de dégradation, potentiellement toxiques, peuvent être générés. L'utilisation de la photocatalyse en tant que procédé propre et sûr peut donc être remise en cause.

Ce travail de thèse a donc pour mission d'apporter des éléments nécessaires à la compréhension des phénomènes de dégradation photocatalytique des bioaérosols bactériens et de statuer, dans la mesure du possible, sur les limites de cette technique, si l'ingénieur adopte une démarche de recherche socialement responsable.

Pour mener à bien cette étude, une approche essentiellement expérimentale devait être initiée dans sa totalité. Précisons que la dégradation photocatalytique expérimentale d'un bioaérosol est le siège de mécanismes complexes : génération du bioaérosol, acheminement vers un dispositif photocatalytique, collecte sur un support actif, inactivation des espèces biologiques, transformations en espèces intermédiaires, libération de produits métaboliques, minéralisation progressive…

La conception du dispositif expérimental devait donc s'articuler autour de deux points d'ancrage principaux. La génération d'un bioaérosol bactérien modèle, stable, homogène et reproductible, parfaitement caractérisé biologiquement et physiquement, semblait être le point de départ indispensable à des essais fiables. Par ailleurs, un dispositif d'épuration photocatalytique du bioaérosol devait être conçu de manière à pouvoir modifier différents paramètres opératoires. L'impact de ces derniers sur la dégradation d'une bactérie modèle, en termes d'inactivation et de minéralisation, devait être mesuré, tout en étudiant les sous-produits de dégradation potentiellement créés. Le choix de la bactérie modèle s'est porté vers *E.coli*, espèce classiquement étudiée en microbiologie pour sa facilité de mise en culture notamment.

Objectivement, cette étude ne pouvait être réalisée dans sa globalité dans le temps imparti pour ce travail de thèse d'autant plus que la manipulation de matériels biologiques rend les essais lourds et chronophages. C'est pourquoi nous avons décidé de découpler les phénomènes mis en jeu en adoptant deux approches : une approche batch (statique), sur

laquelle l'accent a été mis pour ce travail de thèse, et une approche continue (dynamique) basée sur la première, qui devra faire l'objet d'approfondissements futurs.

L'approche batch consiste à ne regarder que le processus photocatalytique en lui même en tentant de mieux comprendre son action sur une bactérie modèle (*E.coli*) et en identifiant les différentes étapes réactionnelles : de l'inactivation en passant par la dégradation en espèces intermédiaires jusqu'à la minéralisation. L'influence de différents paramètres opératoires tels que la durée d'irradiation et le type de support (nature du dioxyde de titane et mise en forme) seront étudiés pour déterminer les degrés d'inactivation accessibles par ce procédé et se prononcer quant à son efficacité. De plus, si la réaction de photocatalyse n'est pas optimale, des sous-produits de dégradation peuvent être générés. *E. coli* étant une bactérie à Gram -, les endotoxines sont des espèces secondaires potentielles dont les effets pathogènes sont reconnus. La littérature associée à la production d'endotoxines par des bactéries soumises au processus photocatalytique est pauvre. C'est pourquoi nous essayerons d'apporter des éléments de réponse à cette question. Par ailleurs, nous tenterons d'identifier le type de dommage induit aux cellules, ce qui n'est habituellement fait qu'en phase liquide. Enfin, nous expérimenterons la minéralisation d'*E.coli* par photocatalyse puisqu'il s'agit de l'étape réactionnelle permettant la dégradation, à proprement parler, de l'agent biologique en espèces chimiques.

L'approche continue permettra, quant à elle, l'étude de la génération d'un bioaérosol expérimental bactérien et sa dégradation dans un dispositif photocatalytique. La démarche entreprise pour l'établissement d'un tel banc d'essais sera présentée brièvement, sachant que l'état de l'art développera les notions nécessaires. Dans ce manuscrit de thèse, seules les caractéristiques du bioaérosol et la validation du réacteur photocatalytique avec un polluant test seront présentées. Des éléments de réflexion seront également apportés pour permettre de réaliser les expérimentations de dégradation photocatalytique du bioaérosol dans de bonnes conditions. Ce manuscrit servira ainsi de document de travail pour de futurs travaux.

Ainsi, après un premier chapitre consacré à l'état de l'art du sujet, les matériels et méthodes employés dans ce travail de recherche seront explicités. Le troisième chapitre recueillera les résultats des différentes expérimentations qui y seront également discutés.

# CHAPITRE I : ÉTAT DE L'ART

# I.1 CONTAMINATION BIOLOGIQUE DE L'AIR

Les polluants atmosphériques, d'origine naturelle ou anthropique, peuvent être classés en deux catégories : chimique (particulaires ou gazeux) et biologique. Bien que les microorganismes soient ubiquitaires, seule une très faible proportion est pathogène. En outre, de nombreux agents biologiques vivent en symbiose avec l'Homme qui utilise, par ailleurs, les facultés de certaines bactéries et levures à des fins alimentaires (fabrication de bières, de pains, de fromages…) et pharmaceutiques (production de vaccins, d'antibiotiques…).

Lorsque l'on souhaite évaluer le risque lié à la contamination biologique de l'air, sur les lieux de travail, il convient, avant toute chose, de distinguer les situations dans lesquelles l'utilisation des microorganismes est délibérée ou non. Si l'emploi est intentionnel, l'identité, les quantités ainsi que la localisation des agents biologiques dans le procédé sont connues (i.e. laboratoires de recherche et développement, industries agroalimentaires et pharmaceutiques). A l'inverse, certains secteurs peuvent conduire à des situations d'exposition si l'activité en elle même est source de microorganismes (métiers de la santé, traitement des déchets…) ou si les caractéristiques du process sont propices au développement rapide des agents biologiques (hygrométrie et températures élevées, abondance de nutriments) comme dans les papeteries.
Pour les employés du secteur tertiaire, travaillant dans des environnements intérieurs tels que des bureaux, l'exposition est généralement moins importante même si les concentrations varient selon la fréquence des émissions, les conditions thermohygrométriques ou encore le taux de renouvellement de l'air.

A l'heure actuelle, l'étude de la contamination biologique de l'air intérieur est au cœur des problématiques liées à l'assainissement des espaces occupés. Les auteurs font généralement références au syndrome des bâtiments malsains (« Sick Building Syndrome ») caractérisé par des sensations de gênes, d'inconfort, de confinement ou des irritations des muqueuses, des voies respiratoires, voire des maladies infectieuses ou allergiques (Squinazi, 2002).

Cette première partie a pour objectif d'éclairer le lecteur sur les risques potentiels liés aux microorganismes aéroportés ainsi que sur les solutions d'épuration existantes. Dans un premier temps, le lecteur non microbiologiste appréciera sans doute un bref rappel sur la classification et les caractéristiques des agents biologiques, plus particulièrement sur les bactéries. Les paragraphes suivants seront consacrés à la description des bioaérosols ainsi qu'à l'évaluation et à la réduction du risque biologique potentiellement associé à ce type de contamination.

## I.1.1 RAPPEL SUR LES MICROORGANISMES

La classification des microorganismes est établie en fonction de l'organisation des cellules. Les procaryotes (bactéries) ont une structure relativement simple caractérisée par l'absence de noyau et d'organites (cf. figure I.1-1) a contrario des eucaryotes (champignons, levures, algues et protozoaires) qui possèdent une organisation cellulaire plus évoluée (cf. figure I.1-1). Le tableau I.1-1 donne quelques informations supplémentaires permettant de différencier les deux classes de microorganismes.

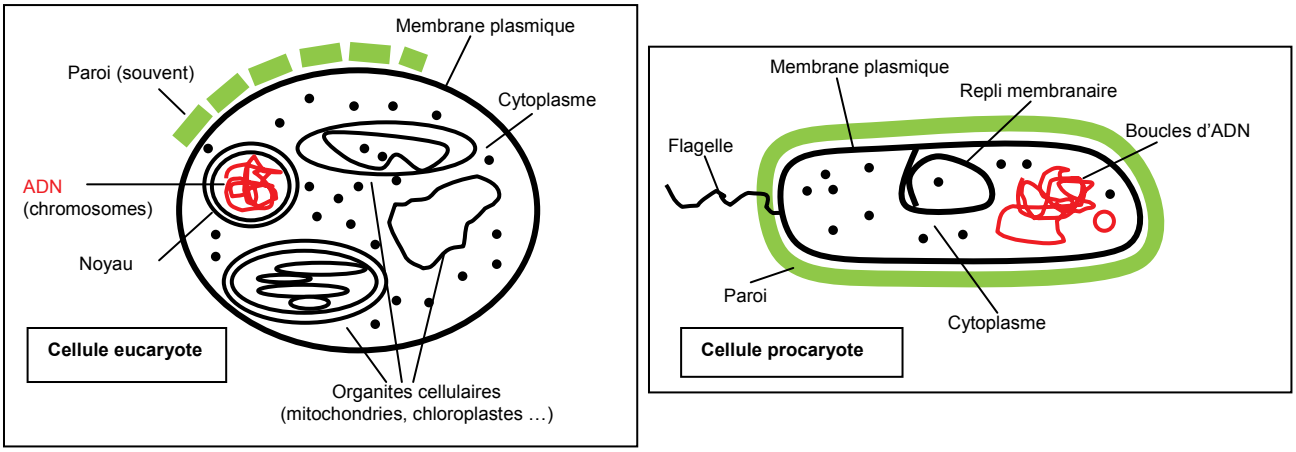



**Figure I.1-1 : Schéma d'une cellule eucaryote (gauche) et procaryote (droite)**

| | Eucaryote | Procaryote |
|---|---|---|
| COMPARTIMENTATION | Un compartiment principal (délimité par une membrane) et un compartiment externe comprenant souvent une paroi. De nombreux sous - compartiments internes permettant une division du travail du vivant | Habituellement un seul compartiment interne délimité par une membrane s'oppose à un compartiment externe |
| CONTENU CYTOPLASMIQUE | Nombreux organites (mitochondries, vacuoles…) | Pas d'organite |
| MATERIEL GENETIQUE | Noyau délimité par une double membrane ou enveloppe cellulaire et chromosomes apparaissant lors de la division cellulaire | Pas de noyau délimité par une enveloppe et jamais de chromosome lors de la division cellulaire |

**Tableau I.1-1 : Différences principales entre les eucaryotes et les procaryotes**

Les bactéries peuvent être divisées en deux groupes (Gram +/ Gram -) basés sur la différence de structure et de composition chimique de la paroi cellulaire mise en évidence par la coloration de Gram. Les bactéries de coloration Gram + possèdent une paroi cellulaire contenant du peptidoglycane épais et des acides teichoïques alors que celles de Gram - présentent un peptidoglycane fin, localisé entre la membrane cytoplasmique et la membrane cellulaire externe. La paroi donne à la bactérie sa forme et la protège contre l'éclatement sous l'effet de la très forte pression osmotique du cytoplasme (cf. figure I.1-2).

Les bactéries Gram - ont également la particularité de posséder au niveau de leur membrane externe des endotoxines. Ce sont des lipopolysaccharides de poids moléculaire élevé, libérables lors de la croissance ou de la lyse cellulaire et dont l'impact sur la santé humaine peut se révéler préoccupant (céphalées, fièvre, syndromes respiratoires essentiellement) (INRS, 2008).

Les bactéries présentent une grande diversité de tailles (typiquement entre 0,5 et 5 µm de longueur) et de formes : sphériques (coques), bâtonnets (bacilles) ou de formes intermédiaires (cocobacilles, hélicoïdales).

Dans des conditions favorables de nutriments et de température, les bactéries se reproduisent et doublent leur nombre environ toutes les vingt minutes. Ces situations sont réunies

notamment pour les mises en culture expérimentale des bactéries. A l'inverse, lorsque les conditions sont défavorables, certaines bactéries ont la faculté d'adopter des structures spéciales, dormantes appelées endospores (surtout les Gram +), qui résistent à la chaleur, à la sécheresse, aux radiations et aux désinfectants. Elles sont également capables de rester au repos pendant de longues années jusqu'à ce que les conditions du milieu s'améliorent : les endospores redeviennent alors actives et se transforment en de nouvelles bactéries.

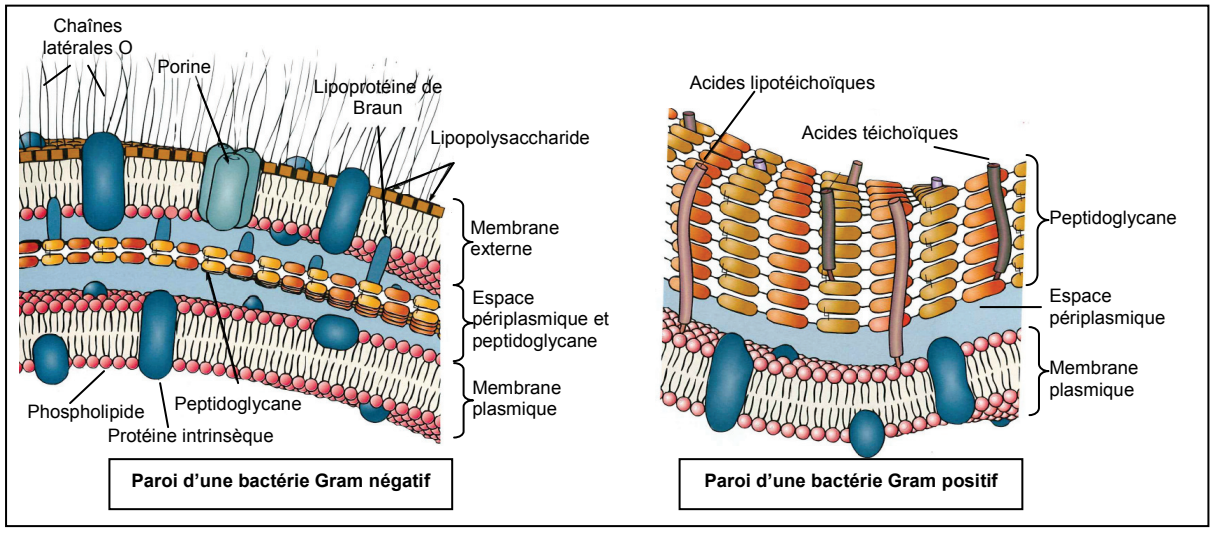



**Figure I.1-2 : Paroi des bactéries Gram négatif et Gram positif**

En dépit de leur apparente simplicité, les bactéries peuvent aussi former des associations complexes en s'attachant aux surfaces et en formant des agrégats appelées biofilms. Les bactéries s'y trouvant présentent un arrangement complexe de cellules et de composants extra-cellulaires qui forment des structures secondaires comme des microcolonies, dans lesquelles se crée un réseau de canaux facilitant la diffusion des nutriments : des relations s'établissent également entre bactéries, permettant une réponse cellulaire intégrée. Au sein de biofilms établis, les caractéristiques physico - chimiques (pH, oxygénation, métabolites) sont néfastes au bon développement bactérien et constituent des conditions stressantes. Les bactéries mettent alors en place des réponses de stress qui sont autant d'adaptation à ces situations défavorables et qui rendent les bactéries plus résistantes à toute forme de destruction par des agents mécaniques ou des molécules biocides.

### I.1.2 BIOAEROSOL : DEFINITION ET CARACTERISTIQUES

Les aérosols biologiques ou bioaérosols sont définis comme des particules d'origine microbienne, animale, ou végétale en suspension dans l'air (Duquenne et al., 2005). L'intérêt pour l'étude des ces aérosols s'est accru ces dernières années et il est actuellement reconnu que l'exposition aux bioaérosols est associable à des maladies infectieuses et des effets sanitaires de type toxinique, allergique ou cancérogène.
La composition des aérosols est complexe. Elle varie en fonction des sources, des conditions environnementales et du temps. Parmi les principaux éléments qui entrent dans la composition d'un aérosol biologique on distingue :

- les structures viables :
    - cellules ou spores microbiennes ;
    - fragments de mycélium ou spores fongiques ;
    - cellules ou kystes protozoaires.

Bien que n'étant pas des structures viables à proprement parler, les virus entrent également dans cette catégorie.

- les structures non viables :
    - fragments cellulaires ;
    - autres produits ou métabolites microbiens (endotoxines, mycotoxines, composés organiques volatils microbiens (COVM)).

Ces éléments sont présents dans l'air sous différentes formes :

- éléments biologiques individualisés (spores, cellules bactériennes, virus isolés) ;
- agrégats ou assemblages constitués de plusieurs éléments biologiques individualisés et/ou d'autres matériels d'origine biologique ;
- produits ou fragments d'éléments biologiques individualisés ou autres matériels d'origine biologique ;
- particules d'origine biologique associées à des particules d'origine non biologique.

Il faut préciser que tous les microorganismes ne sont pas aérotransportables (Stetzenbach, 1998). Certains ne sont d'ailleurs pas suffisamment résistants et subissent des dommages pendant l'aérosolisation. A titre d'exemple, les bactéries à Gram - aérosolisées ne survivent pas bien et sont affectées par la température et l'humidité relative. Cependant les cocci à Gram +, composés de pigments protecteurs et de parois cellulaires plus épaisses, peuvent rester viables quand elles sont exposées au stress du transport aéraulique.

De nombreuses sources de microorganismes résident dans l'air intérieur, avec notamment la présence de biocontaminants capables de croître dans de nombreux matériaux de construction et de mobilier tels que les papiers peints ou les revêtements de sols. Les systèmes de ventilation mécanique sont également souvent impliqués dans le relargage de biocontaminants dans les bureaux ou les bâtiments publics. En effet, les systèmes de chauffage, climatisation et ventilation mélangent de l'air extérieur filtré avec de l'air intérieur « potentiellement contaminé » sans cesse recyclé. Ces dispositifs sont ainsi une source de contamination pour les occupants des immeubles qui restent, en eux - mêmes, potentiellement générateur de pollution biologique puisque de nombreuses espèces bactériennes ou virales sont transmissibles d'homme à homme.

Le tableau I.1-2 rassemble quelques sources de polluants (Stetzenbach, 1998).

| | | |
|---|---|---|
| Systèmes de traitement de l'air | Systèmes de climatisation, chauffage, ventilation | *Bacillus, Pseudomonas, Staphylococcus* |
| | Tours aéroréfrigérées, systèmes de dispersion de l'eau | *Legionella* |
| | Humidificateurs | *Legionella, Pseudomonas* |
| Matériaux de construction et d'habitat | Plafond, isolation, papier peint | *Aspergillus, Penicillium* |
| | Tapis | *Bactéries et champignons non spécifiés* |
| | Sol de jardin | *Legionella* |
| | Chauffe - eau | *Legionella* |
| | Poussière de maison | *Champignons non spécifiés* |
| Occupants des immeubles | Hommes, fragments de peau | *Bactéries aérobies* |
| Industries | Industrie du bois, de la cellulose | *Aspergillus, Penicillum* |
| | Fabrication et stockage d'aliments | *Champignons nos spécifiés, mycotoxines* |
| | Emballage | *Aerobasidium pullulans* |

**Tableau I.1-2 : Sources de contaminants microbiens dans l'air**

Lorsqu'une quantification des microorganismes présents dans l'air est réalisée, il est parfois difficile de caractériser des niveaux de concentration : les teneurs sont-elles basses, classiques, élevées ? Le tableau I.1-3 pourra aiguiller le lecteur en donnant quelques valeurs mesurées dans des situations particulières (Goyer et al., 2001).

| | Bactéries ($UFC.m^{-3}$) | Moisissures ($UFC.m^{-3}$) |
|---|---|---|
| Extérieur | $10^2$ | $10^3$ |
| Agriculture | $10^7$ | $10^{3-4}$ |
| Centre de compostage | $10^5$ | $10^4$ |
| Centre d'épuration des eaux usées | $10^4$ | $10^3$ |
| Edifices à bureaux | $10^2$ | $10^{2-3}$ |
| Industrie papetière | $10^6$ | $10^3$ |
| Tri des déchets domestiques | $10^4$ | $10^4$ |

**Tableau I.1-3 : Concentrations en bioaérosols (Unité Formant Colonie, UFC)**

### I.1.3 EVALUATION ET REDUCTION DU RISQUE BIOLOGIQUE ASSOCIE AUX BIOAEROSOLS

La communauté scientifique s'accorde sur le fait que certains bioaérosols sont pathogènes. Afin d'évaluer ces risques, il convient d'établir la chaîne de transmission et de répertorier les risques associés. La figure I.1-3 illustre les cinq maillons de la chaîne de transmission (INRS, 2008).

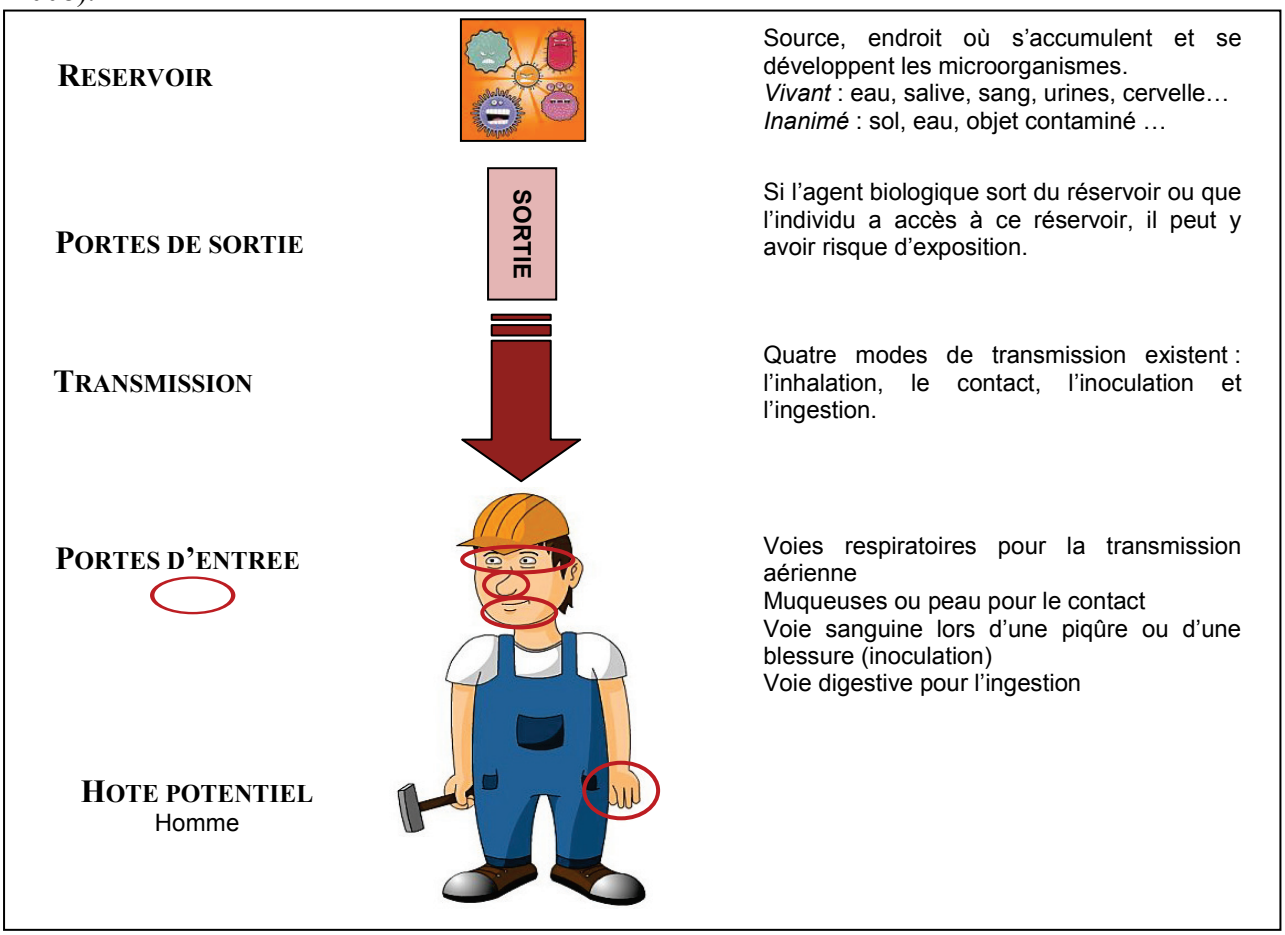



**Figure I.1-3 : Chaîne de transmission**

Suite au contact avec des microorganismes, les impacts sur la santé diffèrent selon l'agent biologique et le mode d'exposition. Alors que tous les types de microorganismes et beaucoup de leurs métabolites ou sous produits sont associés à des pathologies, les bactéries et les champignons sont, dans la plupart des cas, les premiers impliqués (Goyer et al., 2001).
Parmi les multiples contaminations possibles (contact, ingestion, piqûres…), l'inhalation est la voie principale. Sachant que les bioaérosols sont composés de gouttelettes ou de particules de diamètre compris entre 0,5 et 30 µm, les sites de dépôt dans les voies respiratoires sont plus ou moins profonds et dépendent également de l'individu, de son anatomie et de sa respiration.

Généralement, on distingue quatre types de risques (INRS, 2008) :

- **Les risques infectieux :** il y a infection lorsqu'un microorganisme pénètre dans le corps puis se multiplie. Selon l'agent biologique impliqué, les effets sur la santé sont variables dans leur localisation, leur gravité ou leur temps d'apparition. L'état de santé de l'individu (affaiblissement des défenses immunitaires) a aussi une importance.
- **Les risques immuno-allergiques :** les allergies ou réactions d'hypersensibilité sont dues à une défense de l'organisme trop importante. Ces réactions sont dues à la présence dans l'organisme d'un allergène provenant d'un agent biologique. Le seuil de déclenchement de ces effets est très variable d'une personne à l'autre et pour une même personne fluctue au cours du temps.
- **Les risques toxiniques :** l'ensemble de troubles résultants de l'action exercée sur l'organisme par une ou des toxine(s) issue(s) d'agents biologiques peut être considéré comme une intoxication. Selon la nature de la toxine les effets seront différents.
- **Les risques cancérogènes :** quand certaines infections deviennent chroniques, elles conduisent parfois à la formation de cancers (tumeurs malignes formées par la multiplication désordonnée des cellules).

Le tableau I.1-4 résume les types de microorganismes ainsi que leurs effets sur la santé (Stetzenbach, 1998).

| | |
|---|---|
| Algues | Réactions allergiques |
| Bactéries | Hypersensibilité pulmonaire, infections, irritations des muqueuses |
| Endotoxines | Rhumes, céphalées, fièvre, malaises, douleurs musculaires, détresse respiratoire |
| Champignons | Réactions allergiques, asthme, irritations cutanées, hypersensibilité pulmonaire, infections, irritations des muqueuses |
| Mycotoxines | Céphalées, problèmes musculaires, désordre neurologique, détresse respiratoire, toxicose |
| Parasites | Encéphalites, infections, réactions d'hypersensibilité |
| Virus | Infections |

**Tableau I.1-4: Effets des microorganismes sur la santé humaine**

Afin de diminuer les risques, une rupture de la chaîne de transmission doit être opérée le plus en amont possible. Il est envisageable d'*agir sur le réservoir* pour éviter la prolifération des

agents biologiques : nettoyage, voire désinfection/stérilisation, lutte contre la prolifération des insectes et des rongeurs en tant que diffuseurs de l'agent pathogène... Si ce n'est pas suffisant, il faut empêcher l'accès au réservoir en *fermant les portes de sortie* (confinement des procédés par exemple). Il est également concevable d'*agir sur la transmission* en améliorant la ventilation et l'assainissement des locaux (diminution du risque de transmission par inhalation) en limitant l'empoussièrement, les projections. Si ces mesures demeurent insuffisantes ou ne sont pas facilement applicables, il est alors possible d'*agir sur les portes d'entrée* en employant des équipements de protection individuelle classiques (vêtements de protection, gants, lunettes, appareils de protection respiratoire…).

L'action sur les portes d'entrée est donc la dernière étape à envisager pour prévenir les risques. A choisir, il est préférable d'intervenir au niveau de la transmission via différents procédés d'assainissement d'air.

### I.1.3.1 Ventilation-dilution

La ventilation des locaux assure un apport d'air neuf pour les occupants ainsi qu'un renouvellement d'air permettant l'élimination des odeurs et la diminution des teneurs en polluants chimiques et biologiques. Elle évite également les problèmes de condensation et de développement de moisissures dus à une hygrométrie élevée (Squinazi, 2002) qui conduisent à des effets néfastes tant sur les occupants que sur les bâtis en eux mêmes. Malgré un coût énergétique élevé, cette technique, qu'elle soit mécanique ou naturelle, est la plus facile à mettre en œuvre et la mieux connue. Cependant, elle n'aboutit pas à la destruction des polluants (Goswami, 2003) et une des difficultés majeures réside dans le placement des bouches de soufflage et d'extraction d'air puisque ceci est primordial pour l'obtention d'une efficacité satisfaisante en accord avec un confort thermique convenable pour les occupants (Bolashikov et al., 2009).

### I.1.3.2 Filtration et recyclage

La filtration est une technique fréquemment employée pour traiter les effluents chargés en microorganismes (Burton et al., 2005 ; Foarde et al., 1999 ; Möritz et al., 2001 ; Predicala et al., 2002 ; Wang et al., 2001 ; Yu et al., 2008). L'air stérile généré dans un poste de sécurité microbiologique est traité par cette technologie. Les filtres couramment employés sont soit des filtres HEPA (High Efficiency Particulate Air) qui doivent retenir 99,97 % des particules de diamètre supérieur à 0,3 µm, soit des filtres ULPA (Ultra Low Penetration Air) qui doivent retenir, quant à eux, 99,999 % des particules de diamètre supérieur à 0,1 µm. La filtration n'est donc a priori pas efficace contre les microorganismes de faible taille tels que les virus. De par leur grande efficacité, ces filtres occasionnent une importante perte de charge qui rend le procédé relativement coûteux. De plus, ces filtres se chargent continuellement en microorganismes. Cette accumulation peut conduire à la formation d'un biofilm qui engendre un colmatage du filtre et aboutit à un relargage d'agents biologiques (Goswami, 2003 ; Kemp et al., 2001 ; Kuehn et al., 1994). La filtration est de ce fait souvent associée à une autre technique pour détruire les microorganismes sur le filtre. Bolashikov et al. (2009), mentionnent par exemple, l'utilisation de filtres sur lesquels ont été déposées des enzymes qui ont pour fonction d'attaquer la membrane cellulaire des microorganismes et par conséquent de les inactiver. Cependant, cela requiert un très bon contact entre l'enzyme et le microorganisme ce qui n'est pas toujours avéré. D'autres traitements des filtres sont également employés comme les UVC (Griffiths et al., 2005) ou la photocatalyse (Lin et al., 2003 ; Yu et al., 2008) pour laquelle l'utilisation de filtres comme supports chargés en $TiO_2$ permet une optimisation du contact entre l'agent actif et le polluant.

### I.1.3.3 UVC-germicides

L'irradiation des bioaérosols par des lampes germicides UVC ($\lambda$<254 nm), est également une technique d'épuration employée (First et al., 2007 ; Ko et al., 2002 ; Lai et al., 2004 ; Peccia et al., 2004 ; Scarpino et al., 1998 ; Ulevicius et al., 1999). Les dommages engendrés sur l'ADN et l'ARN des cellules par cette technique dépendent de plusieurs paramètres dont l'intensité, la durée de l'irradiation ou encore l'humidité relative du flux à traiter (Peccia et al., 2001). Ce procédé, adapté aux traitements de zones contaminées peu étendues, reste cependant faiblement efficace dans des systèmes de ventilation centraux (Goswami, 2003). De plus, ce rayonnement est néfaste pour l'homme ce qui nécessite de prendre des précautions particulières pour éviter tout contact avec la peau et les yeux.
Par cette voie de décontamination, les cellules perdent toute activité. Cependant, aucun questionnement sur la production d'espèces secondaires toxiques n'est mentionné dans la littérature alors que l'innocuité du traitement pourrait être mise en cause.

### I.1.3.4 Ozonation

L'ozone est une molécule fortement oxydante pour différents types de polluants chimiques et microbiologiques comme les bactéries, moisissures et spores (fongiques et bactériennes) par rupture de la paroi cellulaire des microorganismes (Goswami, 2003 ; Khurana, 2003). Ce procédé possède l'inconvénient majeur de fournir des taux résiduels d'ozone dangereux pour l'homme. La question des sous-produits de dégradation n'est par ailleurs jamais étudiée.

### I.1.3.5 Ionisation

Ce procédé consiste à ioniser, positivement ou négativement, les molécules de l'air. Les ions ainsi générés vont charger les microorganismes, leurs permettant de se déposer sur les surfaces (Fletcher et al., 2007 ; Noyce et al., 2002 ; Yu et al., 2008). De plus, Fletcher et al. (2007) montrent qu'il existe une surestimation de l'effet « épurateur » de cette technique car la génération expérimentale des ions s'accompagne de la production d'un champ électrique et d'ozone qui, a priori, ont également un impact sur les microorganismes. La quantité d'ozone produite est également problématique et l'étude des sous-produits reste absente.

### I.1.3.6 Techniques émergentes

D'autres techniques, moins étudiées, permettent aussi l'abaissement de la concentration en microorganismes dans l'air.

- **Traitement thermique**

L'équipe de Jung a testé l'effet d'une augmentation de température importante pendant un temps très court, sur la viabilité de bactéries (160 °C) et de moisissures (350-400 °C) (Jung et al., 2009a ; Jung et al., 2009b). Ils ont également mis en évidence que les dommages structurels étaient plus importants que les dommages métaboliques pour les bactéries.

- **Technologie plasma**

Cette technique consiste à créer un plasma entre deux électrodes ce qui donne naissance à des radicaux tels que $OH^{\bullet}$ qui agissent ensuite sur les protéines et les polysaccharides des microorganismes et les tuent (Bolashikov et al., 2009 ; Gallagher et al., 2004). Ce processus s'accompagne également de la formation d'ozone et potentiellement d'autres sous-produits méconnus.

- **Nanotechnologie**

L'utilisation de nanoparticules d'argent, dont les propriétés bactéricides sont connues depuis l'Antiquité, est également un moyen d'action possible pour réduire la teneur en bioaérosols. Toutefois, le risque potentiel lié aux nanoparticules (HCSP, 2010) ne permet pas une pulvérisation de ces dernières dans l'air (Bolashikov et al., 2009). L'intérêt pour des revêtements contenant des nanoparticules d'argent pourrait alors apparaître. Yoon et al. (2008) ont notamment déposé des particules d'argent nanométriques sur du charbon actif. Ces derniers sont très souvent employés pour adsorber les matières organiques qui peuvent être une source nutritionnelle pour les microorganismes, permettant la prolifération des espèces et diminuant l'adsorption des polluants. L'argent empêcherait ainsi cette croissance microbienne.

- **Huiles essentielles**

Certains auteurs étudient l'inhibition du métabolisme des microorganismes, comme la croissance et la multiplication, par les huiles essentielles dont certains composants pourraient avoir des effets létaux (Hammer et al., 2001 ; Pibiri et al., 2006). Néanmoins, leur emploi peut engendrer chez l'homme des réactions allergiques voire des effets toxiques si les doses sont trop élevées ou encore s'il y a contact épidermique ou ingestion.

Une autre technique d'épuration biologique de l'air fait l'objet de nombreuses applications. Il s'agit de la photocatalyse. Initialement étudiée pour l'abattement des polluants organiques tels que les Composés Organiques Volatils (COV), elle trouve aujourd'hui son application pour traiter les microorganismes, et en particulier les bactéries. Le paragraphe suivant y est consacré.

## I.2 TRAITEMENT DES BIOAEROSOLS BACTERIENS PAR PHOTOCATALYSE

Objet d'un intérêt croissant depuis quelques années, la photocatalyse est très souvent considérée comme une technique universelle, simple, « non polluante » et extrêmement efficace. Elle présente de nombreux avantages dont celui d'opérer à température ambiante et à pression atmosphérique. Si les conditions opératoires optimales sont réunies, les produits issus de la minéralisation complète des polluants à dégrader, sont l'eau, le dioxyde de carbone, l'azote et d'autres espèces minéralisées qui ne nécessitent, a priori, pas de traitements ultérieurs.

La photocatalyse a montré ses capacités sur un large panel de composés tels que les colorants (Li et al., 2006 ; Wang et al., 2007), les pesticides (Herrmann et al., 2000), les polluants organiques des eaux usées (Bousselmi et al., 2000 ; Hamill et al., 2001), les substances chlorées (Alberici et al., 1998 ; Ávila et al., 2002) et bien d'autres COV (Kim et al., 2002 ; Queffeulou et al., 2010 ; Vincent et al., 2008 ; Zuo et al., 2006). Elle est, en outre, de plus en plus utilisée à des fins de désinfection, touchant différents microorganismes que ce soit des bactéries, des champignons ou même des virus.

Cette vision, idéaliste voire utopique, est fréquemment employée pour présenter cette technique. Toujours est-il que les conditions optimales menant à la minéralisation complète des polluants sont rarement rassemblées et que des sous-produits de dégradation, parfois plus toxiques que les polluants à éliminer initialement, sont alors formés. Par conséquent, la

question de l'innocuité de la photocatalyse reste complète à ce jour et demande une meilleure prise en compte du problème par la communauté scientifique.
En ce qui concerne les expérimentations paramétriques relatives à l'aspect germicide de la photocatalyse, elles sont en majorité réalisées en phase aqueuse notamment, car leur mise en œuvre est plus aisée et que la viabilité des microorganismes, en dehors du processus photocatalytique, n'est endommagée que dans une moindre mesure (Dunlop et al., 2002 ; Gumy et al., 2006b ; Rincon et al., 2004a ; Rizzo, 2009 ; Sun et al., 2003). En effet, l'étude de la purification de l'air par ce processus nécessite une mise en suspension des microorganismes dans l'air délicate et des dispositifs d'épuration complexes alliant d'autres techniques telle que la filtration (Huang et al., 2009 ; Lin et al., 2003). Avant de considérer l'inactivation d'un bioaérosol par photocatalyse, Pal et al. (2005), ont adopté une vision statique du phénomène en déposant les agents biologiques, en phase liquide, sur un support photocatalytique permettant ainsi de découpler les phénomènes (affranchissement des problèmes de filtration par exemple) et de simplifier la compréhension des processus mis en jeu.

Cette double vision, statique-dynamique, paraît pertinente pour entreprendre l'étude d'une technique novatrice et sera donc adoptée pour ce travail de thèse. Précisons que la réaction photocatalytique, siège de mécanismes encore mal élucidés, est influencée par différents paramètres opératoires et permet d'une part, d'inactiver les microorganismes et d'autre part, de les minéraliser, en générant potentiellement des sous-produits de dégradation. L'objectif de ce deuxième paragraphe consacré à l'action de la photocatalyse sur les bactéries est donc d'informer le lecteur sur le processus photocatalytique en lui-même et de présenter les dispositifs d'épuration expérimentaux existants pour ces deux approches.

## I.2.1 GENERALITES

### I.2.1.1 Principe

La photocatalyse est basée sur l'excitation d'un semi-conducteur par l'absorption d'un rayonnement, le plus généralement ultra-violet, (figure I.2-1) entraînant des modifications électroniques au sein de la structure du semi-conducteur. Il y a ainsi formation de radicaux, à l'origine de réactions d'oxydoréduction des composés adsorbés à la surface du catalyseur.

Chaque semi-conducteur est caractérisé par la largeur de sa bande interdite qui correspond à la différence d'énergie entre sa bande de conduction et sa bande de valence. Si le semi-conducteur est irradié par un rayonnement d'énergie supérieure à cette bande interdite, un électron de la bande de valence passe alors dans la bande de conduction laissant derrière lui un trou positif appelé aussi, lacune électronique. Il y a alors création d'une *paire électron-trou.*

$$\text{semi-conducteur} + h\nu \longrightarrow e^-_{BC} + h^+_{BV}$$

Ce sont ensuite l'électron de la bande de conduction et le trou de la bande de valence qui sont à l'origine respectivement, des réactions de réduction et d'oxydation de différentes espèces adsorbées à la surface du semi-conducteur, dont $O_2$ et $H_2O$.

- réduction des espèces accepteuses d'électrons adsorbées sur le semi-conducteur par les électrons : $e^-_{BC} + A_{ads} \rightarrow A^{\bullet}_{ads}$
  tel que l'oxygène : $e^-_{BC} + O_{2\,ads} \rightarrow O_{2ads}^{\bullet -}$
- oxydation des espèces donneuses d'électrons adsorbées sur le semi-conducteur par les lacunes positives : $h^+_{BV} + D_{ads} \rightarrow D^{\bullet}_{ads}$

telle que l'eau pour former les radicaux $OH^{\bullet}$ : $h^{+}_{BV} + H_2O \rightarrow OH^{\bullet} + H^{+}$

Les radicaux $OH^{\bullet}$, à durée de vie très courte, sont les principales espèces actives.

Enfin, le trou positif et l'électron de la bande de conduction peuvent se recombiner pour rendre la neutralité au semi-conducteur : $h_{BV}^{+} + e^{-}_{BC} \rightarrow$ neutralité + chaleur

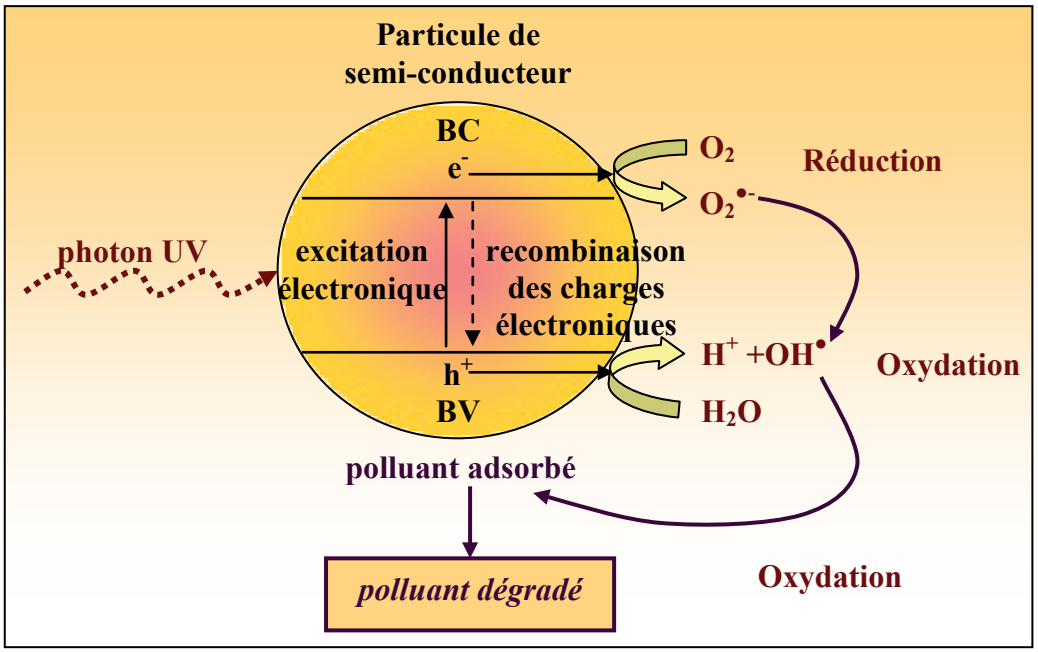



**Figure I.2-1 : Principe de la photocatalyse**

### I.2.1.2 Le photocatalyseur : le dioxyde de titane

L'écorce terrestre est composée de 0,44 % de titane. Cependant, dans les minerais, le titane et le fer sont le plus souvent associés sous formes d'oxydes mixtes ce qui exclut la séparation purement physique des deux éléments. Les minerais se présentent sous forme de roches ou de sables. Le principal minerai de titane est l'ilménite, oxyde mixte de type ($TiO_2$, FeO, $Fe_2O_3$), dont la teneur en $TiO_2$ varie de 45 à 65 %. A l'état naturel, le dioxyde de titane, non complexé au fer, peut se présenter sous deux formes : rutile (90 à 98 % de $TiO_2$), et anatase (30 à 40 % de $TiO_2$). Concernant la fabrication industrielle du $TiO_2$, on recense deux grands procédés : celui au sulfate et celui au chlore ( SCF, 2010).

L'activité photocatalytique du $TiO_2$ dépend de nombreux paramètres dont la forme cristalline, le taux de cristallinité, la taille des particules, la surface spécifique, la porosité et la densité des groupements $OH^{\bullet}$ à la surface. On trouve trois formes cristallines: deux formes tétragonales, rutile et anatase, se différenciant par l'empilement des tétraèdres, et une forme orthorhombique appelée brookite. Seules les formes tétragonales sont employées en photocatalyse, la forme anatase étant la plus active ; deux types de dioxyde de titane sont communément employés, le P25 de Degussa et le PC500 de Millenium, dont les caractéristiques sont rassemblées en tableau I.2-1.

D'autres matériaux à base de $TiO_2$ sont commercialisés, entre autres par la société Millenium : PC50, PC200, PC300, par exemple. Ils diffèrent par leur taille, leur composition et leur surface spécifique qui atteint parfois 400 $m^2.g^{-1}$, ce qui conduit à une activité catalytique nettement supérieure à celle du P25 de Degussa.

| | Degussa P25 | Millenium PC500 |
|---|---|---|
| Composition | 80 % anatase - 20 % rutile | 100 % anatase |
| Taille des particules élémentaires (nm) | 30 | 10-15 |
| Taille des agglomérats (nm) | 200-215 | 600-700 |
| Taille des pores (Å) | 104 (porosité des agglomérats) | 54 |
| Aire spécifique (BET) ($m^2.g^{-1}$) | 50 | 375 |

**Tableau I.2-1 : Caractéristiques des $TiO_2$ couramment employés (Nguyen et al., 2005)**

Le dioxyde de titane sous sa forme anatase est déjà très réactif. Cependant, ses capacités photocatalytiques peuvent être améliorées en ajoutant d'autres composés dopants ayant pour effet de diminuer le taux de recombinaison entre les électrons de la bande de conduction et les trous de la bande de valence. Généralement, les dopants les plus employés sont des ions métalliques issus principalement du fer, du platine, du lanthanide, du chrome, du manganèse ou du cobalt. Mais, le recours aux ions argent, dont le pouvoir désinfectant est utilisé en médecine depuis plusieurs décennies, est le plus fréquent pour dégrader des microorganismes (Evans et al., 2007 ; Vohra et al., 2006). Nonami et al. (2004), proposent également d'utiliser un matériau céramique recouvert d'apatite et de dioxyde de titane. L'apatite, qui appartient à la famille des phosphates orthogonaux, chimiquement inerte, est capable d'adsorber les bactéries sans pour autant les détruire.

De façon pratique, la mise en forme du catalyseur est capitale et le support utilisé doit être adapté. Le dioxyde de titane est disponible sous la forme de poudre, de grains, de bâtonnets, ou déposé sur des supports tels que le verre, la céramique, la fibre de verre ou encore la cellulose. Le conditionnement du catalyseur est primordial puisqu'il ne doit pas engendrer de pertes de charge élevées et doit permettre une bonne irradiation du catalyseur tout en assurant le contact entre le photocatalyseur et le polluant. Si celui-ci est pulvérulent, le plus simple est de le conditionner sous forme de lit de fixe ou de lit fluidisé, même si l'irradiation ne parvient pas au cœur du lit et que l'efficacité en est réduite. Une solution judicieuse consiste donc à supporter le catalyseur : une fine couche de $TiO_2$ est déposée sur le support optimisant ainsi l'irradiation. Il existe deux grands types de supports :

- les supports non poreux : quartz et pyrex principalement, acier inoxydable (Evans et al., 2007). Les deux premiers supports transmettent en partie ou totalement les rayons UV ce qui permet l'irradiation des deux faces.
- les supports poreux : papiers, non-tissés, fibres de verre, fibres textiles. Ces types de supports sont bien adaptés aux flux gazeux qui peuvent les traverser.

Certains procédés, tels que la méthode sol-gel ou celle d'inversion de micelles, permettent d'avoir des films de $TiO_2$ très fins (Yu et al., 2002). Ces films sont ensuite disposés sur différents supports plus ou moins complexes. Il est également possible d'assembler des nanoparticules de $TiO_2$ pour former une membrane composite fine (Kim et al., 2003) ou de recouvrir des structures ouvertes, type mousses, de $TiO_2$. Ces matériaux engendrent ainsi une surface de contact démultipliée entre le catalyseur et le polluant, favorable à une réaction photocatalytique complète (Yamamoto et al., 2004). Ce paramètre est primordial pour le traitement des bioaérosols par photocatalyse. En effet, en comparaison avec les gaz, les microorganismes sont des espèces volumineuses qui diffusent peu (de l'ordre de $10^{-11}$ $m^2.s^{-1}$*

* Calculé pour une particule micronique à 20 °C, à partir de la relation décrite dans le paragraphe consacré aux propriétés des aérosols biologiques.

contre $10^{-5}$ $m^2.s^{-1}$ pour les gaz (Perry et al., 1998)). Ainsi, l'utilisation de supports poreux, permet d'une part, la rétention des agents biologiques et d'autre part, leur « dégradation » par le photocatalyseur déposé. De ce fait, la filtration est un processus souvent associé à la technique d'épuration photocatalytique, même si, d'après certains auteurs, les media classiquement utilisés ne permettraient pas un captage suffisamment important des microorganismes (Lin et al., 2003 ; Yu et al., 2008).

Par ailleurs, pour que la réaction photocatalytique soit amorcée, il convient d'exciter le semi-conducteur par un rayonnement d'énergie suffisante, supérieure à sa largeur de bande interdite, respectivement de 3,2 et 3,1 eV pour le $TiO_2$ sous sa forme anatase et sous sa forme rutile. A partir de ces valeurs, il est alors possible de calculer la longueur d'onde minimale d'excitation du semi-conducteur via la relation de Planck (relation I.2-1).

$$\text{Largeur}_{\text{bande interdite}} = h\nu = \frac{hc}{\lambda} \qquad \textbf{(I.2-1)}$$

$$\text{Ainsi, } \lambda = 388\ nm\ pour\ l'anatase\ ou\ 400\ nm\ pour\ le\ rutile$$

Le dioxyde de titane sous ses deux formes est donc excité par un rayonnement ultraviolet (<380 nm). Rappelons que les ultraviolets sont divisés en trois gammes : les UVA (380-315 nm), les UVB (315-280 nm), et les UVC (280-10 nm), des moins énergétiques au plus énergétiques.

### I.2.1.3 Les sources lumineuses

Généralement, les rayonnements UV artificiels sont produits à l'aide de sources lumineuses à vapeur de mercure parmi lesquelles on distingue les lampes basse et haute pression se différenciant par leur spectre, leur géométrie ou encore leur puissance (cf. tableau I.2-2). Les tubes sont remplis de gaz ou de vapeur métallique au travers duquel passe un courant électrique. Il s'ensuit une production de photons donc de lumière, cependant le rendement photonique/électrique de ces lampes reste encore faible, de l'ordre de 20 %.

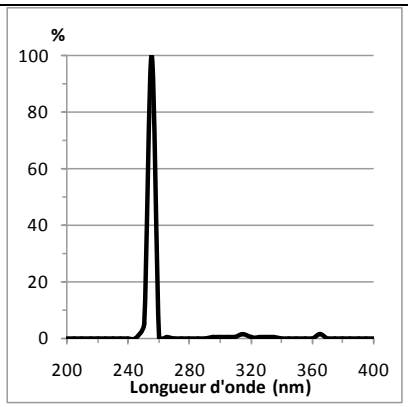
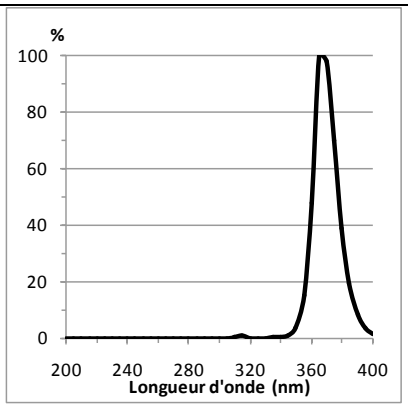
| | *Lampe basse pression* (lampe germicide) (Benabbou et al., 2007, Scarpino et al., 1998) | *Lampe haute pression* (lampe à lumière noire) (Ibanez et al., 2003 ; Josset et al., 2007 ; Pal et al., 2005) |
|---|---|---|
| Puissance | de 0,01 à 0,5 W/cm | de 5 à 150 W/cm |
| Longueur | De 10 à 200 cm | De 5 à 250 cm |
| Puissance totale | 5 W à 200 W | 50 W à 100 kW |
| Raie d'émission | 254 nm | 365 nm |
| Répartition spectrale |  Philips TUV6W |  Philips TL6W/08 |



**Tableau I.2-2 : Lampes à vapeur de mercure (André et al., 1988 ; CatRayon, 2000)**

Huang et al. (2009), proposent également d'utiliser des diodes électroluminescentes pour générer des UVA. Cette technique présente certains avantages dont une durée de vie longue, un meilleur rendement photonique/électrique que les lampes à vapeur de mercure, ainsi qu'une compacité plus élevée et une faible consommation électrique.
Afin d'améliorer la répartition de la lumière au sein des réacteurs, il est aussi possible d'employer des fibres optiques. Cette technologie a déjà été utilisée pour dégrader photocatalytiquement des composés gazeux tels que l'acétone et le benzène (Choi et al., 2001 ; Wang et al., 2003).

De nombreuses études sur la photocatalyse solaire, en phase liquide, ont également été réalisées (Rincon et al., 2004b ; Sichel et al., 2007 ; Vidal et al., 1999). Outre des essais extérieurs, l'équipe de A.G. Ricon et C. Pulgarin a mené des expériences avec des lampes simulant le spectre solaire (Rincon et al., 2004a ; Rincon et al., 2004b). Il s'agit d'une lampe Hanau Suntest (AM1) ayant un spectre d'émission avec environ 0,5 % de photons émis à des longueurs d'onde inférieures à 300 nm, et environ 7 % entre 300 et 400 nm. Le spectre d'émission entre 300 et 800 nm suit le spectre solaire.

#### I.2.1.4 Les bactéries cibles

Même si tous les types de microorganismes sont étudiés en vue de leur dégradation photocatalytique, les publications sur l'inactivation des bactéries sont de loin les plus nombreuses. Le tableau I.2-3 dresse une liste non exhaustive des différentes espèces bactériennes dégradées photocatalytiquement en statique ou en dynamique. Il apparaît que de multiples travaux ont été réalisés sur *Escherichia coli* (*E.coli*), bactérie Gram négatif, en forme de bâtonnet, de 1 à 5 µm de long pour 0,3 à 1 µm de diamètre. *Escherichia coli*, également appelé colibacille, est une bactérie intestinale des mammifères très commune chez l'être humain. Découverte en 1885 par Théodore Escherich, c'est un coliforme fécal, hôte commun de la microflore commensale intestinale de l'Homme et des animaux à sang chaud (mammifères et oiseaux). Cependant, certaines souches d'*E. coli* peuvent être pathogènes entraînant alors gastro-entérites, infections urinaires, méningites, ou septicémies. *E. coli* est sans doute l'organisme vivant le plus étudié à ce jour : en effet, l'ancienneté de sa découverte et sa culture aisée (division cellulaire toutes les 20 minutes à 37 °C dans un milieu riche) en font un sujet d'étude de choix. C'est pourquoi nos essais seront réalisés sur cette bactérie.

| | NOM | REFERENCES | | MILIEUX DE PRESENCE | EFFETS PATHOGENES SUR L'HOMME |
|---|---|---|---|---|---|
| | | ***Dynamique*** | ***Statique*** | | |
| **GRAM+** | *Bacillus subtilis* | Lin et al., 2003 ; Pal et al., 2005 | Pal et al., 2007 | Eaux douces ou de mer, sols | Oui selon les espèces (i.e : *Bacillus anthracis, cereus*) |
| | *Bacillus cereus* | Vohra et al., 2006 | | | |
| | *Mycobacterium sp.* | Pal et al., 2005 | | Eaux, sols | Oui selon les espèces (i.e : *Microbacterium tuberculosis, leprae*) |
| | *Paenibacillus sp.* | | Pal et al., 2007 | Sols | Pas pour l'Homme, mais pour les animaux |
| | *Staphylococcus aureus* | Huang et al., 2009 ; Vohra et al., 2006 | | Flore commensale de l'Homme | Infections cutanées, sinusites, otites, infections respiratoires, urinaires… |
| **GRAM-** | *Escherichia coli* | Lin et al., 2003 ; Pal et al., 2005 ; Pal et al., 2008 ; Sato et al., 2003 ; Vohra et al., 2006 ; Yu et al., 2008 | Caballero et al., 2009 ; Kim et al., 2009 ; Pal et al., 2007 | Intestins des mammifères | Diarrhées, gastro-entérites… |
| | *Legionella pneumophilia* | Josset et al., 2010 ; Josset et al., 2007 | | Eaux, boues | Légionellose |
| | *Pseudomonas fluorescens* | | Pal et al., 2007 | Eaux, sols, plantes, denrées alimentaires | Surinfection des plaies, infections nosocomiales |
| | *Serratia marcescens* | Goswami, 2003 | | Eaux, sols | Infections nosocomiales, urinaires, septicémies |

**Tableau I.2-3 : Exemples de bactéries étudiées dans le cadre de la photocatalyse**

### I.2.2 DISPOSITIFS D'EPURATION EXPERIMENTAUX

Cette partie a pour objectif de décrire, dans les grandes lignes, le déroulement des expériences réalisées sur *E.coli* par d'autres auteurs tout en présentant les dispositifs expérimentaux associés.

#### I.2.2.1 Approche statique

- **Préparation de l'inoculum test**

Avant toute expérimentation d'inactivation, les bactéries doivent être mises en culture. D'après la littérature il existe deux familles de protocoles différents schématisées en figure I.2-2.

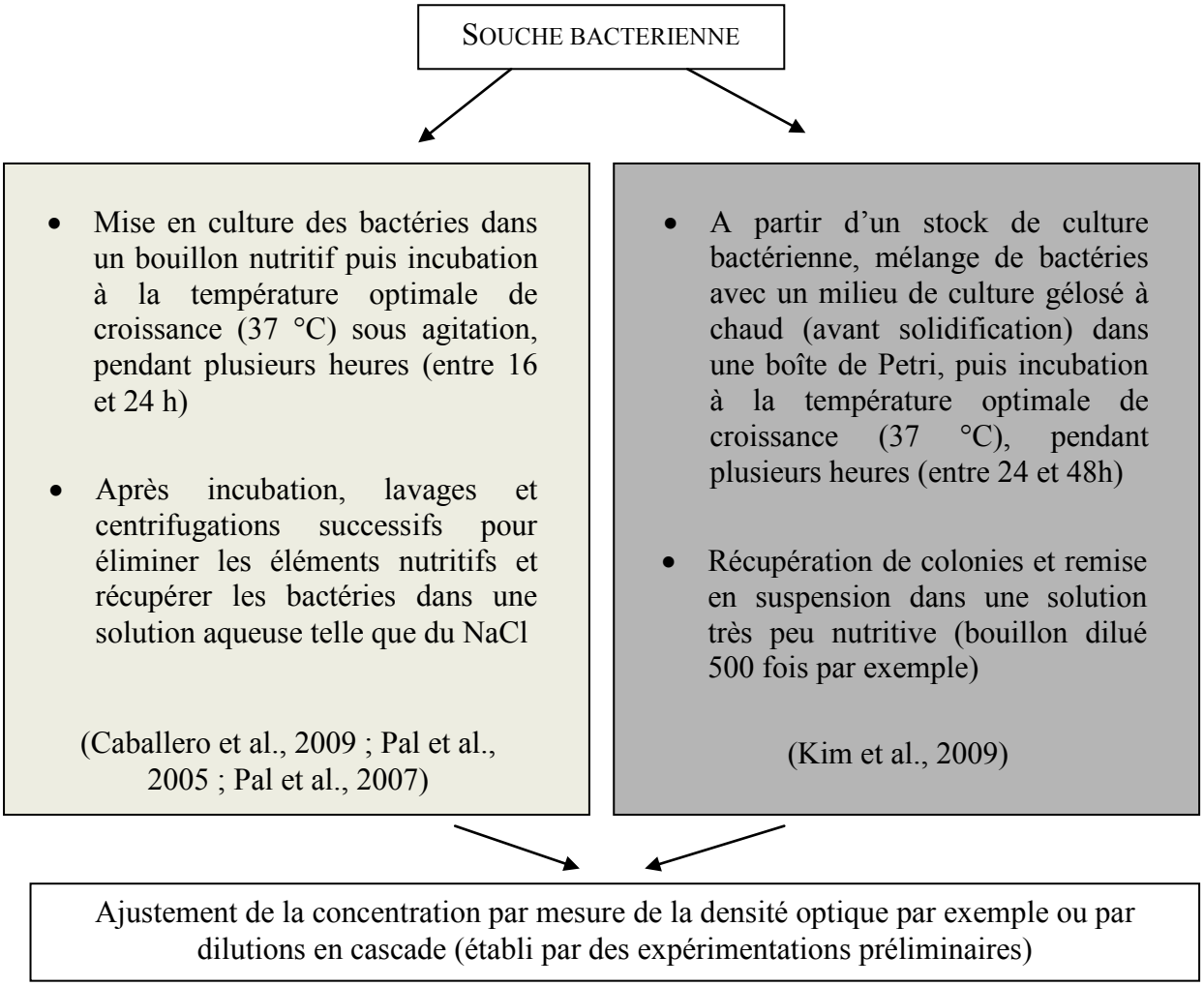



**Figure I.2-2 : Protocole de préparation de l'inoculum test**

- **Préparation des supports photocatalytiques**

Les supports utilisés sont poreux ou non. Dans le premier cas ce sont généralement des filtres, en fibres de verre ou en acétate de cellulose (diamètre des pores compris entre 0,4 et 0,45 µm) où le dioxyde de titane, préalablement dispersé dans une phase aqueuse est déposé par filtration ou par simple trempage. Les filtres sont ensuite séchés voire calcinés (Caballero et al., 2009 ; Kim et al., 2009 ; Pal et al., 2005 ; Pal et al., 2007). Dans le second cas, on utilise communément des lames de verre, immergées à plusieurs reprises dans une suspension de dioxyde de titane puis séchées et calcinées (Kim et al., 2009). La charge initiale en $TiO_2$ est

déterminée par différence de masse et peut être modifiée en utilisant, par exemple, des dispersions de concentrations variables.

- **Inactivation photocatalytique**

Un aliquot de l'inoculum bactérien est déposé soit par pipetage soit par filtration, sur les supports photocatalytiques puis placé sous irradiation pour initier l'inactivation. Les dispositifs expérimentaux sont relativement simples comme le montre la figure I.2-3.

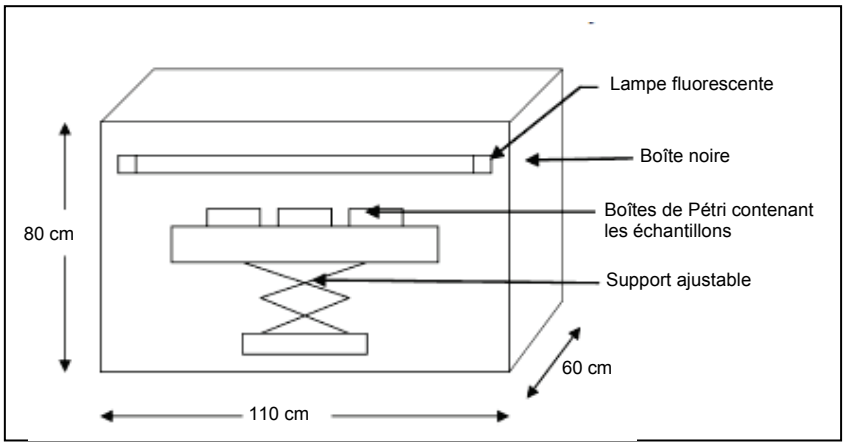



**Figure I.2-3 : Dispositif d'inactivation photocatalytique de bactérie en statique (Pal et al., 2007)**

Généralement, les inactivations se font sur des durées relativement longues allant de 15 minutes à 2h (Caballero et al., 2009 ; Kim et al., 2009 ; Pal et al., 2005 ; Pal et al., 2007) et des configurations témoins sont réalisées en parallèle (effet du $TiO_2$ non éclairé, effet des UVA seuls…) (Pal et al., 2007). Les activités antibactériennes expérimentales sont variables de 0,5 log à plusieurs log[†] selon les concentrations initiales (seuil de détection) et les conditions opératoires.

- **Analyses**

Tout d'abord, les supports photocatalytiques sont généralement observés par microscopie pour vérifier que le dépôt de $TiO_2$ est homogène. Les analyses biologiques permettent, quant à elle, de déterminer la flore viable et cultivable des échantillons après irradiation. Cela consiste à dénombrer les colonies ayant crû sur un milieu nutritif gélosé après incubation. Pour se faire les supports photocatalytiques poreux peuvent être déposés directement sur le milieu de culture (face exposée aux UV contre la gélose - Eosine Bleu de Méthylène (EMB) - (Caballero et al., 2009 ; Pal et al., 2005 ; Pal et al., 2007)) ou bien lavés, la solution de lavage ainsi récupérée étant ensuite dénombrée par étalement sur milieu gélosé - Tryptone Soja Agar (TSA) - (Kim et al., 2009).

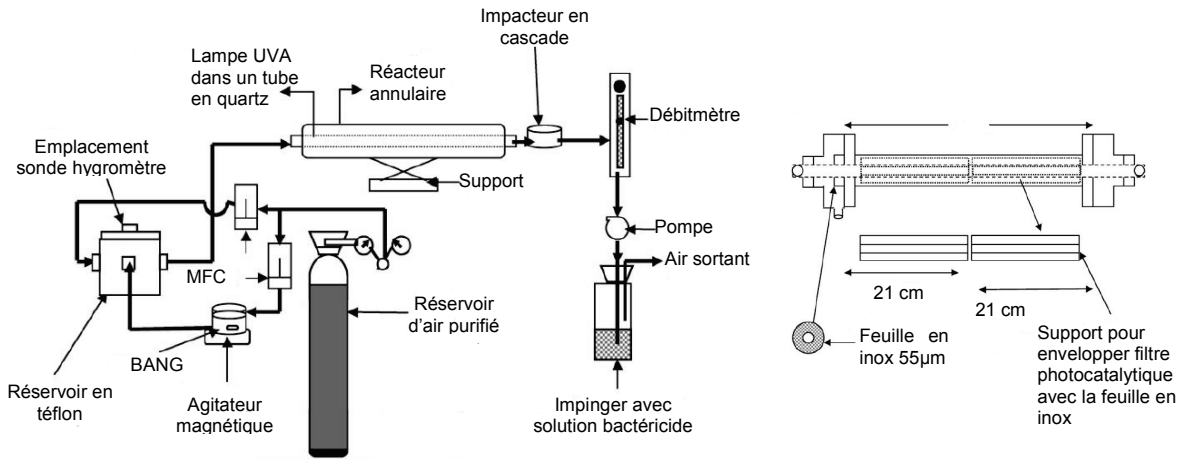
Précisons que le comptage des colonies sur milieu gélosé est statistiquement valable si le nombre de colonies est compris entre 30 et 300. Ainsi, pour obtenir une quantité correcte de colonies, la seconde méthode peut permettre une meilleure sensibilité analytique car généralement, la solution de lavage est diluée en cascade au dixième et trois dilutions successives sont étalées. Cependant l'extraction des supports doit permettre de collecter l'ensemble des bactéries présentes sur le support.

[†] L'activité antibactérienne est souvent définie comme le logarithme du rapport des concentrations avant et après photocatalyse.

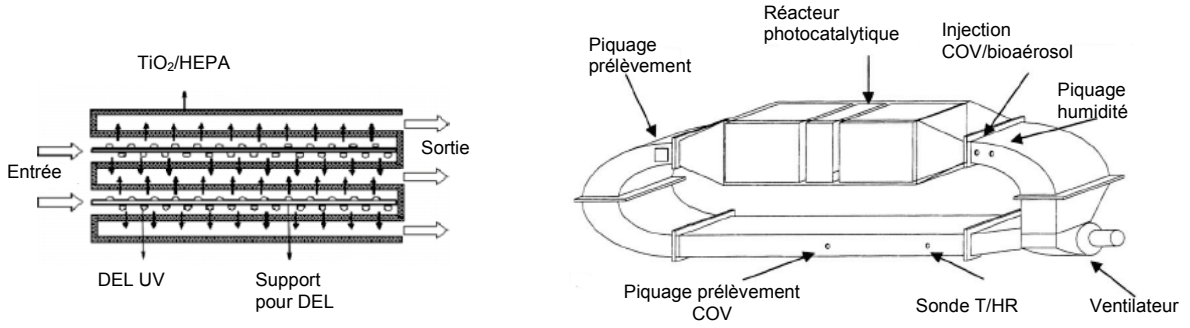
### I.2.2.2 Approche dynamique

Les tests de dégradation d'un bioaérosol par photocatalyse en dynamique débutent par la mise en suspension des microorganismes dans l'air. D'après la littérature, les bactéries sont mises en culture conformément au protocole décrit sur la figure I.2-2. Après collecte des bactéries dans un milieu non nutritif, l'aérosolisation est généralement réalisée par nébulisation pneumatique (Lin et al., 2003 ; Pal et al., 2005 ; Pal et al., 2008 ; Sato et al., 2003 ; Vohra et al., 2006 ; Yu et al., 2008). De plus amples détails sur les techniques de génération, de prélèvements et d'analyses des bioaérosols seront apportés dans le paragraphe consacré aux aérosols biologiques. Les supports photocatalytiques sont essentiellement des filtres mécaniques, d'efficacité variable, couverts de $TiO_2$ permettant ainsi la rétention des microorganismes, étape nécessaire voire fondamentale pour le processus photocatalytique (Goswami, 2003 ; Huang et al., 2009 ; Pal et al., 2008 ; Yu et al., 2008). Selon la disposition des supports, les réacteurs peuvent être de différents types : réacteur annulaire (Pal et al., 2008), réacteur « chicané » (Huang et al., 2009) ou encore réacteur à flux traversant (Goswami, 2003 ; Yu et al., 2008) (cf. figure I.2-4).

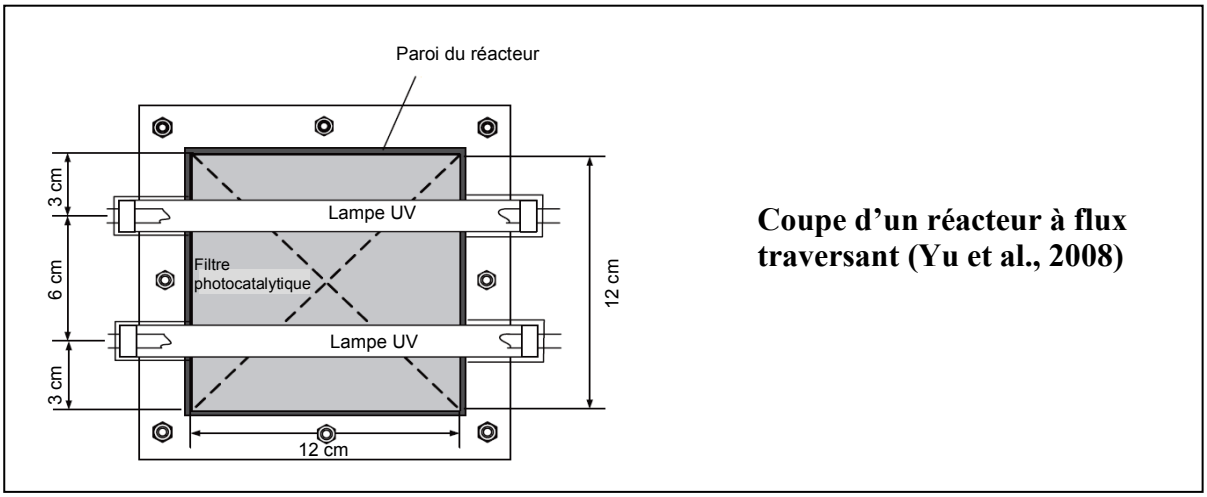
Dans les configurations en flux traversant, le choix du filtre conditionne grandement l'efficacité de la photocatalyse. Lin et al. (2003) ont utilisé différents types de filtres conduisant à une pénétration d'*E.coli* parfois inférieure à 50 % aboutissant à des taux d'inactivation photocatalytique de l'ordre de 45 % montrant une capacité germicide négligeable. Huang et al. (2009) ont employé des filtres HEPA imprégnés de $TiO_2$ pour traiter un bioaérosol de *Staphyloccocus aureus,* ce qui leur a permis d'abattre entre 3 et 4 log en une passe et de décontaminer complètement leur filtre en plus de 50 h.




**Réacteur annulaire (Pal et al., 2008)**



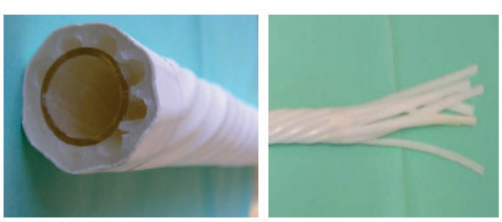

**Réacteur chicané (Huang et al., 2009)** **Réacteur à flux traversant (Goswami, 2003)**



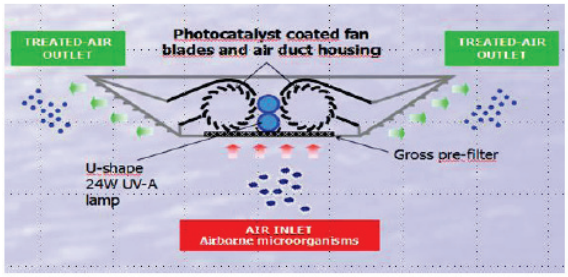

**Coupe d'un réacteur à flux traversant (Yu et al., 2008)**

**Figure I.2-4 : Dispositifs d'inactivation photocatalytique de bactéries en dynamique**

Des réacteurs à géométries plus complexes ont été élaborés par Josset (2008), pour traiter un bioaérosol contaminé par *Legionella*. Quelques schémas sont présentés en figure I.2-5.



**Réacteur torsadé**




**Réacteur tangentiel**

**Figure I.2-5 : Dispositifs d'inactivation de *Legionella* en dynamique (Josset, 2008)**

L'efficacité des différents systèmes résulte donc du compromis entre l'optimisation du contact entre l'agent biologique et le dioxyde de titane et l'irradiation de ce dernier. L' « adhésion » peut être assurée dans les situations à flux traversant avec des supports efficaces tels que les filtres HEPA, ou dans des espaces annulaires de faible taille dans lesquels la turbulence est importante, de même que dans les réacteurs chicanés voire torsadés. Toutefois, la turbulence doit être ajustée de manière à ne pas engendrer de contraintes de cisaillement trop élevées pour les microorganismes. Enfin, une irradiation radiale du catalyseur est optimale pour les espaces annulaires et les réacteurs torsadés tout comme l'utilisation de diodes électroluminescentes (DEL) compactes pour les réacteurs chicanés.

### I.2.2.3 Appareils commerciaux

Les applications industrielles de la photocatalyse se multiplient considérablement depuis quelques années (Faure et al., 2009). A titre d'exemple, les grands groupes appliquent les propriétés autonettoyantes, conférées par la photocatalyse à certains matériaux : le verre autonettoyant de Saint-Gobain, les revêtements routiers et les murs antipollution d'Eurovia ou encore le ciment autonettoyant et dépolluant de Calcia. En termes de traitement de l'air ambiant, de nombreuses PME proposent des gammes d'épurateurs d'air autonomes en présentant leurs appareils comme universels, hautement efficaces, sans se soucier aucunement de l'innocuité des sous-produits potentiellement créés (Alcion, 2010 ; Biowind, 2010 ;

Epurae, 2010 ; Photocleanquartz, 2010). Ils associent généralement des techniques de filtration, d'adsorption sur charbon actif et de dégradation photocatalytique. Les cibles étant multiples (fumées de cigarettes, odeurs de cuisson, COV, microorganismes…), ces épurateurs d'air sont installés dans des lieux publics (bars, restaurants, cafés), des transports collectifs, des lieux médicaux (salles d'attentes, salles opératoires, hôpitaux, ambulances), des crèches, des écoles maternelles ou encore des salles de réunions.

### I.2.3 PARAMETRES D'INFLUENCE

La réaction photocatalytique est un processus catalytique hétérogène régi par un schéma réactionnel à sept étapes (cf. figure I.2-6).

**1-** Diffusion externe : migration diffusionnelle des réactifs de la phase fluide vers la surface du grain de catalyseur ;
**2-** Diffusion interne : migration diffusionnelle des réactifs dans les pores du grain ;
**3-** Adsorption des réactifs ;
**4-** Réaction de surface ;
**5-** Désorption des produits ;
**6-** Diffusion interne des produits ;
**7-** Diffusion externe des produits.

Ainsi, pour optimiser la réaction de photocatalyse, il est primordial d'assurer un bon transfert externe des polluants vers le catalyseur, en adaptant la géométrie des réacteurs et en assurant une bonne agitation, dans l'objectif d'augmenter la turbulence. De même, le transfert interne des polluants vers les pores est un paramètre clé qui dépend des propriétés diffusives de l'espèce en question (fonction de la taille et de l'écoulement notamment). Lors des traitements photocatalytiques de gaz, les étapes d'adsorption, réaction et désorption sont généralement les plus limitatives puisque l'équilibre d'adsorption/désorption dépend en partie de la concentration du polluant, de la masse de catalyseur et de la nature du couple composé/support. Enfin, la réaction en elle-même doit être assurée par une irradiation correcte du catalyseur, pour amorcer le processus.

Dans le cas particulier du traitement photocatalytique d'agents biologiques, les limitations diffusionnelles externes sont importantes et le transfert interne vers les pores est nul puisque ces espèces sont cent à mille fois plus grosses que les pores du catalyseur. La réaction se fait donc en surface et l'optimisation du contact entre les microorganismes et le catalyseur est essentielle. En pratique, le transfert externe est fréquemment assuré par des processus de filtration sur media photocatalytique éclairé.

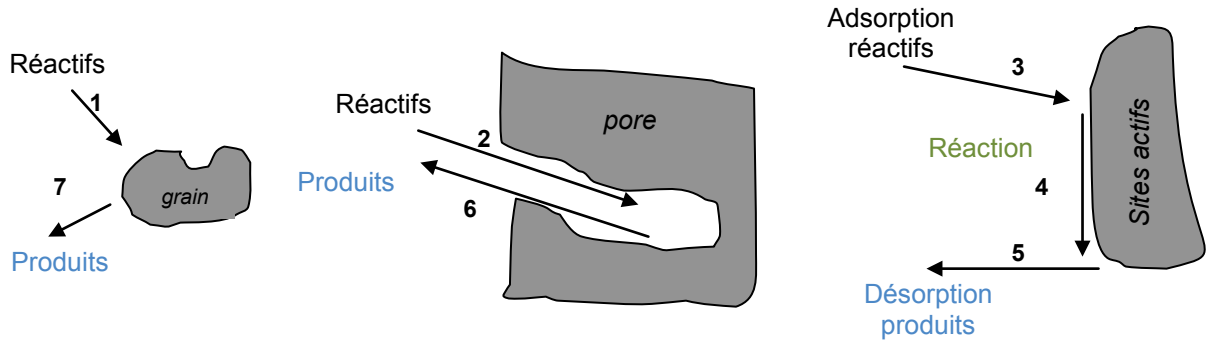



**Figure I.2-6 : Schéma classique d'une réaction catalytique hétérogène**

Par ailleurs, la modification de certains paramètres expérimentaux permet également d'influencer la réaction photocatalytique.

- **L'intensité lumineuse**

Pour rendre la réaction de photocatalyse possible, il est nécessaire d'exposer le catalyseur à un rayonnement d'énergie suffisante pour provoquer le transfert d'électrons de la bande de valence à la bande de conduction. En statique ou en dynamique, il a été montré que l'efficacité d'inactivation des bactéries et la vitesse de désinfection augmentent quand l'intensité lumineuse augmente (Kim et al., 2009 ; Pal et al., 2005 ; Pal et al., 2008). En effet, plus la dose d'UV est élevée plus la quantité de radicaux générés est importante et plus leur attaque sur les cellules est massive. Toutefois la littérature ne met pas pour autant en évidence qu'il existe une intensité optimale au-delà de laquelle l'apport de photons supplémentaires serait inutile, cela dépend notamment de la masse de catalyseur ; sachant qu'à quantité fixée, il est possible de déterminer expérimentalement cette intensité.

- **L'humidité relative**

L'influence de l'humidité relative sur la dégradation d'un bioaérosol par photocatalyse est fréquemment étudiée. En effet, la proportion de molécules d'eau présentes dans le milieu est un paramètre important puisqu'elle conditionne la quantité de radicaux $OH^{\bullet}$ potentiellement actifs pour l'inactivation des agents biologiques. Pal et al. (2008), ont fait varier l'hygrométrie du bioaérosol (50, 70 et 85 %) et ont logiquement observé que plus l'hygrométrie est élevée plus l'inactivation est importante. Cependant, Goswami (2003), préconise des taux d'humidité relative proches de 50% pour éviter une survie, voire une prolifération, des microorganismes sur les supports photocatalytiques qui pourrait se produire pour de fortes hygrométries. Par ailleurs l'hygrométrie peut avoir une influence sur la dégradation des sous produits de dégradation et sur la minéralisation des microorganismes et des espèces intermédiaires.

- **La durée d'irradiation**

Que ce soit en statique, ou en dynamique, le processus photocatalytique appliqué à des microorganismes est long comparé au traitement des gaz, puisque les agents biologiques sont un ensemble de molécules chimiques de poids moléculaire très important. Ainsi, la totalité des auteurs s'accorde sur le fait que plus la durée d'irradiation, ou le temps de passage, sont importants, plus l'inactivation est efficace puisque l'attaque des radicaux $OH^{\bullet}$ est prolongée (Kim et al., 2009 ; Pal et al., 2005 ; Pal et al., 2007). En outre, des essais plus approfondis réalisés en phase liquide ont montré l'aptitude de certaines bactéries à recouvrer leur viabilité après une interruption de la réaction photocatalytique (Rincon et al., 2003). En effet, contrairement à des espèces chimiques classiques, les espèces biologiques endommagées ont la capacité de se rétablir lorsque des conditions favorables sont réunies : présence de nutriments, arrêt du processus destructeur… Cependant, une forte durée d'irradiation conduit à un état d'endommagement tel que les microorganismes sont trop affaiblis pour enclencher ces mécanismes de défenses complexes (Goosen et al., 2008).

- **La charge en $TiO_2$**

Globalement, il apparaît que plus la charge initiale en dioxyde de titane est importante, plus l'inactivation sera rapide et élevée (Caballero et al., 2009 ; Pal et al., 2008 ; Pal et al., 2007). Pourtant, selon les conditions opératoires, il peut exister une masse optimale de $TiO_2$ résultant d'un compromis entre l'optimisation du contact bactérie-$TiO_2$ et de l'irradiation du semi-conducteur (Caballero et al., 2009 ; Pal et al., 2005). La figure I.2-7 établie par Caballero et al. (2009), permet d'illustrer cette problématique.

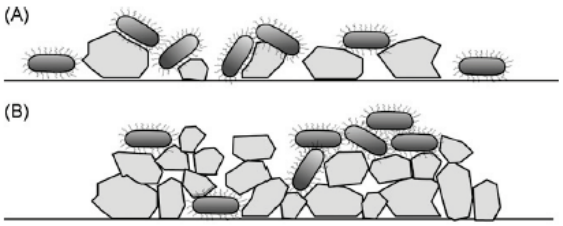



**Figure I.2-7 : Représentation schématique du contact entre les bactéries et le $TiO_2$ lors du processus d'inactivation photocatalytique (Caballero et al., 2009)**
**(A) faible charge en $TiO_2$, contact entre les cellules et le $TiO_2$ optimal pour une bonne transmission de la lumière (meilleurs taux de dégradation) ; (B) forte charge en $TiO_2$, excès de $TiO_2$ et de bactérie et mauvaise transmission de la lumière (effet photocatalytique moindre)**

Par ailleurs, Kim et al. (2009), ont comparé l'effet d'un $TiO_2$ classique à un $TiO_2$ mésoporeux[‡] qui est plus efficace puisque les cristaux sont plus petits et qu'ils génèrent ainsi une plus grande surface et un nombre de sites actifs plus important entraînant, par conséquent, une meilleure inactivation.

### I.2.4 MODES D'ACTION DE LA PHOTOCATALYSE

La compréhension des mécanismes mis en jeu lors de l'inactivation photocatalytique de bactéries reste encore confuse au jour d'aujourd'hui. Les principales suppositions ont été établies à partir d'expérimentations en phase liquide, les travaux en phase aérosol étant plus récents.
Comme dans tout processus photocatalytique, les multiples radicaux générés à la surface du catalyseur ($O_2^{-\bullet}$, $HO_2^{\bullet}$, $OH^{\bullet}$) sont souvent considérés comme les espèces actives. Tous ont des caractéristiques bactéricides, mais les radicaux les plus puissants sont les radicaux hydroxyles (Rincon et al., 2001). Cependant, Kikuchi et al. (1997) ont étudié la dégradation d'*E. coli* en phase aqueuse et suggèrent que l'agent bactéricide principal n'est pas $OH^{\bullet}$ puisque sa durée de vie très courte lui confère une mobilité réduite, mais plutôt $H_2O_2$ qui peut traverser les membranes cellulaires. On distingue deux modes d'action du peroxyde d'hydrogène fonction de la concentration présente dans le milieu : pour des teneurs basses (inférieures à 2 $mmol.L^{-1}$), le métabolisme relargue des espèces inconnues conduisant à la mort des cellules, tandis que pour les teneurs plus élevées (10 $mmol.L^{-1}$) la mort est induite par les radicaux $OH^{\bullet}$ résultant de la réaction de Fenton ($H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow Fe^{3+} + OH^{\bullet} + OH^-$).

Même si les radicaux sont souvent impliqués dans les systèmes photocatalytiques, la compréhension des mécanismes de mort cellulaire nécessite un approfondissement. Certains auteurs proposent des mécanismes impliquant une action de la photocatalyse à différents niveaux cellulaires.

Les dommages initiaux ont sans doute lieu dans la paroi de la cellule en contact avec le $TiO_2$. Cependant, même si la paroi de la cellule est endommagée, elle reste viable. En effet, Dunlop et al. (2002), ont observé que les bactéries sont capables de renaître après 48 heures de désinfection photocatalytique si le processus n'est pas suffisamment long. Les cellules faiblement endommagées peuvent entrer dans un état de viabilité non-cultivabilité (Viable But Non Cultivable state, VBNC) quand elles sont exposées à un stress oxydant. Dans cet état, elles sont indétectables par les méthodes traditionnelles. Mais si les conditions

[‡] Un matériau mésoporeux est caractérisé par une surface spécifique élevée et une porosité contrôlée.

deviennent favorables, les cellules ont l'aptitude à recouvrer un état viable et cultivable et sont, à nouveau capables de causer des maladies. Néanmoins, si le processus photocatalytique se prolonge, il y a élimination de la protection de la paroi cellulaire, les dommages oxydants prennent place au niveau de la membrane cytoplasmique sous-jacente. Progressivement, la perméabilité des cellules augmente sous l'action photocatalytique permettant, par conséquent, le relargage de composants cellulaires conduisant à la mort des cellules (Huang et al., 2000). De manière plus détaillée, les espèces actives sont capables d'entrainer des altérations et d'induire des désordres significatifs dans la membrane cellulaire qui sont démontrés par une rapide fuite d'ions potassium et une libération lente de protéines et d'ADN qui mènent, de façon ultime, à la rupture de la paroi cellulaire et à la mort complète de la cellule (Ibanez et al., 2003).
La photocatalyse permettrait également le blocage de certaines fonctions vitales comme la respiration par diminution d'une enzyme, la coenzyme A et la formation de son dimère (Ibanez et al., 2003 ; Rincon et al., 2001).
Enfin, l'effet des UV sur l'ADN des systèmes cellulaires est souvent impliqué dans les mécanismes de dégradation photocatalytique. Au même titre que chez l'Homme, les conséquences des UV sur les microorganismes diffèrent en fonction de leur niveau énergétique. Selon Robertson et al. (2005), les UVB et C inactivent les organismes en produisant des lésions de l'ADN, ce qui empêche une réplication normale. L'hypothèse est relayée par Rincon et al. (2005), qui précisent que les UVB agissent directement ou non, en générant des photoproduits d'ADN dont les plus communs sont : le dimère de cyclobutane pyrimidine (CPD), la pyrimidine (6-4) et la pyrimidinone (6-4 PP). L'accumulation de ces photoproduits d'ADN peut être létale pour les cellules puisqu'ils bloquent la réplication de l'ADN et la transcription de l'ARN. Cependant, les bactéries ont développé des mécanismes de réparation ou de tolérances aux endommagements de l'ADN sous l'action des UV (Goosen et al., 2008). Quant aux UVA, les dommages apparaissent à la suite d'une excitation des molécules photosensibles dans les cellules. Il y a alors production d'espèces actives ($O_2^{-\bullet}$, $HO_2^{\bullet}$, $OH^{\bullet}$ et $H_2O_2$) potentiellement létales ou sublétales pour le génome bactérien ou pour d'autres molécules intracellulaires, qui peuvent conduire à une altération physiologique, une croissance retardée et des perturbations dans les membranes bactériennes aboutissant à l'inhibition de la croissance (Robertson et al., 2005).

### I.2.5 CINETIQUES D'INACTIVATION

Comme tout processus chimique, l'inactivation de bactéries par photocatalyse est caractérisable par des cinétiques qui comportent classiquement trois étapes (Chen et al., 2010 ; Marugan et al., 2008 ; Cho et al., 2004) (cf. figure I.2-8).

La première phase correspond à une décroissance lente de la concentration bactérienne au cours du temps voire une stabilisation de celle-ci : il s'agit d'un plateau (I) dont la présence peut s'expliquer par une attaque isolée sur de multiples cibles qui conduirait à un faible endommagement des cellules. Puis viennent l'étape de décroissance « log-linéaire » (II) qui couvre la plus grande partie de la réaction et dans laquelle l'attaque des cellules est démultipliée, et le troisième stade qui correspond au ralentissement final du processus (III).

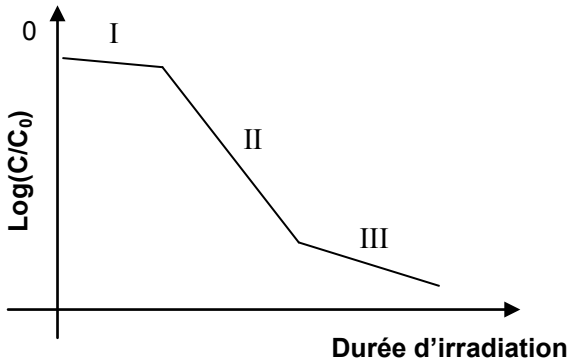



**Figure I.2-8 : Inactivation photocatalytique de bactéries**

- **<u>Modèles de Chick-Watson (1908)</u>**

Les processus d'inactivation ou de désinfection sont le siège de mécanismes complexes. C'est pourquoi les cinétiques d'inactivation sont caractérisées par des équations empiriques dont la plus courante est celle de Chick-Watson (Alrousan et al., 2009 ; Marugan et al., 2008 ; Pal et al., 2007) (équation I.2-2).

$$\log(\frac{C}{C_0}) = -k[c]^n t \qquad \textbf{(I.2-2)}$$

Avec C : concentration en bactéries à l'instant t
$C_0$ : concentration initiale en bactéries
k : constante cinétique d'inactivation
c : concentration de l'agent désinfectant (ici le $TiO_2$)
n : ordre de la réaction

Ce modèle ne prend pas en compte l'influence de paramètres opératoires tels que l'intensité du flux lumineux ou l'hygrométrie.
Dans le cas de la photocatalyse, la charge en $TiO_2$ ne varie pas selon le temps et l'équation I.2-2 devient :

$$\log(\frac{C}{C_0}) = -k't \qquad \textbf{(I.2-3)}$$

Cependant, il semble important de préciser que cette charge de $TiO_2$ devient de moins en moins accessible si nous avons un flux continu de bactéries à traiter ; ce que le modèle ne prend pas en compte.
D'après ce modèle, le taux d'inactivation est dépendant du temps. Il ne peut donc s'appliquer que dans la seconde phase de la figure I.2-8.
Si l'on souhaite prendre en compte la phase de « retard » dans l'inactivation de la bactérie (région I), on peut alors utiliser le modèle de Chick Watson en faisant intervenir un temps $t_0$ correspondant à ce temps de retard (cf. équation I.2-4).

$$\log(\frac{C}{C_0}) = \begin{cases} 0 & si \quad t \le t_0 \\ -k'(t - t_0) & si \quad t \ge t_0 \end{cases} \qquad \textbf{(I.2-4)}$$

Dans d'autres cas, le taux de désinfection est constant dès le début montrant un ralentissement après une longue période de traitement lorsque la concentration en bactéries est devenue très faible. Il est alors possible d'utiliser le modèle de Chick-Watson modifié (équation I.2-5) qui représente bien des cinétiques sans plateau ou sans stabilisation.

$$\log(\frac{C}{C_0}) = k_1\left[1 - \exp(-k_2 t)\right] \quad \textbf{(I.2-5)}$$

- **Modèles de Hom (1972)**

Le modèle de Hom peut être appliqué lorsque l'inactivation n'évolue pas de manière log-linéaire (Marugan et al., 2008) (équation I.2-6). Cette équation, similaire à celle de Chick-Watson, fait intervenir un paramètre supplémentaire *h*. Pour *h=1*, on retrouve l'expression du précédent modèle, pour *h>1* l'expression reproduit les étapes I et II, si *h<1*, les phases II et III.

$$\log(\frac{C}{C_0}) = -k' t^h \qquad \textbf{(I.2-6)}$$

Enfin, si l'on souhaite modéliser les trois régions, une modification de ce dernier modèle peut être apportée (équation I.2-7) (Marugan et al., 2008).

$$\log(\frac{C}{C_0}) = -k_1\left[1 - \exp(-k_2 t)\right]^{k_3} \qquad \textbf{(I.2-7)}$$

**Récapitulatif**

La figure I.2-9 récapitule les différents modèles cinétiques détaillés précédemment.

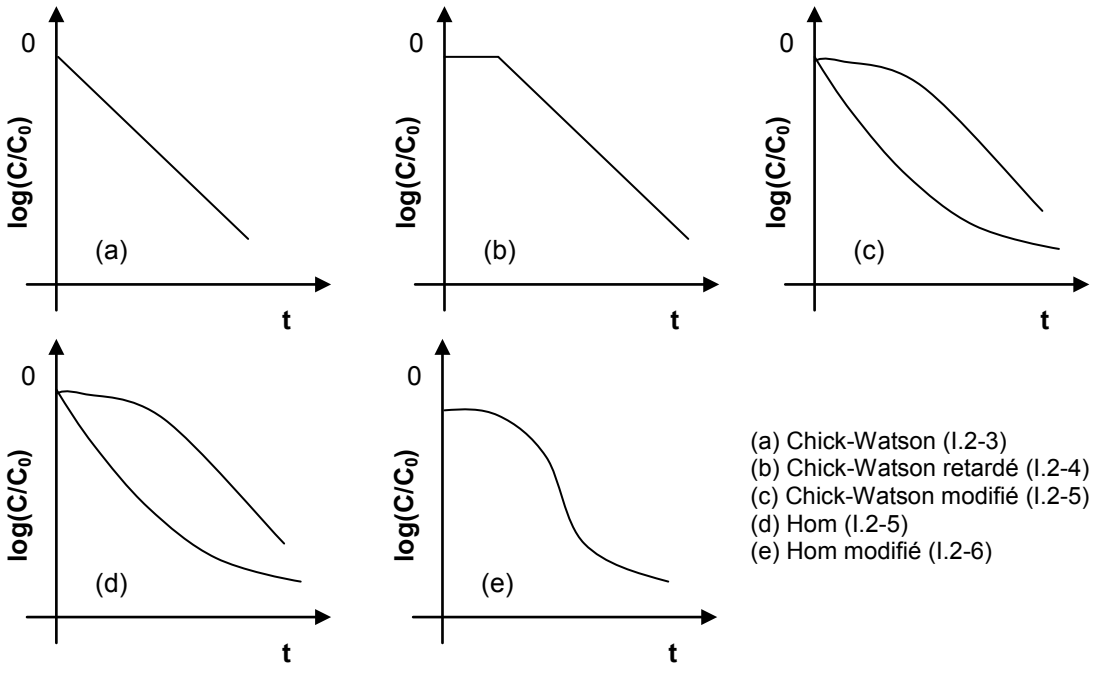



**Figure I.2-9 : Modèles cinétiques empiriques (Marugan et al., 2008)**

Outre ces modèles empiriques, Marugan et al. (2008), mentionnent un autre type d'équation, non empirique, pour modéliser la cinétique d'inactivation photocatalytique en se basant sur le schéma réactionnel suivant :

$$C_0 \xrightarrow{k_1} C_1 \xrightarrow{k_2} \cdots C_i \xrightarrow{k_i} \cdots C_{n-1} \xrightarrow{k_n} C_n$$

Où $C_i$ : représente la population de bactéries avec un niveau d'endommagement $i$ ($i$ =0, 1, 2,...,$i$ ,...,$n$)

$k_i$ : la constante cinétique entre les niveaux d'endommagement $i$-1 et $i$

$n$ : la limite correspondant à un dommage entraînant l'inactivation de la bactérie

En considérant que toutes les constantes cinétiques sont égales, l'évolution de la population bactérienne encore active s'exprime par l'équation I.2-8 :

$$\log(\frac{C}{C_0}) = \log\frac{\sum_{i=0}^{n-1} C_i}{C_0} = -kt + \ln\left(1 + \sum_{i=1}^{n}\frac{(kt)^i}{i!}\right) \qquad \textbf{(I.2-8)}$$

### I.2.6 SOUS-PRODUITS DE DEGRADATION ET MINERALISATION

Comme nous l'avons vu précédemment, la réaction photocatalytique peut conduire à la formation de sous-produits de dégradation si la réaction est incomplète. Ces sous-produits peuvent être classés en deux catégories selon qu'ils proviennent des microorganismes (fragments ou produits du métabolisme) ou du processus photocatalytique en lui même. Concernant la première catégorie on peut citer, les *endotoxines* (contenues dans la paroi cellulaire des bactéries à Gram -), et les *mycotoxines* (produits par le métabolisme des champignons) (Fabian et al., 2005). On peut également ajouter les Composés Organiques Volatils Microbiens (COVM) (Fischer et al., 1999) qui sont des substances de différents types comme les hydrocarbures, les alcools, les aldéhydes, les cétones, les éthers ou encore les esters. Certains COVM permettent par exemple l'identification d'une pollution due, spécifiquement, aux champignons. A propos de la seconde catégorie de sous-produits, le processus photocatalytique peut engendrer de nouveaux produis nocifs capables d'agir sur les microorganismes en inhibant la létalité des cellules, en provoquant un filtre pour le flux lumineux ou encore en jouant le rôle de nutriment. Dans ce cas, les microorganismes ont la possibilité de recroître après traitement et de restreindre un quelconque effet résiduel de la photocatalyse (Ibanez et al., 2003). A notre connaissance, peu, voire aucune publication ne mentionne l'étude des sous-produits de dégradation associés à l'inactivation de microorganismes. Toutefois Jacoby et al. (1998), ont étudié la minéralisation de bactéries par photocatalyse en réacteur fermé par suivi du $CO_2$. A partir d'un bilan carbone, ils ont pu montrer qu'après 80 heures d'exposition aux UV, seuls 55 % des bactéries avaient été minéralisés. Ainsi la question des sous-produits de dégradation reste entière et devrait faire l'objet d'une attention particulière pour considérer l'innocuité de la photocatalyse, en termes de toxicité.

Cette partie consacrée au traitement des bioaérosols par photocatalyse a permis de poser les fondements nécessaires à la compréhension de ce procédé d'épuration. Les dispositifs expérimentaux existants ont été décrits rapidement et le paragraphe qui vient permettra aux

lecteurs d'acquérir des notions relatives tant à la génération et à l'analyse des bioaérosols qu'à la physique permettant de décrire leur comportement.

## I.3 PROPRIETES DES AEROSOLS BIOLOGIQUES

Les aérosols biologiques sont avant tout des aérosols possédant la particularité d'être vivants. Le comportement des bioaérosols est donc classiquement décrit par les équations caractérisant les écoulements diphasiques : mouvement d'une phase dispersée (indice D) dans une phase continue (indice C). Le premier paragraphe s'attache donc à décrire les phénomènes auxquels sont soumises des particules en mouvement. Les parties suivantes seront consacrées aux spécificités liées à la génération expérimentale ainsi qu'aux prélèvements et aux analyses de bioaérosols. Nous finirons par donner quelques informations sur la théorie de la filtration des aérosols puisque l'étude bibliographique a pu démontrer que cette technique est souvent couplée à la photocatalyse pour optimiser le contact entre les microorganismes et le dioxyde de titane sans lequel la réaction ne peut être initiée.
Le lecteur possédera ainsi les bases utiles à la compréhension de la démarche entreprise pour la réalisation du banc d'essais de dégradation photocatalytique d'un bioaérosol expérimental, qui sera présentée ponctuellement de ce manuscrit.

### I.3.1 COMPORTEMENT DES PARTICULES AEROPORTEES

Un aérosol est défini comme la suspension de particules solides ou liquides dans un milieu gazeux présentant une vitesse de chute négligeable (Baron et al., 2001). Dans l'air et dans les conditions normales, cela correspond à des particules de tailles inférieures à 100 µm. Le comportement de ces particules dans l'aérosol dépend pour une grande partie des propriétés intrinsèques du gaz et de leur taille. On considère généralement trois domaines caractérisés par le nombre de Knudsen :

$$Kn = \frac{2\lambda_m}{d_p} \qquad \textbf{(I.3-1)}$$

Avec $\lambda_m$ : libre parcours moyen du gaz, $d_p$ : diamètre de la particule
Ces domaines sont :

- Le domaine moléculaire qui correspond à des particules submicroniques caractérisé par les équations de la théorie cinétique des gaz (Kn>>1) ;
- Le domaine continu, pour des particules plus grosses, supérieures au micromètre, les équations de la mécanique des fluides sont alors employées (Kn<<1) ;
- Le domaine intermédiaire correspondant à des particules de taille moyenne ($d_p$ entre 0,01 et 1µm) dont le comportement est décrit par des équations généralement adaptées des domaines précédents (Kn≈1).

Selon leur diamètre, les particules seront soumises à deux types de phénomènes :

- La diffusion brownienne, mouvement des particules à l'échelle moléculaire, induit par les chocs moléculaires, qui concernent essentiellement les particules submicroniques ;
- Le mouvement relatif des particules dans la phase continue provoqué par un champ extérieur (sédimentation par exemple) et/ou par les variations de mouvement du gaz porteur (impaction, turbulence).

### I.3.1.1 Diffusion brownienne

Qu'ils soient liquides ou solides, les aérosols de petites dimensions sont soumis au principe de la diffusion mutuelle. Dans un gaz renfermant des aérosols, le mouvement brownien tente de rendre la concentration uniforme dans tout le volume gazeux, de sorte que les particules vont se déplacer des régions fortement concentrées vers celles faiblement chargées. Ce phénomène de diffusion de particules (phase dispersée) en suspension dans un gaz (phase continue) est exprimé par la première loi de Fick :

$$\varphi_D = -D\frac{dn_D}{dz} \qquad \textbf{(I.3-2)}$$

avec $\frac{dn_D}{dz}$ le gradient de concentration molaire normal à la surface unité, D le coefficient de diffusion mutuelle de l'ensemble gaz-aérosols en suspension.
Pour des particules sphériques ou quasi-sphériques

$$D = \frac{k_B T C_c}{3\pi\mu d_p} \qquad \textbf{(I.3-3)}$$

Avec $k_B$ constante de Boltzmann et $C_C$ facteur de Cunningham.

L'importance relative du mouvement brownien peut être caractérisée par sa comparaison au mouvement convectif, c'est-à-dire par un nombre de Péclet tel que :

$$Pe = \frac{u_{CD} d_P}{D} \qquad \textbf{(I.3-4)}$$

Dans un champ de cisaillement, avec $\dot{\gamma}$ la vitesse de cisaillement, le nombre de Péclet s'écrit :

$$Pe_\gamma = \frac{\dot{\gamma} d_P{}^2}{D} \qquad \textbf{(I.3-5)}$$

Si l'on admet que la transition se situe pour $Pe_\gamma \cong 1$ alors, dans un champ de cisaillement de 100 $s^{-1}$ à 293 K et dans l'air, le diamètre critique est de l'ordre de 1 µm. Ainsi, les particules microniques ou submicroniques sont, le plus couramment, soumises de manière prépondérante à la diffusion (Midoux, 2006).

### I.3.1.2 Mouvement relatif d'une particule solide dans un fluide

La problématique du mouvement d'une phase dispersée dans une phase continue est abordée de manière simplifiée dans ce paragraphe. Le cas des écoulements turbulents, trop endommageants pour les cellules bactériennes, ne sera pas explicité ici, mais le lecteur pourra trouver de plus amples informations dans les références bibliographiques (Midoux, 2006).
De par sa difficulté, l'introduction aux écoulements diphasiques nécessite de poser quelques hypothèses :

- Les seules forces susceptibles d'agir sur l'aérosol sont les forces extérieures (force de pesanteur, force dynamique du fluide porteur) et la résistance du milieu lorsqu'une particule est en mouvement ;
- Les forces d'interaction entre les particules sont négligeables.

La description des forces s'appliquant à une particule qui se déplace dans un fluide est détaillée en annexe 1. Si l'on tient compte de l'ensemble des effets, l'équation de mouvement de la particule peut s'écrire, symboliquement sous la forme (Midoux, 2006) :

$$\rho_D V_P \frac{du_D}{dt} = \rho_C V_P \frac{du_C}{dt} + F_E + T_0 + F_B + F_V + F_A \qquad \textbf{(I.3-6)}$$

| Inertie de la particule | Force superficielle de pression | Force de masse virtuelle | Force de traînée stationnaire | Force de Basset | Force de volume | Force d'Archimède |
|---|---|---|---|---|---|---|

Ainsi, pour une particule sphérique, l'équation I.3-6 devient :

$$\left(1+C_E\frac{\rho_C}{\rho_D}\right)\frac{du_D}{dt}=\frac{\rho_C}{\rho_D}(1+C_E)\frac{du_C}{dt}+C_{X0}\frac{3}{4d_P}\frac{\rho_C}{\rho_D}|u_{CD}|u_{CD}$$
$$+C_B 9\sqrt{\frac{\nu_C}{\pi {d_p}^2}}\frac{\rho_C}{\rho_D}\int_{-\infty}^{t}\frac{du_{CD}(\lambda)}{d\lambda}\frac{d\lambda}{\sqrt{t-\lambda}}+\left(1-\frac{\rho_C}{\rho_D}\right)(g_x+a_x) \qquad \textbf{(I.3-7)}$$

Avec

$C_B$ : coefficient de la force de Basset
$C_E$ : coefficient de masse virtuelle
$C_{X0}$ : coefficient de traînée
g : accélération de la pesanteur
a : accélération mécanique

Il est intéressant de considérer les deux cas extrêmes de petites particules présentant une vitesse relative faible (régime de Stokes) et des grosses particules présentant au contraire une vitesse relative élevée (régime de Newton).

- **<u>Régime de Stokes</u> :** $u_{CD}\to 0 \quad C_E\to\frac{1}{2} \quad C_B\to 1 \quad C_{X0}\to\frac{24}{\mathrm{Re}_{P0}}=\frac{24\mu_C}{\rho_C|u_{CD}|d_P}$

L'équation I.3-7 devient

$$\left(1+\frac{1}{2}\frac{\rho_C}{\rho_D}\right)\frac{du_D}{dt}=\frac{3}{2}\frac{\rho_C}{\rho_D}\frac{du_C}{dt}+\frac{18}{{d_P}^2}\frac{\mu_C}{\rho_D}u_{CD}$$
$$+9\sqrt{\frac{\nu_C}{\pi {d_p}^2}}\frac{\rho_C}{\rho_D}\int_{-\infty}^{t}\frac{du_{CD}(\lambda)}{d\lambda}\frac{d\lambda}{\sqrt{t-\lambda}}+\left(1-\frac{\rho_C}{\rho_D}\right)(g_x+a_x) \qquad \textbf{(I.3-8)}$$

- **<u>Régime de Newton</u> :** $u_{CD}\to\infty \quad C_E\to 1{,}05\cong 1 \quad C_B\to 0{,}48\cong\frac{1}{2} \quad C_{X0}\to 0{,}44$

L'équation I.3-7 devient

$$\left(1+\frac{\rho_C}{\rho_D}\right)\frac{du_D}{dt}=2\frac{\rho_C}{\rho_D}\frac{du_C}{dt}+\frac{1}{3d_P}\frac{\rho_C}{\rho_D}|u_{CD}|u_{CD}$$
$$+\frac{9}{2}\sqrt{\frac{\nu_C}{\pi {d_p}^2}}\frac{\rho_C}{\rho_D}\int_{-\infty}^{t}\frac{du_{CD}(\lambda)}{d\lambda}\frac{d\lambda}{\sqrt{t-\lambda}}+\left(1-\frac{\rho_C}{\rho_D}\right)(g_x+a_x) \qquad \textbf{(I.3-9)}$$

La relation I.3-8 permet de définir la vitesse terminale d'une particule et le temps de relaxation correspondant. En effet la vitesse terminale d'une particule se déplaçant dans un fluide porteur en mouvement est obtenue lorsque $u_D = u_C$ et que $\frac{du_D}{dt}=0$.

Le temps de relaxation $\tau$ est défini comme le temps nécessaire pour accélérer ou ralentir une particule d'une vitesse initiale à une vitesse finale $u_D = u_C = u_t$ si le fluide est en mouvement et

$u_D$-$u_C$ = $u_t$ si la particule sédimente dans un fluide porteur au repos. Dans ce cas, la vitesse terminale de chute ($u_t$) de la particule, en régime de Stokes et si $\rho_D >> \rho_C$, s'écrit :

$$u_t \approx \frac{{d_P}^2}{18\mu_C}\rho_D(g_x + a_x) \qquad \textbf{(I.3-10)}$$

$$\text{Ainsi, } u_t \approx (g_x + a_x)\tau \qquad \textbf{(I.3-11)}$$

$$\text{Et } \tau \approx \frac{{d_P}^2}{18\mu_C}\rho_D \qquad \textbf{(I.3-12)}$$

**Remarque** : pour $Re_t < 10^{-4}$ lorsque $d_p \sim \lambda_m$, le fluide ne peut plus être considéré comme un milieu continu par la particule. La notion de viscosité et le principe d'adhérence ne sont plus applicables. La vitesse terminale de chute en régime de Stokes s'écrit :

$$u_t \approx \frac{{d_P}^2}{18\mu_C}\rho_D(g_x + a_x)C_c \qquad \textbf{(I.3-13)}$$

Pour un écoulement d'ensemble superposé de la phase continue à la vitesse $u_C$, il est intéressant de comparer les temps de relaxation aux temps caractéristiques de l'écoulement $\frac{d_P}{u_C}$. On obtient le nombre de Stokes, généralement défini par :

$$Sk = \frac{\rho_D {d_P}^2 u_C}{18\mu_C d_P} \qquad \textbf{(I.3-14)}$$

Si le nombre de Stokes est faible, la particule est capable de s'adapter très vite aux accélérations de l'écoulement porteur, alors que si le nombre de Stokes est grand, l'inertie relative de la particule sera importante et elle aura des difficultés à suivre les trajectoires imposées par le fluide.

### I.3.2 GENERATION DE BIOAEROSOLS

Rappelons que l'objectif de ces travaux concerne l'étude de la dégradation d'un bioaérosol expérimental par photocatalyse. L'étape de génération du bioaérosol est très délicate, le dispositif de génération devant permettre la production d'un bioaérosol de composition homogène et stable dans le temps (Simon et al., 2009b).

Généralement on distingue deux méthodes de mise en suspension des microorganismes (Reponen et al., 1997) :

- par voie humide (bactéries, levures, moisissures sous forme de cellules végétatives ou de spores, virus) ;
- par voie sèche (bactéries, moisissures sous forme de cellules déshydratées, lyophilisées ou de spores).

#### I.3.2.1 Dispersion par voie humide

Les systèmes par voie humide conduisent à la mise en suspension dans l'air de gouttelettes à partir d'un milieu liquide (suspension microbienne - bactéries ou spores en général) sous l'action d'autres fluides (en général de l'air comprimé). Les nébuliseurs pneumatiques et les systèmes de type « bulleurs » sont les plus employés.

- **Les nébuliseurs pneumatiques**

Les nébuliseurs pneumatiques produisent un aérosol polydispersé constitué de gouttelettes. Pour générer l'aérosol, de l'air comprimé est injecté à grande vitesse à travers une buse dans une chambre contenant la culture microbienne (cf. figure I.3-1). Le courant d'air insufflé a deux effets. Il crée une dépression locale qui provoque la remontée de la suspension dans un tube et transforme la culture en gouttelettes à la sortie de ce tube. Les gouttes les plus grosses sont déposées par inertie sur les parois de la chambre et réincorporées dans la suspension tandis que les plus petites sont entraînées vers la sortie du nébuliseur. Ces dernières sont généralement séchées à la sortie du nébuliseur pour obtenir le bioaérosol d'essai. Un inconvénient majeur de ce système réside dans le fait qu'il impose des contraintes de cisaillement importantes qui peuvent affecter la viabilité des microorganismes mis en suspension. De plus, une grande partie du liquide dispersé est réintroduite dans la suspension microbienne (on parle de recyclage d'une partie de la suspension) ; il s'en suit qu'un microorganisme peut subir de nombreuses fois le stress relatif à sa génération avant de quitter la chambre. Ces nombreuses sollicitations sont néfastes pour la viabilité des microorganismes et sont suspectées de dégrader et fragmenter les cellules biologiques (Reponen et al., 1997 ; Ulevicius et al., 1997).

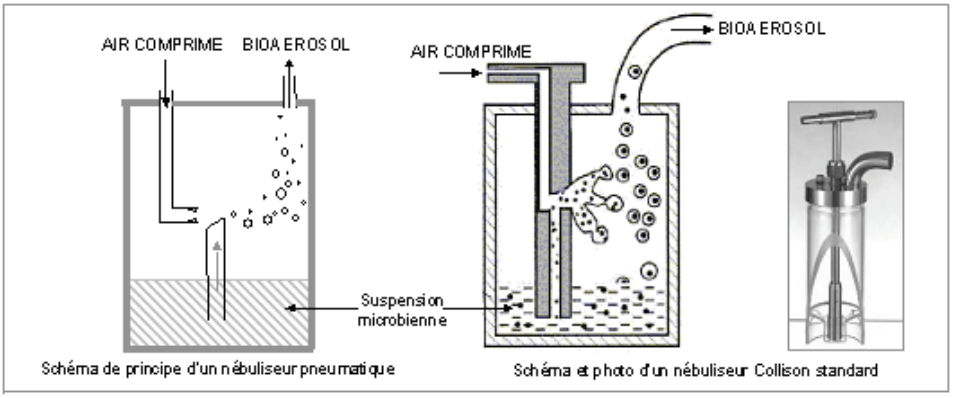



**Figure I.3-1 : Nébuliseurs pneumatiques (Simon et al., 2009b)**

- **Les systèmes de type « bulleur »**

La génération de bioaérosols par les systèmes « bulleurs » (cf. figure I.3-2) repose sur le principe du barbotage. Elle est obtenue en faisant passer de l'air à travers un milieu poreux fritté qui est immergé dans la suspension cellulaire contenue dans l'enceinte. Les gouttelettes ainsi formées sont immédiatement déshydratées par l'injection tangentielle d'air sec. Sous l'effet de la déshydratation, la taille des gouttelettes diminue et ces dernières sont entraînées vers la sortie du bulleur (Reponen et al., 1997). Les « bulleurs » utilisent généralement deux entrées d'air distinctes : une première pour l'air de bullage et la seconde pour l'air de séchage. Ces dispositifs affectent moins la viabilité des microorganismes car ils minimisent les contraintes de cisaillement (Reponen et al., 1997) (le stress et les dommages engendrés par l'éjection du microorganisme par éclatement de bulles sont moins importants que dans le cas des accélérations brutales enregistrées dans un nébuliseur). De plus, et pour la même raison, les microorganismes mis en suspension par cette technique transportent moins de charges électriques comparativement à ceux générés par un nébuliseur Collison. Cependant, l'effet néfaste du recyclage existe également dans le cas où le fritté est immergé dans la solution microbienne.

Afin d'utiliser le principal avantage du générateur de type « bulleur » (minimiser les contraintes imposées aux microorganismes) et de s'affranchir du phénomène néfaste de recyclage, un nouveau type de « bulleur » a été proposé, le « Liquid Sparging Aerosolizer » –

LSA (Mainelis et al., 2005) (cf. figure I.3-2). Le milieu poreux n'est plus immergé dans la solution microbienne. Une pompe péristaltique alimente en continu la surface supérieure du fritté avec une suspension microbienne qui se dépose sous forme d'un film liquide fin. Le passage d'air sec à travers ce film liquide conduit à la formation de bulles qui éclatent sous forme de gouttelettes qui sont, soit sédimentées au fond de l'enceinte du générateur, soit entraînées dans le flux d'air, séchées et finalement conduisent à la génération de particules biologiques en sortie du LSA. Les particules microbiennes qui sédimentent au fond de la cuve ne sont pas recyclées. Les particules mises en suspension ne subissent donc qu'une seule fois le stress lié à leur génération.

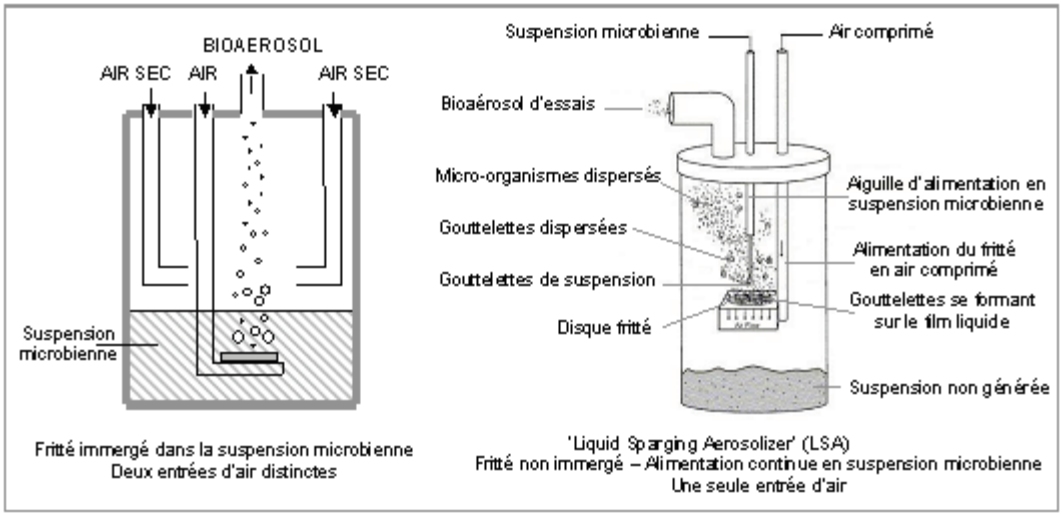



**Figure I.3-2: Les systèmes de type « bulleur » (Simon et al., 2009b)**

### I.3.2.2 Dispersion par voie sèche

Les systèmes par voie sèche consistent à disperser des microorganismes, le plus souvent sous forme de spores, de cellules déshydratées ou lyophilisées (mise en suspension dans l'air d'éléments microbiens non dispersés dans un liquide). Ceci peut également être effectué directement à partir du milieu de culture comme c'est généralement le cas pour les moisissures par exemple. Une méthode couramment utilisée consiste à générer un aérosol en faisant passer un flux d'air à la surface d'une culture microbienne sur un milieu gélosé.

- **Les générateurs conventionnels**

Les générateurs conventionnels produisent un aérosol à partir de microorganismes totalement séparés de leur milieu de culture et sous forme de poudre (cf. figure I.3-3). La dispersion peut être obtenue, le plus simplement, en insufflant de l'air à la surface de la poudre. Des systèmes d'agitation et de vibration favorisent la génération. La poudre peut être préparée en déshydratant les microorganismes, mais ce procédé affecte fortement la viabilité des germes. Elle peut être également préparée à partir de spores de moisissures ou d'actinomycètes qui, très peu hydratées, conviennent à cette application (Reponen et al., 1997).

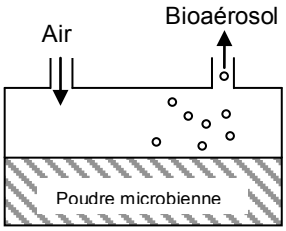



**Figure I.3-3: Générateur conventionnel, Simon et al. (2009b), d'après Reponen et al. (1997)**

- **<u>Les générateurs de type « tube-agar »</u>**

Le système « tube-agar » est constitué d'un cylindre en verre dont une moitié longitudinale est occupée par un milieu gélosé à la surface duquel un microorganisme s'est développé (cf. figure I.3-4) (Reponen et al., 1997). Le flux d'air est introduit à l'une des extrémités du tube et provoque la dispersion des spores. Le diamètre de l'entrée d'air peut être modifié pour ajuster la turbulence du flux d'air et le diamètre de sortie également, afin de tenter de briser les amas de particules sous forme de chaînes.
La force de détachement d'une particule déposée sur un support, sous l'effet d'un flux d'air, est proportionnelle à la fraction de sa surface qui offre une résistance à l'air, c'est à dire au carré de son diamètre. Comme les spores d'actinomycètes sont généralement plus petites que les spores de moisissures, leur mise en suspension après détachement nécessitera, par exemple, des flux d'air plus grands. Ce système est particulièrement adapté pour les spores fongiques car il reproduit la manière dont ces microorganismes sont naturellement mis en suspension dans l'air.

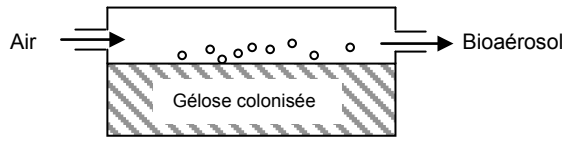



**Figure I.3-4 : Générateur de type « tube-agar » , Simon et al. (2009b), d'après Reponen et al. (1997)**

- **<u>Les générateurs de type flux cyclonique</u>**

Le système à « flux cyclonique » a été développé par l'équipe de Reponen et al. (1997). Il est constitué d'un cylindre vertical dont la surface interne est couverte de milieu gélosé colonisé par les microorganismes (cf. figure I.3-5). Des buses en verre de 1 mm de diamètre interne insufflent de l'air à 2 mm de la surface du milieu de culture et les particules sont détachées et entraînées à l'extérieur de la chambre cylindrique sous l'effet d'un flux d'air turbulent. Cette technique peut avantageusement être utilisée pour générer des spores d'actinomycètes car le système « tube-agar » ne parvient pas à fournir une concentration stable du fait de la faible taille de ces spores. D'une manière générale, elle est utilisable pour tous types de spores.

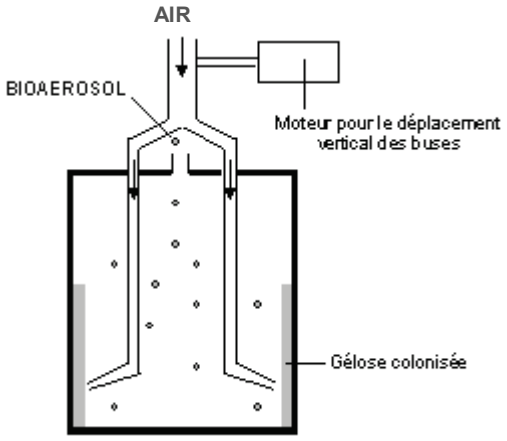



**Figure I.3-5: Générateur de type « flux cyclonique », Simon et al. (2009b), d'après Reponen et al. (1997)**

Pour conclure, il apparaît que les systèmes de dispersion par voie humide offrent un plus grand éventail d'applications.
Nous nous orienterons donc vers ce mode de génération, en privilégiant les dispositifs les moins nocifs pour les microorganismes. Les générateurs de types bulleurs paraissent donc les plus appropriés notamment le LSA (Liquid Sparging Aerosolizer) décrit précédemment.

## I.3.3 ECHANTILLONNAGE DES BIOAEROSOLS

Un aérosol biologique doit être caractérisé physiquement (granulométrie, distribution de taille, charge des particules, formation d'agrégats…) et biologiquement (viabilité, physiologie des microorganismes, résistance au stress, recouvrement bactérien…) par différents échantillonneurs connectés à des dispositifs de prélèvement.

### I.3.3.1 Dispositifs de prélèvement

Classiquement, le mesurage des aérosols, inertes ou biologiques implique qu'un échantillon représentatif de l'aérosol à mesurer soit transporté jusqu'à l'appareil de mesure proprement dit. Ceci est réalisé en prélevant un échantillon de son environnement puis en le transportant le long d'un conduit jusqu'au détecteur. Un dispositif de prélèvement comprend donc plusieurs éléments placés en série (cf. figure I.3-6) (Witschger, 1996).
$E_E$ (sur la figure I.3-6) correspond à l'efficacité d'échantillonnage qui correspond à la probabilité qu'à une particule de l'aérosol ambiant de se retrouver prise en compte au niveau de l'étage du collecteur. On peut décomposer cette efficacité en différents éléments qui constituent le dispositif de prélèvement (cf. figure I.3-6).

$$E_E = E_C.E_T.E_S.E_D \quad \textbf{(I.3-15)}$$

A cette efficacité physique vient s'ajouter une efficacité biologique dans le cas des bioaérosols. Elle rend compte de la cultivabilité des microorganismes après échantillonnage ainsi que des éventuels dommages qu'ils ont subi pendant l'aérosolisation et la capture.

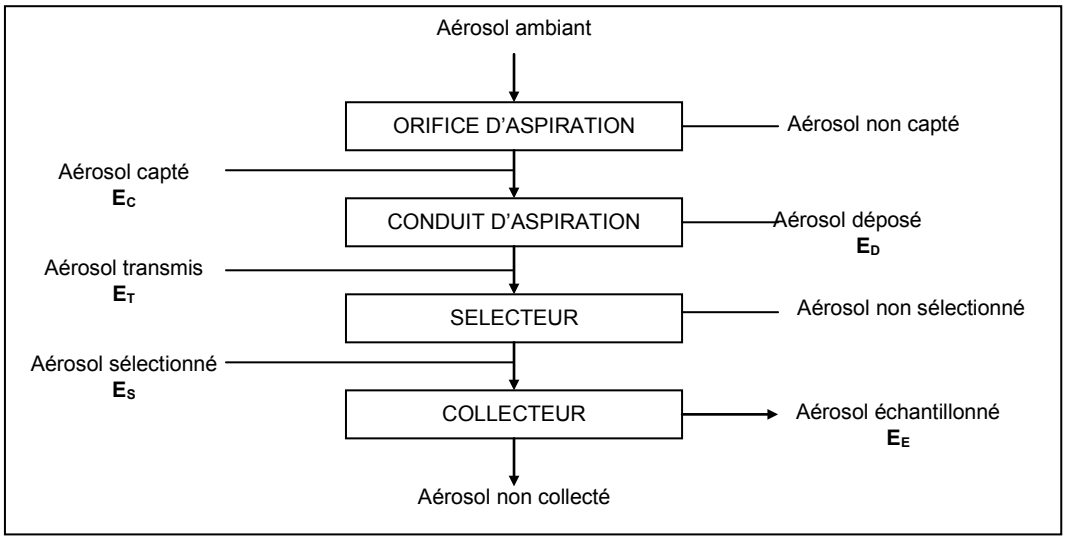



**Figure I.3-6: Dispositif de prélèvement d'un aérosol (Witschger, 1996)**

Un paramètre important représentatif de l'écoulement au voisinage d'un orifice d'aspiration est le rapport adimensionnel R, appelé encore isocinétisme est défini par :

$$R = \frac{W}{U_s} \qquad \textbf{(I.3-16)}$$

où W représente la vitesse du fluide en amont du capteur et $U_S$ la vitesse moyenne dans l'orifice de captage.
Selon ce rapport de vitesse, le prélèvement est représentatif (R=1) ou non (R≠1) (cf. figure I.3-7). Le captage est dit *isocinétique* lorsque R=1, toutes les particules sont prélevées de façon équivalente. Lorsque R<1, le captage est dit *superisocinétique* les plus petites particules sont prélevées au détriment des plus grosses. L'inverse se produit lorsque R>1, le captage est dit alors *subisocinétique*.

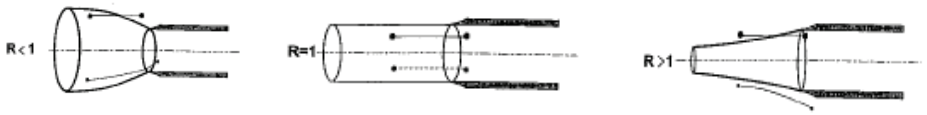



**Figure I.3-7 : Représentation schématique de l'influence du paramètre aéraulique R et de l'inertie des particules sur le processus de captage d'un aérosol (Witschger, 1996)**

Toutefois, selon la taille des particules composant l'aérosol et les conditions d'échantillonnage, le biais lié à un captage non isocinétique peut parfois être négligeable. En pratique, les aérosols sont généralement prélevés en conduit via une canne coudée, ce qui pousse à considérer l'efficacité physique de prélèvement comme la combinaison des efficacités d'aspiration et de transport à travers un coude.

Le calcul de ces efficacités, via des corrélations, permet de dimensionner des sondes de prélèvement de manière à échantillonner efficacement l'aérosol de travail et/ou à estimer l'erreur liée à un prélèvement sub/superisocinétique. Le tableau I.3-1 rassemble quelques unes d'entre elles.

| Efficacité d'aspiration (sonde horizontale à bords minces) en air calme |
|---|
| • Su et al., 2004<br>$E_a = 1 - 0{,}8(4SkR_g^{3/2}) + 0{,}08(4SkR_g^{3/2})^2 - 0{,}8(0{,}5R_g^{1/2}) - 0{,}2\left\{0{,}12R_g - 0{,}4(e^{-p} - e^{-q})\right\}$ **(I.3-17)**<br>$Sk = \frac{d_{ae}^2 \rho_D U_s}{18\mu_C \delta}$ nombre de Stokes, $R_g = \frac{d_{ae}^2 \rho_D g}{18\mu_C U_s}$, $p = 2{,}2R_g^{1,3}Sk$, $q = 752R_g^{1,7}Sk$<br>Pour $10^{-2}<Sk<10^2$ et $10^{-2}<R_g<10^{-1}$<br>• Grinshpun et al., 1993<br>$E_a = \exp\left[-\frac{4Sk^{(R_g^{0.5}+1)}}{1+2Sk}\right] + R_g \cos\varphi_g$ **(I.3-18)**<br>Pour un tube horizontal $\varphi_g = 90°, \cos\varphi_g = 0$ ; $10^{-3}<Sk<10^2$ et $10^{-3}<R_g<1$<br>• Davies, 1977<br>$E_a = \frac{1}{1+0{,}62Sk}$ **(I.3-19)**<br>Pour $0{,}2<Sk<20$ |
| Efficacité de transport à travers un coude à 90° (dépôt inertiel) |
| • Crane et Evans, 1977 (Baron et al., 2001)<br>$E_T = 1 - Sk$ **(I.3-20)**<br>$Sk = \frac{d_{ae}^2 \rho_D U_s}{18\mu_C \delta}$, nombre de Stokes où $U_s$ est la vitesse dans le conduit de transport, $Sk<1$ |

**Tableau I.3-1 : Corrélations pour le calcul des efficacités d'échantillonnage**

### I.3.3.2 Techniques spécifiques aux bioaérosols

Les dispositifs d'échantillonnage des bioaérosols doivent permettre une caractérisation de l'aérosol selon deux voies. En effet, un bioaérosol est avant tout un aérosol qui doit être caractérisé de façon physique d'une part, via des appareillages classiques tels que les compteurs optiques de particules ou les impacteurs en cascade afin d'évaluer sa concentration en nombre ou encore sa distribution granulométrique. D'autre part, son aspect biologique doit être analysé avec des techniques spécifiques, développées dans les paragraphes à venir, afin d'expliciter son état de viabilité voire d'endommagement par exemple.
Il est également impératif d'ajouter des spécificités liées à la manipulation de matériels biologiques, à savoir :

- l'application des protocoles d'utilisation du matériel dans des conditions aseptiques ;
- la prise en compte de la viabilité des agents biologiques lors du prélèvement ;
- l'utilisation de substrats de collecte ad hoc pour l'échantillonnage ;
- l'emploi de méthodes d'analyses propres à l'étude des agents biologiques.

Parmi les paramètres d'échantillonnage, le choix du volume d'air échantillonné est déterminant puisqu'il conditionne la représentativité de l'échantillon et la limite de quantification de la méthode de mesurage. Un volume trop faible peut conduire à des dénombrements inférieurs à la limite de détection de la méthode d'analyse, alors qu'un volume trop important peut aboutir à un échantillon saturé. Le cas échéant, il peut être envisagé de procéder à des échantillonnages successifs avec des volumes d'air échantillonnés différents à chaque point de prélèvement, sachant qu'une partie des échantillons sera inexploitable. Enfin, il est indispensable de réaliser des prélèvements dits de « référence »

dans une zone bien identifiée comme l'extérieur, ou une zone moins polluée et de relever les conditions environnementales (T, HR) sur le lieu d'échantillonnage.
Ainsi les appareils destinés à l'échantillonnage spécifique des aérosols microbiens font appel à trois principes fondamentaux : l'impaction, la filtration et « l'impingment » (Duquenne et al., 2005).

- **Impaction**

L'air aspiré passe à travers une série d'orifices (grilles) et les particules viennent s'impacter sur une surface cible (support de collecte) placée sur le trajet du flux d'air. Dans le cas de bioaérosols, la surface interposée est généralement un milieu de culture gélosé. Il existe différentes méthodes d'impaction qui se différencient par les mécanismes mis en jeu pour collecter les particules, le support de collecte et les caractéristiques du matériel utilisé. Selon ces critères, on peut distinguer les impacteurs à orifices circulaires, les impacteurs à fentes et les impacteurs centrifuges.
Les impacteurs mono-étage sont constitués d'un seul ensemble grille-support de collecte. Avec le débit d'air échantillonné, les caractéristiques de la grille telles que le nombre, le diamètre et la répartition des orifices, sont des éléments déterminants dans l'efficacité d'échantillonnage des appareils correspondants. La distance entre la grille et le support de collecte influence aussi l'efficacité d'échantillonnage.
Les impacteurs de plusieurs étages sont constitués de deux à huit étages unitaires superposés. Les caractéristiques des grilles évoluent d'un étage à l'autre, de sorte que la vitesse d'impaction des particules augmente et que chaque étage collecte une fraction particulaire aux propriétés aérodynamiques données.
*Exemples* : impacteur MAS 100 (Ambroise et al., 1999) et impacteur Andersen (First et al., 2007 ; Lin et al., 2003 ; Predicala et al., 2002) sur milieux gélosés, impacteur Marple sur filtres (Macher et al., 1987).

- **Filtration**

La méthode par filtration consiste à séparer les particules de l'air en le faisant traverser un média filtrant (Duquenne et al., 2005). La collecte des particules par le filtre se fait par impaction ou par interception à la surface ou dans le réseau poreux du milieu filtrant. L'efficacité de collecte est fonction du diamètre des fibres, des pores, de l'épaisseur du filtre, du diamètre des particules et de la vitesse du flux d'air.
En pratique, on utilise des filtres capillaires (types membranes en polycarbonate) ou des filtres poreux (types filtres en fibres de verre). L'analyse se fait soit directement en déposant le filtre sur un milieu de culture, soit directement après une étape de remise en suspension des microorganismes dans un liquide. Cette technique est fréquemment utilisée (Burton et al., 2005 ; Li et al., 1999 ; Predicala et al., 2002 ; Wang et al., 2001).

- **« Impingment »**

Le prélèvement par « impingment » consiste à provoquer un contact entre le flux d'air et un liquide de collecte (Duquenne et al., 2005). Le liquide de collecte est généralement de l'eau, ou une solution physiologique à laquelle peuvent être ajoutés des agents de protection contre les chocs osmotiques ou la dessiccation, des tensio-actifs… Après échantillonnage, le liquide de collecte peut être dilué et il est compatible avec un grand nombre de méthodes d'analyse (culture sur milieu gélosé, microscopie, biologie moléculaire…).
Cependant, ces prélèvement sont relativement courts (15 à 20 minutes) car les liquides sont facilement évaporables. L'équipe de Lin a testé des liquides non évaporables pour des prélèvements plus longs (4h) (Lin et al., 1999).

*Exemples :* SKC-BioSampler (Haas et al., 2005 ; Lin et al., 1999), AGI-30 Sampler (Li et al., 1999 ; Salie et al., 1995 ; Scarpino et al., 1998 ; Ulevicius et al., 1999), CIP-10 (Görner et al., 2006 ; Robine et al., 2006).

#### I.3.3.3 Transport des échantillons

Le transport des échantillons est une étape souvent négligée dans le processus de mesurage des bioaérosols (Duquenne et al., 2005). Il a pourtant une influence essentielle sur le résultat final et doit répondre à des exigences spécifiques. En particulier, les conditions de transport doivent permettre de préserver, au mieux, les propriétés des échantillons qui seront exploitées pour l'analyse ultérieure. Ces conditions sont généralement définies en fonction du paramètre à analyser et de la nature de l'échantillon et doivent être systématiquement consignées. En effet, la physiologie de la population microbienne présente dans un échantillon est susceptible d'évoluer au cours du temps en fonction des conditions de transport. Par exemple, les échantillons destinés à des analyses par culture doivent être délivrés le plus rapidement possible au laboratoire, dans les 24 heures après la collecte. La température de transport doit être suffisamment basse pour limiter le développement des microorganismes sans toutefois les détériorer. Sauf avis contraire lié à la présence de microorganismes particuliers dans l'échantillon ou à l'exigence d'une norme, un transport à l'abri de la lumière dans une enceinte réfrigérée à 4 °C peut convenir pour ce type d'échantillons.

De plus, les mesures doivent être prises afin d'assurer qu'aucun élément extérieur ne puisse contaminer les échantillons pendant leur transport. Ces mesures doivent toutefois respecter la physiologie des microorganismes échantillonnés. Par exemple, les filtres sont transportés dans leurs cassettes d'échantillonnage correctement rebouchées et positionnées de telle sorte qu'elles puissent rester fixes pendant le transport. De même, il faut s'assurer que les boîtes de Petri ne puissent pas s'ouvrir au cours du transport.

### I.3.4 ANALYSES DES ECHANTILLONS

Les méthodes d'analyse sont définies en fonction des marqueurs microbiens recherchés dans les bioaérosols. Ces marqueurs peuvent être des microorganismes ou leurs composés ayant une action potentielle, infectieuse, toxinique ou allergique sur la santé humaine. Mais ils peuvent également être des éléments n'ayant pas d'action sur la santé mais permettant d'identifier ou de quantifier des groupes microbiens spécifiques. Dans tous les cas, il est préférable que ces méthodes soient validées, compatibles avec les dispositifs d'échantillonnage employés et qu'elles permettent d'atteindre les limites de détection et de quantification souhaitées. Seules les méthodes les plus employées sont présentées (Duquenne et al., 2005).

#### I.3.4.1 Microscopie

Les méthodes microscopiques sont beaucoup employées pour compter, identifier ou caractériser les particules biologiques. Généralement on distingue la microscopie optique classique permettant d'observer les microorganismes (taille, forme, présence d'agrégats) et la microscopie à épifluorescence, qui par l'emploi de colorants spécifiques permet de déterminer la flore totale voire de différencier les bactéries mortes ou vivantes sans pour autant distinguer un état cultivable ou non.

### I.3.4.2 Mise en culture

Les bactéries et les champignons peuvent être étudiés par le biais de culture sur milieux nutritifs. Lorsqu'elles sont incubées dans des conditions favorables et lorsque les microorganismes sont cultivables, les cellules microbiennes se développent. Cette croissance est détectable soit par une colonie sur un milieu solide, soit par un trouble dans un milieu liquide. Les méthodes de culture sont utilisées à la fois pour le dénombrement et l'identification des microorganismes. Une attention particulière doit être portée sur le choix des milieux de culture et sur les conditions d'incubation, notamment la température, qui sélectionnent les microorganismes susceptibles de se développer.
La méthode de culture sur milieu gélosé est très employée dans l'étude des bioaérosols, particulièrement lorsque l'échantillonnage est effectué par impaction directe de l'air sur le milieu (Ambroise et al., 1999 ; Duquenne et al., 2005). Bien qu'incontournable, elle présente quelques limites. Premièrement, les résultats ne sont disponibles qu'au terme de la période d'incubation (parfois plusieurs jours). Ensuite, seules les cellules cultivables sont dénombrées et la fraction non cultivable de la population microbienne présente dans l'aérosol, généralement stressée ou endommagée, n'est pas prise en compte. Enfin, une seule colonie peut être observable, alors que plusieurs cellules ont été déposées au même endroit sur la gélose lors de l'échantillonnage. C'est particulièrement le cas pour les boîtes de Petri utilisées pour l'échantillonnage par impaction. Pour celles-ci, des méthodes de correction mathématique existent.

### I.3.4.3 Autres méthodes

L'étude des bioaérosols peut être également envisagée par le biais d'autres méthodes en vue de détecter des molécules entrant dans la composition ou le métabolisme cellulaire (enzymes, métabolites…). Ainsi, la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG-SM) est une méthode permettant l'analyse de certains constituants de l'enveloppe des cellules et des composés organiques volatils microbiens. De même, la chromatographie liquide à haute performance est une des nombreuses méthodes qui permettent de quantifier les mycotoxines. La méthode de Lysat d'Amébocytes de Limule (LAL) par spectrophotométrie est utilisée pour doser les endotoxines et les β-D-glucanes. Des méthodes d'immunologie peuvent être utilisées pour la détection d'anticorps spécifiques d'allergènes d'animaux et de champignons. Enfin, les méthodes de biologie moléculaire comme la PCR (Polymerase Chain Reaction) quantitative sont présentées comme des méthodes rapides, très sensibles et très spécifiques se développant très fortement à l'heure actuelle.

## I.3.5 OPTIMISATION DE LA DEGRADATION PHOTOCATALYTIQUE DE BIOAEROSOLS

Comme nous l'avons largement mis en évidence dans l'étude bibliographique consacrée à la photocatalyse, il est essentiel d'assurer un contact optimal entre les microorganismes et le dioxyde de titane. En phase aéroportée, la solution technologique préconisée consiste à coupler la photocatalyse à un dispositif de filtration. Ce paragraphe a pour intention de présenter la théorie relative à la filtration des aérosols dans le but d'adapter le support photocatalytique.

Généralement, les filtres utilisés sont des filtres à fibres. Ils sont constitués d'un assemblage de fibres naturelles, synthétiques ou métalliques. Ces media filtrants peuvent subir différents

traitements (thermiques ou mécaniques) pour leur donner les propriétés recherchées (Bémer et al., 2006).
Un filtre est caractérisé par sa perte de charge et son efficacité initiale (E). Si les débits en amont et en aval du filtre sont égaux, l'efficacité (E) est donnée par la relation I.3-21.

$$E = 1 - \frac{C_{aval}}{C_{amont}} \qquad \textbf{(I.3-21)}$$

L'efficacité qui est définie pour un diamètre de particule est indépendante de l'unité de concentration (en nombre ou en masse). Elle est dite fractionnelle.

L'efficacité initiale est déterminée expérimentalement. Il est cependant possible sous certaines conditions de la calculer. Ainsi pour un filtre homogène dans sa structure et sa composition, l'efficacité d'un filtre à fibres est déterminée par l'équation I.3-22 (Bémer et al., 2006 ; Callé, 2000).

$$E = 1 - \exp\left( -4\eta \frac{\alpha}{1-\alpha} \frac{Z}{\pi d_f} \right) \qquad \textbf{(I.3-22)}$$

Pour des filtres d'efficacité élevée, on parle généralement de perméance P (P=1-E).
L'efficacité unitaire de collection d'une fibre est fonction de différents mécanismes physiques de collecte de particules solides (Callé, 2000 ; Hinds, 1999).

- **diffusion Brownienne** (pour les très petites particules dp < 0,5 µm)

Les petites particules soumises au mouvement Brownien sont déviées des lignes de courant et peuvent être collectées par les fibres (cf. figure I.3-8). Ce mécanisme et son efficacité sont caractérisés par l'importance relative du mouvement diffusionnel comparé à celui de convection de l'air à travers le filtre. Le nombre adimensionnel de Péclet intervient donc dans l'expression du mécanisme de capture par diffusion Brownienne (cf. équation I.3-23). Cette relation est basée sur des mesures expérimentales et le coefficient « 2 » est déterminé empiriquement par Kirsch and Fuchs (1968) (Hinds, 1999).

$$\eta_D = 2Pe^{-2/3} \qquad \textbf{(I.3-23)}$$

Avec $Pe = \frac{d_f U_f}{D}$, nombre de Péclet

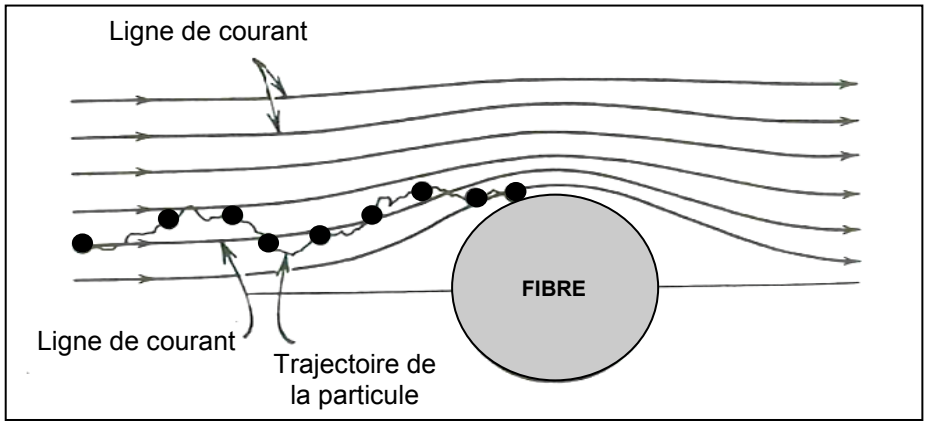



**Figure I.3-8 : Collection des particules par diffusion Brownienne (Callé, 2000)**

- **interception** (pour les particules de taille intermédiaire dp > 0,5 µm)

Ce mécanisme intervient lorsque la distance qui sépare une particule d'une fibre est inférieure à son rayon. (cf. figure I.3-9). En régime de Stokes, le tracé des lignes de courant est

indépendant de la vitesse. Le mécanisme de collecte par interception doit donc être indépendant de la vitesse. Il ne dépend que d'un paramètre adimensionnel $R_d$ défini comme le rapport du diamètre des particules sur le diamètre des fibres.
L'efficacité unitaire de collection par interception est donnée par l'équation I.3-24 établie par Lee et Ramamurthi en 1993 (Callé, 2000 ; Hinds, 1999).

$$\eta_R = \frac{(1-\alpha){R_d}^2}{Ku(1+R_d)} \qquad \textbf{(I.3-24)}$$

Avec $R_d = \frac{d_p}{d_f}$ et $Ku$ : nombre de Kuwabara $Ku = -\frac{\ln\alpha}{2} - \frac{3}{4} + \alpha - \frac{\alpha^2}{4}$ ; $0{,}005<\alpha<0{,}25$.

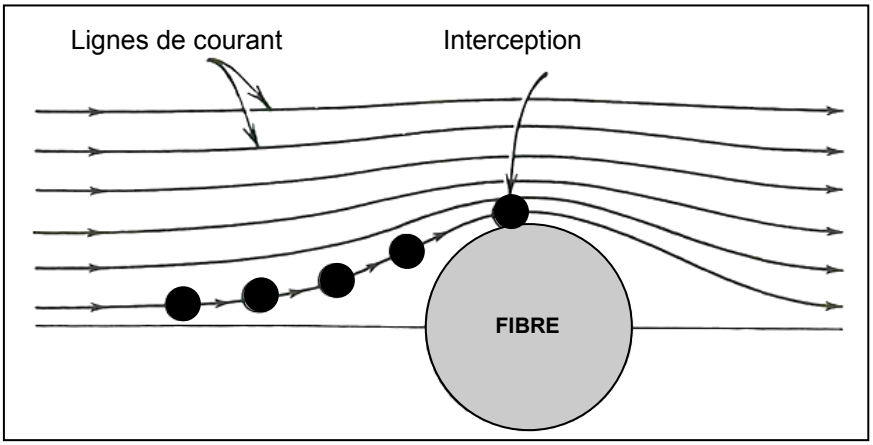



**Figure I.3-9 : Collecte des particules par interception (Callé, 2000)**

- **impaction inertielle** (pour les particules de grosse taille dp > 1 µm)

L'impaction inertielle est due à la déviation d'une particule d'une ligne de courant sous l'action de son inertie (cf. figure I.3-10).
L'efficacité unitaire de collecte par impaction inertielle s'exprime par la relation I.3-25 établie par Yeh and Liu en 1974 (Hinds, 1999).

$$\eta_I = \frac{J(Sk)}{2Ku^2} \qquad \textbf{(I.3-25)}$$

Avec $Sk = \frac{\rho_D {d_p}^2 U_f C_c}{18\mu_C d_f}$ $J = (29{,}6 - 28\alpha^{0{,}62}){R_d}^2 - 27{,}5{R_d}^{2{,}8}$

pour $0{,}01<R_d<0{,}4$ $0{,}0035<\alpha<0{,}111$; $J = 2{,}0$ pour $R_d> 0{,}4$

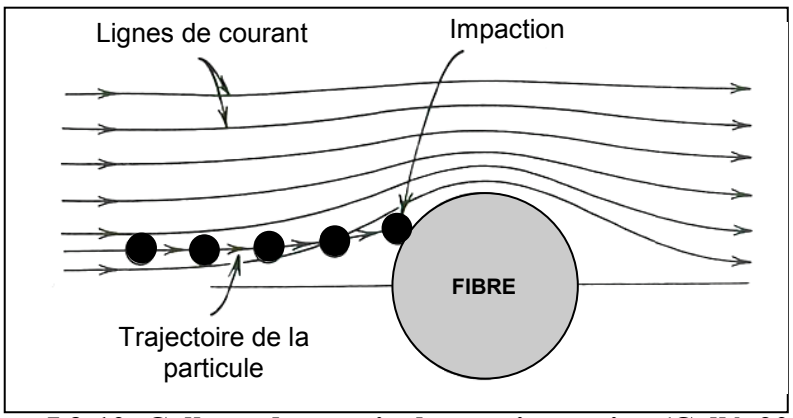



**Figure I.3-10: Collecte des particules par impaction (Callé, 2000)**

- **gravitation** (pour les très grosses particules dp >> 10 µm)

La collection par gravitation a lieu pour des particules très grosses. L'efficacité unitaire de collecte est fonction du rapport de la vitesse de sédimentation sur la vitesse de filtration (équation I.3-26) (Hinds, 1999).

$$\eta_G \approx G(1+R_d) \qquad \textbf{(I.3-26)}$$

Avec $G = \dfrac{\rho_D {d_p}^2 C_c g}{18 \mu_C U_f}$

- **mécanismes électrostatiques** (pour toutes les particules)

Les forces électrostatiques peuvent modifier les trajectoires des particules, en changeant les phénomènes d'adhérence et de rebond. Le résultat de l'action des forces électrostatiques est qu'une particule passant au voisinage de la fibre est déviée de sa trajectoire et peut venir s'y fixer. L'efficacité unitaire de collecte par l'attraction électrostatique, établie à partir de mesures expérimentales par Brown en 1993 (Hinds, 1999) est donnée par la relation I.3-27 :

$$\eta_q = 1{,}5\left[\frac{(\varepsilon f-1)}{(\varepsilon f+1)}\frac{q^2}{12\pi^2 \mu_C U_f \mathrm{E}_0 d_p {d_f}^2}\right] \qquad \textbf{(I.3-27)}$$

Ainsi, l'efficacité globale de filtration est définie par la somme des efficacités unitaires détaillées précédemment.

$$\eta_T \approx \eta_D + \eta_R + \eta_I + \eta_G + \eta_q \quad \textbf{(I.3-28)}$$

Cette expression tend à surestimer l'efficacité totale car certains phénomènes en compétition peuvent être comptabilisés deux fois. Si un mécanisme prédomine alors l'efficacité totale dépend de ce mécanisme.

Concernant les bactéries, les mécanismes généralement considérés sont ceux d'impaction inertielle et d'interception. Comme ces particules présentent des coefficients de diffusion faibles ($10^{-11}$ $m^2.s^{-1}$), le mécanisme de diffusion brownienne peut être négligé (Yu et al., 2008).

## I.4 CONCLUSION ET DEMARCHE ENTREPRISE

Cette revue de la littérature met en évidence l'étendue et la complexité du sujet. Les connaissances requises pour réaliser ce travail font appel à de nombreuses disciplines (microbiologie, physique des aérosols, conception de réacteur, chimie) qui rendent la mise en œuvre des expériences et la compréhension des processus mis en jeu délicates.

En effet, la dégradation photocatalytique d'un bioaérosol se décompose en plusieurs étapes :

- la génération du bioaérosol (stable, homogène et reproductible) ;
- son acheminement vers un réacteur photocatalytique adapté ;
- sa collecte sur un support actif, avant que les processus ne soient initiés ;
- sa dégradation à proprement parler, suivant des mécanismes encore mal connus à l'heure actuelle : inactivation, transformation en espèces intermédiaires, libération de produits métaboliques, minéralisation progressive…

Avoir une vision globale des processus mis en jeu semblait donc difficile. C'est pourquoi nous avons choisi de mener deux approches en parallèle pour découpler les phénomènes et apporter des éléments de réponse quant à l'action bactéricide de la photocatalyse.

La première approche, statique ou batch (pour employer le vocabulaire courant du génie des procédés), permet de ne s'intéresser qu'au processus photocatalytique en lui-même en faisant abstraction des étapes de génération et de collecte du bioaérosol sur un support photocatalytique. Ce mode de réflexion a été couramment entrepris dans la littérature (Caballero et al., 2009 ; Kim et al., 2009 ; Pal et al., 2007) pour l'étude de l'inactivation photocatalytique de différentes bactéries, même si la plupart des travaux a été menée sur *E.coli*, dont la facilité de mise en culture et la bonne connaissance de sa structure en font un sujet de choix. Ce coliforme a donc été retenu comme modèle bactérien pour nos essais, d'autant plus que cette bactérie, Gram –, peut relarguer des endotoxines, à l'origine de problèmes sanitaires, lorsqu'elle est soumise à un stress oxydant tel que la photocatalyse. Ces sous-produits potentiels seront donc recherchés lors des tests de dégradation.

Ainsi, l'effet bactéricide de la photocatalyse sera mesuré en termes d'impact sur la viabilité et la cultivabilité de l'agent biologique. Même si cette technique présente des inconvénients (cf. paragraphe I.3.4), elle demeure une méthode analytique de référence dans les laboratoires de microbiologie. L'utilisation de cet outil métrologique permettra ainsi la comparaison de nos travaux avec ceux publiés dans les revues scientifiques. De plus, pour étoffer ces résultats, deux milieux de culture seront employés pour les analyses afin de mettre en avant des différences, si elles existent, et de caractériser le type de dommages engendrés aux cellules (métabolique, structurel ?).

Par ailleurs, d'après la littérature, les tests d'inactivation sont habituellement réalisés sur des supports photocatalytiques élaborés en laboratoire. Certains seront ainsi conçus in situ dans le but de confronter leurs performances avec un support commercial classiquement utilisé pour l'abattement photocatalytique de composés organiques volatils.
L'utilisation d'un support commercial pour ces essais semble nouvelle et présente des avantages pour la transposition d'un procédé de laboratoire à l'échelle pilote voire industrielle. Tous ces supports, aux caractéristiques différentes en termes de mise en forme du photocatalyseur, du type de $TiO_2$ et des flux de photons absorbés seront comparés. Ce traitement des résultats permettra d'identifier les paramètres les plus influents dans l'inactivation des bactéries par photocatalyse.
Une fois ces essais d'inactivation réalisés, des expérimentations supplémentaires permettront de quantifier la minéralisation des bactéries par photocatalyse en suivant la production de dioxyde de carbone, en réacteur fermé. A notre connaissance, seule l'équipe de Jacoby (Jacoby et al., 1998 ; Wolfrum et al., 2002) a étudié ce paramètre. Nous tenterons de compléter leurs résultats par une étude paramétrique afin d'optimiser la minéralisation des bactéries.

La seconde approche, dynamique ou continue, permet, quant à elle l'étude de la dégradation photocatalytique du bioaérosol, dans son ensemble, en incluant les étapes de génération et de collecte. Etant donné le temps imparti pour ce travail de thèse, il ne s'agit pas de réaliser ces essais, mais seulement de concevoir et mettre en place un tel dispositif expérimental, à partir de l'élaboration d'un cahier des charges. Ainsi, dans ce manuscrit de thèse, la majorité des informations prérequises au déroulement de ces expérimentations dynamiques seront apportées. Le dispositif de génération de bioaérosols sera présenté et ses performances décrites en termes de niveaux de concentrations atteignables, stabilité et reproductibilité du bioaérosol expérimental. Une présentation analogue sera réalisée pour le réacteur photocatalytique continu, dont la validation avec un polluant test sera développée.

Les conclusions des essais réalisés par une approche batch seront ainsi de solides bases au développement des essais continus. En effet, une fois le bioaérosol généré et collecté sur le support photocatalytique, le processus réactionnel peut s'initier dans des conditions similaires aux essais batch. Ces tests préliminaires permettront également de choisir le support photocatalytique le plus adapté en tenant compte des contraintes recensées. Enfin, une réflexion quant au déroulement d'un essai type de dégradation photocatalytique d'un bioaérosol sera proposée.

# CHAPITRE II : MATERIELS ET METHODES

# II.1 INACTIVATION D'*E.COLI* EN BATCH

## II.1.1 PREPARATION DES BACTERIES

### II.1.1.1 Mise en culture

La suspension de cellules végétatives d'*Escherichia coli*, ou culture liquide, est préparée à partir d'une souche de collection de l'Institut Pasteur (CIP 53.126). Cette souche est d'abord isolée sur une boîte de Petri contenant le milieu Trypticase Soja Agar (TSA) (AES, Bruz, France) puis incubée 24 heures à 37°C. A partir de cette boîte, les cellules récoltées sont introduites dans une solution de Tryptone Sel stérile (TS) (AES, Bruz, France) de manière à obtenir une suspension de densité optique (DO) d'environ 0,5 à 600 nm. 2 mL de cette préparation sont ajoutés à 25 mL de bouillon lactosé (LB) (AES, Bruz, France) avant d'être incubés à 37°C pendant 24 heures sur une table d'agitation à 100 rpm. Les cellules sont ensuite récupérées après trois lavages successifs de la suspension bactérienne. Chaque lavage consiste en une centrifugation à 7000 g pendant 7 minutes à 4°C avec élimination du surnageant et reprise du culot dans de l'eau ultrapure stérile[§].

### II.1.1.2 Dénombrement et intervalle de confiance

La quantification des bactéries viables et cultivables est réalisée par la méthode d'étalement qui consiste à réaliser des dilutions en série au $10^{ème}$ de la solution à analyser et d'étaler un aliquot (100 µL) sur un milieu de culture gélosé. Ici, un milieu classiquement utilisé pour le dénombrement des bactéries a été utilisé : Tryptone Soja Agar (TSA) (AES, Bruz, France). Après incubation à 37°C pendant 24 heures, le dénombrement des colonies peut être effectué.
Le nombre N de microorganismes présents dans l'échantillon (UFC.mL$^{-1}$) est calculé en tant que moyenne pondérée en volume à partir de deux dilutions successives selon la relation (II.1-1)

$$N = \frac{\sum C}{v(n_1 + 0{,}1 n_2)\,dil} \quad \textbf{(II.1-1)}$$

Avec

| | | |
|---|---|---|
| $\sum C$ | : | somme des colonies comptées sur toutes les boîtes retenues |
| $n_1$ | : | nombre de boîtes retenues à la première dilution |
| $n_2$ | : | nombre de boîtes retenues à la deuxième dilution |
| v | : | volume de l'inoculum appliqué à chaque boîte (mL) |
| dil | : | taux de dilution correspondant à la première dilution retenue |

La validité et l'interprétation des résultats sont appuyés par le calcul d'un intervalle de confiance caractérisant la répartition statistique des microorganismes dans l'échantillon soumis au dénombrement des bactéries viables et cultivables (AFNOR, 1996).
Avec une probabilité de 95 %, l'intervalle de confiance Δ caractérisant cette dispersion microbienne est déterminé avec l'équation (II.1-2).

[§] La viabilité et la cultivabilité des bactéries dans l'eau ultrapure reste constante sur plusieurs heures, montrant que le risque de choc osmotique est négligeable ici.

$$\Delta = \left[ \frac{\sum C}{B} + \frac{1{,}92}{B} \pm \frac{1{,}96\sqrt{\sum C}}{B} \right] \frac{1}{dil} \qquad \textbf{(II.1-2)}$$

Avec : $B = V(n_1 + 0{,}1n_2)$

### II.1.1.3 Choix d'un milieu de culture restrictif

Selon le choix du milieu de culture, les dénombrements de bactéries endommagées ou stressées peuvent donner des résultats divergents. L'objectif ici, est donc de comparer les dénombrements des bactéries ayant subi une inactivation photocatalytique sur deux milieux de culture différents, un classique (non sélectif, complet tel que TSA[**]) et un restrictif (sélectif, minimal ou contenant des agents inhibiteurs).
Le milieu restrictif, selon sa composition, va permettre de détecter deux types de dommages : un *dommage structurel* ou un *dommage métabolique*.

- Une bactérie endommagée dans sa *structure* sera capable de se multiplier et de former des colonies sur un milieu gélosé complet, non sélectif, mais pas sur un milieu sélectif contenant des agents inhibiteurs (Ray et al., 1973 ; Stewart et al., 1995). Dans le cas des bactéries à Gram - (tel qu'*E.coli*), leur membrane extérieure formée de mucopeptides et de lipopolysaccharides est une barrière à certains composés tels que les tensio-actifs ou les sels biliaires. Ainsi, la capacité de cette membrane à bloquer les sels biliaires est utilisée dans le dénombrement sur un milieu contenant ces sels, comme le milieu de Mac Conkey (Stewart et al., 1995). Ceci permet donc de détecter un dommage structurel.
- Une bactérie endommagée dans son *métabolisme* sera capable de se multiplier et de former des colonies sur un milieu gélosé complet, non sélectif, mais pas sur un milieu contenant des sels inorganiques ($K_2HPO_4$, $KH_2PO_4$, $MgSO_4$ 7 $H_2O$ ou $(NH_4)_2SO_4$ par exemple), moins nutritif (Ray et al., 1973 ; Stewart et al., 1995).

Trois milieux restrictifs ont été testés au préalable des essais d'inactivation photocatalytique, l'objectif est d'en choisir un, qui conduise à des résultats équivalents au dénombrement d'une suspension bactérienne sur le milieu non sélectif complet. Quelques précisions sur ces milieux sont données ci-dessous.

- **<u>Mac Conkey</u>**

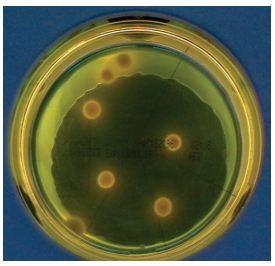


Mac Conkey, est un milieu sélectif pour l'isolement des bacilles Gram - *Salmonella* et *Shigella* ainsi que des bactéries coliformes dans les eaux, les produits alimentaires, les produits pharmaceutiques et biologiques. Les sels biliaires et le cristal violet inhibent la pousse des bactéries Gram +. L'indicateur de pH, le rouge neutre, met en évidence la dégradation du lactose. Les germes lactose - développent des colonies incolores, alors que ceux lactose + (comme *E.coli*) présentent des colonies rouge brique entourées d'un halo de sels biliaires précipités.

*(Composition pour 1 L d'eau: peptone : 20 g, lactose : 10 g, sels biliaires : 1,5 g, NaCl : 5 g, rouge neutre : 0,03 g, cristal violet : 0,001 g, agar : 13,5 g)*

[**] Composition du milieu TSA pour un litre d'eau : pastone : 15g, peptone papaïnique de soja : 5g, NaCl : 5g, agar : 15 g.

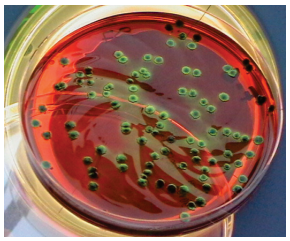
- **Drigalski**



La gélose lactosée de Drigalski est un milieu solide pour différencier les Enterobactéries lactose + de celles lactose -. La fermentation du lactose se manifeste par une production d'acide entraînant le virage au jaune du bleu de bromothymol. Le cristal violet inhibe la croissance des bactéries Gram +. La gélose Drigalski est utilisée pour isoler les bacilles Gram - dans les urines et autres prélèvements. Sa non sélectivité envers toutes les Entérobactéries en fait un milieu de choix pour la recherche d'*E.coli* entéropathogène dans les selles du nourrisson.

*(Composition pour 1 L d'eau : tryptone : 15 g, extrait de viande : 3 g, extrait de levure : 3 g, lactose : 15 g, désoxycholate de sodium : 1 g, thiosulfate de sodium : 1 g, cristal violet 0,005 g, bleu de bromothymol : 0,08g, agar : 11 g)*

- **EMB Levine**



La gélose à l'EMB (Eosin Methylen Blue) est utilisée pour isoler et différencier les Entérobactéries fermentant ou non le lactose, notamment *Escherichia coli* et *Enterobacter aerogenes*. Les colorants présents dans le milieu, éosine Y (jaunâtre) et bleu de méthylène, inhibent la croissance des bactéries Gram + sauf *Streptococcus faecalis*. Le tampon phosphate facilite la différenciation entre *Escherichia coli* et *Enterobacter aerogenes* en minimisant l'acidification produite par la lente fermentation du lactose des *Enterobacter.*

*(Composition pour 1 L d'eau : peptone pancréatique de gélatine 10 g, lactose 10 g, phosphate dipotassique 2 g, bleu de méthylène 0,065g, Eosine Y 0,40 g, agar 15 g)*

- **Test pour le choix du milieu de culture restrictif**

Une suspension bactérienne est préparée conformément au mode opératoire mentionné précédemment. Le dénombrement est ensuite réalisé sur les quatre milieux de culture et les résultats sont présentés sur la figure II.1-1. En comparaison avec le milieu non sélectif, complet, TSA, les résultats sur EMB sont identiques, les intervalles de confiance à 95 % se recoupant. A l'opposé il existe des disparités avec les deux autres milieux de culture et surtout avec Mac Conkey qui donne un écart de presque 2 log (1,8). Ces différences plus ou moins importantes sont considérés comme inacceptables pour les essais à réaliser. Le choix du milieu restrictif s'est donc porté sur EMB, milieu qui est parfois utilisé pour identifier une inactivation photocatalytique sur *E.coli* (Pal et al., 2008).

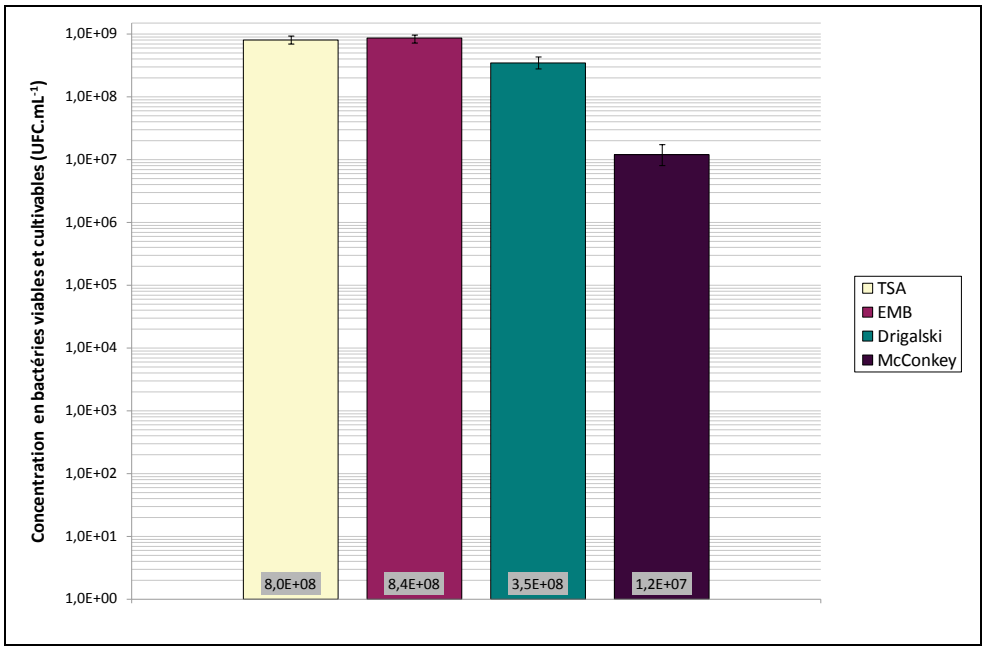



**Figure II.1-1 : Comparaison des dénombrements d'une culture liquide sur différents milieux de culture**

## II.1.2 SUPPORTS PHOTOCATALYTIQUES

Au total, cinq types de supports photocatalytiques ont été testés pour les essais d'inactivation d'*E.coli* par photocatalyse. Certains sont disponibles dans le commerce, d'autres sont conçus au laboratoire. La mise en forme du $TiO_2$ a été choisie comme paramètre à modifier pour les différents supports puisque la revue de la littérature a mis en évidence que le contact entre le catalyseur et l'agent biologique est la clé de voûte d'une inactivation efficace.
Ainsi deux mises en forme sont globalement possibles. Classiquement, et pour des raisons pratiques indéniables, le $TiO_2$ est immobilisé sur un support sur lequel les bactéries sont ensuite déposées. La société Ahlstrom commercialise un produit de ce type, fréquemment utilisé par la communauté scientifique (Barka et al., 2008 ; Thu et al., 2005). Ce support évite la manipulation de dioxyde de titane sous forme nanométrique ce qui le rend très attractif pour une application industrielle future potentielle. Toutefois, dans le cas présent, le dioxyde de titane est associé à un liant inorganique qui peut réduire, a priori, le contact direct avec les agents biologiques. C'est pourquoi des supports, type filtres en fibres de quartz QMA, ont été imprégnés de $TiO_2$ en laboratoire sans ajout de liant. Deux types de dioxyde de titane ont été employés : du P25 de Degussa, le plus employé pour les tests photocatalytiques, et du PC500 de Millenium puisque le support Ahlstrom contient ce type de $TiO_2$.
Par ailleurs une deuxième mise en forme possible pour optimiser le contact entre le $TiO_2$ et les bactéries consiste à « mélanger » l'agent biologique avec le dioxyde de titane puis à déposer cette suspension sur un support vierge. Cette configuration, qui ne possède pas de réel avenir industriel permet toutefois d'étudier l'influence du paramètre clé que nous avons choisi. Ainsi les différents supports testés sont :

- Support commercial Ahlstrom
- Filtre en fibres de quartz QMA, imprégné de $TiO_2$ P25
- Filtre en fibres de quartz QMA, imprégné de $TiO_2$ PC500

} Pour un dépôt de bactéries en suspension dans l'eau

- Filtre en fibres de quartz QMA vierge + suspension de $TiO_2$ P25
- Filtre en fibres de quartz QMA vierge + suspension de $TiO_2$ PC500

} Pour un dépôt de bactéries en suspension dans du $TiO_2$

### II.1.2.1 Support commercial Ahlstrom

Deux supports commerciaux (avec ou sans $TiO_2$) fournis par la société Ahlstrom (Pont-Evêque, France) (référence 1048 ou 1045) ont été utilisés. Il s'agit de fibres synthétiques imprégnées ou non de silice colloïdale (20 $g.m^{-2}$) et de $TiO_2$ (18 $g.m^{-2}$, PC 500 Millenium, 100% anatase, surface spécifique 375 $m^2.g^{-1}$, diamètre des particules de 5 à 10 nm) et de zéolithes (2 $g.m^{-2}$). Des échantillons de 4 $cm^2$ ont été autoclavés (121°C, 15 minutes) préalablement aux tests de dégradation.

Des observations de ces supports ont été réalisées par microscopie électronique (protocole décrit ci-après) (cf. figure II.1-2). D'après cette figure, il semble que le dioxyde de titane soit partiellement « emprisonné » dans le liant et que, par conséquent, la masse de $TiO_2$ réellement disponible pour la dégradation des bactéries soit inférieure à 18 $g.m^{-2}$. L'épaisseur du papier ainsi que la distribution granulométrique des fibres ont également été déterminées. Le diamètre moyen des fibres est de 17 µm avec une majorité des fibres comprises entre 10 et 15 µm, pour une épaisseur de papier d'environ 260 µm.

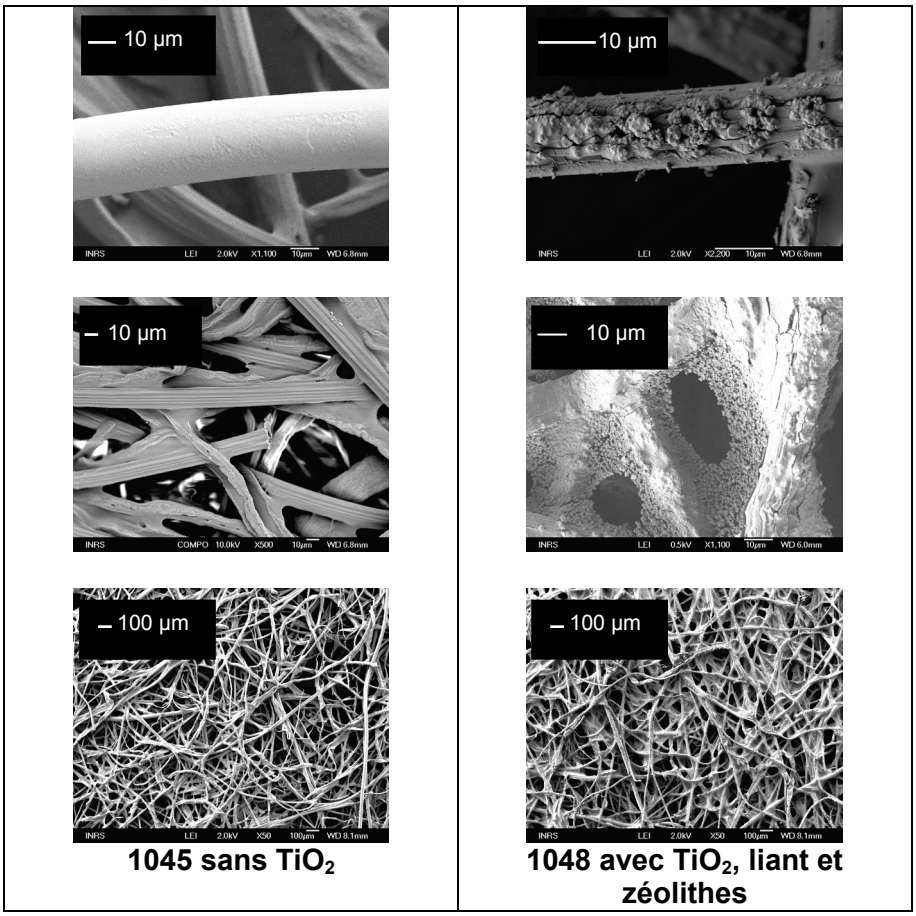



**Figure II.1-2: Observation des supports 1045 et 1048 au MEB**

### II.1.2.2 Supports non commerciaux

Des supports photocatalytiques non commerciaux, préparés au laboratoire, ont été testés en comparaison avec le support commercial d'Ahlstrom.
Le choix du support de base s'est porté vers un matériau inerte, autoclavable et résistant à de fortes températures (conditions nécessaires pour les essais de minéralisation qui seront décrits ultérieurement) et pouvant agir comme un filtre pour retenir les particules biologiques (pour les applications prochaines avec le bioaérosol). Des filtres en fibres de quartz QMA (Wathman, Kent, UK) semblaient satisfaire ces conditions, le diamètre moyen des fibres est de 1 µm avec une majorité des fibres comprise entre 0,5 et 1,2 µm, pour une épaisseur de filtre d'environ 450 µm.
Ces supports ont été enrichis en dioxyde de titane de deux façons (imprégnation ou suspension). Deux types de dioxyde de titane, de nature et de propriétés différentes, sont classiquement employés pour les applications photocatalytiques. Il s'agit du P25 de Degussa et du PC500 de Millenium dont les caractéristiques ont été mentionnées dans la revue bibliographique et sont rappelées ci-dessous. Ces deux $TiO_2$ ont été utilisés ici.

| | Degussa P25 | Millenium PC500 |
|---|---|---|
| Composition | 80 % anatase - 20 % rutile | 100 % anatase |
| Taille des particules élémentaires (nm) | 30 | 10-15 |
| Taille des agglomérats (nm) | 200-215 | 600-700 |
| Taille des pores (Å) | 104 (porosité des agglomérats) | 54 |
| Aire spécifique (BET) ($m^2.g^{-1}$) | 50 | 375 |

**Tableau I.2-1 : Caractéristiques des $TiO_2$ couramment employés (Nguyen et al., 2005)**

#### *II.1.2.2.1 Supports imprégnés de $TiO_2$*

Des filtres en fibres de quartz QMA de 25 mm de diamètre sont imprégnés de $TiO_2$, puis stérilisés (dépyrogénéisation à 250 °C pendant 2h00). Selon le $TiO_2$ mis en œuvre, le protocole est différent, puisque le $TiO_2$ PC500 sédimente beaucoup plus rapidement que le P25 (taille des agglomérats plus élevée). Les filtres sont pesés avant et après imprégnation de manière à connaître la quantité de $TiO_2$ disponible pour la réaction.

Les différentes étapes nécessaires à la réalisation de ces supports sont les suivantes :

1- Etuvage à 50 °C pendant 2h00 puis passage dans un dessiccateur pendant une nuit ;
2- Pesée des filtres à l'aide d'une balance (Genius ME 2 15 P, Sartorius Mechatronics, Palaiseau, France) ;
3- Dépôt de 3*125 µL d'une suspension de $TiO_2$ PC500 à $4g.L^{-1}$ (dans l'eau distillée) répartis uniformément sur le filtre **ou** trempage pendant 10 s dans une suspension de $TiO_2$ P25 à $4g.L^{-1}$ (dans l'eau distillée) (cf. figure II.1-3) ;
4- Etuvage à 50 °C pendant 2h00 puis passage dans un dessiccateur pendant une nuit ;
5- Pesée des filtres à l'aide d'une balance (Genius ME 2 15 P, Sartorius Mechatronics, Palaiseau, France) ;
6- Stérilisation.

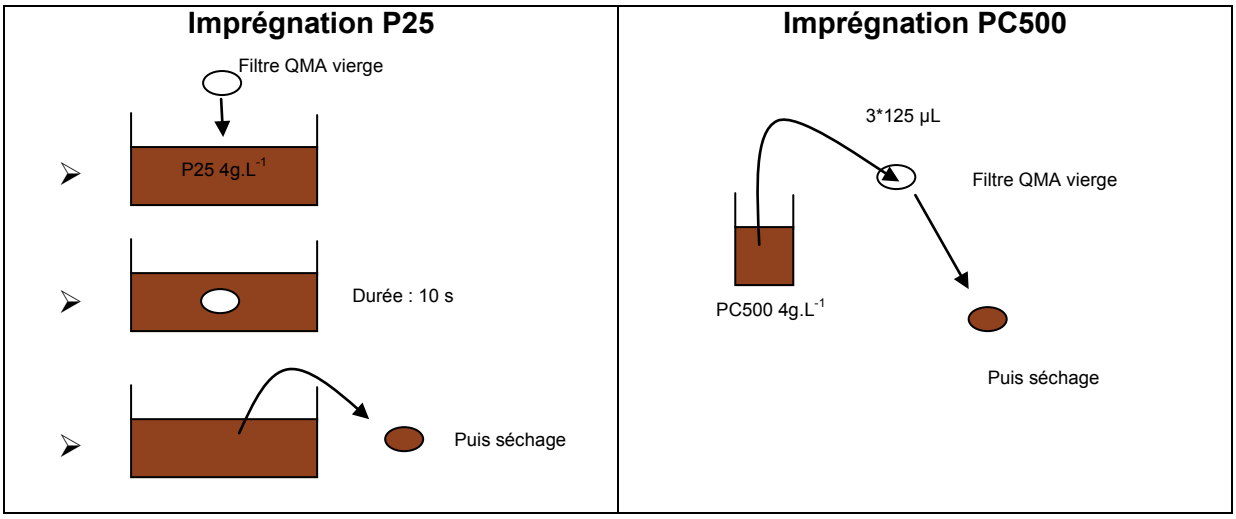



**Figure II.1-3 : Protocole d'imprégnation des supports**

Dans ces conditions, les masses de $TiO_2$ pour chacun des supports sont équivalentes :

- PC500 imprégnation : 0,92±0,1 mg ; 1,9 $g.m^{-2}$ (sur 42 filtres)
- P25 imprégnation : 1,13±0,2 mg ; 2,3 $g.m^{-2}$ (sur 48 filtres)

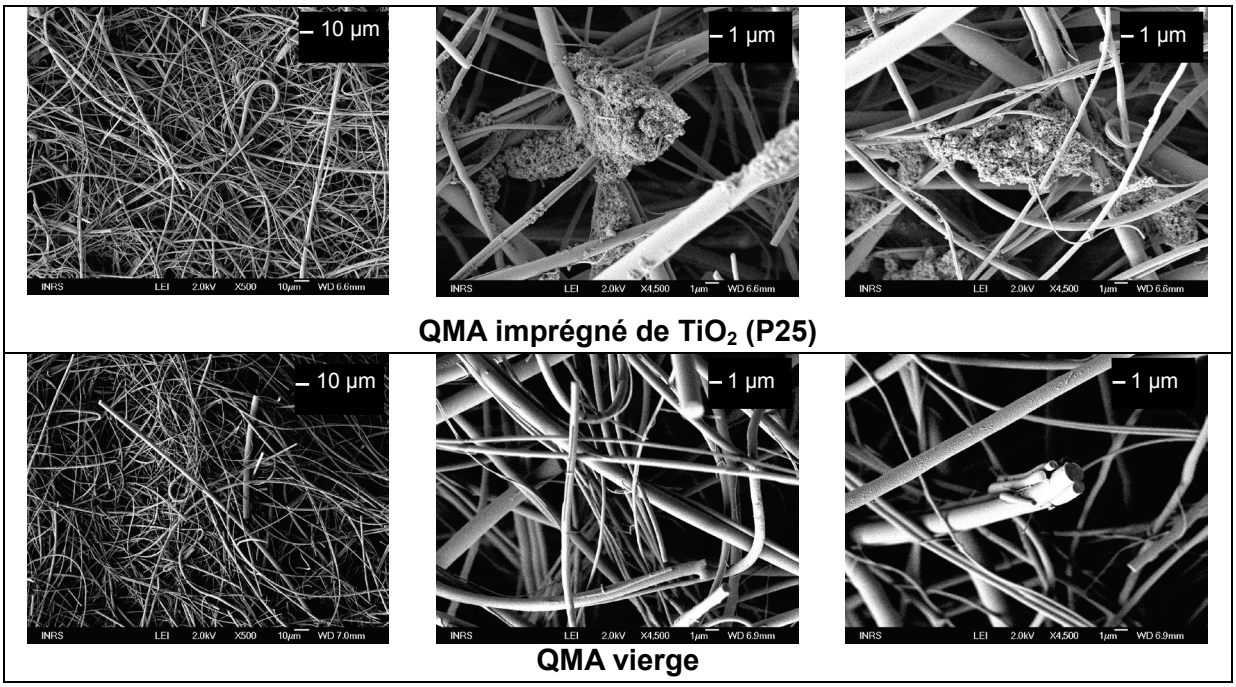



**Tableau II.1-1 : Observation des supports QMA vierge et imprégné au MEB (protocole décrit ci-après)**

### *II.1.2.2.2 Supports et suspension de $TiO_2$*

Pour cette autre configuration, les supports ne requièrent pas de préparation particulière, puisque des supports vierges sont utilisés et le $TiO_2$ est ensuite déposé en suspension avec les bactéries. Une simple stérilisation des filtres QMA vierges et de la suspension de $TiO_2$ (dans l'eau distillée) s'impose donc. Une concentration en $TiO_2$ de 1 $g.L^{-1}$, couramment employée d'après la littérature (Coleman et al., 2005 ; Rincon et al., 2003 ; Rincon et al., 2005) a été utilisée ici.

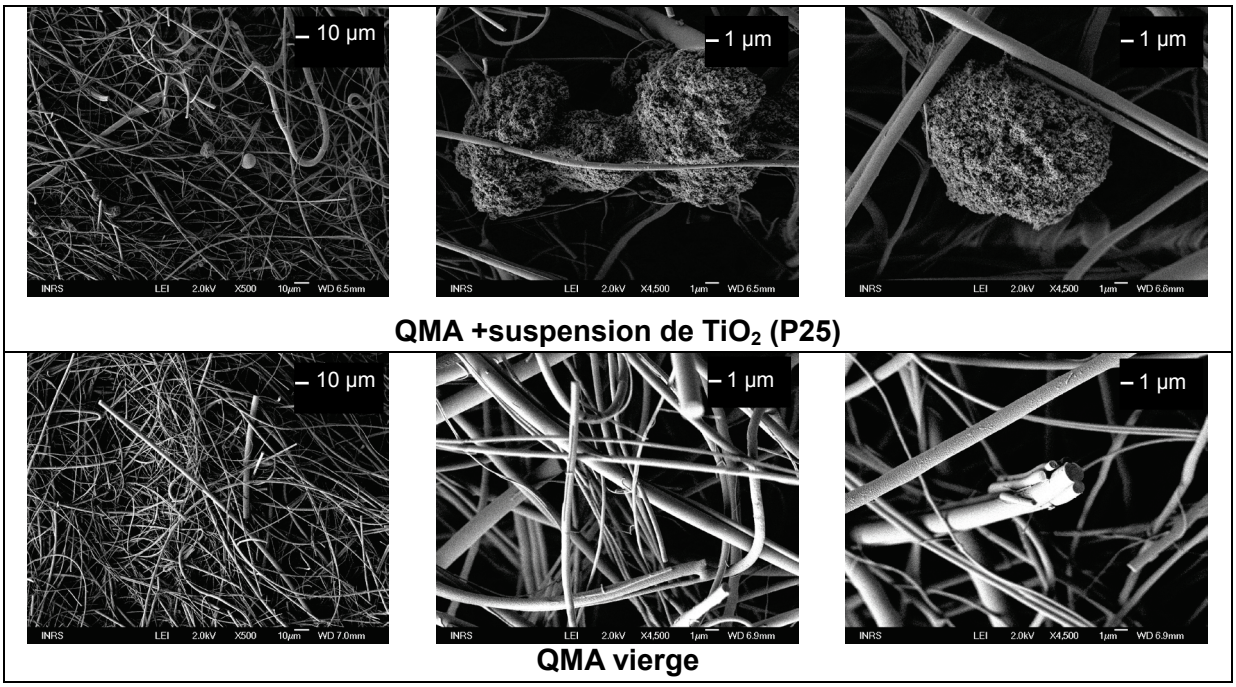



**Tableau II.1-2 : Observation des supports QMA vierge et avec ajout d'une suspension de $TiO_2$ au MEB (protocole décrit ci-après)**

### II.1.2.3 Protocole pour l'analyse microscopique des filtres

Les différents supports photocatalytiques ont été observés en microscopie électronique à balayage avec un microscope Jeol, modèle 7400-F. Un échantillon est préalablement découpé puis collé sur un plot en laiton via de la laque d'argent. L'ensemble est métallisé à l'Or-Palladium pendant 30 secondes. Les conditions d'observations sont détaillées ci-dessous.

- <u>imagerie sur les faces :</u>

| **vues globales** | **vues détaillées** |
|---|---|
| haute tension : 2 kV<br>grandissement : gx50<br>distance de travail : 8 mm<br>mode d'imagerie : LEI (lower electron image) | haute tension : 2 kV (QMA),<br>0,5 kV (Ahlstrom)<br>grandissement : gx1000<br>distance de travail : 6 mm<br>mode d'imagerie : LEI (lower electron image) |

- <u>imagerie sur les tranches</u> (détermination de l'épaisseur) :

| **supports Ahlstrom** | **supports QMA** |
|---|---|
| haute tension : 2 kV<br>grandissement : gx160<br>distance de travail : 15 mm<br>mode d'imagerie : LEI (lower electron image) | haute tension : 10 kV<br>grandissement : gx500<br>distance de travail : 6 mm<br>mode d'imagerie : BEI (backscattered electron image) -COMPO |

### II.1.3 REACTEUR PHOTOCATALYTIQUE BATCH

Le réacteur batch est composé d'un tube fermé en inox de 80 cm de long et de 20 cm de diamètre (cf. figure II.1-4).
Il est équipé d'une lampe à lumière noire (pic d'émission à 365 nm (cf. figure II.1-5), UVA) (Philips TL-D 18 W, BLB, SLV, longueur 59 cm -58 cm effectifs- diamètre 26 mm, puissance 18W) et permet de disposer six supports simultanément, selon la longueur, à une distance de 11 cm de la lampe. Afin de travailler dans des conditions stériles, il est nécessaire d'avoir recours à une procédure de nettoyage avant et après chaque expérimentation. Le réacteur batch, de par ses dimensions et son branchement électrique, n'est pas autoclavable. La solution retenue a donc été d'appliquer un spray désinfectant sur toute la surface après avoir installé le réacteur sous un poste de sécurité microbiologique dont l'air est stérile.
Le spectre d'émission de la lampe est obtenu à l'aide d'un spectroradiomètre à double monochromateur (OL 750, Optronic Laboratories, Orlando, Etats-Unis). Cet instrument est associé à une optique d'entrée de type sphère intégratrice qui permet de mesurer l'éclairement énergétique spectrique (en $W.cm^{-2}.nm^{-1}$) de la lampe, avec sa réglette d'alimentation. Pour des contraintes techniques, les mesures ont été faites à une distance d'environ 8 cm et pour des longueurs d'onde comprises entre 300 et 400 nm sachant que le pic d'émission des tubes à lumière noire se trouve à 365 nm, ce qui a pu être vérifié expérimentalement (cf. figure II.1-5).

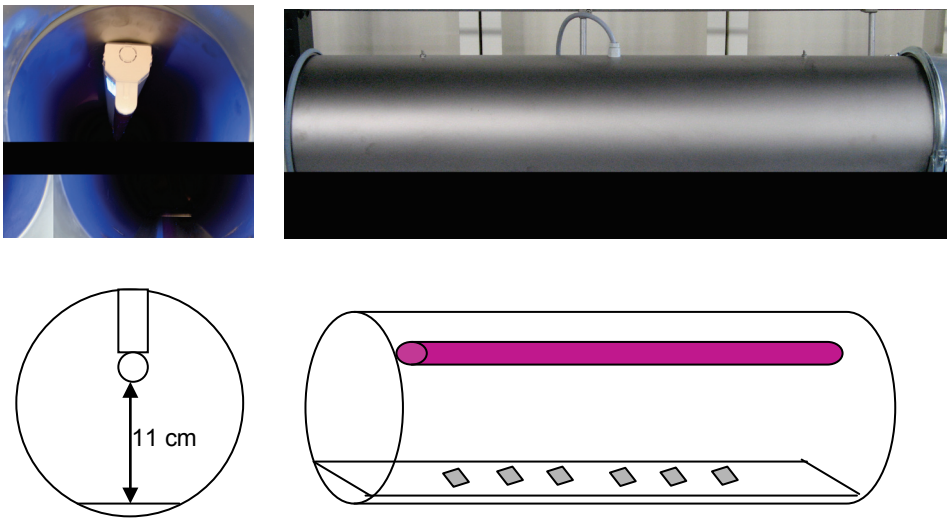



**Figure II.1-4 : Réacteur batch**

La majeure partie du spectre ainsi obtenu satisfait la condition d'activation du dioxyde de titane.
Ces mesures permettent également de calculer les puissances émise et dissipée. En effet, la puissance émise peut être calculée par intégration de la courbe obtenue et multiplication par la surface d'un cylindre de rayon 8 cm et de longueur 58 cm, et vaut 3,65 W (soit environ $1,1.10^{-5}$ mole de photon.$s^{-1}$, en considérant le pic d'émission). Précisons que dans ce calcul, le facteur d'absorption de l'air a été négligé. Connaissant la puissance d'alimentation de la lampe (18W), il est possible de déduire que la puissance dissipée s'élève à 14,35 W, soit des pourcentages d'énergie émise de 20 % et dissipée de 80 %.

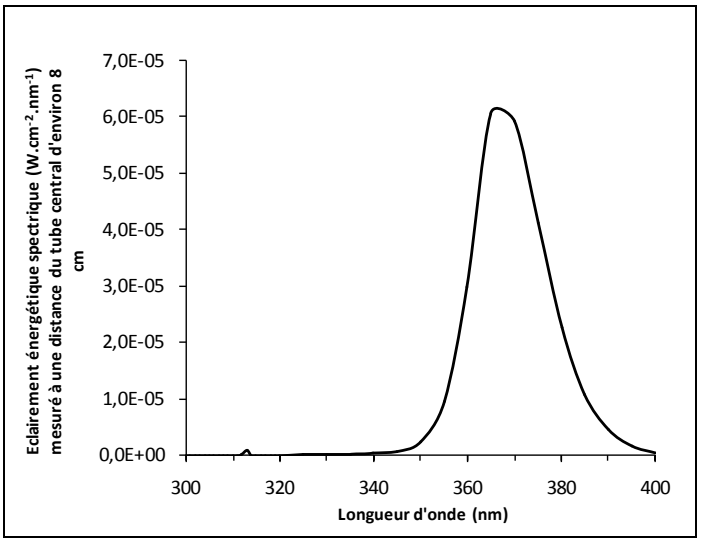



**Figure II.1-5 : Spectre d'émission de la lampe (à 8 cm)**

### II.1.4 FLUX PHOTONIQUE DISPONIBLE POUR L'INACTIVATION

L'objectif est de déterminer la quantité de photons réellement reçue par le dioxyde de titane lorsqu'il est irradié dans cette configuration batch.
Un photon, émis par la lampe, est soumis à différents processus : absorption, réflexion ou transmission selon les matériaux qu'il rencontre comme l'inox et le support photocatalytique en lui même (cf. figure II.1-6), ce qui rend la mesure expérimentale difficile.

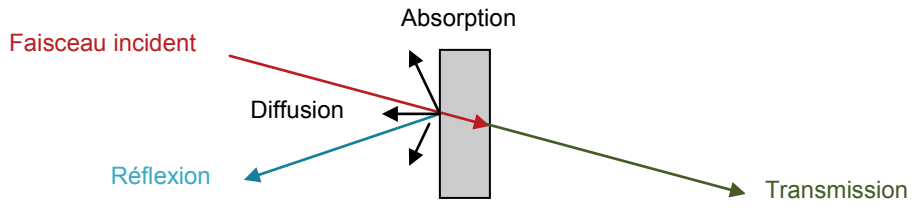



**Figure II.1-6 : Interactions de la lumière avec un solide**

Une simulation peut permettre d'estimer la quantité de photons émis par la lampe (entre 300 et 400 nm) réellement disponibles pour la réaction photocatalytique. Pour ce faire, un algorithme de lancer de rayons par la méthode de Monte Carlo, décrit en figure II.1-7, a été résolu dans Matlab©.
Certaines entrées sont nécessaires pour le programme, à savoir, la loi d'émission de la lampe ainsi que les propriétés optiques des supports photocatalytiques et de l'inox en termes d'absorption, transmission et réflexion. L'ensemble de ces données est présenté en annexe 2.
Plusieurs paramètres peuvent être modifiés à savoir, le nombre de photons lancés (i =20 000 ou 30 000), la position du catalyseur dans le réacteur de longueur L (L/4, 3L/8 et L/2) ou encore le type et la taille du support photocatalytique. A préciser que les disques QMA seront considérés comme des carrés (à surface équivalente) dans un souci de généralisation du programme.

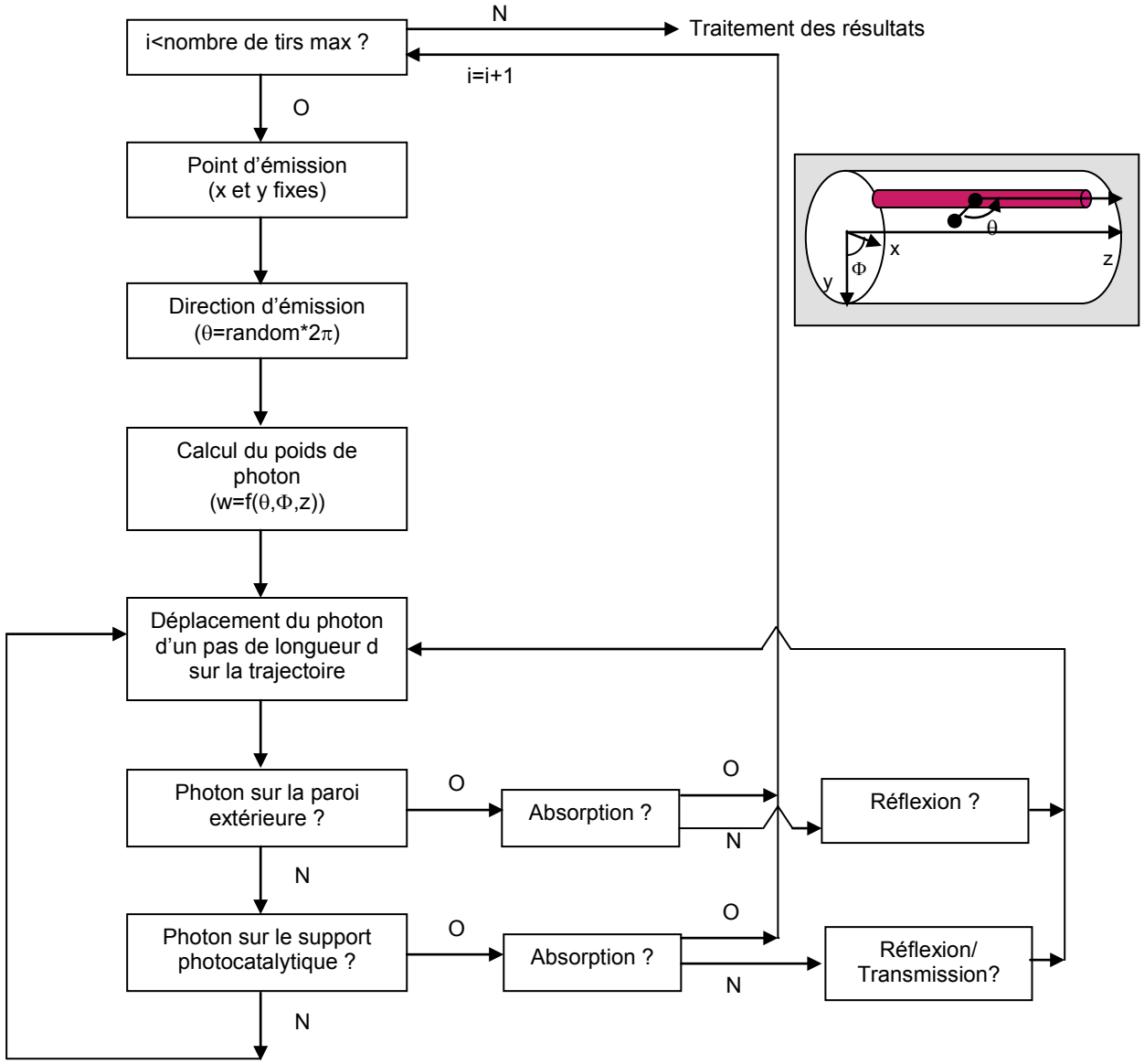



**Figure II.1-7 : Algorithme du lancer de rayons par la méthode de Monte Carlo**

### II.1.5 PROTOCOLE EXPERIMENTAL

Afin d'identifier l'effet de la photocatalyse, il est nécessaire de pouvoir découpler les effets des UVA ou du $TiO_2$ seuls s'ils existent. Pour ce faire chaque expérimentation a consisté à tester les quatre configurations suivantes :

- **Avec UV/avec $TiO_2$ :** photocatalyse
- **Avec UV/sans $TiO_2$ :** photolyse
- **Sans UV/avec $TiO_2$ :** propriété antibactérienne du $TiO_2$ non activé/ « adsorption »
- **Sans UV/sans $TiO_2$ :** témoin

Le tableau II.1-3 détaille ces différentes configurations pour les cinq supports testés.

| | Lampe ON ou OFF | |
|---|---|---|
| | **Avec UV/avec $TiO_2$** | **Avec UV/sans $TiO_2$** |
| **AHLSTROM** ($S=4cm^2$, $m_{TiO2}=7,2$ mg) | *Support 1048* + bactéries dans l'eau ultrapure | *Support 1045* + bactéries dans l'eau ultrapure |
| **IMPREGNATION PC500** ($S=4,9cm^2$, $m_{TiO2}=0,9$ mg) | *QMA imprégné de PC500* + bactéries dans l'eau ultrapure | *QMA vierge* + bactéries dans l'eau ultrapure |
| **IMPREGNATION P25** ($S=4,9cm^2$, $m_{TiO2}=1,1$ mg) | *QMA imprégné de P25* + bactéries dans l'eau ultrapure | *QMA vierge* + bactéries dans l'eau ultrapure |
| **SUSPENSION PC500** ($S=4,9cm^2$, $m_{TiO2}=0,1$ mg) | *QMA vierge* + bactéries dans une suspension de $TiO_2$ PC 500 à $1g.L^{-1}$ | *QMA vierge* + bactéries dans l'eau ultrapure |
| **SUSPENSION P25** ($S=4,9cm^2$, $m_{TiO2}=0,1$ mg) | *QMA vierge* + bactéries dans une suspension de $TiO_2$ P25 à $1g.L^{-1}$ | *QMA vierge* + bactéries dans l'eau ultrapure |

**Tableau II.1-3 : Configurations de travail pour les différents supports**

Pour les essais avec UV, l'irradiation des supports a été réalisée après stabilisation de la température de la lampe (30 minutes). Tous les tests ont été effectués sous Poste de Sécurité Microbiologique (PSM).

L'expérimentation repose sur la mise en contact d'un volume de suspension bactérienne (100 µL) avec les supports maintenus sur des lames de microscope et préalablement mouillés avec 150 µL d'eau ultrapure stérile pour éviter leur assèchement à des temps d'irradiation élevés (de l'ordre de 2h) (cf. figure II.1-8). De même, une hygrométrie élevée est assurée dans le réacteur par la disposition de boîtes de Petri remplies d'eau ultrapure stérile.
Les tests ont été menés à partir de suspension bactérienne de concentration environ égale à $1,3.10^7$ $UFC.mL^{-1}$ (dilution au $50^{ème}$ de la suspension bactérienne mère) sur des durées de 20, 40, 60 et 120 minutes.

Les supports sont ensuite lavés à l'eau ultrapure stérile (19,9 mL), puis agités afin d'extraire les bactéries et de les analyser.

Le protocole d'extraction comprend plusieurs phases :

- **Phase 1** : Agitation du support et de la lame de microscope dans 19,9 mL d'eau ultrapure stérile pendant 10 secondes à 2500 rpm.
- **Phase 2** : Enlèvement de la lame de microscope puis agitation du support seul pendant 30 secondes à 2500 rpm ; puis analyse.
- **Phase 3 (un contrôle pour chaque support)** : Enlèvement du support, déplacement dans un autre tube puis ajout de 2 mL d'eau ultrapure stérile, agitation pendant 15 secondes à 2500 rpm ; puis analyse. Cette deuxième extraction permet de vérifier que la quantité de bactéries restante dans le support est minime et que l'extraction est efficace.

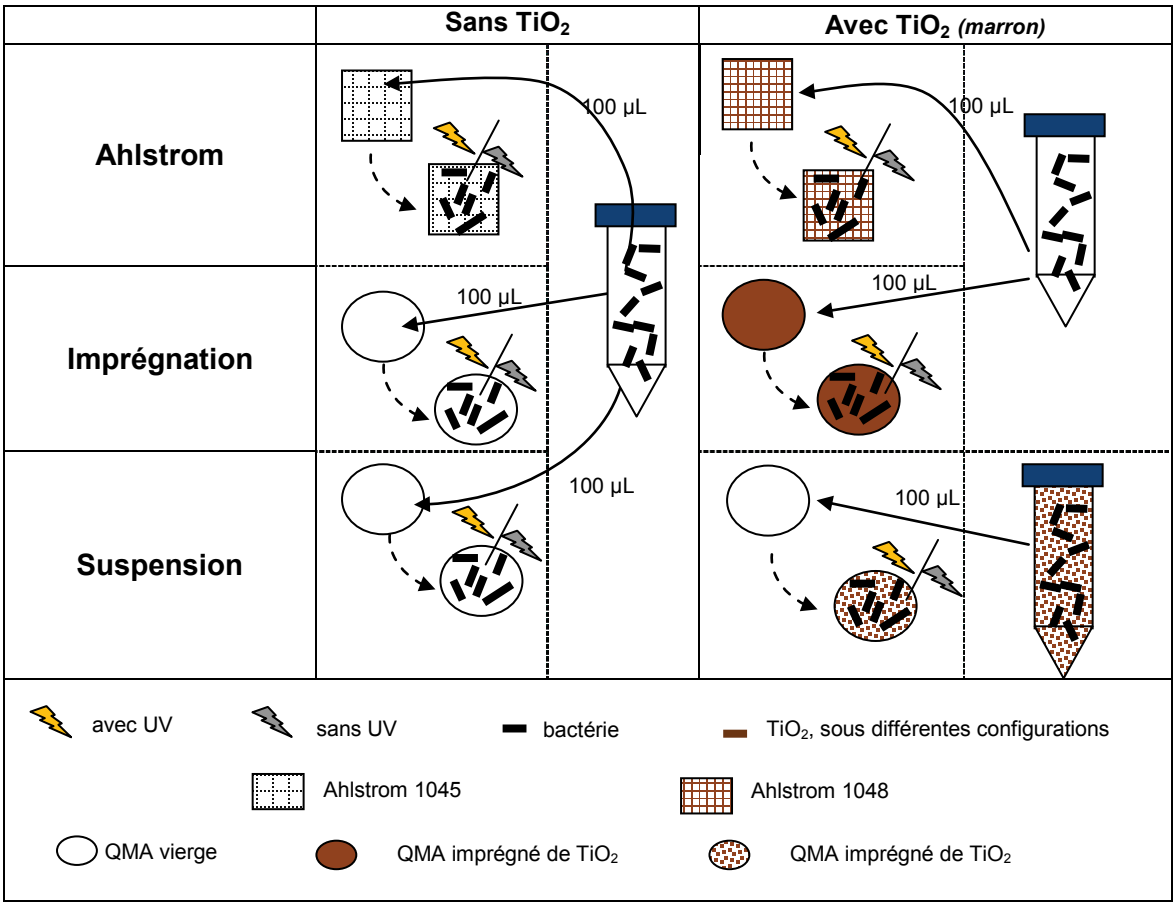



**Figure II.1-8 : Protocole opératoire pour les essais d'inactivation batch**

La quantification des bactéries viables et cultivables est réalisée par la méthode d'étalement qui a été mentionnée précédemment. Trois répétitions ont été réalisées pour chaque configuration et les résultats sont encadrés par un intervalle de confiance à 95 % sur le dénombrement des bactéries viables et cultivables (3 échantillons en parallèle pour une configuration donnée). Les différentes étapes de ces essais sont rappelées en figure II.1-9.

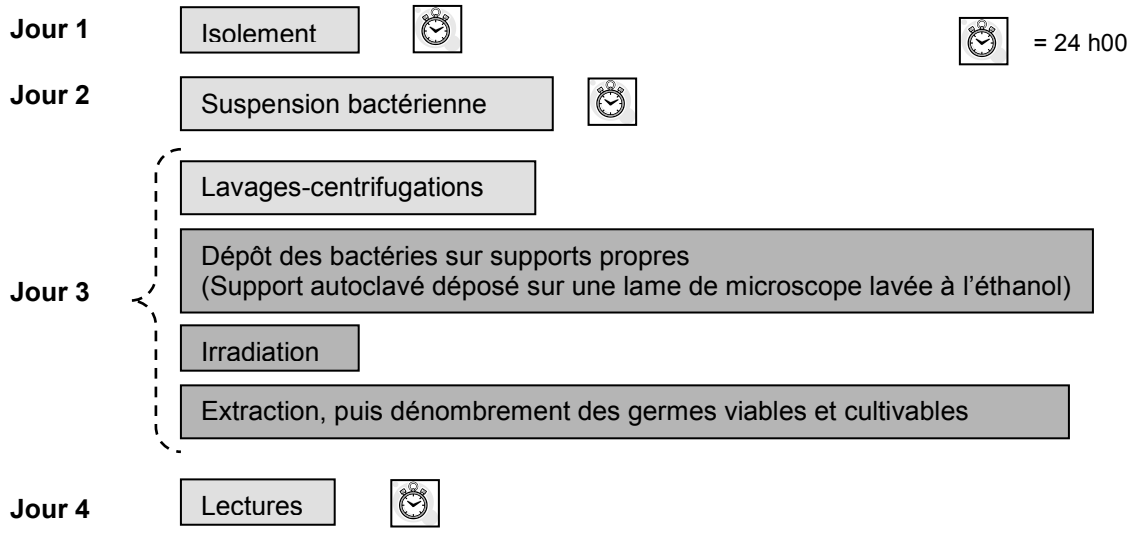



**Figure II.1-9 : Protocole opératoire des expérimentations en batch**

### II.1.6 EFFICACITE D'INACTIVATION ET CINETIQUE

En considérant que l'extraction est optimale, l'efficacité d'inactivation, E, est définie par :

$$E = \frac{C_{culture\ liquide} - C_{avec\ UV\ /\ avec\ TiO_2}}{C_{culture\ liquide}} \qquad \textbf{(II.1-3)}$$

Sayilkan et al. (2009) ont proposé une échelle d'efficacité pour mesurer l'effet de la photocatalyse. Ils considèrent qu'entre 0 et 20 % l'effet est nul, entre 20 et 50 % l'effet est faible, entre 50 et 70 % l'effet est notoire et au-delà l'effet est puissant. Cette classification a été adoptée pour nos essais.

Par ailleurs, les cinétiques de désinfection sont le plus souvent représentées par des modèles empiriques qui ont été mentionnés dans le premier chapitre relatif à l'état de l'art. Parmi eux, le modèle de Chick-Watson avec retard est applicable dans le cas présent.

$$\frac{1}{m_{TiO2}}\log(\frac{C}{C_0}) = \begin{cases} 0 & si \quad t \le t_0 \\ -k''(t - t_0) & si \quad t \ge t_0 \end{cases} \qquad \textbf{(II.1-4)}$$

Avec k'' : constante cinétique d'inactivation rapportée à la masse de $TiO_2$ ( $k'' = \frac{k'}{m_{TiO2}}$ )

Ainsi par tracé de $\frac{1}{m_{TiO2}}\log(\frac{C}{C_0})$ en fonction de *t*, la pente et l'ordonnée à l'origine donnent accès à k'' et $t_0$.

Selon les supports utilisés, le temps de retard peut être nul ($t_0$ calculé à partir de la pente et de l'ordonnée à l'origine inférieur ou égal à 0). La courbe de tendance peut ainsi être retracée en considérant le modèle de Chick-Watson sans retard.

$$\frac{1}{m_{TiO2}}\log(\frac{C}{C_0}) = -k''t \qquad \textbf{(II.1-5)}$$

### II.1.7 ANALYSES COMPLEMENTAIRES

#### II.1.7.1 Analyse de la flore totale

Afin de compléter ces essais en statique, il est appréciable de déterminer l'impact de la photocatalyse sur la flore totale (bactéries viables et non viables) en plus de celui sur la flore viable et cultivable. Ceci permet d'estimer si la photocatalyse, dans nos conditions, tue complètement les bactéries ou si elle n'a qu'un effet d'inactivation.

Le dénombrement des bactéries totales est réalisé par microscopie à épifluorescence après un marquage par un colorant spécifique le DAPI (Microscope Leica DM 2500).

Le nombre total de bactéries d'un échantillon représente l'ensemble des bactéries quel que soit leur état physiologique, capable de fixer le fluorochrome au niveau de leur ADN et émettant une fluorescence bleue quand elles sont soumises à l'excitation d'une lumière UV (entre 340 et 380 nm). Le DAPI (4'-6 diamidino-2-phénylindole) est un fluorochrome qui se fixe préférentiellement sur les séquences de trois paires de bases A-T (Adénosine -Thymine) de l'ADN.

Globalement l'analyse est composée de quatre étapes : un pré-traitement des échantillons, le marquage des cellules avec le fluorochrome, le comptage des cellules marquées au microscope à épifluorescence et le calcul de la concentration en microorganismes dans l'échantillon (cf. annexe 3).
Les analyses sont effectuées à partir des solutions d'extraction sur lesquelles sont réalisés les dénombrements des germes viables et cultivables, soit les quatre configurations d'échantillon.
Certaines contiennent donc du $TiO_2$ qu'on ne peut pas séparer facilement des bactéries ni par filtration, ni par centrifugation. Or le $TiO_2$ est excité dans les mêmes longueurs d'onde que le DAPI. La question de savoir si la présence de $TiO_2$ ne provoque pas d'interférence avec le DAPI peut se poser dès lors.

### II.1.7.2 Analyse des endotoxines

Les endotoxines sont des lipopolysaccharides (LPS) présents dans la membrane externe des bactéries à Gram négatif. Ce sont des molécules complexes, de poids moléculaire élevé (2000 à 20000 daltons), constitués à la fois d'une partie polysaccharidique et d'une partie lipidique. Les endotoxines peuvent être libérées lors de la croissance et de la lyse cellulaire. Ces composés ont un impact sur la santé humaine : syndromes respiratoires, maux de tête, fièvres. Il n'existe pas, aujourd'hui, de valeur limite d'exposition à court terme (VLCT) ni de valeur limite d'exposition professionnelle (VLEP) pour les endotoxines en milieux professionnels. Toutefois la valeur de 200 $UE.m^{-3}$[††] (Unité d'Endotoxines) est adoptée aux Pays Bas et est régulièrement évoquée dans la littérature.
Le dosage des endotoxines dans les échantillons est effectué avec la méthode cinétique et chromogénique au « Lysat d'Amébocyte de Limule » (LAL). Il s'agit d'une réaction enzymatique réalisée in vitro avec un réactif naturel extrait de la limule ou crabe en fer à cheval qui permet de doser les endotoxines libres et cellulaires sans faire de distinction (cf. annexe 3).

[††] 1 UE=1 ng

# II.2 MINERALISATION DES BACTERIES PAR PHOTOCATALYSE

## II.2.1 DISPOSITIF EXPERIMENTAL

La minéralisation d'*E.coli* par photocatalyse a été menée dans un réacteur spécifique fermé, de faible volume pendant 72 h, par suivi de la production de dioxyde de carbone.
Le réacteur (cf. figure II.2-1) est composé d'un cylindre en inox d'environ 290 mL fermé par un couvercle en pyrex. Des vannes sont placées sur les deux piquages latéraux permettant ainsi de purger le réacteur en $CO_2$ et d'assurer les différents prélèvements, puis de le fermer de façon étanche. Les supports photocatalytiques sont déposés dans une boite de Petri en verre, initialement insérée dans le réacteur.
Les dispositifs sont préalablement désinfectés à l'éthanol, l'emploi d'un spray désinfectant étant proscrit puisque les composants (ammoniums quaternaires) ne sont pas suffisamment volatils et que la minéralisation de leurs résidus conduirait à une interférence dans la mesure du dioxyde de carbone.

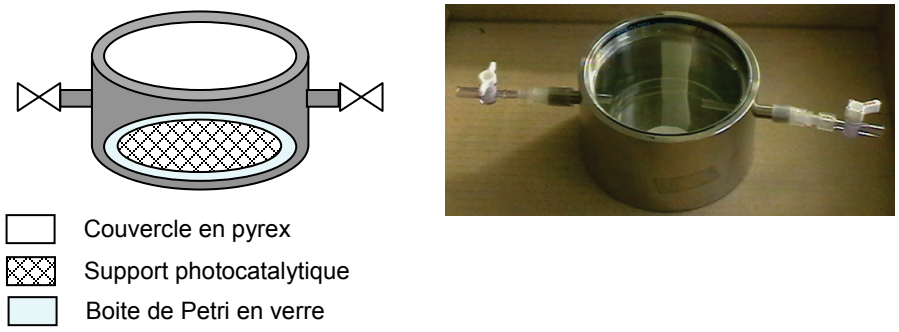



**Figure II.2-1 : Réacteur fermé dédié à la minéralisation des bactéries**

Le choix du support photocatalytique s'est porté vers des filtres QMA (37 mm) chargés de $TiO_2$ P25 (imprégné ou en suspension) puisque des tests préliminaires ont montré une moins bonne efficacité de dégradation des bactéries par le $TiO_2$ PC500. Avant tout essai, une calcination des supports photocatalytiques est nécessaire pour éliminer les résidus carbonés présents initialement sur les filtres. Elle est réalisée par chauffage à 600 °C pendant 12 h. Les filtres peuvent ensuite être imprégnés de dioxyde de titane, conformément au protocole décrit précédemment. Une imprégnation préalable à la calcination n'était pas envisageable sans modification de la forme cristalline du $TiO_2$, puisque la transition entre la forme anatase et la forme rutile débute aux environs de 600 °C (Wang et al., 1999). Par ailleurs, le support commercial Ahlstrom n'étant pas calcinable, la minéralisation avec ce papier n'a pas pu être envisagée.

Avant de placer le réacteur sous irradiation, l'air du réacteur doit être appauvri en $CO_2$ et l'hygrométrie ajustée, par passage de l'air sur un tamis moléculaire et sur une cartouche desséchante (silica gel) ou dans un barboteur d'eau stérile, conduisant ainsi au test de deux taux d'humidité. La figure II.2-2 schématise les montages expérimentaux et les conditions opératoires. Les taux résiduels de $CO_2$ après cette étape sont de l'ordre de 20 ± 10 ppm.

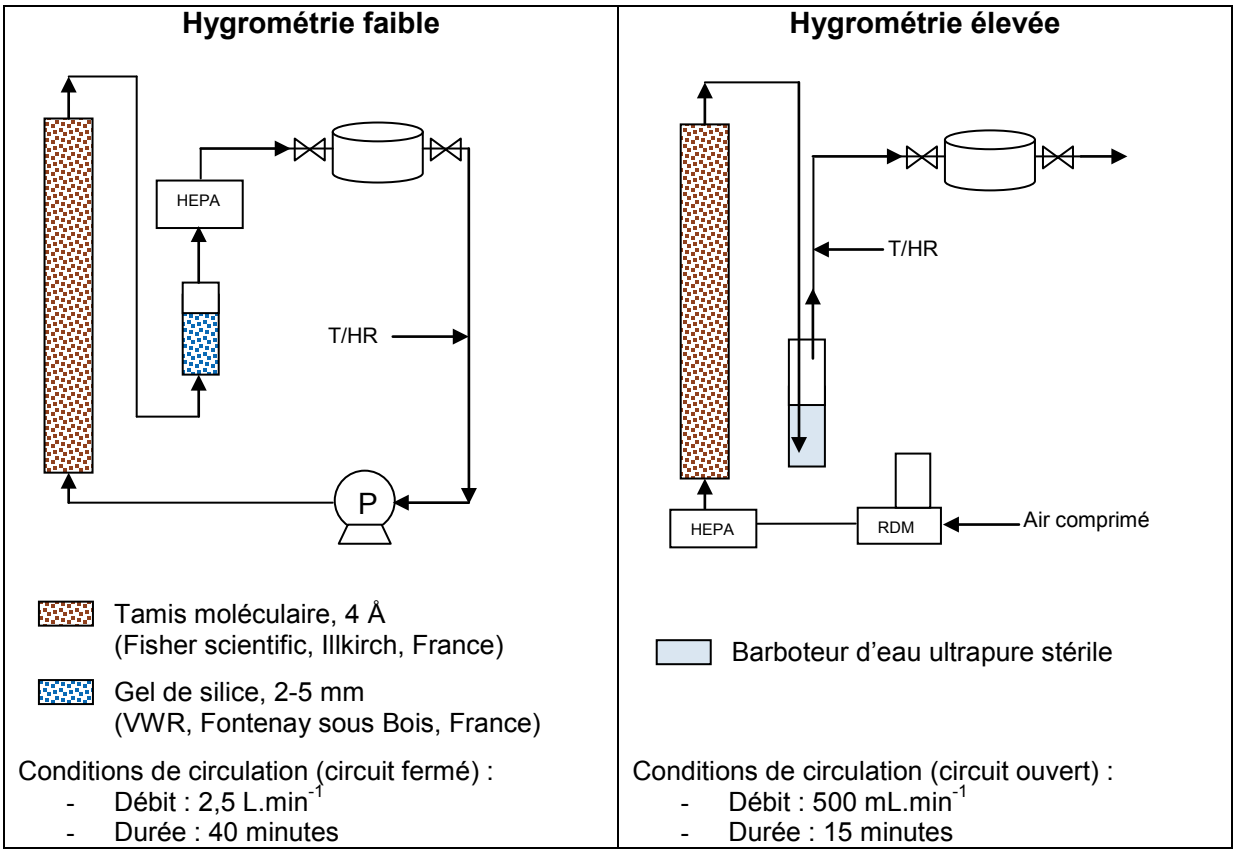



**Figure II.2-2 : Préparation des réacteurs avant les tests de minéralisation**

## II.2.2 PRELEVEMENTS ET ANALYSES

Précisons que les réacteurs sont positionnés sous PSM dans un laboratoire de microbiologie. Les analyses chimiques du $CO_2$ par chromatographie gazeuse ne sont pas effectuées en ligne. Ceci nécessite donc un volume tampon de prélèvement, suffisamment faible, étanche et qui permette de réaliser plusieurs injections manuelles successives en chromatographie pour obtenir une bonne précision sur la teneur en $CO_2$ (intervalle de confiance à 95 % calculé à partir de la moyenne et de l'écart type sur cinq valeurs). Ainsi, une seringue à gaz de 5 mL a été utilisée comme volume tampon. Elle permet de prélever 2,5 mL dans le réacteur après avoir introduit 2,5 mL d'azote exempt de dioxyde de carbone, pour maintenir une pression constante dans le réacteur fermé (cf. figure II.2-3). Après homogénéisation, le dispositif de prélèvement est déconnecté du réacteur fermé puis acheminé à proximité du chromatographe en phase gazeuse (CPG) servant à l'analyse du $CO_2$. Les injections au CPG sont réalisées manuellement par prélèvement de 200 µL dans le volume tampon, pour une injection de 100 µL au CPG (5 injections pour un point) (cf. figure II.2-3). De même, la pression dans le dispositif de prélèvement est maintenue constante par déplacement du piston de la seringue à gaz servant de volume tampon.

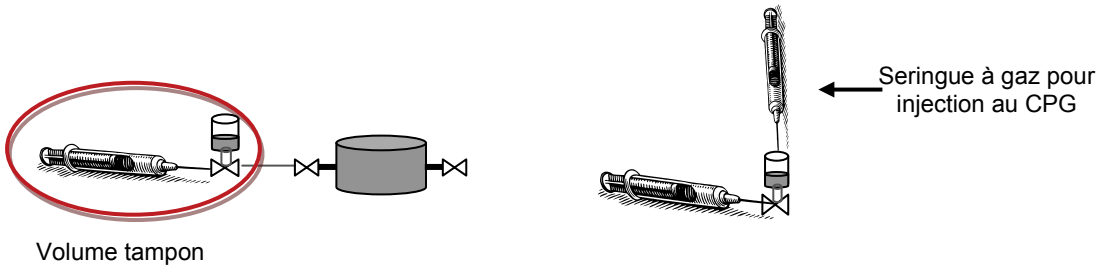



**Figure II.2-3: Volume tampon pour le prélèvement et l'injection au CPG**

Le dioxyde de carbone est analysé par chromatographie en phase gazeuse associée à un dispositif de méthanisation et un détecteur à ionisation de flamme (FID). Le principe de la méthanisation repose sur la réduction catalytique du dioxyde de carbone sur nickel[‡‡] selon la relation (II.2-1).

$$CO_2 + 2\,H_2 \leftrightarrow CH_4 + O_2 \qquad \textbf{(II.2-1)}$$

Le tableau II.2-1 regroupe les conditions analytiques pour l'analyse du $CO_2$ en CPG.

| | |
|---|---|
| Appareil | ➢ Varian CP 3800<br>➢ Détecteur FID équipé d'un méthaniseur |
| Colonne | ➢ BP1 (non polaire)<br>➢ Longueur 50 m – diamètre 0,53 mm- film 5 µm |
| Conditions analytiques | ➢ Injecteur : 220 °C<br>➢ Division ½ (50 µL)<br>➢ Four : 50 °C en isotherme<br>➢ Pression de la colonne : 8 Psi<br>➢ Détecteur : 250 °C<br>➢ Méthaniseur : 400 °C, balayage par $H_2$ à 20 $mL.min^{-1}$ |
| Paramètres d'étalonnage | ➢ Temps de rétention : 2,98 min<br>➢ Droite d'étalonnage :<br>$[CO_2]$ (ppm)=0,936*surface de pic (µV.min)-40,37<br>$R^2$=0,999 |

**Tableau II.2-1 : Conditions analytiques pour l'analyse du $CO_2$ en CPG**

## II.2.3 FLUX PHOTONIQUE DISPONIBLE POUR LA MINERALISATION

De manière analogue à la détermination du flux photonique disponible pour l'inactivation photocatalytique des bactéries, il est possible de simuler celui disponible pour la minéralisation en modifiant la surface du support et en tenant compte de la présence du réacteur fermé en inox ainsi que du couvercle en pyrex (cf. figure II.2-4). Le flux photonique disponible pour la minéralisation est calculé à partir de celui disponible pour l'inactivation. Ces changements sont précisés en annexe 2.
Les simulations sont réalisées pour les supports QMA (37 mm) chargés en P25 (suspension ou imprégnation), pour deux quantités de photons lancés (20 000 et 30 000) et pour une position de catalyseur (L/2).

[‡‡] Dépôt de Ni sous forme de nitrate de nickel sur un lit de Chromosorb G.

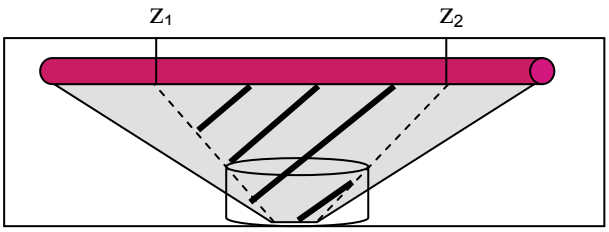



**Figure II.2-4 : Irradiation du catalyseur pendant la minéralisation**

## II.2.4 PROTOCOLE EXPERIMENTAL

Plusieurs étapes sont nécessaires à la mise en place d'un essai de minéralisation de bactéries par photocatalyse.

- **Etape 1** : Préparation du support photocatalytique :
  - Dépôt de 500 µL de suspension bactérienne de concentration connue et variable selon les besoins
  - Séchage du filtre sur plaque chauffante
  - Mise en place du filtre dans le réacteur
  - Fermeture du réacteur
- **Etape 2 :** Préparation du réacteur
  - Elimination du $CO_2$ résiduel et ajustement de l'humidité comme indiqué sur la figure II.2-2
  - Fermeture des vannes
- **Etape 3** : Analyse du $CO_2$ présent dans le réacteur
  - t=0 : après le passage sur tamis moléculaire
  - Irradiation du réacteur
  - Puis prélèvement au cours du temps t=5 h, 24 h, 29 h, 48 h, 53 h et 72 h.

Par ailleurs, une augmentation de la concentration en $CO_2$ au cours des expérimentations doit pouvoir être attribuée à la minéralisation des bactéries en écartant toute production de dioxyde de carbone parasite (intrinsèque aux supports photocatalytiques par exemple). C'est pourquoi, des essais sur 24 h ont été menés pour contrôler les différents paramètres mentionnés dans le tableau II.2-2.

| Paramètres à vérifier | Configuration de test |
|---|---|
| ➢ Etanchéité des réacteurs | Réacteurs vides |
| ➢ Relargage de $CO_2$ par les filtres | Réacteur + filtres avec ou sans $TiO_2$, lampe OFF |
| ➢ Relargage de $CO_2$ par les bactéries non soumises aux UVA | Réacteur + filtres sans $TiO_2$, avec ou sans bactéries, lampe OFF |
| ➢ Relargage de $CO_2$ par les bactéries soumises aux UVA | Réacteur+ filtres sans $TiO_2$, avec ou sans bactéries, lampe ON |
| ➢ Relargage de $CO_2$ par les filtres avec $TiO_2$ et sous UV | Réacteur+ filtres avec $TiO_2$, lampe ON |
| *Certaines vérifications pourront potentiellement être omises en fonction des premières conclusions* | |

**Tableau II.2-2 : Vérifications préalables aux essais de minéralisation de bactéries**

En outre, la minéralisation des bactéries peut être affectée par la variation de différents paramètres opératoires tels que l'intensité du flux lumineux, la charge initiale en bactéries et

l'hygrométrie. La mise en forme du dioxyde de titane (imprégnation ou suspension) sera également étudiée pour une seule configuration donnée puisque le cas « suspension » n'est pas industriellement envisageable.

Le tableau II.2-3 reprend les différentes configurations testées.

| | | Flux lumineux maximal | | Flux lumineux minimal |
|---|---|---|---|---|
| | | Hygrométrie faible | Hygrométrie forte | Hygrométrie faible |
| QMA imprégné P25 | $C_1$<br>$C_2$<br>$C_3$ | | | |
| QMA+ suspension P25 | $C_1$<br>$C_2$<br>$C_3$ | | | |

**Avec**
Flux lumineux minimal=$6{,}2.10^{-6}$ $E.s^{-1}$
Flux lumineux maximal=$1{,}1.10^{-5}$ $E.s^{-1}$
Hygrométrie forte=0,015 (humidité absolue)
Hygrométrie faible=0,0015 (humidité absolue)
$C_1=1{,}3.10^9$ $UFC.mL^{-1} \in [1{,}2.10^9 ; 1{,}5.10^9]$
$C_2=7{,}2.10^8$ $UFC.mL^{-1} \in [6{,}2.10^8 ; 8{,}4.10^8]$
$C_3=5{,}0.10^8$ $UFC.mL^{-1} \in [4{,}2.10^8 ; 6{,}0.10^8]$

**Tableau II.2-3 : Configurations testées pour la minéralisation de bactéries**

### II.2.5 TAUX DE MINERALISATION

Le taux de minéralisation maximal issu de la dégradation photocatalytique des bactéries est quantifiable par l'établissement d'un bilan carbone. La connaissance de la quantité de carbone bactérien déposé sur les supports photocatalytiques est donc incontournable.

La littérature révèle que la proportion de carbone contenu dans une bactérie varie entre 47 % et 53 % en masse (Abbott et al., 1973 ; Van Dijken et al., 1975). Plus récemment, Battley (1991), a pu déterminer expérimentalement la composition élémentaire d'*E.coli* (souche K-12), montrant qu'un gramme de cellules asséchées est composé de 49,67 % de carbone, 6,65 % d'hydrogène, 24,77 % d'oxygène, 15,22 % d'azote, 2,90 % de phosphore et de 0,79 % de soufre.

Rappelons que, de manière pratique, un volume de culture liquide, de concentration connue, est déposé sur les supports photocatalytiques. Le nombre d'unité formant colonie à minéraliser est donc aisément accessible. Il reste à déterminer la masse d'une unité formant colonie et la proportion de carbone. Deux types d'expérimentations sont donc menés en parallèle.

D'une part, la détermination de la masse sèche d'une UFC est réalisée par l'assèchement et la pesée de cultures liquides de concentrations connues selon le protocole décrit ci-dessous (cf. figure II.2-5) :

- Réalisation d'une suspension bactérienne conformément au mode opératoire décrit précédemment (avec lavages et centrifugations) ;
- Dilution au $10^{ème}$ , et quantification des bactéries viables et cultivables par la méthode d'étalement (70 mL de suspension diluée au $10^{ème}$) ;
- Réalisation de la tare de trois cristallisoirs ;
- Répartition de 20 mL de suspension diluée au $10^{ème}$ dans chacun des cristallisoirs ;
- Etuvage à 50°C pendant 24 h ;
- Pesée des cristallisoirs ;
- Détermination de la masse sèche d'une unité formant colonie d'*E.coli.*

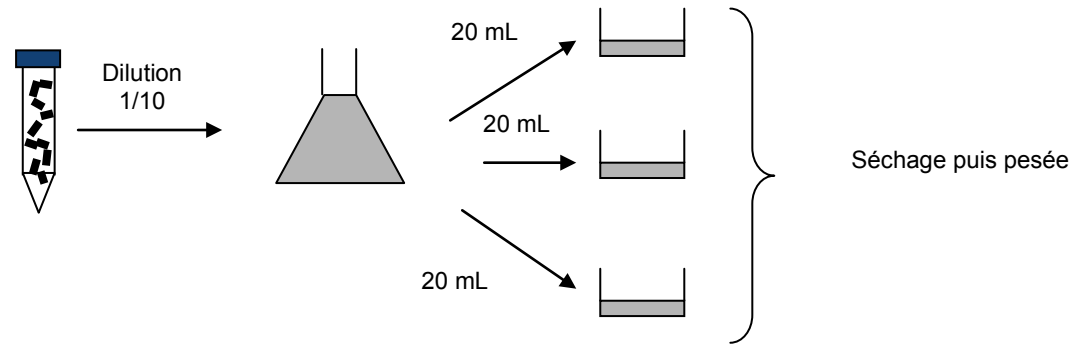



**Figure II.2-5 : Protocole de détermination de la masse sèche d'une UFC**

D'autre part, la proportion de carbone dans une UFC est quantifiée par coulométrie. Cette technique analytique consiste à mesurer le dioxyde de carbone issu de la combustion du carbone contenu dans la matière à analyser, initialement déposée sur des filtres en fibres de quartz QMA (25 mm) (INRS, 2007b). Ces filtres sont préalablement calcinés à 600 °C pendant 12 h pour éliminer tout résidu organique.
L'instrument utilisé est un coulomètre Coulomat 702 (Ströhlein-Juwe-Bruker, Korschenbroich, Allemagne) constitué :

- d'une unité de combustion, composée d'un four à combustion à lampe infrarouge, d'un second four de post-oxydation (CuO-800°C) puis d'un troisième four rempli de laine d'argent (400°C) destiné à éliminer les gaz acides. Le filtre est placé dans une nacelle en silice introduite dans le four de combustion. Celle-ci est effectuée à 950 °C sous courant d'oxygène ;

- d'une unité d'analyse du $CO_2$, constituée d'une cellule d'absorption du $CO_2$ par barbotage dans une solution de perchlorate de baryum de pH donné. Cette absorption modifie le pH. Le titrage en retour au pH initial est obtenu par l'envoi d'une quantité de courant électrique proportionnelle à la quantité de $CO_2$ absorbée dans la solution.

Expérimentalement, des volumes connus de suspension bactérienne sont déposés sur des filtres qui sont ensuite séchés puis analysés par coulométrie :

- 3 filtres avec 100 µL de culture liquide à $7{,}6.10^{8}$ UFC.mL$^{-1}$
- 3 filtres avec 200 µL de culture liquide à $7{,}6.10^{8}$ UFC.mL$^{-1}$
- 3 filtres avec 250 µL de culture liquide à $7{,}6.10^{8}$ UFC.mL$^{-1}$
- 3 filtres avec 200 µL d'eau ultrapure stérile pour témoin
- 3 filtres vierges pour témoin

La proportion est définie par :

$$\%C = \frac{masse\ de\ carbone\ sur\ le\ filtre}{masse\ d'UFC\ déposées\ sur\ le\ filtre} \qquad \textbf{(II.2-2)}$$

A partir de ces données, un bilan carbone permettra de déterminer la quantité de $CO_2$ atteignable pour une minéralisation complète du carbone bactérien en dioxyde de carbone. Par comparaison avec la concentration expérimentale de $CO_2$ mesurée dans nos échantillons, le taux de minéralisation défini par la relation II.2-3 pourra être établi.

$$\text{taux de minéralisation} = \frac{\text{quantité } CO_{2\ exp}}{\text{quantité } CO_{2\ minéralisation\ complète}} \times 100 \qquad \textbf{(II.2-3)}$$

# II.3 ESSAIS D'INACTIVATION D'UN BIOAEROSOL : PREREQUIS

Rappelons que l'objectif global de la thèse est d'étudier la dégradation photocatalytique d'un bioaérosol en découplant les différents phénomènes coexistants dans un tel processus par une approche batch d'une part, et une approche continue d'autre part.
L'approche continue consiste à inactiver un bioaérosol expérimental d'*E.coli*, dans un dispositif d'épuration conçu à cet effet. Etant donné le temps imparti pour ce travail de thèse, l'approche continue ne pouvait être étudiée dans sa globalité. Cependant, elle devait permettre la mise en place d'une méthode de génération d'un bioaérosol test d'*E.coli* et d'un réacteur photocatalytique en répondant à un cahier des charges exigeant (cf. annexe 4).
Ce sont donc ces deux points qui sont abordés dans ce paragraphe consacré aux prérequis nécessaires à l'inactivation d'un bioaérosol.

## II.3.1 GENERATION D'UN BIOAEROSOL D'*E.COLI*

### II.3.1.1 Présentation du générateur

Un banc d'essais (confiné sous PSM) a été dimensionné et conçu à l'INRS (département Métrologie des Polluants / laboratoire Métrologie des Aérosols) pour disposer de bioaérosols expérimentaux homogènes dans un espace donné, stable pendant une période de temps donnée, dont les caractéristiques physiques et biologiques sont connues de manière répétable et reproductible dans une atmosphère contrôlée.
La conception et le principe du générateur étudié s'inspirent largement du Liquid Sparging Aerosolizer développé par Mainelis et al. (2005). Des modifications ont toutefois été apportées par rapport au système décrit en 2005. Ces dernières ont par ailleurs fait l'objet d'une demande de brevet (Simon et al., 2009a). Le générateur met en suspension les microorganismes dans l'air, par bullage d'air à travers un film de suspension bactérienne (cf. figure II.3-1). Pour ce faire, une pompe péristaltique alimente (à un débit $Q_L$ variable) la surface supérieure d'un disque poreux calibré avec une suspension microbienne qui se dépose sous forme d'un film liquide, de hauteur $H_{liq}$. Le passage d'un flux d'air sec de génération (à un débit $Q_G$ variable) à travers ce film liquide conduit à la formation de bulles qui éclatent en produisant des gouttelettes contenant des particules biologiques. Les gouttelettes et

microorganismes sont ensuite entraînés par le flux d'air ascendant vers la sortie. Le positionnement de la sortie d'air juste au-dessus du fritté et l'ajout d'un air complémentaire d'entraînement (à un débit $Q_E$ variable) favorisent un transport efficace des particules vers la sortie. Le débit d'entraînement $Q_E$ est composé d'un mélange d'air sec et d'air humide en proportion variable pour assurer une valeur d'humidité relative de l'air constante à ± 2% au cours d'un essai. Précisons que les microorganismes mis en suspension dans l'air mais qui toutefois ne sortent pas du générateur (sédimentation, projections) ne seront pas recyclés par la suite dans le système. Une enceinte de prélèvement complète ce banc d'essais. L'échantillonnage du bioaérosol expérimental s'effectue par des sondes à bord mince dimensionnées pour assurer des efficacités de captage et de transmission satisfaisantes pour les tailles de particules attendues (95% ou plus pour tous les diamètres aérodynamiques < 10 µm).

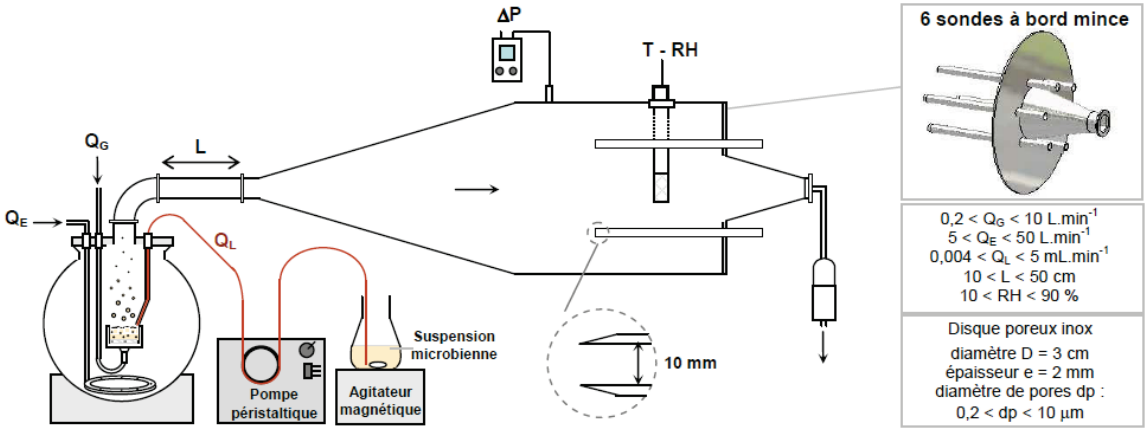



**Figure II.3-1 : Schéma du banc de génération et de caractérisation de bioaérosols expérimentaux (Simon et al., 2010a)**

### II.3.1.2 Préparation et caractérisation de la suspension bactérienne

La suspension bactérienne d'*E.coli*, destinée à la génération, est préparée conformément au protocole défini dans la partie relative aux essais d'inactivation batch. Le dénombrement des bactéries viables et cultivables est réalisé par la méthode d'étalement et de mise en culture sur TSA. Les concentrations en bactéries viables et cultivables d'une telle suspension fraîchement préparée varient entre $1.10^8$ et $2.10^8$ UFC.mL$^{-1}$. Les essais de génération du bioaérosol durant plusieurs heures, des analyses de la suspension ont été réalisées au cours du temps et aucune perte de viabilité n'a pu être mise en évidence sur 4h00 (Simon et al., 2009b).

Par ailleurs, une distribution granulométrique de la suspension bactérienne a été réalisée au compteur Coulter Multisizer 3 (Beckman Coulter, Brea, USA) (cf. figure II.3-2). Le principe de comptage consiste à mettre en suspension les particules à analyser dans une solution électrolytique. La solution est composée de 85% en masse de l'électrolyte Isoton II et de 15% en masse de glycérol, ce qui permet de limiter la sédimentation des grosses particules dans le bécher d'analyse. Un tube en verre, également rempli avec cette solution électrolytique et doté d'un orifice calibré de 30 µm, est ensuite plongé dans le bécher. La solution contenant les particules est aspirée à travers l'orifice, ce qui a pour conséquence de créer une différence de potentiel entre une électrode de platine située à l'intérieur du tube en verre et une électrode immergée dans la suspension à analyser. Lorsqu'une particule passe à travers l'orifice, elle

déplace une quantité de solution proportionnelle à son volume, ce qui augmente temporairement la résistance électrique entre les deux électrodes et ce qui crée une impulsion directement proportionnelle au diamètre équivalent en volume $d_v$ de la particule. Pour un volume de solution analysé, le Multisizer 3 compte le nombre de particules aspirées et les classe suivant 64 canaux adjacents correspondants à des intervalles de diamètre $Dd_v$.

Précisons que la suspension bactérienne est acheminée dans le générateur de bioaérosols par une pompe péristaltique. Cette étape ne modifie ni la distribution granulométrique ni la concentration en bactéries viables et cultivables (Simon et al., 2009b).

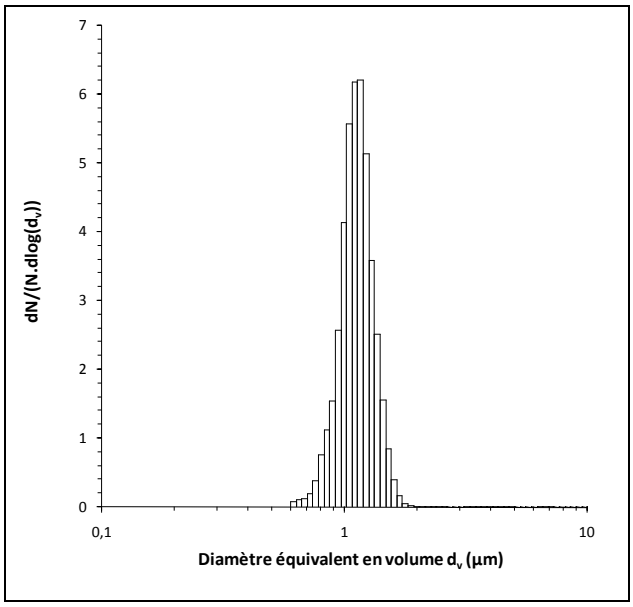



**Figure II.3-2 : Distribution granulométrique des cellules d'*E.coli* dans la suspension bactérienne (Simon et al., 2009b).**

### II.3.1.3 Prélèvements et analyses

Une enceinte de prélèvement permet l'échantillonnage du bioaérosol expérimental par six sondes à bord mince de 10 mm de diamètre qui assurent des efficacités de captage et de transmission satisfaisantes pour les tailles de particules attendues (Simon et al., 2009b). Le bioaérosol est caractérisé physiquement et biologiquement. La méthode et les résultats ont été précédemment publiées (Simon et al., 2010b).

- **Paramètres physiques** :

Détermination de la concentration en nombre et de la distribution granulométrique de l'aérosol via l'utilisation d'un compteur optique de particule Grimm 1.109 (Intertek Testing Service, Le Vaudreuil, France). Le principe est basé sur l'interaction des particules avec la lumière. Un rayon lumineux est focalisé sur un volume de mesure à travers lequel les particules en suspension passent une par une. La quantité de lumière diffusée par chaque particule est alors mesurée par un détecteur optoélectronique. L'amplitude du signal est enregistrée dans différents canaux ce qui permet ensuite de déduire la distribution en dimension. Cet appareil quantifie les particules de 0,25 µm à 32 µm.

- **Paramètres biologiques**

Détermination de la quantité de bactéries viables et cultivables présentes dans le bioaérosol par filtration. Les filtres en polycarbonate (pores 0,8 µm) sont associés à un adsorbant PAD et

placés dans une cassette de prélèvement (Millipore). L'extraction est ensuite réalisée dans une solution aqueuse de peptone et de Tween 80 ($1g.L^{-1}$, $0,1g.L^{-1}$ respectivement). Le dénombrement est réalisé par la méthode d'étalement sur milieu gélosé (TSA).

#### II.3.1.4 Protocole expérimental

Avant tout essai de génération d'un bioaérosol expérimental certains contrôles sont nécessaires :

- vérification de l'étanchéité de l'ensemble du banc (comparaison des débits entrée-sortie) ;
- vérification que l'air comprimé employé est parfaitement exempt de particules après son passage dans le système de filtration de l'air et les régulateurs de débits massiques ;
- vérification de la stérilité du banc d'essais par analyse de la flore viable et cultivable sur un échantillon prélevé par cassette fermée pendant une heure de « génération » d'eau ultrapure stérile ;
- détermination de la concentration en nombre de particules et de la distribution granulométrique de l'aérosol résiduel issu de la « génération » d'eau ultrapure stérile.

Rappelons que les objectifs principaux de ces travaux sont d'évaluer les performances du générateur à produire un bioaérosol expérimental d'*E.coli* stable dans le temps, reproductible sur plusieurs essais avec une gamme de concentration la plus étendue possible.

- **Essais de stabilité du bioaérosol généré**

Durée : 180 minutes — $Q_E$= 20 $L.min^{-1}$ — $H_{liq}$=8 mm
$Q_G$=2,5 $L.min^{-1}$ — HR=50±2 %

Pour chaque essai, la concentration en nombre de particules correspondants à *E.coli* ($d_{opt}$>0,4 µm) a été suivie pendant 180 minutes. Les valeurs mesurées au cours du temps ont ensuite été normées par rapport à la concentration moyenne mesurée pendant les trois premières minutes de génération (pour prendre en compte les différentes répétitions effectuées). Pour chaque essai, la concentration en bactéries viables et cultivables a également été suivie pendant 180 minutes (6 prélèvements successifs de 30 minutes). Ces valeurs successives ont été normées par rapport à la concentration mesurée pendant la première plage de 30 minutes.

- **Gamme de concentration et reproductibilité**

Durée : 60 minutes — $Q_E$= 20 $L.min^{-1}$ — $H_{liq}$=8 mm
$Q_G$ variable de 0,2 à 5 $L.min^{-1}$ (5 valeurs) — HR=50±2 %

Les concentrations en nombre de particules de diamètre optique supérieur à 0,4 µm et en bactéries viables et cultivables ont été mesurées sur des générations de 60 minutes. Les niveaux de concentration ont été modifiés en faisant varier le débit de génération $Q_G$. A une valeur moyenne de concentration est associé un écart type prenant en compte les répétitions.

Chaque configuration a fait l'objet d'au minimum trois répétitions.

### II.3.2 RECEPTION DU REACTEUR CONTINU

Rappelons que la dégradation photocatalytique du bioaérosol sera menée dans un réacteur continu dédié et conçu en accord avec le cahier des charges établi en annexe 4. Avant tout essai avec des agents biologiques, la prise en main du réacteur peut être réalisée avec un polluant chimique, ces premières expérimentations ayant pour objectif de valider le bon fonctionnement du réacteur photocatalytique et/ou de déceler d'éventuels dysfonctionnements. La méthodologie repose sur la dégradation d'un polluant communément employé au laboratoire pour mettre en place des bancs d'essais : l'éthanol. Connaissant l'influence des paramètres opératoires tels que l'intensité lumineuse, la charge initiale en polluant, l'hygrométrie et le temps de passage sur sa dégradation il est alors possible de vérifier si les tendances habituellement rencontrées se retrouvent dans le cas présent. Le support photocatalytique Ahlstrom a été employé pour ses avantages pratiques notamment.
Le schéma de principe du banc d'essais dynamique est représenté en figure II.3-3.

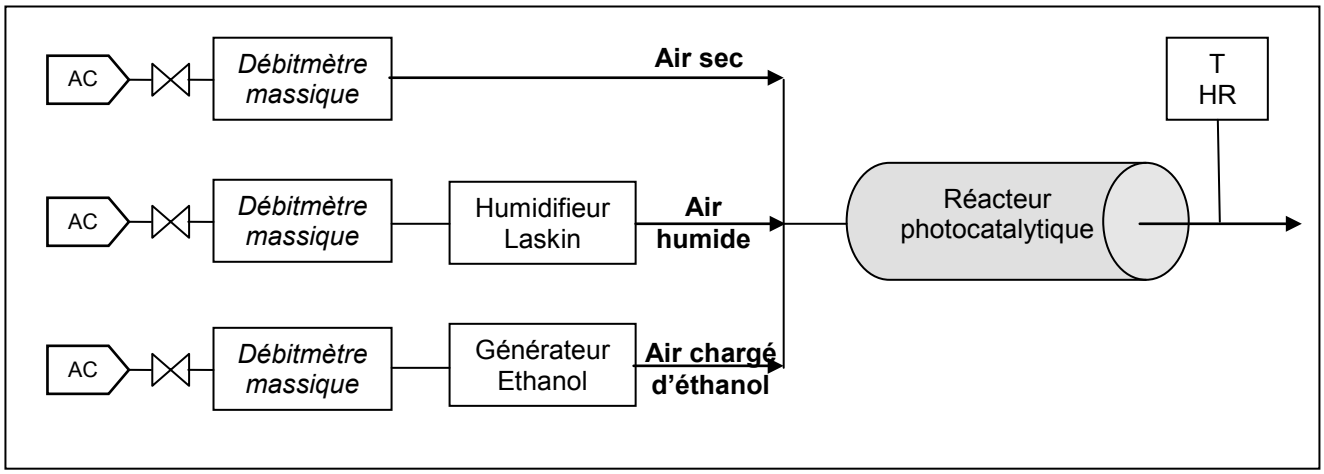



**Figure II.3-3: Description du banc d'essais**

L'hygrométrie du flux d'air peut être modifiée en faisant varier les débits d'air sec et d'air humide.

#### II.3.2.1 Génération et analyse de l'éthanol

La génération de l'éthanol est réalisée par barbotage d'un flux d'air sec dans un barboteur rempli d'éthanol. Le flux d'air sortant, ainsi chargé en éthanol, est acheminé vers une fiole de garde pour limiter la condensation avant d'être mélangé au flux d'air humide. La concentration en polluant est modifiable par ajustement du débit de barbotage. L'éthanol est analysé par chromatographie en phase gazeuse équipé d'un catharomètre.

| | |
|---|---|
| Appareil | ➢ Micro-CPG Agilent 3000<br>➢ Détecteur à thermoconductivité ou catharomètre |
| Colonne | ➢ OV-1 (non polaire)<br>➢ Longueur 8 m – diamètre 0,15 mm- film 2µm |
| Conditions analytiques | ➢ Injecteur : 90 °C<br>➢ Four : 80 °C<br>➢ Pression de la colonne : 25 Psi<br>➢ Durée de l'injection : 50 ms |
| Paramètres d'étalonnage | ➢ Temps de rétention : 33 s<br>➢ Droite d'étalonnage :<br>[EtOH] (ppm)=0,6075*surface de pic ($\mu V.s^{-1}$)<br>$R^2$=0,999 |

**Tableau II.3-1 : Conditions analytiques pour l'analyse de l'éthanol par CPG**

### II.3.2.2 Réacteur photocatalytique continu

Le réacteur photocatalytique a été conçu de manière à pouvoir positionner le catalyseur dans de multiples configurations. L'éthanol diffusant bien, une disposition du catalyseur en flux léchant a été envisagée de manière à augmenter la surface et le temps de contact (cf. figure II.3-4).

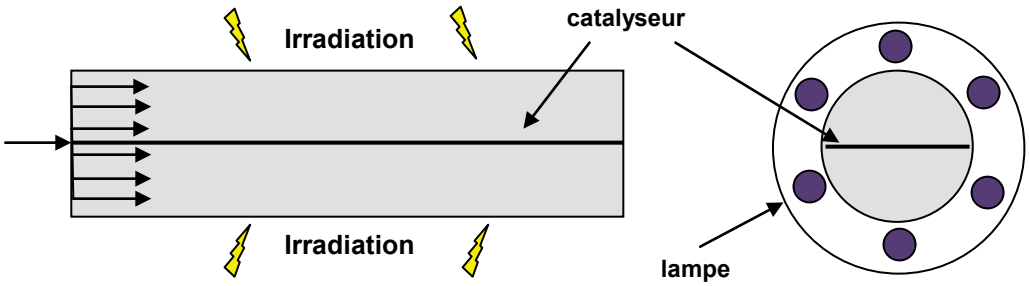



**Figure II.3-4 : Ecoulement en flux léchant et irradiation radiale**

Les lampes utilisées sont des lampes à lumière noire (Philips TL-D 18 W, BLB, SLV, 18 W, pic d'émission à 365 nm) semblables à celle utilisée pour les essais d'inactivation. Le support photocatalytique présente une surface de 0,11 $m^2$.

### II.3.2.3 Protocole expérimental

Les essais consistent à suivre la dégradation de l'éthanol par photocatalyse et à étudier l'influence de différents paramètres opératoires tels que la concentration initiale en polluant (C), l'hygrométrie (en termes d'humidité absolue), l'intensité de l'irradiation et le temps de passage ($\tau$).

Après stabilisation de la concentration en éthanol en amont du réacteur, les lampes sont allumées et des prélèvements sont effectués en aval, au-delà des 30 minutes de préchauffage de la lampe. Par comparaison des concentrations amont-aval, le rendement de dégradation peut être calculé. Les différentes configurations de tests sont rappelées dans le tableau II.3-2.

| | | 6 lampes | | | 4 lampes | 2 lampes |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Hygrométrie faible | Hygrométrie moyenne | Hygrométrie forte | Hygrométrie moyenne | Hygrométrie moyenne |
| $\tau_1$ | $C_1$ | | | | | |
| | $C_2$ | | | | | |
| | $C_3$ | | | | | |
| | $C_4$ | | | | | |
| $\tau_2$ | $C_3$ | | | | | |
| $\tau_3$ | $C_3$ | | | | | |

**Avec**
Hygrométrie faible= 0,0003 (humidité absolue)
Hygrométrie moyenne=0,006 (humidité absolue)
Hygrométrie forte=0,016 (humidité absolue)

$\tau_1$=12 s ($\Leftrightarrow$20 L.min$^{-1}$)
$\tau_2$=25 s ($\Leftrightarrow$10 L.min$^{-1}$)
$\tau_3$=50 s ($\Leftrightarrow$5 L.min$^{-1}$)
$C_1$=50 ppm
$C_2$=100 ppm
$C_3$=150 ppm
$C_4$=200 ppm

**Tableau II.3-2 : Configurations à tester pour la dégradation photocatalytique d'éthanol**

### II.3.3 CHOIX DES SUPPORTS PHOTOCATALYTIQUES ADAPTES

La dégradation photocatalytique du bioaérosol est réalisée sur un support qui permet la «rétention » des bactéries pour que le contact avec le dioxyde de titane soit optimisé. Ainsi, les configurations en flux traversant sont souvent mises en place dans les dispositifs d'épuration. Il paraît donc important de déterminer expérimentalement les efficacités de filtration des supports photocatalytiques Ahlstrom et QMA. Ces tests ont été menés sur les supports non imprégnés de $TiO_2$ puisque le diamètre des fibres n'est pas augmenté de façon significative par la présence du semi-conducteur.
Un aérosol de chlorure de sodium, de distribution granulométrique comparable à celle du bioaérosol d'*E.coli*, a été généré par nébulisation. Les supports ont été placés dans un conduit et des prélèvements en amont-aval du filtre sont réalisés avec un compteur optique de particules Lasair 1001 (Particle Measuring Systems Inc., Dourdan, France) mesurant des diamètres optiques compris entre 0,1 et 2 µm. Les schémas des différents montages sont présentés sur la figure II.3-5. Les conditions opératoires (débit, surface de filtre) ont été ajustées de manière à obtenir une vitesse de filtration identique (0,1 m.s$^{-1}$) que ce soit pour ces tests de filtration ou pour les futurs tests d'inactivation dans le réacteur continu.

L'efficacité de filtration est définie par :

$$E = 1 - \frac{C_{aval}}{C_{amont}}$$

Pour chacun des supports, six séries de prélèvements amont-aval ont été menées puis moyennées.

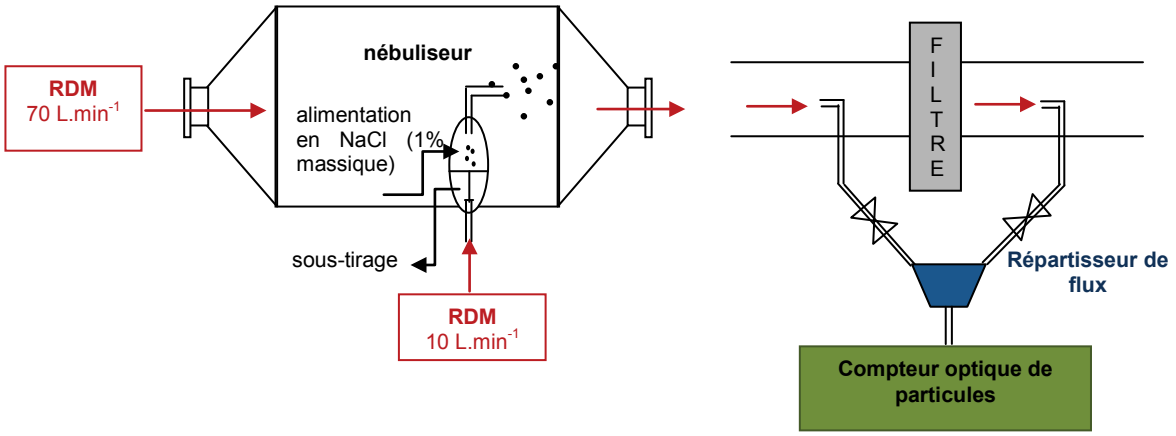



**Figure II.3-5 : Détermination de l'efficacité de filtration des supports photocatalytiques**

La caractérisation des supports en termes de filtration des particules orientera le choix du support photocatalytique le plus adapté pour mener à bien la dégradation du bioaérosol bactérien d'*E.coli*.

# CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSIONS

# III.1 ESSAIS D'INACTIVATION BATCH

Rappelons que ces essais ont pour objectif de déterminer l'impact de la photocatalyse sur la viabilité et la cultivabilité d'une bactérie tout en mettant en évidence les paramètres clés d'une inactivation efficace. Les tests ont été réalisés sur cinq supports photocatalytiques et sur quatre durées d'irradiation (de 20 à 120 minutes), sachant que des expérimentations plus longues ont été entreprises pour un des supports, afin de démontrer ses capacités optimales. Par ailleurs, les analyses de bactéries viables et cultivables ont été menées sur deux milieux de culture (TSA et EMB). Les tendances globales sont identiques sur les deux milieux nutritifs c'est pourquoi seuls les graphes récapitulatifs sur le milieu classique seront présentés dans le texte, ceux sur EMB sont rapportés en annexe 7.

## III.1.1 EXTRACTION

Conformément au protocole d'extraction explicité dans la partie précédente, une deuxième extraction est réalisée sur les cinq types de supports photocatalytiques. Les résultats, identiques pour chacun des supports, montrent que la première extraction est efficace puisque seul 0,1 % des bactéries initialement déposées demeurent sur le support à l'issue de la première phase du protocole (cf. figure III.1-1).

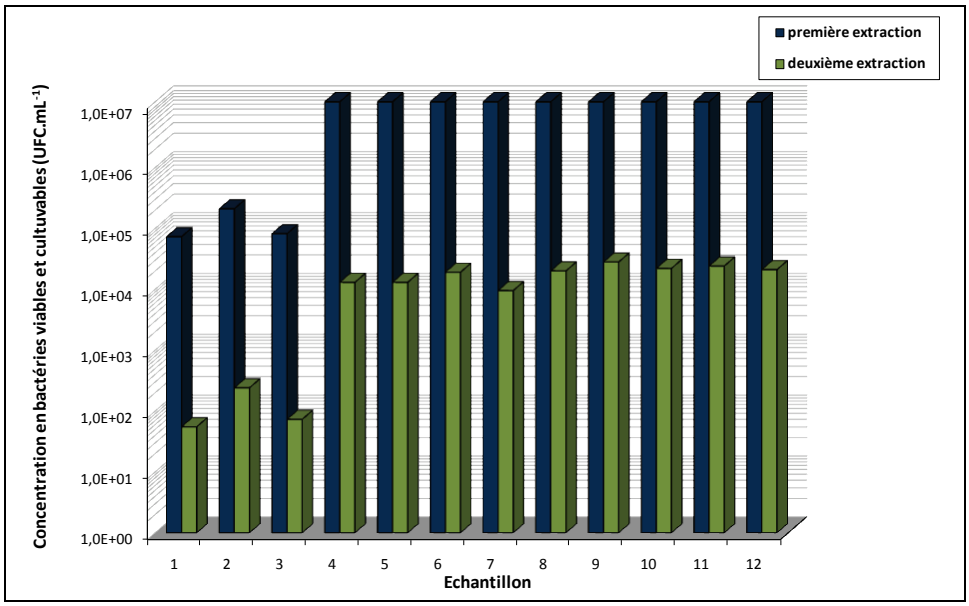



**Figure III.1-1 : Efficacité de la première extraction sur support QMA imprégné de P25 ou vierge (exemple : 40 minutes, TSA)**
**(échantillons 1 à 3 : avec UV/avec $TiO_2$, 4 à 6 : avec UV/sans $TiO_2$, 7 à 9 : sans UV/avec $TiO_2$, 10 à 12 : sans UV/sans $TiO_2$)**

Ainsi le calcul de l'efficacité de dégradation à partir de la concentration initiale dans la suspension bactérienne est possible sans commettre d'erreur.

### III.1.2 FLUX LUMINEUX DISPONIBLE POUR L'INACTIVATION

La détermination du flux lumineux a été simulée par lancer de rayons via la méthode de Monte Carlo. Les simulations ont été réalisées pour deux quantités de photons (20 000 et 30 000 lancers), trois positions du support photocatalytique dans le réacteur et ce, pour les cinq supports photocatalytiques.

Les résultats, équivalents pour les trois positions et les deux quantités des photons, ont été moyennés pour aboutir aux valeurs mentionnées dans le tableau III.1-1. Selon les supports, de faibles variations sont observées sur le flux lumineux absorbé par le dioxyde de titane.

A partir de ces estimations des flux lumineux reçus par le dioxyde de titane sur les différents supports, il est possible de calculer les « doses d'UVA » associées aux durées d'irradiation.

| | |
|---|---|
| - Support Ahlstrom | $1{,}5.10^{-8}$ E.s$^{-1}$soit $5{,}1.10^{-3}$ W |
| - P25 imprégnation | $1{,}6.10^{-8}$ E.s$^{-1}$soit $5{,}3.10^{-3}$ W |
| - PC500 imprégnation | $1{,}8.10^{-8}$ E.s$^{-1}$soit $6{,}0.10^{-3}$ W |
| - P25 suspension | $1{,}7.10^{-8}$ E.s$^{-1}$soit $5{,}5.10^{-3}$ W |
| - PC500 suspension | $1{,}2.10^{-8}$ E.s$^{-1}$soit $4{,}0.10^{-3}$ W |

**Tableau III.1-1 : Flux lumineux disponibles pour l'inactivation**

### III.1.3 CONFIGURATIONS TESTEES

Pour chaque support photocatalytique et chaque temps d'irradiation, quatre configurations ont été mises en œuvre pour identifier l'impact de la photocatalyse sur la viabilité et la cultivabilité d'*E.coli* :

- avec UV/avec $TiO_2$ : photocatalyse
- avec UV/sans $TiO_2$ : photolyse
- sans UV/avec $TiO_2$ : propriété antibactérienne du $TiO_2$ non activé / « adsorption »
- sans UV/sans $TiO_2$ : témoin

La figure III.1-2 montre un exemple classique de graphe pour un support photocatalytique donné. L'ensemble des données pour les cinq supports et les deux milieux de culture (TSA et EMB) est regroupé en annexe 5.

Tout d'abord, les échantillons témoins présentent des niveaux de concentration comparables à la concentration initiale de la culture liquide. Le dépôt, l'expérimentation et l'extraction n'engendrent pas d'altération des bactéries, qui restent viables et cultivables pendant quelques heures dans l'eau ultrapure stérile.

Par ailleurs, le dioxyde de titane, non excité, ne possède pas de propriété bactéricide, contrairement à ce qu'observe Liu dans de récents travaux (Liu et al., 2009 ; Liu et al., 2007). Cependant, on ne peut pas affirmer, pour autant, que les bactéries ne sont pas « adsorbées » (n'adhèrent pas) sur le dioxyde de titane. En effet, aucune étape de séparation entre le semi-conducteur et les bactéries n'est opérée avant l'analyse. Ainsi, il est envisageable que des particules nanométriques de $TiO_2$ soient déposées sur le milieu gélosé avec les bactéries sans, néanmoins, empêcher la formation de colonies après incubation.

Les conclusions quant à l'effet des UVA diffèrent en fonction du temps d'irradiation (cf. figure III.1-3). En effet, pour des durées d'exposition faibles (20, 40 et 60 minutes) l'effet est nul. Cependant, à partir de 120 minutes, un impact est remarquable pour les supports en quartz mais pas pour le support commercial Ahlstrom (toute déshydratation ayant pu être écartée). Cette différence est sans doute liée aux propriétés intrinsèques du quartz vis-à-vis du rayonnement UVA. En effet, la détermination des propriétés optiques des supports a permis de mettre en évidence que le support Ahlstrom 1045 mouillé absorbe plus de photons qu'un filtre QMA vierge mouillé (8 % contre 4 % vers 360 nm cf. annexe 2). Ainsi pour un rayonnement identique, plus de photons sont disponibles pour attaquer les bactéries avec les filtres QMA qu'avec le support Ahlstrom. L'effet photolytique des UVA sur le support Ahlstrom 1045 n'apparaît qu'au-delà de 140 minutes d'irradiation et devient très important à 160 minutes (cf. annexe 5). Cependant, après 2h40 d'exposition, il est possible d'envisager que l'effet des UVA soit cumulé à un assèchement des supports, même si, visuellement, ces derniers semblent encore humides.
Ainsi, sur des temps d'irradiation de plusieurs heures, les UVA permettent d'endommager les bactéries. Ces conclusions sont, notamment étayés par les travaux de Robertson et al. (2005) qui ont démontré un effet photolytique des UVA sur *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* et *Pseudomonas aeruginosa* sur des durées de 2h.

Pour conclure, la perte de viabilité observée figure III.1-2 (histogramme rouge) est attribuable à l'action de la photocatalyse qui est discutée dans les paragraphes suivants.

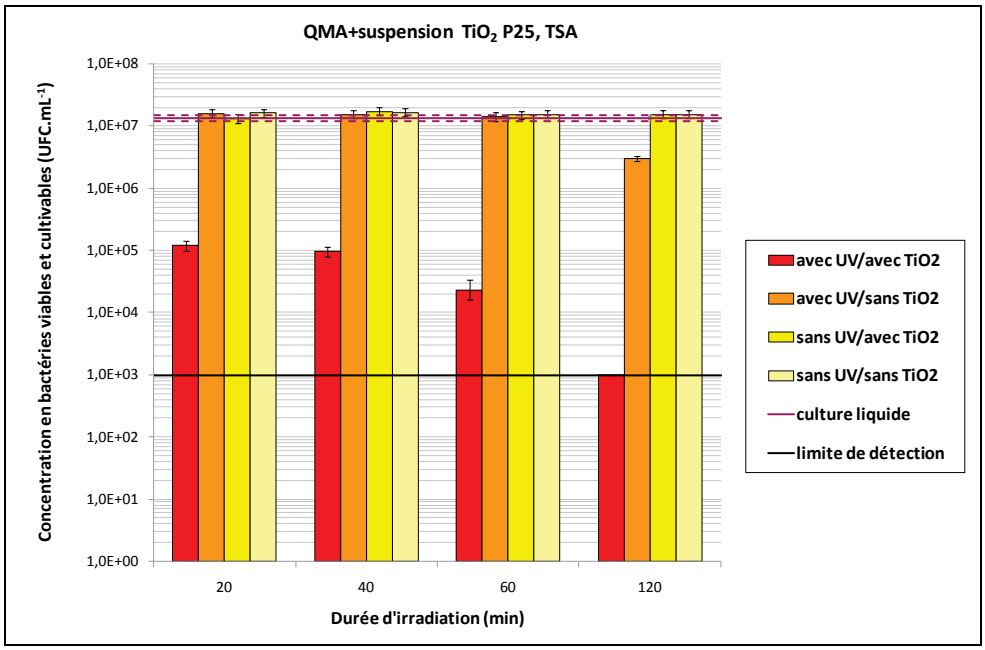



**Figure III.1-2 : Inactivation sur support QMA+suspension de $TiO_2$ P25 en fonction du temps d'irradiation, dénombrement sur TSA**

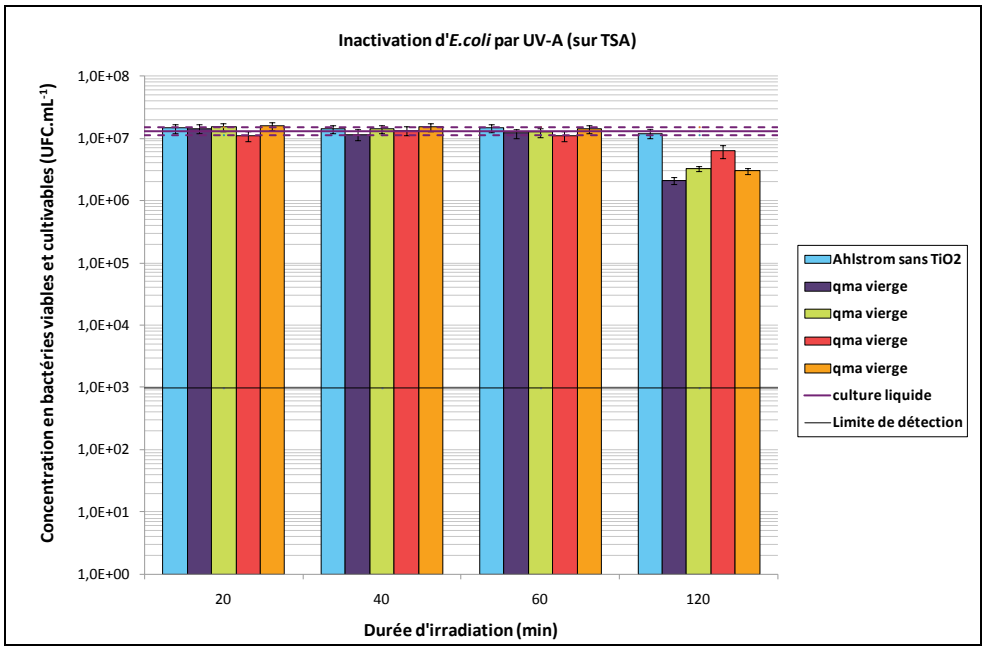



**Figure III.1-3 : Inactivation par photolyse sur les différents supports en fonction du temps d'irradiation, dénombrements sur TSA**

**(les quatre histogrammes « qma vierge » correspondent aux quatre supports sans $TiO_2$ autres que le support commercial)**

### III.1.4 EFFET DU TEMPS D'IRRADIATION ET INFLUENCE DU MILIEU DE CULTURE

La figure III.1-4 représente la concentration en bactéries viables et cultivables des échantillons ayant été soumis à la photocatalyse, en fonction du temps d'irradiation et ce pour les différents supports photocatalytiques.

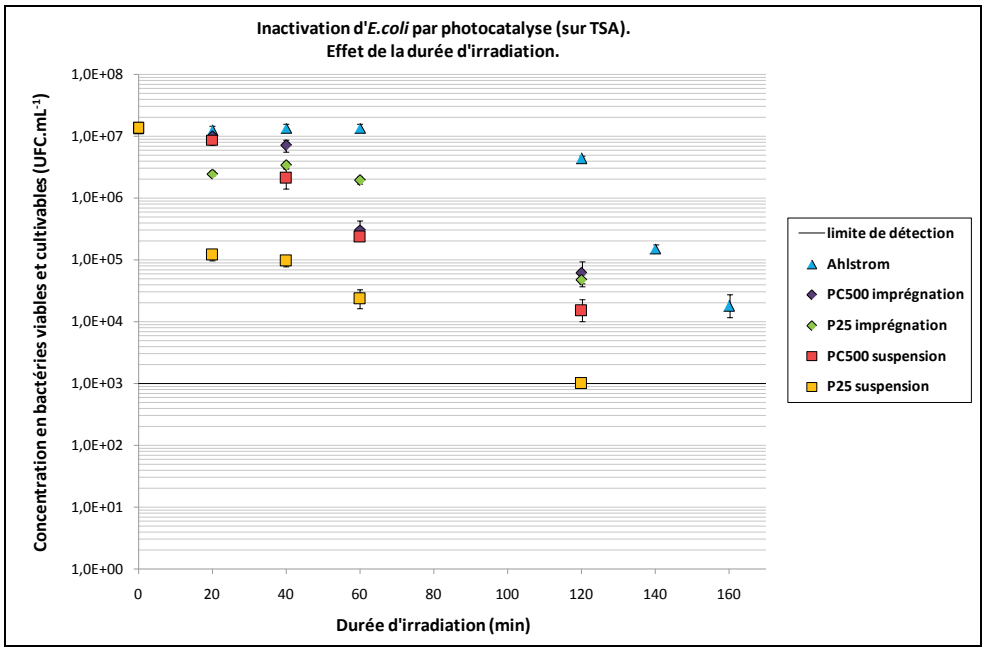



**Figure III.1-4 : Inactivation d'*E.coli* sur différents supports en fonction du temps d'irradiation, dénombrement sur TSA**

De façon globale, l'inactivation est favorisée par des temps d'irradiations longs sur les cinq supports photocatalytiques. Cette évolution est observée sur les deux milieux de culture. Cependant, les dénombrements sur ces deux milieux nutritifs aboutissent à des inactivations différentes, l'effet étant plus marqué sur le milieu restrictif EMB que sur le milieu classique TSA (cf. tableau III.1-2 et annexes 6 et 7). Ainsi, après traitement photocatalytique, les bactéries ont plus de difficultés à former des colonies sur un milieu plus pauvre en carbone (EMB) que sur un milieu complet (TSA). D'après la littérature, cet écart observé entre un milieu restrictif, contenant des sels inorganiques et un milieu classique met en évidence un endommagement métabolique des cellules dû au processus photocatalytique (peut-être consécutif à un endommagement structurel, que les analyses ne permettent pas d'identifier). Ceci est une information quant au mécanisme photocatalytique appliqué à un composé bactérien.

| | | **Efficacité d'inactivation (%)** | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| Supports | Durée (min) | TSA | | EMB | |
| Ahlstrom | 20 | | 7,12 | | 17,16 |
| | 40 | | 0,00 | | 23,67 |
| | 60 | | 0,00 | | 52,34 |
| | 120 | | 66,40 | | 89,95 |
| | 140 | | 98,85 | | 99,73 |
| | 160 | | 99,86 | | >99,99 (<LD) |
| Imprégnation PC500 | 20 | | 25,03 | | 73,43 |
| | 40 | | 46,32 | | 79,24 |
| | 60 | | 97,66 | | 96,06 |
| | 120 | | 99,54 | | 99,47 |
| Imprégnation P25 | 20 | | 81,23 | | 96,55 |
| | 40 | | 74,32 | | 76,16 |
| | 60 | | 85,47 | | 92,81 |
| | 120 | | 99,64 | | 99,99 |
| Suspension PC500 | 20 | | 33,96 | | 97,83 |
| | 40 | | 84,17 | | 99,76 |
| | 60 | | 98,23 | | 99,64 |
| | 120 | | 99,89 | | > 99,99 (< LD) |
| Suspension P25 | 20 | | 99,09 | | 99,92 |
| | 40 | | 99,28 | | 99,37 |
| | 60 | | 99,82 | | 99,99 |
| | 120 | | > 99,99 (< LD) | | > 99,99 (< LD) |

**Echelle de Sayılkan, et al., 2009**

Effet nul (0-20 %) — Effet faible (20-50 %) — Effet notoire (50-70 %) — Effet puissant (> 70%)

**Tableau III.1-2 : Récapitulatif des efficacités d'inactivation**

Par ailleurs, en fonction du support utilisé, l'inactivation peut être plus conséquente et plus brutale. Une classification rapide des supports, du moins efficace au plus efficace, est possible :

- support commercial Ahlstrom
- support QMA imprégné PC500

- support QMA imprégné P25
- support QMA + suspension PC500
- support QMA + suspension P25

Ces variations peuvent s'expliquer par le type de $TiO_2$, la configuration du support en lui-même et le flux de photons réellement disponible pour l'inactivation. Ces différents points sont discutés dans les parties suivantes.

En conclusion, le processus photocatalytique appliqué à des bactéries requiert des temps d'irradiation longs (plusieurs minutes, voire plusieurs heures) pour obtenir une perte significative de viabilité (plusieurs log). Or, dans des appareils commerciaux, qu'ils soient autonomes ou intégrés aux systèmes de ventilation-climatisation, les temps de passage sont très courts (de l'ordre de la seconde). La question de l'efficacité de ces appareils se pose dès lors, même si d'autres paramètres influencent l'inactivation-dégradation (Lin et al., 2003). L'immobilisation des microorganismes sur des supports photocatalytiques paraît donc inévitable pour assurer une exposition prolongée.

### III.1.5 EFFET DU SUPPORT PHOTOCATALYTIQUE

La comparaison des supports photocatalytiques composés du même type de dioxyde de titane permet d'étudier l'effet de la configuration du $TiO_2$ (aspect « commercial »/imprégnation/ suspension). La figure III.1-5 représente donc les résultats pour le support Ahlstrom et les supports QMA avec du $TiO_2$ PC500 qu'ils soient imprégnés ou en suspension.

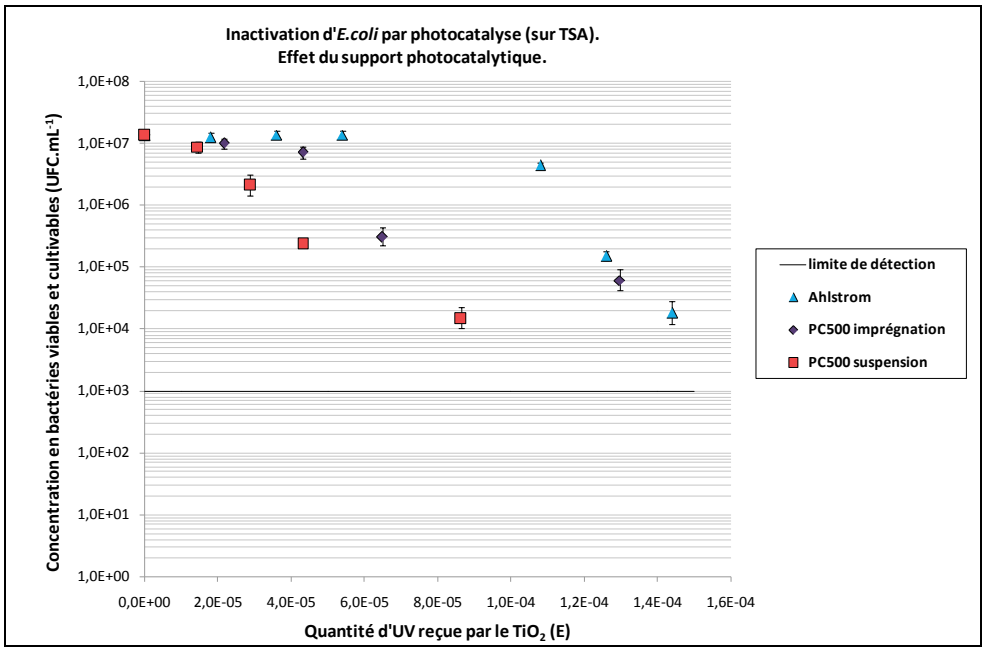



**Figure III.1-5 : Effet du support photocatalytique sur l'inactivation d'*E.coli* après 160 minutes au plus, dénombrement sur TSA**

D'après ce graphe, il apparaît, à quantité de photons équivalentes, que le support commercial Ahlstrom conduit à de moins bonnes inactivations, que le support imprégné de PC500, lui même moins efficace que le support avec ce dioxyde de titane en suspension (évolution identique sur les deux milieux de culture).

Rappelons que pour inactiver une même quantité de bactéries (100 µL d'une culture à $1,3.10^7$ UFC.mL$^{-1}$), ces supports, de surfaces légèrement différentes, ne contiennent pas la même quantité de $TiO_2$ (cf. tableau III.1-3).

| | Masse de $TiO_2$ (mg) | Charge initiale en bactéries (UFC.$g_{TiO2}^{-1}$) |
|---|---|---|
| Ahlstrom | 7,2 | $1,8.10^8$ |
| QMA imprégné PC500 | 0,9 | $1,4.10^{10}$ |
| QMA suspension PC500 | 0,1 | $1,3.10^{11}$ |

**Tableau III.1-3 : Caractéristiques des supports contenant du $TiO_2$ PC500**

Le support permettant la plus grande perte de viabilité est le support le moins chargé en dioxyde de titane. Or, même s'il existe une quantité optimale de $TiO_2$, on pourrait s'attendre à obtenir des rendements plus importants ou équivalents avec une masse supérieure. Ce n'est pas le cas ici. Cependant, les quantités de $TiO_2$ mentionnées dans le tableau ci-dessus sont globales. Il ne s'agit pas de la masse de semi-conducteur réellement en contact avec les bactéries et à laquelle on ne peut avoir accès facilement.

Or, pour que le processus photocatalytique soit amorcé, il est nécessaire que la bactérie soit en contact avec le $TiO_2$ et que ce dernier soit excité par les photons. Ce contact bactérie-$TiO_2$ diffère selon les supports photocatalytiques utilisés ici, et peut être schématisé par la figure III.1-6.

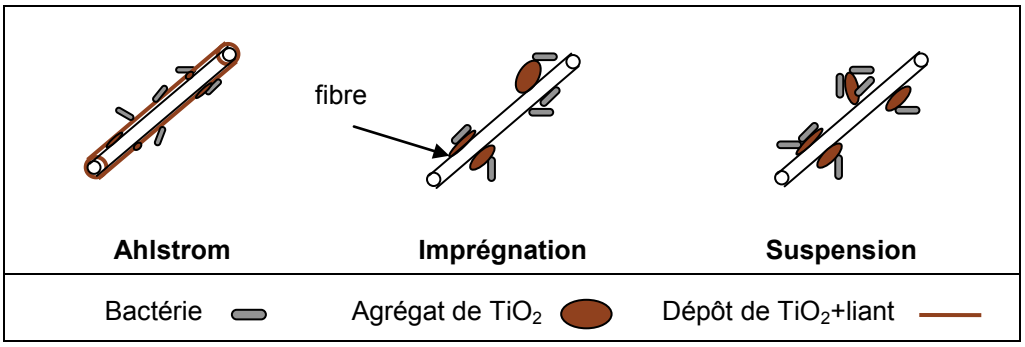



**Figure III.1-6 : Contact $TiO_2$-bactéries selon les supports (échelles non respectées)**

Sur le support Ahlstrom, les fibres sont recouvertes de $TiO_2$ en mélange avec un liant et des zéolithes. Le dioxyde de titane est donc, en partie « emprisonné » et donc inaccessible pour être en contact avec les bactéries. La masse globale de $TiO_2$ de 7,2 mg est donc potentiellement surestimée. Pour le support QMA imprégné de $TiO_2$, la masse est plus faible mais le semi-conducteur, en l'absence de liant, est plus disponible. Cependant, la répartition des bactéries sur les fibres et donc sur le dioxyde de titane n'est pas maitrisée : des bactéries peuvent être sur les fibres sans être en contact avec le photocatalyseur. Enfin, lorsque les bactéries sont en suspension avec le $TiO_2$, avant de les déposer sur le support, le contact est optimal par rapport aux deux autres cas. Par ailleurs, ces hypothèses auraient pu être étayées par des observations au microscope. Cependant, l'enchevêtrement des fibres et le fait que les bactéries pénètrent les filtres en profondeur rendent ces analyses difficiles. Seuls quelques clichés ont pu être réalisés sur des bactéries en suspension avec du $TiO_2$, déposées sur des filtres nucléopores (figure III.1-7). Ces photographies montrent le contact entre les bactéries et le dioxyde de titane.

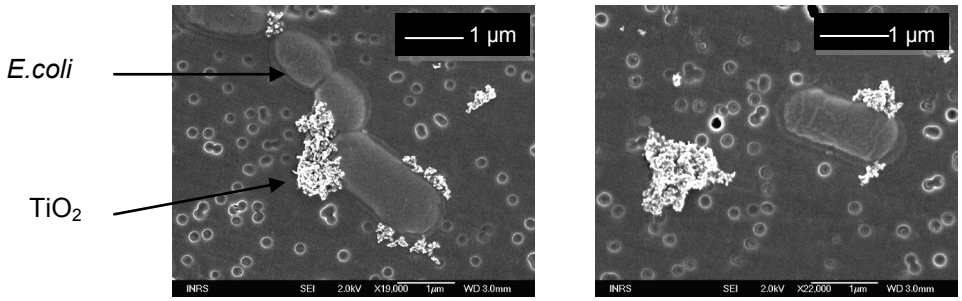



**Figure III.1-7 : *E.coli* en suspension avec du $TiO_2$**

Pour conclure, le processus photocatalytique est plus efficace lorsque le contact entre les bactéries et le dioxyde de titane est optimisé (configuration suspension). Cependant, industriellement, ce type de configuration est délicat, puisqu'il implique la manipulation de nanoparticules de $TiO_2$ supposées cancérogènes (classé cancérogène 2 B par le Centre International de Recherche sur le Cancer). Dans l'optique de développer des procédés propres et sûrs, il convient donc d'immobiliser le dioxyde de titane. Il faut alors veiller à imprégner des supports de façon à optimiser l'accessibilité du $TiO_2$ pour la réaction, tout en assurant son accroche au support pour éviter tout relargage.
Par ailleurs, la question de la pénétration des bactéries sur les différents supports pourraient être étudiée de manière plus précise, puisque selon la disposition des microorganismes dans le media, le flux lumineux ne pourrait en atteindre qu'une certaine proportion.

### III.1.6 EFFET DU $TiO_2$

Deux types de dioxyde de titane ont été mis en œuvre pour réaliser les inactivations : du Degussa P25 et du Millenium PC500, dans deux configurations distinctes (imprégnation et suspension). Rappelons que ces formes diffèrent notamment par leurs compositions (anatase/rutile) et leurs tailles (des particules élémentaires ou des agglomérats). Etant données les dimensions des bactéries, les différences en termes de tailles de pores ou d'aire spécifique n'ont pas tellement d'importance dans le cas présent.

La figure III.1-8 représente l'évolution de la concentration en bactéries viables et cultivables en fonction de la quantité de photons reçue par le $TiO_2$, pour les supports QMA avec du $TiO_2$ PC500 ou P25 qu'ils soient imprégnés ou en suspension.

Ainsi, à configuration identique, le PC500 paraît globalement moins efficace que le P25 dans notre cas, ce qui est en accord avec les conclusions récentes de Lydakis-Simantiris et al. (2010). Cette différence peut s'expliquer par la forme cristalline et/ou par la taille des agglomérats de dioxyde de titane (tableau I.2-1). Selon Nguyen et al. (2005), les agglomérats de $TiO_2$ PC500 sont plus gros (600-700 nm) que ceux de P25 (200-215 nm). Ainsi, pour une quantité identique de $TiO_2$, la surface disponible pour le contact entre les bactéries et le dioxyde de titane est plus élevée pour le P25 que pour le PC500, ce qui peut expliquer les écarts observés.

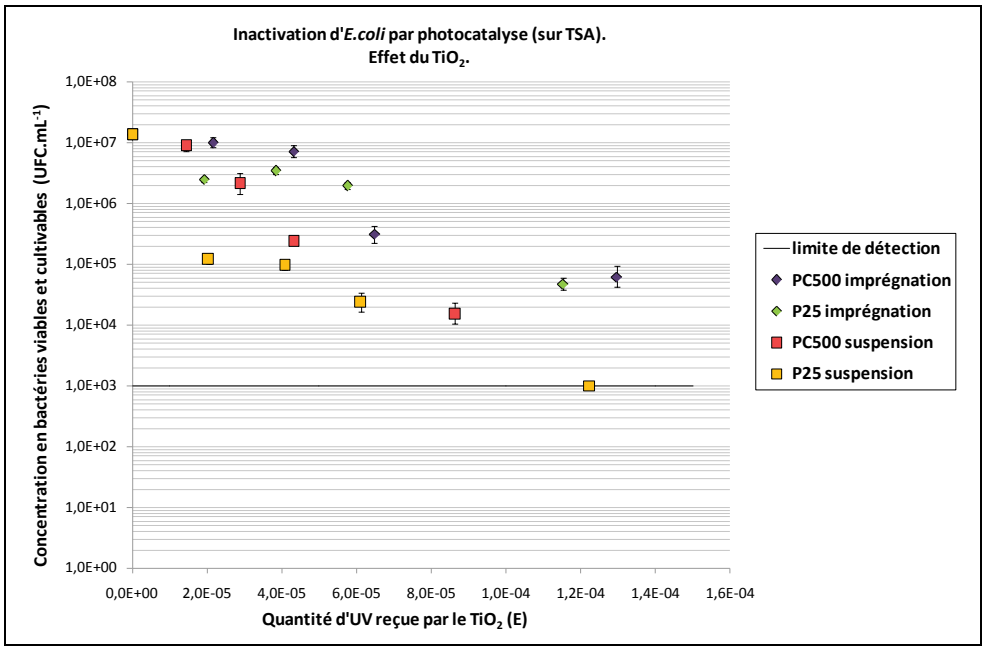



**Figure III.1-8 : Effet du type de $TiO_2$ sur l'inactivation d'*E.coli* après 120 minutes, dénombrement sur TSA**

Ces constatations renforcent le fait que le contact entre les bactéries et le dioxyde de titane est l'élément déterminant d'une inactivation efficace.

### III.1.7 CINETIQUE D'INACTIVATION

D'après la littérature, les cinétiques de désinfection sont classiquement représentées par des modèles empiriques qui ne considèrent généralement que la phase de décroissance log-linéaire du processus.

Ainsi, le modèle de Chick-Watson avec retard semble pouvoir s'appliquer dans le cas présent, en prenant en compte la masse de $TiO_2$ disponible selon les supports utilisés, et en n'examinant que cette phase log-linéaire.

$$\frac{1}{m_{TiO2}}\log\left(\frac{C}{C_0}\right) = \begin{cases} 0 & si \quad t \le t_0 \\ -k''(t-t_0) & si \quad t \ge t_0 \end{cases}$$

Avec k'' : constante cinétique d'inactivation rapportée à la masse de $TiO_2$ ( $k'' = \frac{k'}{m_{TiO2}}$ )

$t_0$ : temps de retard

Ainsi par tracé de $\frac{1}{m_{TiO2}}\log\left(\frac{C}{C_0}\right)$ en fonction de *t*, la pente et l'ordonnée à l'origine donnent accès à k'' et $t_0$ (cf. figures III.1-9).

Par ailleurs, en fonction des supports utilisés, le temps de retard peut être nul ($t_0$ calculé à partir de la pente et de l'ordonnée à l'origine, inférieur ou égal à 0). La courbe de tendance peut ainsi être retracée en considérant le modèle de Chick-Watson sans retard (pointillés) :

$$\frac{1}{m_{TiO2}}\log(\frac{C}{C_0}) = -k''t$$

De plus, si les dénombrements des différents échantillons aboutissent à des valeurs inférieures à la limite de détection, ces points seront exclus des courbes et le modèle de Chick-Watson non retardé sera appliqué (P25 suspension sur TSA, P25 et PC500 suspension sur EMB (cf. annexe 7)) puisque dans ce cas, les processus sont rapidement mis en place.

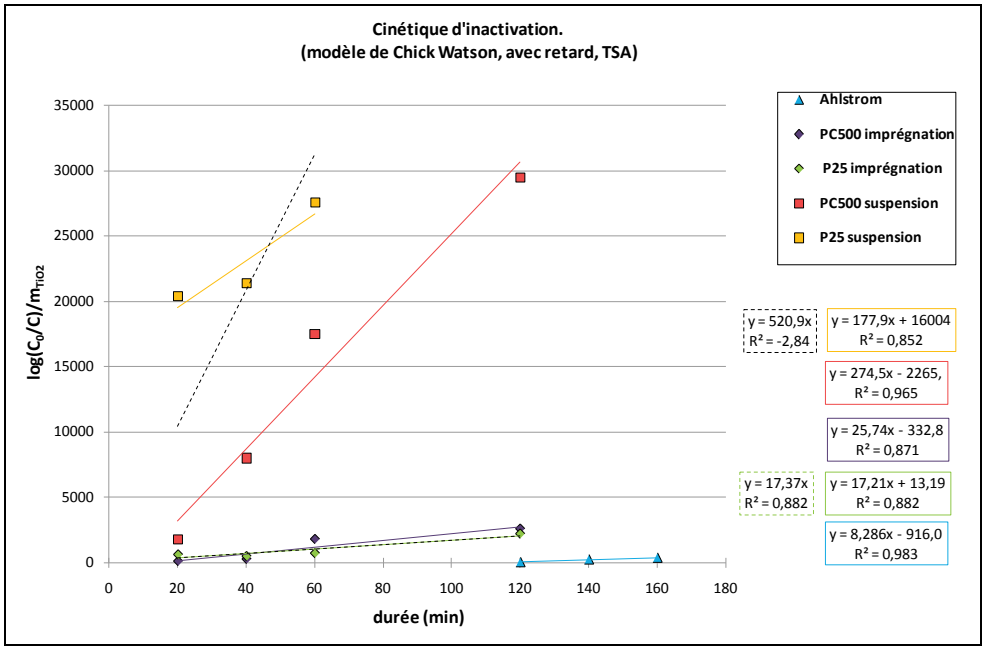



**Figure III.1-9 : Cinétique d'inactivation, en fonction des différents supports photocatalytiques, sur TSA**

Remarque :
L'utilisation du modèle de Chick-Watson sans retard (droite passant par l'origine) peut s'accompagner d'un coefficient $R^2<0$ car les points sont plus éloignés de la droite de tendance.

Le tableau III.1-4 récapitule les valeurs des constantes cinétiques k'' et des temps de retard $t_0$ déterminés en fonction des supports photocatalytiques et des milieux de culture.

| | TSA | | EMB | |
|---|---|---|---|---|
| | k'' ($min^{-1}.g_{TiO2}^{-1}$) | $t_0$ (min) | k'' ($min^{-1}.g_{TiO2}^{-1}$) | $t_0$ (min) |
| Ahlstrom | 8,3 | 110 | 2,9 | 42 |
| PC500 imprégnation | 25,7 | 13 | 22,0 | 0 |
| P25 imprégnation | 17,4 | 0 | 26,9 | 0 |
| PC500 suspension | 274,5 | 8 | 509,1 | 0 |
| P25 suspension | 520,9 | 0 | 682,6 | 0 |

**Tableau III.1-4 : Constantes cinétiques et temps de retard associés aux modèles d'inactivation de Chick-Watson**

Globalement, les supports photocatalytiques sont d'autant plus efficaces que les constantes cinétiques sont élevées : $k''_{P25\ suspension} >> k''_{PC500\ suspension} > k''_{imprégnation\ P25\ et\ PC500} > k''_{Ahlstrom}$.

Ainsi, le support commercial Ahlstrom procure une faible inactivation, puis viennent les supports imprégnés et enfin la configuration suspension, pour laquelle le P25 présente une efficacité plus élevée. Ces observations sont identiques sur les deux milieux de culture et les constantes cinétiques sont équivalentes.

A l'opposé, les temps de retard sont considérablement réduits lorsque la mesure de l'inactivation est réalisée sur le milieu restrictif : par exemple, près de deux heures, sur TSA, contre 40 minutes sur EMB pour le support commercial. Concernant les configurations imprégnation et suspension les temps de retard demeurent faibles sur TSA (≈ 10 minutes) et n'apparaissent plus sur EMB.
Pour conclure, l'endommagement métabolique des cellules est plus rapidement visible sur le milieu restrictif, même si les constantes cinétiques sont du même ordre de grandeur sur chacun des deux milieux.

### III.1.8 FLORE TOTALE : EXPERIENCES

Le processus photocatalytique conduit à l'inactivation des bactéries (diminution de la viabilité-cultivabilité uniquement). Cependant, il est possible que cette technique engendre une perte totale de viabilité des cellules conduisant à leur mort. Afin d'étudier ce phénomène, le dénombrement des bactéries totales (viables et non viables) a été réalisé sur quelques échantillons.

Etant donné les risques d'interférence avec le dioxyde de titane, les expériences ont été menées sur le support commercial pour lequel la quantité de $TiO_2$ dans la solution d'extraction est limitée puisque le semi-conducteur est emprisonné dans un liant.
Ainsi, cinq échantillons ont été dénombrés : un par configuration sur le support Ahlstrom (avec UV/avec $TiO_2$, avec UV/sans $TiO_2$, sans UV/avec $TiO_2$, sans UV/sans $TiO_2$) et un pour la culture liquide.
La figure III.1-10 montre que le $TiO_2$ empêche tout dénombrement des bactéries totales avec le DAPI qui s'y fixe. La fluorescence du dioxyde de titane ne permet pas la distinction des bactéries.

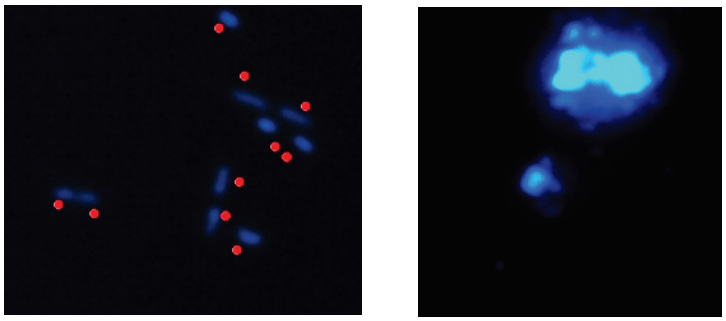


**Figure III.1-10 : Dénombrement des bactéries totales (culture liquide à gauche, échantillon avec $TiO_2$ à droite)**

Les essais de dénombrements de flore totale ont donc été interrompus. Pour réaliser ce type d'analyses dans de meilleures conditions, il serait intéressant de mettre au point un protocole de séparation entre le $TiO_2$ et les bactéries. Cependant, la taille des agrégats de dioxyde de titane est a priori équivalente à la taille des bactéries les plus petites, la séparation n'est donc pas simple. De plus, elle ne doit pas endommager les bactéries, ce qui constitue une contrainte supplémentaire.

Par ailleurs, une autre solution serait d'utiliser des colorants qui ne sont pas excités dans le domaine des UV et qui permettent d'apporter des informations complémentaires à la mesure de la viabilité-cultivabilité (bactéries moribondes…). A titre d'exemple, l'utilisation du kit Baclight $^{TM}$ pourrait être envisagée. Cette technique utilise deux colorants se fixant sur les acides nucléiques : le Syto 9 et l'iodure de propidium. Le syto 9 (excitation 480 nm, émission 500 nm) pénètre les membranes endommagées et intactes et émet une fluorescence verte tandis que l'iodure de propidium (excitation 490 nm, émission 635 nm) ne pénètre que les membranes endommagées en se substituant au syto 9. Les cellules endommagées fluorescent alors dans le rouge (Auty et al., 2001). La question de l'adsorption de ces deux colorants sur le dioxyde de titane peut également se poser. Josset (2008) a en effet montré que le syto 9 et l'iodure de propidium s'adsorbent dans des proportions différentes sur le $TiO_2$.

### III.1.9 ENDOTOXINES

Rappelons qu'*E.coli* est une bactérie à Gram négatif, sa membrane est donc composée d'endotoxines dont les effets sanitaires peuvent s'avérer préoccupants.
Les mécanismes de dégradation photocatalytique d'une bactérie sont encore mal connus. Cependant, il semble que ce processus endommage la membrane bactérienne (Huang et al., 2000). Des endotoxines peuvent donc être potentiellement libérées. L'objectif est donc de mettre en évidence l'aptitude de la photocatalyse à dégrader ces espèces ou non et le cas échéant, de limiter leurs impacts sanitaires.

Les essais ont été réalisés sur trois supports différents : Ahlstrom, imprégnation P25, suspension P25, à partir des essais d'inactivation bactérienne. Cependant, plusieurs interférences expérimentales empêchent une interprétation rigoureuse et aisée des résultats (cf. annexe 8). Ces interférences analytiques proviennent soit du support, soit de la production d'endotoxines par les bactéries et vont être décrites.

- **<u>Quantité d'endotoxines dans une culture liquide d'*E.coli*</u>**

La réalisation des cultures liquides selon le protocole décrit précédemment conduit à des concentrations en flore viable et cultivable répétables ($1{,}3.10^7 \pm 0{,}2.10^7$ UFC.mL$^{-1}$). Cependant, les niveaux d'endotoxines mesurés dans ces cultures présentent quant à eux une grande disparité (cf. tableau III.1-5).

Ainsi, même si les bactéries croissent de façon analogue, leur état physiologique peut être différent d'une culture à l'autre et par conséquent, la quantité d'endotoxines mesurée aussi. Il est donc très difficile de conclure quant à l'impact des différentes configurations (photocatalyse, photolyse, adsorption, témoin) sur la production ou la destruction d'endotoxines.

| | Concentration en flore viable et cultivable ($UFC.mL^{-1}$) | Concentration en endotoxines ($UE.mL^{-1}$) |
|---|---|---|
| Ahlstrom | $1,3.10^7$ | 470 |
| | $1,4.10^7$ | 320 |
| | $1,5.10^7$ | 730 |
| Imprégnation P25 | $1,5.10^7$ | 290 |
| | $1,3.10^7$ | 355 |
| | $1,1.10^7$ | 420 |
| Suspension P25 | $1,5.10^7$ | 230 |
| | $1,3.10^7$ | 585 |
| | $1,2.10^7$ | 325 |

**Tableau III.1-5 : Quantité d'endotoxines dans une culture liquide**

- **<u>Problèmes liés aux supports</u>**

Avant toute chose, il est nécessaire d'utiliser des supports ne contenant pas d'endotoxines. Une dépyrogénéisation est donc effectuée (250 °C pendant 2h00). Les filtres QMA résistent à de telles températures, contrairement au support Ahlstrom. Cependant, des tests préalables ont montré que ce support commercial contient une concentration en endotoxines négligeable (inférieure à la limite de détection de l'analyse). Nous pouvons donc l'utiliser sans dépyrogénéisation, sa stérilité étant assurée par un simple autoclavage (121 °C, 15 minutes).

Le protocole d'analyse des endotoxines (cf. annexe 3) impose une extraction des supports par agitation à 2000 rpm pendant 60 minutes, suivi d'une centrifugation à 2000 g pendant 10 minutes à 4 °C. Cette dernière étape permet d'obtenir un surnageant, contenant les bactéries et les endotoxines, tout en éliminant les fibres des supports puisque l'analyse consiste à mesurer la densité optique à 405 nm des échantillons.

Cependant, ici, les supports photocatalytiques subissent deux protocoles successifs d'extraction : pour les analyses de bactéries viables et cultivables puis pour les endotoxines soit :

- agitation lame microscope+support photocatalytique pendant 10 s à 2500 rpm
- agitation support photocatalytique pendant 30 s à 2500 rpm
- agitation support photocatalytique pendant 60 min à 2000 rpm
- centrifugation à 2000 g pendant 10 min

Les filtres QMA, plus que le support Ahlstrom, sont donc endommagés et de nombreuses fibres sont libérées dans la solution. Ainsi, pour déceler d'éventuels biais dans les analyses, quelques expérimentations simples ont été menées. Des supports ont été désorbés dans l'eau puis agités et centrifugés, conformément à ce protocole, puis la densité optique du surnageant à 405 nm a été mesurée. Le tableau III.1-6 rassemble les valeurs.

D'après ces résultats, il semble que les supports QMA soient très endommagés par l'extraction et que la centrifugation ne suffise pas à obtenir un surnageant clair. De plus, il est difficile d'adapter le protocole puisqu'une centrifugation plus forte éliminerait également les bactéries du surnageant. La proportion d'endotoxines cellulaires ne serait donc pas mesurée. Une étape de filtration ne permettrait pas non plus de séparer les fibres des bactéries.

| | Densité optique à 405 nm |
|---|---|
| $H_2O$ | Zéro appareil |
| Ahlstrom sans $TiO_2$ (1045) | 0,000 |
| Ahlstrom avec $TiO_2$ (1048) | 0,005 |
| Qma vierge | 0,242 |
| Qma imprégné | 0,851 |
| Qma + $TiO_2$ en suspension | 0,288 |

**Tableau III.1-6 : Trouble des solutions d'extraction des différents supports**

Face à ces différentes contraintes expérimentales, la décision a été prise de déterminer l'impact des différentes configurations sur les endotoxines, en partant d'une solution référence et en ne testant que le support Ahlstrom, malgré son efficacité inférieure pour l'inactivation d'*E.coli*.

- **<u>Utilisation d'une solution de référence</u>**

Les essais ont été réalisés à partir d'une solution d'endotoxines de référence à 50 $UE.mL^{-1}$ dont 100 µL ont été déposés sur les différents supports Ahlstrom (préalablement mouillés), puis soumis aux UVA (ou non) pendant 120 minutes. L'extraction des échantillons a été réalisée dans 19,9 mL d'eau p.p.i. Chaque configuration a été réalisée six fois et les résultats sont présentés figure III.1-11.

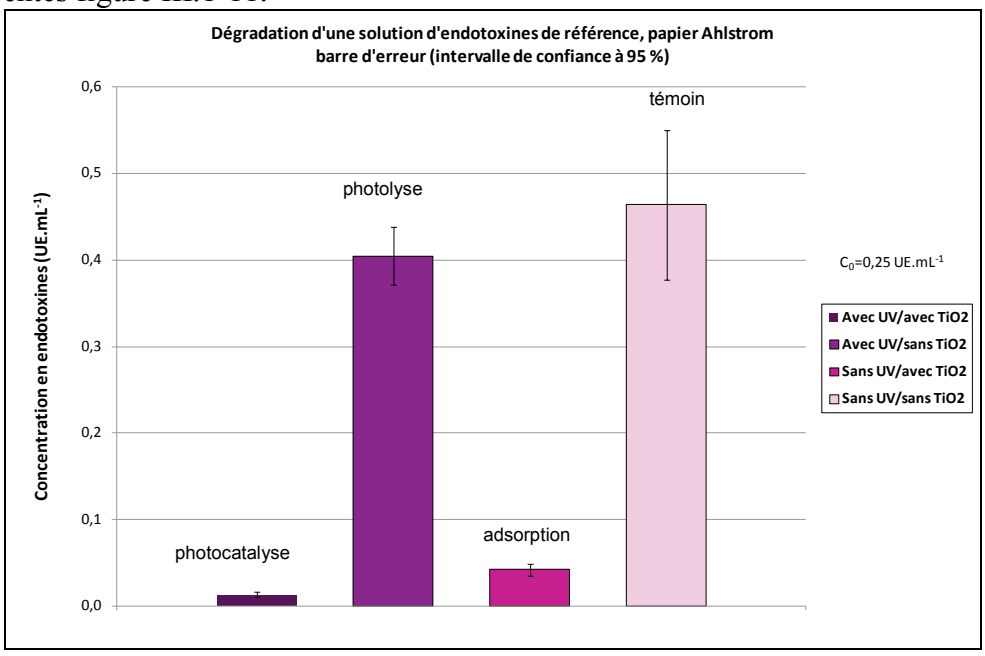



**Figure III.1-11 : Dégradation d'une solution d'endotoxines de référence**

La concentration de la configuration témoin devrait être proche de la concentration initiale (0,25 $EU.mL^{-1}$) or elle est quasiment doublée. Cette observation a été faite sur les six échantillons excluant tout problème expérimental de manipulation. Cependant, il est plausible qu'il y ait des endotoxines sur le support même si les tests préliminaires avaient démontrés le contraire. En effet, entre ces tests et ces essais, quelques mois se sont écoulés entraînant une durée de stockage des échantillons et une contamination possible en endotoxines peut être plus élevée. Par ailleurs, le support Ahlstrom est composé de fibres cellulosiques, et la cellulose est un interférent dans l'analyse des endotoxines. De ce fait, l'impact des différentes

configurations sur la concentration en endotoxines sera identifié par comparaison avec la configuration témoin et non avec la concentration initiale.

Globalement, l'effet des UVA seuls n'est pas mesurable sur les endotoxines. Il n'y a pas de processus de dégradation par photolyse. Par ailleurs, ces lipopolysaccharides semblent pouvoir s'adsorber sur le dioxyde de titane à 90 % ($1-C_{adsorption}/C_{témoin}$) et semblent pouvoir être détruits par photocatalyse à 97 % ($1-C_{photocatalyse}/C_{témoin}$) (auquel il faut enlever l'adsorption). Ainsi en comparant la photocatalyse à l'adsorption, nous aboutissons à un rendement de 70 % ($1-C_{photocatalyse}/C_{adsorption}$).
La photocatalyse permet donc, a priori, la dégradation des endotoxines, ce que l'équipe de Sunada a démontré en parallèle à l'inactivation d'*E.coli* par photocatalyse (Sunada et al., 1998 ; Sunada et al., 2003). Cependant, pour confirmer ces hypothèses, les problèmes analytiques devront être résolus et des expérimentations complémentaires réalisées.

### III.1.10 CONCLUSIONS

L'impact de la photocatalyse sur la viabilité et la cultivabilité d'une bactérie modèle a été étudié sur cinq supports photocatalytiques se différenciant par le type (P25 ou PC500) et la mise en œuvre du dioxyde de titane ($TiO_2$ en imprégnation seul ou avec un liant, ou en suspension).

Ainsi, les supports immobilisant le dioxyde de titane procurent une moins bonne inactivation bactérienne que les supports où le $TiO_2$ est en suspension (Marugán et al., 2006), puisque le contact avec les bactéries est réduit. De façon analogue, le support commercial Ahlstrom, imprégné d'un mélange de dioxyde de titane et de zéolithes dans un liant est nettement moins efficace qu'un support QMA imprégné, en laboratoire, avec le même type de dioxyde de titane. En effet, le semi-conducteur, « noyé » dans ce liant, est beaucoup moins disponible pour un contact direct avec les agents biologiques. Par ailleurs, dans une configuration « suspension » le dioxyde de titane P25 semble plus efficace que le PC500 (Lydakis-Simantiris et al., 2010). Outre les proportions de formes cristallines différentes, la taille des agrégats de PC500 en solution est trois à quatre fois plus importante (Gumy et al., 2006a ; Nguyen et al., 2005). Ainsi, à masse de $TiO_2$ identique, la surface générée par les particules de P25 est plus importante que celle générée par le PC500, ce qui conduit à une inactivation plus élevée.

La mise en contact du $TiO_2$ avec les bactéries est donc une condition nécessaire mais non suffisante puisque le semi-conducteur doit être activé par un rayonnement UV. De plus, pour réellement atteindre des niveaux d'inactivation tels qu'attendus dans un système de désinfection (perte de viabilité de plusieurs log), les expositions doivent être conséquentes (plusieurs dizaines de minutes).

En résumé, cette approche essentiellement qualitative a permis de mettre en évidence que la clé de voute d'une inactivation photocatalytique de bactéries réside dans la mise en contact prolongée des agents biologiques et du dioxyde de titane, sous irradiation.

Ces conclusions, établies à partir d'une approche « batch », fournissent des éléments essentiels quant à la mise en œuvre du traitement d'un bioaérosol dans un réacteur photocatalytique fonctionnant en continu. La prise en compte de ses contraintes oriente le choix de la disposition du catalyseur dans le réacteur. En effet, une solution technologique

consiste à utiliser le support photocatalytique comme un media filtrant actif. Les microorganismes ainsi collectés par filtration seraient en contact avec le $TiO_2$ sur des durées d'irradiation élevées. D'autres phénomènes restent également à étudier ; notamment les capacités de rétention des différents supports utilisés ici pour affiner la sélection, ainsi que le devenir des bactéries une fois inactivées : production de sous-produits de dégradation, ratio du flux de bactéries collectées sur le flux de bactéries minéralisées...

Par ailleurs, ces travaux ont permis d'enrichir les connaissances sur les mécanismes d'action de la photocatalyse sur les bactéries. Effectivement, la comparaison des dénombrements sur deux milieux nutritifs, l'un classique, l'autre restrictif, laisse conclure quant à l'endommagement métabolique des cellules. De plus, la dégradation photocatalytique des endotoxines a pu être mise en évidence. Les enjeux sanitaires liés à la génération de ces lipopolysaccharides issus de la lyse cellulaire des bactéries Gram négatif lors du processus photocatalytique peuvent donc, a priori, être écartés. Cependant, des expérimentations supplémentaires permettraient d'étayer ces propos.

Enfin, la détermination d'un rendement quantique apparent ($\phi$ en UFC.photon$^{-1}$) peut être effectuée à partir de ces expérimentations, pour autant qu'il s'agisse d'un processus à un photon. $\phi$ est défini comme le rapport de la quantité d'unités formant colonies inactivées, sur le nombre de photons absorbés par le dioxyde de titane, pour un support donné. L'ordre de grandeur de $\phi$ est de $10^{-14}$ UFC.photons$^{-1}$ pour chacun des cinq supports. En outre, Sun et al. (1996), ont déterminé le rendement quantique de formation des radicaux hydroxyles à partir de $TiO_2$ en suspension. Il vaut 0,04. Ainsi, pour inactiver une unité formant colonie d'*E.coli*, environ $10^{12}$ $OH^{\bullet}$ sont nécessaires.

L'estimation de ce rendement quantique, tout comme la détermination de la cinétique d'inactivation sont des données nécessaires au dimensionnement d'un dispositif d'épuration photocatalytique pour des applications futures.

# III.2 MINERALISATION D'*E.COLI* PAR PHOTOCATALYSE

La minéralisation d'*E.coli* par photocatalyse a été menée par suivi du dioxyde de carbone dans un réacteur fermé de faible volume. Les supports photocatalytiques utilisés sont les supports fabriqués en laboratoire à partir des filtres en fibres de quartz QMA chargés en $TiO_2$ P25. L'influence de plusieurs paramètres opératoires a été testée : charge initiale en bactéries, configuration des supports photocatalytiques, intensité lumineuse et hygrométrie.

## III.2.1 VERIFICATIONS PREALABLES

Avant tout essai de minéralisation de bactéries par photocatalyse, différentes vérifications préalables ont été menées.
Tout d'abord il est nécessaire de vérifier l'étanchéité des trois réacteurs fermés. La variation de $CO_2$ étant comprise entre 15 et 50 ppm (avec une précision de ± 10 ppm) sur 24h00, les réacteurs sont considérés comme étanches, puisque cette variation est faible par rapport à celles qui devraient être finalement observées lors de la dégradation photocatalytique de bactéries.
De plus, la quantification de $CO_2$ provenant des filtres en fibres de quartz calcinés doit être menée. Les trois types de supports ont été testés (QMA vierge, QMA imprégné, QMA suspension) sans irradiation. L'apport de $CO_2$ variant de 10 à 50 ppm, les filtres en eux mêmes ne sont pas source de dioxyde de carbone, puisqu'une variation identique a été observée pour les essais d'étanchéité.
De même, le relargage de $CO_2$ par des filtres vierges (sans $TiO_2$) avec ou sans bactérie et sous UV-A a fait l'objet d'une vérification. Les résultats montrent qu'un filtre vierge est à la source de 80 ± 10 ppm après 24h00 et qu'un filtre vierge avec bactéries en produit 90 ± 10 ppm sur la même durée. Ainsi, on considère qu'il n'y a pas d'apport de $CO_2$ par des bactéries seules sous UV-A.
Enfin, l'ultime vérification a pour but d'étudier le relargage de $CO_2$ par les différents filtres sur lesquels le $TiO_2$ a été déposé, mais sous irradiation, ce qui signifie que le $TiO_2$ sera actif. La figure III.2-1 montre le profil obtenu. D'après ce graphe, nous remarquons que les filtres contenant du $TiO_2$, mais sans bactérie, sont tout de même source de $CO_2$, malgré l'étape de calcination. Par conséquent, un filtre avec du $TiO_2$ et sans bactérie sera employé comme témoin pour nos différents essais. D'après la figure III.2-1, quelque soit le type de filtre utilisé (suspension ou imprégnation) les résultats sont semblables. Ainsi, pour des raisons pratiques la configuration QMA suspension sera utilisée comme témoin.

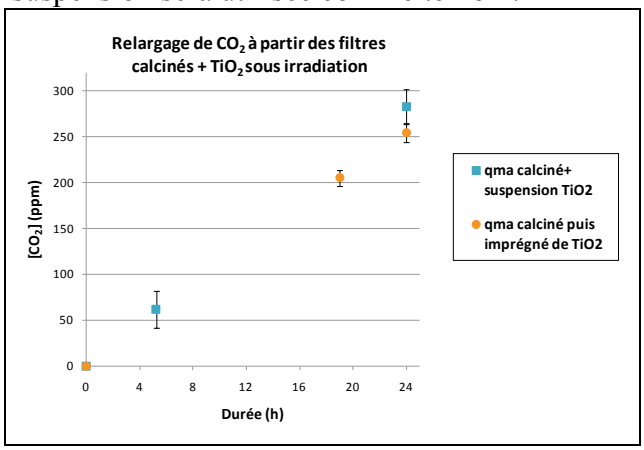



**Figure III.2-1 : Relargage de $CO_2$ des filtres calcinés avec $TiO_2$**

### III.2.2 FLUX LUMINEUX DISPONIBLE POUR LA MINERALISATION

La détermination du flux lumineux a été simulée par lancer de rayons via la méthode de Monte Carlo. Les simulations ont été réalisées à partir de deux quantités de photons (20 000 et 30 000 tirs pour des longueurs d'onde comprises entre 300 et 400 nm). Les résultats, équivalents pour ces deux types de lancers, ont ensuite été moyennés pour aboutir aux valeurs mentionnées dans le tableau III.2-1.

| | Support QMA imprégné de $TiO_2$ P25 | Support QMA + $TiO_2$ P25 en suspension |
|---|---|---|
| Intensité maximale ($1{,}1.10^{-5}$ $E.s^{-1}$) | $4{,}3.10^{-8}$ $E.s^{-1}$soit $1{,}4.10^{-2}$ W | $4{,}5.10^{-8}$ $E.s^{-1}$soit $1{,}5.10^{-2}$ W |
| Intensité minimale ($6{,}2.10^{-6}$ $E.s^{-1}$) | $2{,}4.10^{-8}$ $E.s^{-1}$soit $7{,}8.10^{-3}$ W | |

**Tableau III.2-1 : Flux lumineux disponible pour la minéralisation (flux absorbé par le $TiO_2$ sur chacun des supports)**

A intensité fixe, le flux de photons disponible pour minéraliser les bactéries est légèrement plus important dans la configuration suspension que la configuration imprégnation. Par ailleurs, un rapport de 1,8 est observé entre les flux de photons disponibles à intensité maximale et minimale.

### III.2.1 BILAN CARBONE ET TAUX DE MINERALISATION

Un bilan carbone permet de déterminer la quantité maximale de $CO_2$ produite si le carbone bactérien est totalement transformé en dioxyde de carbone : on parle de minéralisation complète.

Ainsi,

$$n_C = n_{CO_2}$$

Or

$$n_C = \frac{[suspension\ bactérienne] \times V_{déposé} \times m_{sèche} \times \%C}{M_C}$$

Avec

| | | |
|---|---|---|
| $n_C$ | nombre de mole de carbone | *(mol)* |
| $n_{CO2}$ | nombre de mole de dioxyde de carbone | *(mol)* |
| [suspension bactérienne] : | concentration de la suspension bactérienne | *($UFC.mL^{-1}$)* |
| $V_{déposé}$ : | volume de suspension déposé | *(0,5 mL)* |
| $m_{sèche}$ : | masse sèche d'une UFC | *($g.UFC^{-1}$)* |
| %C | proportion de carbone dans une UFC | *(#)* |
| $M_C$ : | masse molaire du carbone | *($12\ g.mol^{-1}$)* |

Les expérimentations nous ont permis d'accéder à la masse sèche d'une UFC et à la proportion de carbone :

- $m_{sèche} = 1{,}1.10^{-12} \pm 3.10^{-13}$ $g.UFC^{-1}$ (sur 36 échantillons)
- %C = 37 ± 10 % (sur 9 échantillons et en cumulant les erreurs sur la masse sèche et sur le nombre d'UFC)

En tenant compte des valeurs déterminées par coulométrie et des données de la littérature, nous considérerons que la proportion de carbone contenue dans une UFC est de 45 %.

Ainsi $$[CO_2]_{ppm} = \frac{[suspension\ bactérienne] \times V_{déposé} \times m_{sèche} \times \%C \times 10^3 \times V_m}{M_C \times V_{réacteur} \times 10^{6}}$$

Avec

| | | |
|---|---|---|
| $[CO_2]$ | concentration en $CO_2$ | *(ppm)* |
| $m_{sèche}$ : | masse sèche d'un UFC | *($1,1.10^{-12}$ g.UFC$^{-1}$)* |
| %C | proportion de carbone dans une UFC | *(0,45)* |
| $V_m$ : | volume molaire à 25°C | *(24,45 L.mol$^{-1}$)* |
| $V_{réacteur}$ : | volume du réacteur fermé pour réaliser la minéralisation | *(290 mL)* |

Il est alors possible de calculer le taux de minéralisation atteint après 72 h d'expérimentation par la relation (II.2-3) :

$$\text{taux de minéralisation} = \frac{\text{quantité } CO_{2\ exp}}{\text{quantité } CO_{2\ minéralisation\ complète}} \times 100 \qquad \textbf{(II.2-3)}$$

Le tableau III.2-2 rassemble les taux de minéralisation atteints après 72 h d'expérimentation, avec les conditions opératoires établies dans le protocole. Ces taux varient en fonction des configurations testées. Ainsi, les influences de la charge initiale en bactéries, de la configuration des supports photocatalytiques, de l'intensité lumineuse et de l'hygrométrie sont discutées dans les paragraphes suivants.

| | | Intensité maximale | | Intensité minimale |
|---|---|---|---|---|
| | | Hygrométrie faible | Hygrométrie forte | Hygrométrie faible |
| QMA imprégné P25 | $C_1$ | 14 % | 6 % | 5 % |
| | $C_2$ | 23 % | 22 % | 17 % |
| | $C_3$ | 29 % | 45 % | 31 % |
| QMA+ suspension P25 | $C_1$ | 20 % | | |
| | $C_2$ | 45 % | | |
| | $C_3$ | 43 % | | |

**Tableau III.2-2 : Taux de minéralisation atteints après 72 h pour les différentes configurations testées (charges bactériennes : $C_1$>$C_2$>$C_3$)**

### III.2.2 EFFET DE LA CHARGE INITIALE EN BACTERIES

Pour chaque variation de paramètre (configuration, intensité lumineuse, hygrométrie) trois charges initiales en bactéries ont été testées.

La figure III.2-2 représente le suivi de la concentration en $CO_2$ normée par rapport à la charge initiale en bactéries, en fonction de la quantité de photons reçue par le dioxyde de titane (flux de photons × durée) pour trois charges initiales en bactéries différentes et dans une condition donnée, sachant que l'évolution est semblable que l'on fasse varier la configuration, l'intensité ou l'hygrométrie.

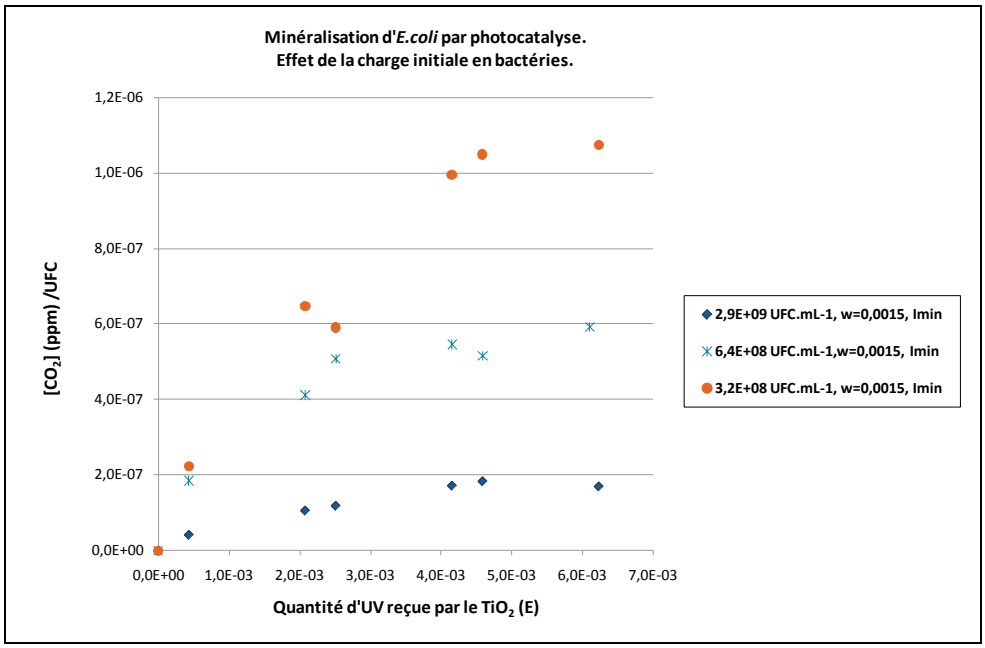



**Figure III.2-2 : Effet de la charge initiale en bactéries sur la minéralisation d'*E.coli* par photocatalyse, en 72 h**
**Configuration imprégnation, intensité minimale, hygrométrie absolue (w) faible**

Ainsi, plus les supports photocatalytiques sont chargés en bactéries plus la formation de $CO_2$ est lente et moins la minéralisation est importante en 72 h.

Une explication possible consiste à considérer la différence d'épaisseur de la couche de bactéries présentes sur le filtre selon la charge initiale. Un calcul rapide permet d'illustrer ces propos.

Considérons un bâtonnet d'*E.coli* de 5 µm de longueur pour 1 µm de diamètre (dimensions acceptables après une croissance optimisée dans un bouillon nutritif à 37 °C pendant 24 h, sous agitation). La surface projetée de la bactérie vaut environ $5.10^{-12}$ $m^2$.

En faisant l'hypothèse qu'une unité formant colonie équivaut à une bactérie (ce qui est le cas le plus favorable pour ce calcul…), il est possible d'estimer la surface, S, qu'occupent les bactéries après dépôt sur le support photocatalytique de $1.10^{-3}$ $m^2$ (disque de 37 mm de diamètre).
Par exemple,

Pour $C_1 = 2{,}9.10^9$ UFC.mL$^{-1}$, S=$7{,}3.10^{-3}$ $m^2$
Pour $C_2 = 6{,}4.10^8$ UFC.mL$^{-1}$, S=$1{,}6.10^{-3}$ $m^2$
Pour $C_3 = 3{,}2.10^8$ UFC.mL$^{-1}$, S=$8.10^{-4}$ $m^2$

Par conséquent, une charge élevée conduit à un empilement de 7 couches de bactéries sur le support photocatalytique, que les photons vont devoir traverser avant d'atteindre le dioxyde de titane et amorcer le processus. Tandis qu'à charge plus faible, l'épaisseur de la couche peut être réduite d'un facteur 10, ce qui permet d'accélérer la production des radicaux hydroxyles.

Par ailleurs, cette estimation est optimiste puisqu'elle est basée sur l'hypothèse qu'une unité formant colonie équivaut à une bactérie ce qui est rarement le cas. L'épaisseur de la couche optique peut être largement plus élevée si l'on considère qu'une UFC équivaut à 10 voire à

100 bactéries. Ceci permet également d'expliquer la raison pour laquelle le taux de minéralisation atteint après 72 h ne dépasse pas 45 % dans le meilleur des cas.

### III.2.3 EFFET DE LA CONFIGURATION DU SUPPORT

L'effet de la configuration du support (imprégnation/suspension) a été étudié à intensité maximale et hygrométrie faible pour trois charges initiales en bactéries.
Les supports présentent des différences en termes de quantité de $TiO_2$ et du flux de photons disponibles pour la minéralisation (cf. tableau III.2-3).

| | Imprégnation | Suspension |
|---|---|---|
| Masse de $TiO_2$ (mg) | 2,64 ± 0,4 (sur 40 filtres) | 0,5 |
| Flux lumineux | $4{,}3.10^{-8}$ E.s$^{-1}$ | $4{,}5.10^{-8}$ E.s$^{-1}$ |

**Tableau III.2-3 : Différences observées pour les deux types de supports**

Le tracé de la concentration en $CO_2$, normée par rapport à la charge initiale en bactéries et à la masse de $TiO_2$, en fonction de la quantité de photons reçue par le catalyseur a permis la prise en compte de ces disparités (cf. figure III.2-3).

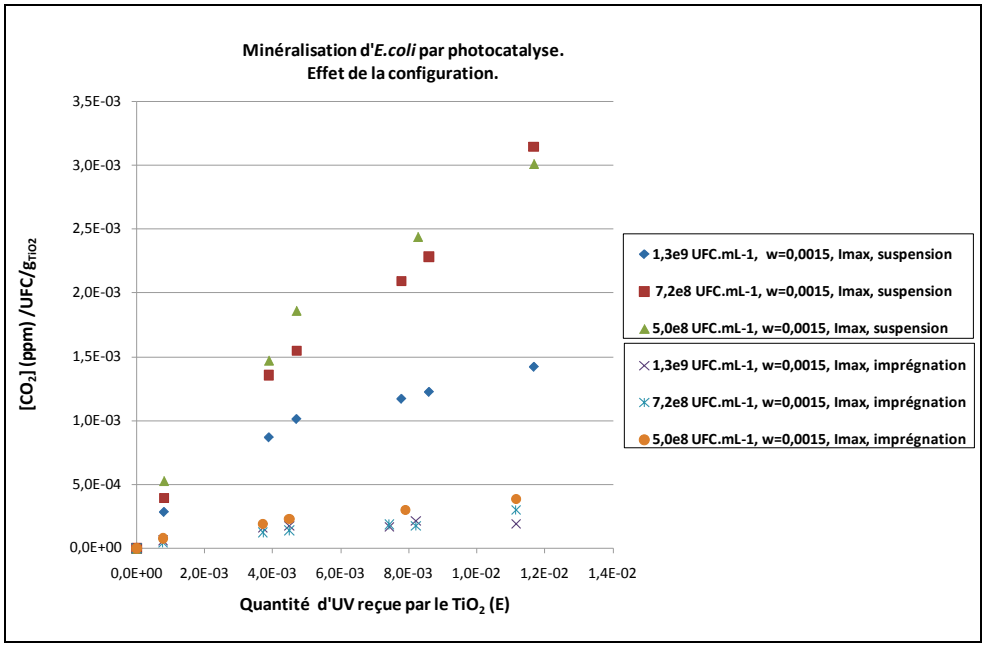



**Figure III.2-3 : Effet de la configuration (suspension/imprégnation) sur la minéralisation d'*E.coli* par photocatalyse, en 72 h**
**Intensité maximale, hygrométrie faible**

Ainsi, la configuration suspension semble plus efficace pour minéraliser les bactéries. Ces résultats vont de paire avec ceux observés pour l'inactivation. La configuration suspension, qui permet d'optimiser le contact entre le dioxyde de titane et les bactéries (cf. figure III.1-6) engendre des taux d'inactivation plus élevés et par conséquent des taux de minéralisation plus poussés. De plus, le dioxyde de titane est a priori plus exposé au rayonnement que dans la configuration imprégnation, ce qui favorise le processus photocatalytique.
Cependant, malgré les avantages de cette mise en forme du $TiO_2$, la fixation du catalyseur sur un support demeure une condition importante pour une application industrielle, pour éviter la manipulation de dioxyde de titane souvent sous forme nanométrique.

### III.2.4 EFFET DE L'INTENSITE LUMINEUSE

L'influence de la dose de photons a été étudiée dans la configuration imprégnation, pour trois charges initiales en bactéries, à hygrométrie fixée. La figure III.2-4 décrit les évolutions de la concentration en $CO_2$, normée par rapport à la charge initiale en bactéries, en fonction de la quantité de photons.

Tout d'abord, il est difficile de conclure de façon définitive quant à l'influence de ce paramètre, seules quelques tendances peuvent être avancées.
En effet, à charges initiales en bactéries moyenne et basse, une augmentation de la quantité de photons ne permet pas une minéralisation des bactéries plus importante. Cependant, à charge plus élevée, il est possible que l'apport de photons supplémentaires permette une meilleure conversion des bactéries en $CO_2$. Toutefois, les niveaux de concentrations utilisés pour obtenir cette charge élevée sont statistiquement différents, et le taux de conversion le plus important est obtenu, certes pour un flux de photons supérieur, mais également pour une charge plus faible ce qui favorise également la minéralisation. Ainsi, la quantité de photons disponible pour la minéralisation n'est pas forcément un paramètre déterminant pour obtenir des taux de conversion élevés (dans les gammes utilisées ici).

### III.2.5 EFFET DE L'HYGROMETRIE

L'effet de l'hygrométrie a été étudié dans la configuration imprégnation, à intensité maximale et pour trois charges initiales en bactéries. La figure III.2-5 représente la progression de la concentration en $CO_2$, normée par rapport à la charge initiale en bactéries, en fonction de la quantité de photons.

De manière analogue à l'intensité lumineuse, l'effet de l'hygrométrie n'est pas identique pour les trois charges initiales en bactéries.
A charges élevée et moyenne, les courbes sont très proches ce qui permet de conclure qu'il n'y a pas de réel effet de l'hygrométrie. Cependant, à faible teneur initiale en bactéries, une hygrométrie absolue décuplée conduit à une minéralisation plus élevée (45 % contre 29 %), s'expliquant par une quantité de radicaux hydroxyles plus importante pour initier les processus photocatalytiques. En outre, les niveaux de concentrations utilisés pour obtenir cette charge faible sont également statistiquement différents, et le taux de conversion le plus important est obtenu, pour une hygrométrie plus élevée, effectivement, mais aussi pour une charge plus faible, ce qui favorise également la minéralisation. Dans l'impossibilité de découpler ces deux phénomènes, l'effet de l'hygrométrie ne peut être qu'envisagé et non confirmé.

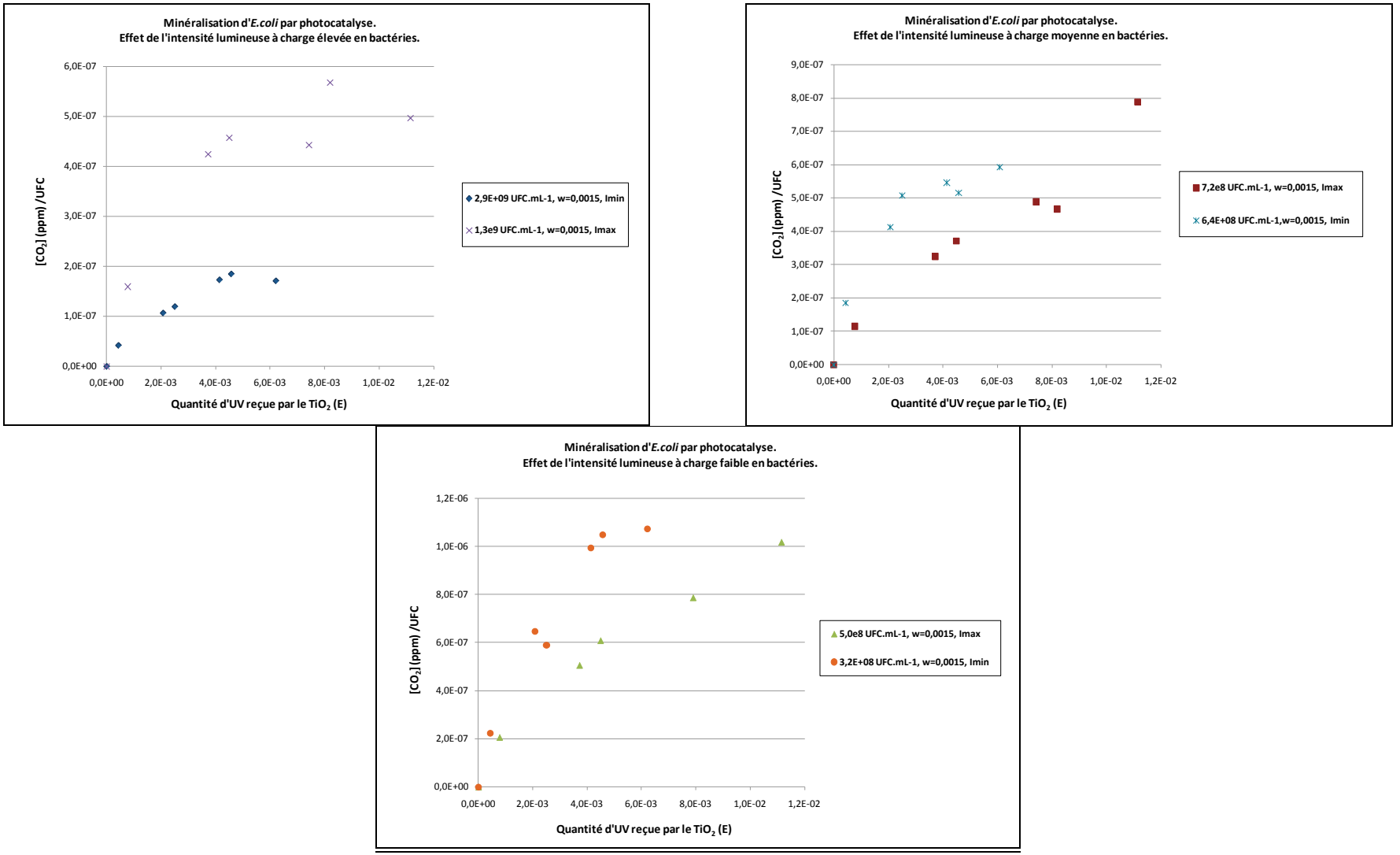



**Figure III.2-4 : Effet de l'intensité lumineuse sur la minéralisation d'*E.coli* par photocatalyse, en 72 h**
**Configuration imprégnation, hygrométrie faible**

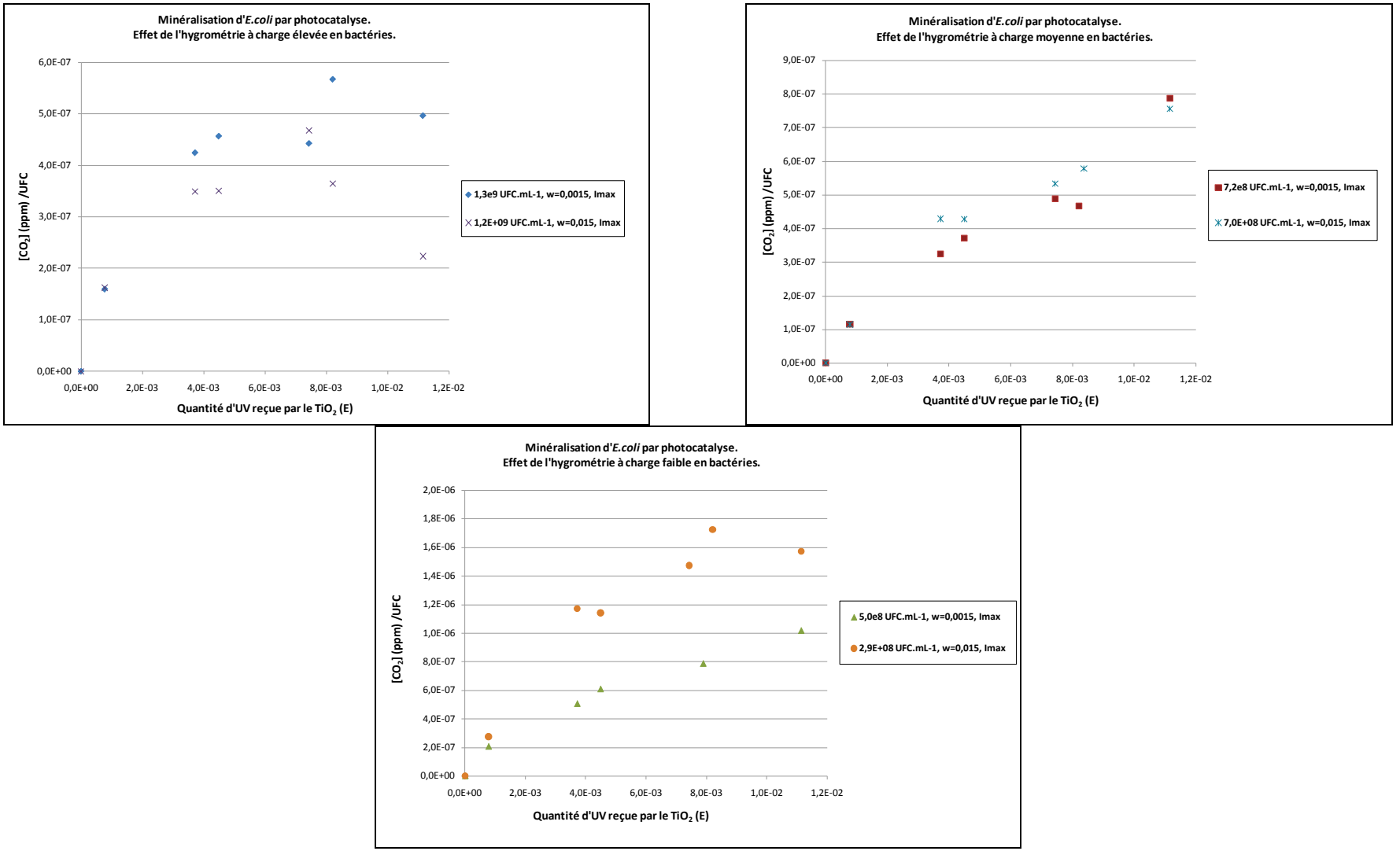



**Figure III.2-5 : Effet de l'hygrométrie sur la minéralisation d'*E.coli* par photocatalyse, en 72 h**
**Configuration imprégnation, intensité maximale**

### III.2.6 DISCUSSION GENERALE

L'étude expérimentale de la minéralisation d'*E.coli* par photocatalyse a permis de mettre en évidence que la charge initiale en bactéries des filtres doit être la plus faible possible pour que la minéralisation soit optimale.
Les influences de l'hygrométrie et l'intensité lumineuse n'ont pas pu être mises en évidence de façon probante. Seules quelques hypothèses ont pu être avancées : par exemple un apport de photons plus important et un taux d'hygrométrie plus élevé pourraient favoriser la minéralisation des bactéries. Ces conclusions sont conformes aux évolutions classiquement observées en photocatalyse puisque ce processus photochimique est excité photoniquement. Ainsi, un apport de photons permet de générer plus de paires électrons-trous et de mieux dégrader les espèces adsorbées à la surface du semi-conducteur. Cependant, ce processus est limité par la recombinaison plus rapide de ces paires électrons-trous à forte intensité (Yang et al., 2008). Par ailleurs, l'apport de molécules d'eau à travers un fort taux d'humidité engendre une formation de radicaux hydroxyles plus importante. Ces radicaux sont très souvent reconnus comme les espèces les plus actives pour dégrader les polluants. Ainsi, une forte présence de radicaux hydroxyles favorisent la réaction. Toutefois, dans le cas traditionnel de la dégradation de composés chimiques, ces radicaux peuvent rentrer en compétition sur les sites actifs du catalyseur avec les espèces à dégrader et diminuer l'effet : il s'agit d'adsorption compétitive. Cependant, dans le cas des bactéries, on ne peut parler d'adsorption des agents biologiques sur les sites actifs du catalyseur, étant donnée leur taille. Il n'y a donc a priori pas de compétition possible. Un apport d'eau devrait rendre le processus plus efficace.
Par conséquent, le paramètre à prendre en compte en premier lieu semble être la charge initiale en bactéries.

Pour qu'un procédé d'épuration photocatalytique soit applicable industriellement, il doit permettre la minéralisation des bactéries. Les tests menés en laboratoire ont démontré que cette minéralisation est possible mais que les processus sont longs (à peine 45 % en 72 h). A plus faible charge, la minéralisation serait sans doute plus rapide et pourrait être favorisée par un taux d'hygrométrie moyen (HA =0,01 correspondant à 50 % d'humidité relative à 25 °C par exemple) et par une illumination du catalyseur adéquat. Il peut donc être intéressant de calculer les charges en bactéries potentiellement collectées sur un filtre photocatalytique positionné dans un système de traitement d'air, pour différentes situations de travail.
A titre d'exemple deux situations limites, représentatives d'une atmosphère peu polluée (édifice à bureaux) d'une part, et d'une atmosphère plus fortement chargée (bâtiments couverts dans les stations d'épuration d'eaux usées) d'autre part, peuvent être étudiées. Classiquement, pour une filtration de l'air à haute efficacité, les vitesses de filtration sont de l'ordre de 0,02 $m.s^{-1}$ tandis que pour une filtration plus grossière type poussières de bois, de ciment, une valeur de 0,1 $m.s^{-1}$ est communément employée (Bémer et al., 2006). Les calculs, établis pour ces deux conditions de filtration, ont pour objectif de donner des ordres de grandeurs sur la charge initiale en bactéries rencontrée en situation réelle et de la comparer aux valeurs expérimentées ici (cf. tableau III.2-4). Dans nos essais menés en laboratoire la charge initiale minimale vaut $1,5.10^{11}$ $UFC.m^{-2}$ contre $1,5.10^{12}$ $UFC.m^{-2}$ pour la maximale.
D'après nos estimations, ces valeurs ne seraient toujours pas atteintes après un an de fonctionnement du dispositif de filtration, ce qui laisse envisager que la minéralisation des bactéries serait possible, à faible charge, en situation réelle. Précisons que ces calculs considèrent la surface totale du filtre comme surface de filtration. Si l'estimation est réalisée sur la surface des fibres, avec une porosité de 0,9 pour le filtre, par exemple, on obtient un facteur 10 fois plus important sur les charges bactériennes collectées.

Précisons que, expérimentalement, l'utilisation de fortes charges initiales en bactéries était indispensable pour détecter et mesurer distinctement la production de dioxyde de carbone issu de la dégradation des bactéries par photocatalyse.

| | Traitement des eaux usées | | Bureau de 20 personnes | |
|---|---|---|---|---|
| Débit d'extraction ($m^3.h^{-1}$) | 5000 (INRS, 2003) | | 500 (Article R. 232-5-3 du code du travail) | |
| Concentration en bactéries totales ($UFC.m^{-3}$) | $10^4$ (Goyer et al., 2001) | | $10^2$ (Goyer et al., 2001) | |
| | $U_f$=0,02 $m.s^{-1}$ | $U_f$=0,1 $m.s^{-1}$ | $U_f$=0,02 $m.s^{-1}$ | $U_f$=0,1 $m.s^{-1}$ |
| Surface de filtration ($m^2$) | 70 | 14 | 7 | 1,4 |
| Charge en bactéries sur les filtres ($UFC.m^{-2}_{filtre}$) après : | | | | |
| - 1 semaine | $1,2.10^8$ | $6,5.10^8$ | $1,2.10^6$ | $6,5.10^6$ |
| - 1 mois | $5,2.10^8$ | $2,6.10^9$ | $5,2.10^6$ | $2,6.10^7$ |
| - 1 an | $6,3.10^9$ | $3,2.10^{10}$ | $6,3.10^7$ | $3,2.10^8$ |

**Tableau III.2-4 : Charge en bactéries sur les filtres, pour deux situations de travail**

Par ailleurs, les essais de minéralisation donnent accès à un rendement quantique global apparent défini par le rapport du nombre de moles de carbone transformé (nombres de moles de $CO_2$ produites) sur le nombre de moles de photons en 72 h. Il est de l'ordre de $10^{-4}$ pour des taux de minéralisation avoisinant les 45 % dans le meilleur des cas. La minéralisation des bactéries par photocatalyse est donc a priori, une réaction par stade.

A partir de ces données établies en laboratoire, un calcul rapide permet d'apporter des informations quant à la possibilité de minéraliser des bactéries en situation réelle.
Expérimentalement, le flux lumineux disponible est de l'ordre de $10^{-8}$ $E.s^{-1}$ pour un support photocatalytique de $10^{-3}$ $m^2$ contenant environ 2 $g.m^{-2}$ de $TiO_2$. Ainsi, en supposant qu'industriellement la charge en dioxyde de titane soit conservée, un flux de photons de $7.10^{-4}$ $E.s^{-1}$ devrait permettre l'irradiation d'un support de 70 $m^2$ (en supposant qu'une solution technologique permette un éclairement du support convenable). Connaissant la charge en bactéries sur les filtres au cours du temps (cf. tableau III.2-4) et le rendement quantique de la réaction, il est possible de calculer qu'il faut environ une minute pour « minéraliser » $10^8$ $UFC.m^{-2}$ (charge hebdomadaire).

Par conséquent, le flux de photons ne semble pas être un facteur limitant dans le processus de minéralisation des bactéries par photocatalyse. Il s'agit bien d'optimiser le contact entre le dioxyde de titane et les bactéries avant tout.

Pour conclure, il pourrait être envisageable de vouloir décrire les processus de dégradation photocatalytique de bactéries par des modèles établis à partir des données expérimentales. Ces modèles, pour être complets, devraient prendre en compte le processus dans sa globalité (inactivation et transformation progressive de la matière) en faisant intervenir les paramètres d'influence. Cependant, dans l'état actuel des connaissances, seule une approche qualitative a pu être abordée ici, en découplant les différentes étapes de dégradation et en mettant en exergue les paramètres importants sans pour autant pouvoir quantifier de manière précise leurs incidences. L'établissement de modèles semble donc prématuré. D'autant plus que les essais ont été menés sur une bactérie type. Pour tenter de se rapprocher d'un cas plus réel, des

tests pourraient être réalisés sur un consortium d'espèces biologiques (bactéries, moisissures, spores…).

# III.3 PREREQUIS A L'INACTIVATION D'UN BIOAEROSOL

## III.3.1 CARACTERISTIQUES DU BIOAEROSOL

### III.3.1.1 Signature granulométrique

La génération d'eau ultrapure stérile (à partir d'air filtré à 0,01 µm), préalablement à la génération du bioaérosol, permet de mettre en évidence la présence de particules qui ne sont pas des microorganismes ou des débris de microorganismes mais qui sont issues d'impuretés présentes dans l'eau ultrapure (particules solides ou impuretés sous forme dissoutes qui cristallisent après séchage complet des gouttelettes (Ho et al., 1988 ; Krarnes et al., 1991)). Ces particules résiduelles qui ne représentent qu'au plus 3 % du nombre total de particules dans une classe granulométrique du bioaérosol, possèdent une signature granulométrique différente des cellules d'*E.coli* générées (cf. figure III.3-1). En effet, les particules composant le bioaérosol possèdent des diamètres optiques compris entre 0,4 et 2 µm alors que les particules résiduelles présentent un mode plus fin.

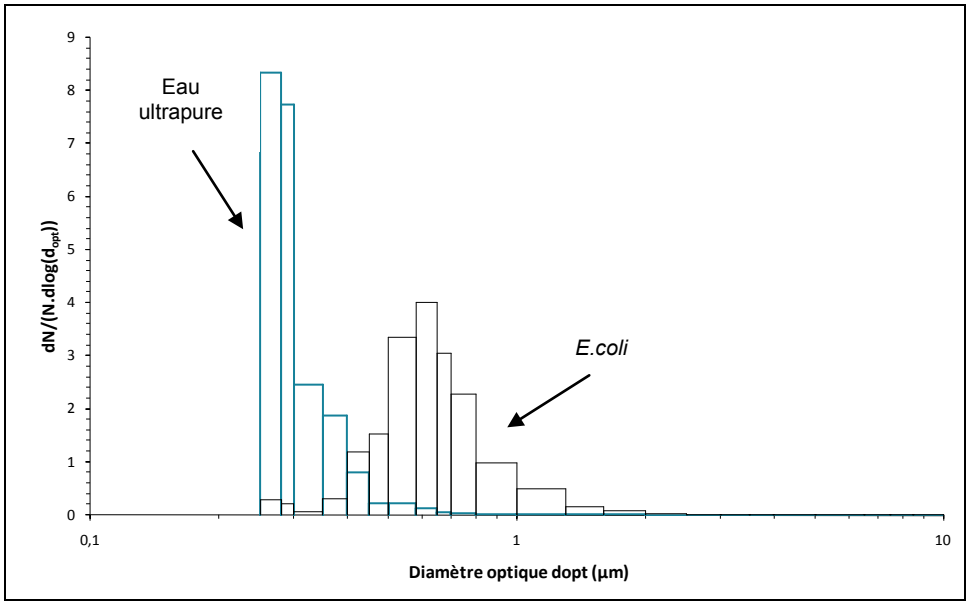



**Figure III.3-1 : Comparaison des distributions granulométriques en nombre en fonction du diamètre optique des particules pour les particules résiduelles d'eau et pour le bioaérosol expérimental d'*E.coli* (Simon et al., 2009b)**
**$Q_G$=2,5 L.min$^{-1}$-$Q_E$=20 L.min$^{-1}$ pour HR=50 ± 2%, $H_{liq}$=8 mm**

La distribution granulométrique polydispersée des particules d'*E.coli* s'explique en partie par l'hétérogénéité de la taille des cellules dans la suspension bactérienne, mais aussi par le fait que ces particules non-isométriques peuvent s'orienter différemment lorsqu'elles traversent la cellule de mesure du compteur optique.

### III.3.1.2 Stabilité des paramètres physiques et biologiques

Les figures III.3-2 et III.3-3 représentent les évolutions de la concentration numérique en particules et de la concentration en bactéries viables et cultivables normées. Ce traitement des

données permet de mettre facilement en évidence une évolution, puisque si ces paramètres étaient parfaitement stables, les concentrations normées seraient égales à l'unité.

Ces graphes résultent de plusieurs essais dont les dispersions sont caractérisées par des écarts types représentés par les courbes enveloppes grises pour les données physiques et par les barres d'erreur pour les données biologiques.

La concentration numérique en particules de diamètre d'intérêt demeure relativement stable pendant les 60 premières minutes, puis augmente (cf. figure III.3-2). Les résultats des différents essais montrent qu'il faut s'attendre à une élévation de la concentration en nombre initiale de l'ordre de 8 % (entre 4 et 12 %) pour 120 minutes de génération, puis d'environ 13 % (entre 8 et 17 %) pour 180 minutes. Par ailleurs, la distribution granulométrique n'évolue pas puisque le diamètre optique médian se stabilise à 0,63 µm avec un écart type géométrique de 1,23 µm.

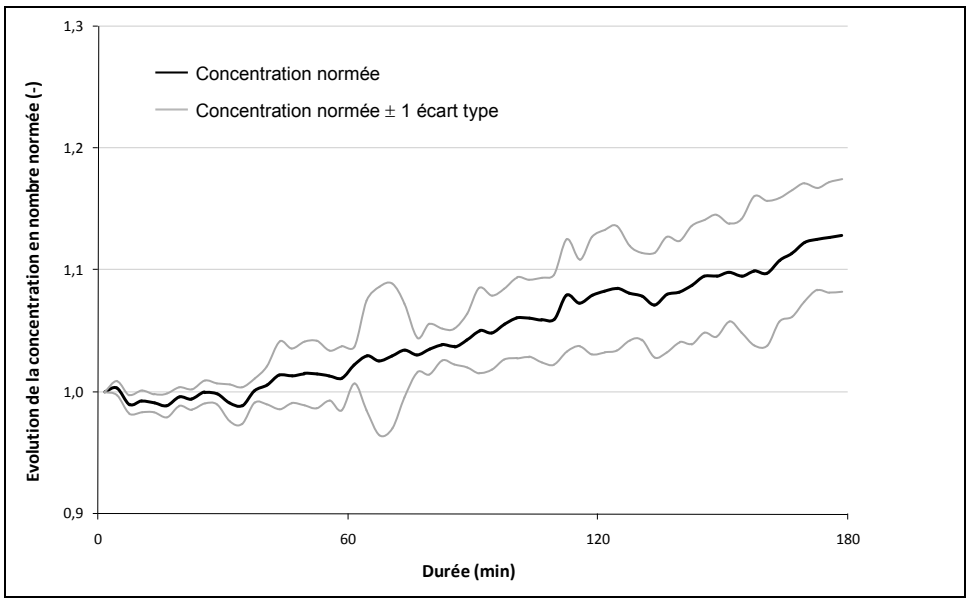



**Figure III.3-2 : Evolution des valeurs de concentration normée en nombre de particules (dopt>0,4 µm) sur 180 minutes (Simon et al., 2010b)**
**$Q_G$=2,5 L.min$^{-1}$-$Q_E$=20 L.min$^{-1}$ pour HR=50 ± 2%, $H_{liq}$=8 mm**

En ce qui concerne la concentration normée en bactéries viables et cultivables, une augmentation est également observée sur une génération de trois heures (cf. figure III.3-3). En effet, la concentration mesurée pendant les 30 premières minutes de fonctionnement est multipliée par un facteur compris entre 1,25 et 1,5 pendant l'heure suivante. Si la génération est maintenue pendant plus de 90 minutes, la concentration peut être multipliée par un facteur compris entre 1,5 et 2 pouvant s'expliquer par une accumulation progressive de matière biologique au niveau du fritté.

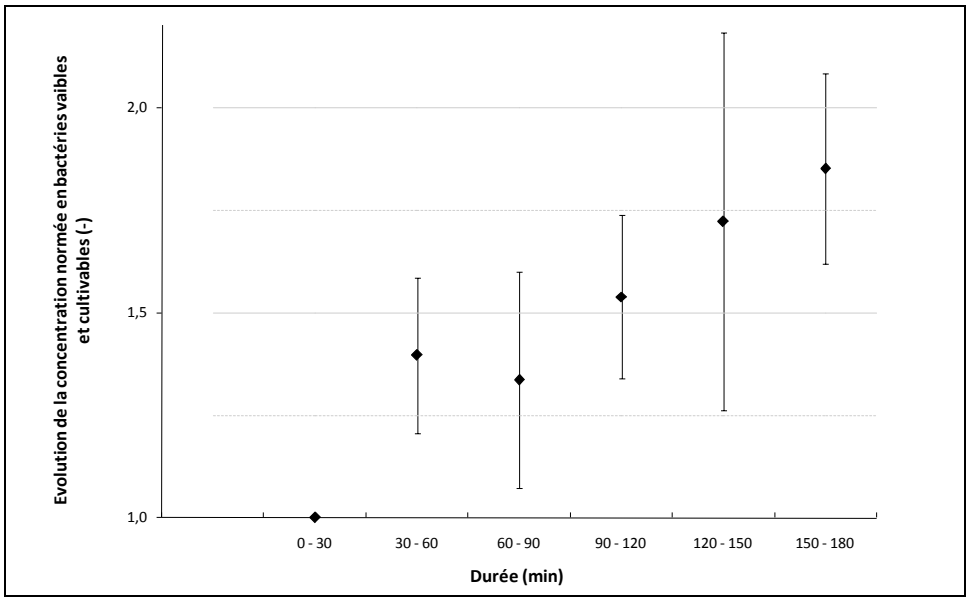



**Figure III.3-3 : Evolution des valeurs de concentration normée en bactéries viables et cultivables sur 180 minutes (barres d'erreur : écart type) (Simon et al., 2010b)**
**$Q_G$=2,5 L.min$^{-1}$-$Q_E$=20 L.min$^{-1}$ pour HR=50 ± 2%, $H_{liq}$=8 mm**

### III.3.1.3 Gamme de concentration et reproductibilité

Les gammes de concentrations atteignables avec le générateur sont étendues que ce soit en nombre des particules (entre $4.10^5$ et $3.10^8$ #.m$^{-3}$) ou en bactéries viables et cultivables (entre $2{,}5.10^4$ et $2.10^7$ UFC.m$^{-3}$) (cf. figure III.3-4). Le dispositif de génération ainsi conçu permet de simuler un grand nombre de situations de travail à la base des niveaux d'exposition différents. Précisons que les limites inférieures et supérieures pourront potentiellement être modifiées par diminution ou augmentation du débit de génération d'une part, ou par dilution ou concentration de la suspension bactérienne d'autre part.

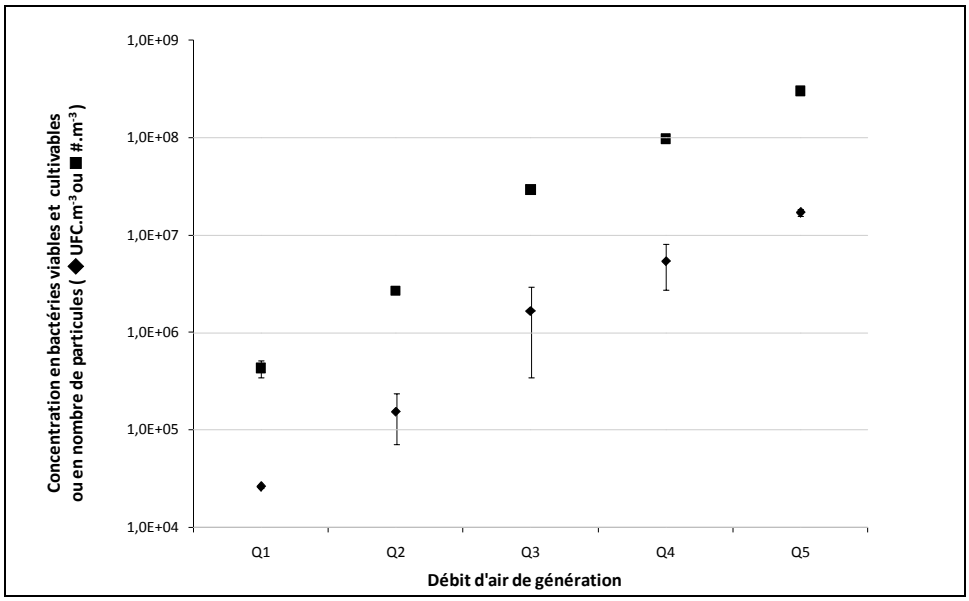



**Figure III.3-4 : Evolution des concentrations en nombre de particules (dopt>0,4 µm) et en bactéries viables et cultivables en fonction du débit de génération (barres d'erreur : écart type) (Simon et al., 2010b)**
**$Q_G$ variable-$Q_E$=20 L.min$^{-1}$ pour HR=50 ± 2%, $H_{liq}$=8 mm**

Les niveaux de concentration en nombre de particules sont reproductibles, de manière satisfaisante, dans la mesure où ce paramètre est mesuré instantanément et, éventuellement ajusté au début de la génération. A l'inverse, les variations sont plus importantes pour la reproductibilité de la concentration en bactéries viables et cultivables dans l'aérosol. Elle reste cependant satisfaisante pour débuter les essais de dégradation photocatalytique d'un bioaérosol expérimental d'*E.coli*. Les différences observées entre le nombre de particules et le nombre de bactéries viables et cultivables peuvent être affectées à la proportion de bactéries mortes ou viables et non cultivables.

Pour conclure, les résultats permettent d'envisager l'utilisation de ces bioaérosols artificiels dans un grand nombre de futurs essais expérimentaux, y compris des essais de tests d'appareil de protection collective tel qu'un réacteur photocatalytique.

### III.3.2 RECEPTION DU REACTEUR

Le bioaérosol expérimental ainsi généré sera dégradé dans un réacteur photocatalytique continu. Préalablement à ces essais, il paraît judicieux de s'assurer de son bon fonctionnement et/ou de déceler d'éventuels problèmes. Dans cette optique, le réacteur est réceptionné par la mise en place d'un test de dégradation photocatalytique d'un polluant chimique, l'éthanol, sur le support commercial Ahlstrom. L'objectif est de vérifier l'influence des paramètres opératoires sur cette dégradation, puisque ces tendances ont déjà été étudiées au laboratoire, dans d'autres réacteurs, et sont largement décrites dans la littérature (Kim et al., 2004 ; Nimlos et al., 1996 ; Piera et al., 2002 ; Sauer et al., 1996). Des évolutions conformes aux tendances habituelles permettront de conclure quant au fonctionnement correct du réacteur.

- **Effet de la concentration initiale**

La figure III.3-5 montre que la quantité d'éthanol dégradée augmente avec la concentration initiale, mais tend vers un palier.

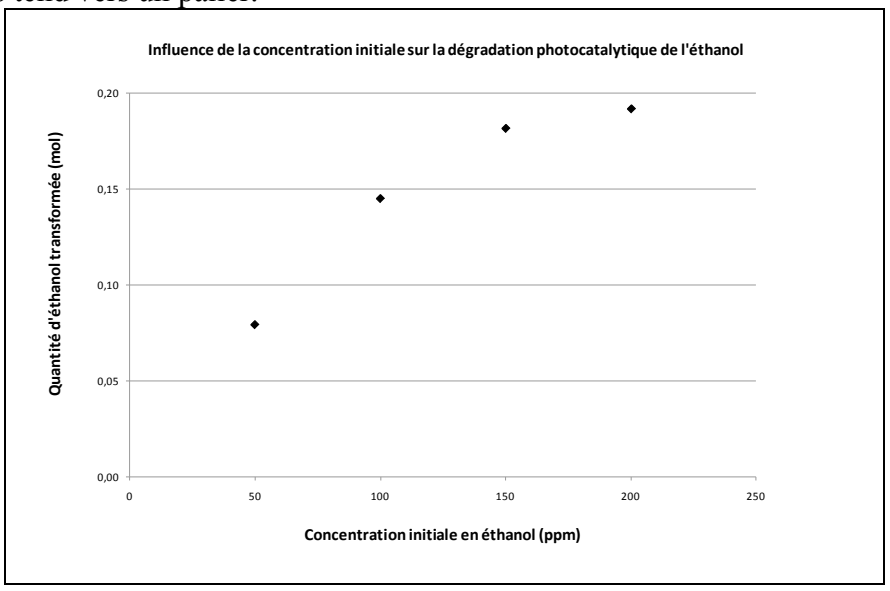



**Figure III.3-5: Influence de la concentration initiale en polluant**
**(Q= 20 L.min$^{-1}$ (12s), HA=0,006, 6 lampes, $C_0$ variable)**

Ceci est probablement dû au fait que pour des faibles concentrations, les sites actifs sont peu occupés, donc une grande quantité d'éthanol réagit. Au contraire, pour des fortes concentrations en polluant, le nombre de photons reste identique alors que les molécules d'éthanol sont plus nombreuses ce qui encombre davantage les sites actifs du catalyseur et amoindrit l'efficacité.

- **Effet de l'irradiation**

La variation globale de l'irradiation est réalisée par modification du nombre de lampes allumées. Les différences observées sur les rendements de dégradation sont importantes pour les essais avec quatre ou deux lampes (cf. figure III.3-6). Cet écart s'explique par la quantité de photons émis par la lampe et absorbés par le catalyseur. En revanche entre quatre et six lampes aucune amélioration n'est constatée. Quatre lampes permettent sans doute un apport de photons suffisant (pour une concentration de 150 ppm). A préciser qu'il existe a priori des répartitions de photons dans l'espace différentes selon le positionnement des lampes allumées. Des essais supplémentaires pourraient être réalisés avec les 6 lampes entourées d'un grillage pour diminuer l'intensité, mais garder une irradiation homogène dans l'espace.

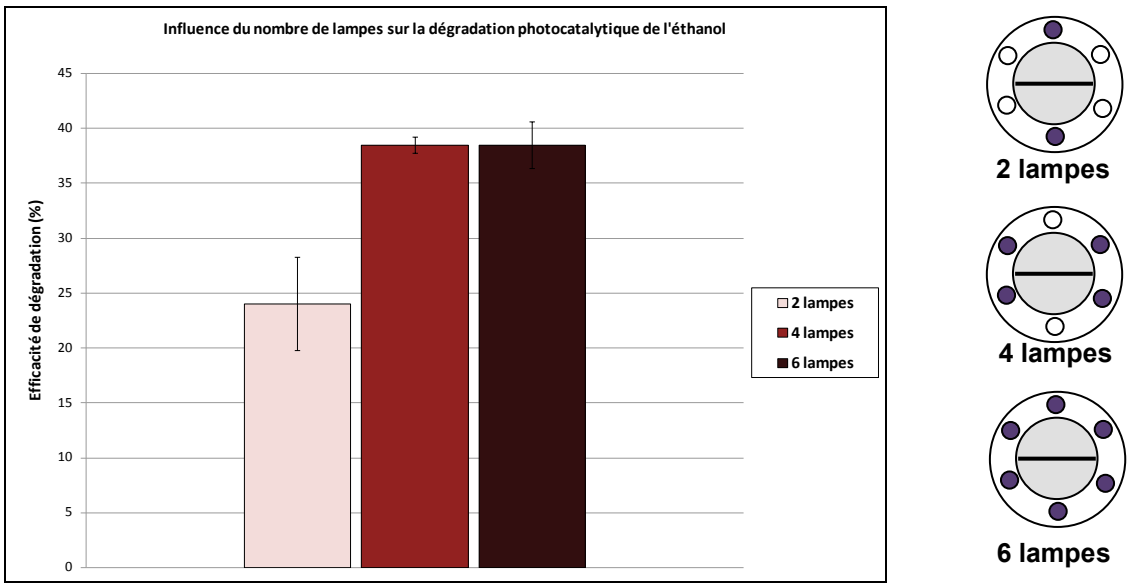



**Figure III.3-6: Influence du nombre de lampes (barres d'erreur : écart type)**
**(Q= 20 L.min$^{-1}$ (12s), HA=0,006, $C_0$=150 ppm, nombre de lampe variable)**

- **Effet de l'humidité relative**

La figure III.3-7 met en évidence que, dans nos conditions, l'efficacité de dégradation photocatalytique de l'éthanol augmente avec l'humidité.

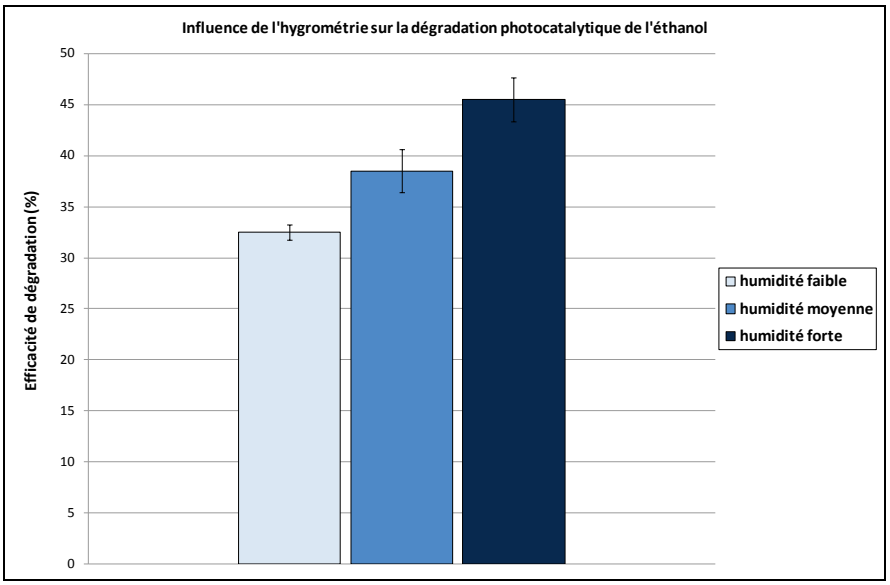



**Figure III.3-7 : Influence de l'humidité (barres d'erreur : écart type)**
**(Q= 20 L.min$^{-1}$ (12s), $C_0$=150 ppm, 6 lampes, hygrométrie absolue variable : 0,0003 ; 0,006 ; 0,016)**

En effet, plus l'hygrométrie est élevée, plus la quantité de radicaux $OH^{\bullet}$ formés est importante. Les interactions entre l'éthanol et ces radicaux sont donc favorisées (liaisons hydrogène) ce qui permet une meilleure dégradation.

- **<u>Effet du temps de passage-temps de contact</u>**

La réaction photocatalytique nécessite une adsorption du polluant sur le catalyseur, qui est fonction, en premier lieu, de la diffusion externe du polluant vers la surface du catalyseur. En flux léchant ce transport vers la surface est favorisé par un temps de contact élevé au sein du réacteur. Les rendements de dégradation sont ainsi optimisés pour des débits de fonctionnement faibles (cf. figure III.3-8).

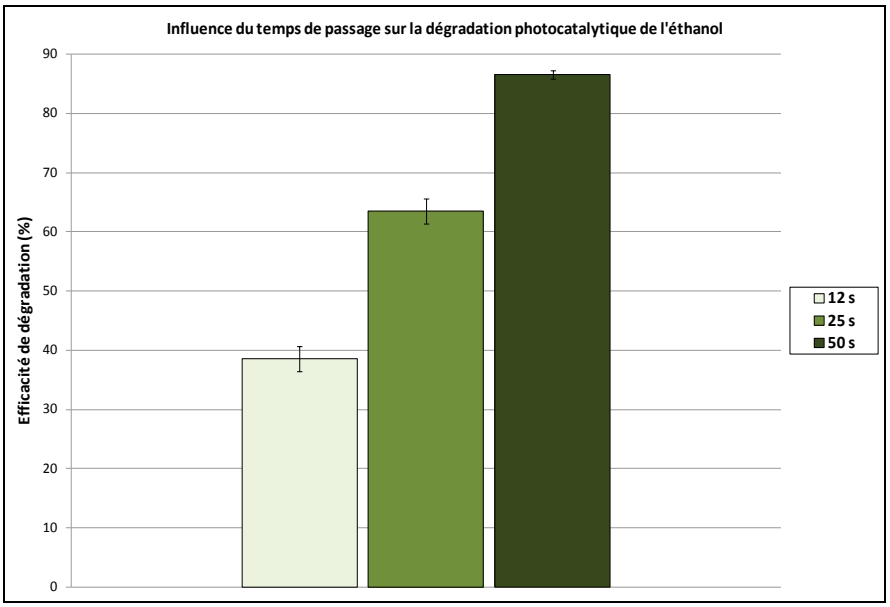



**Figure III.3-8 : Influence du temps de passage (barres d'erreur : écart type)**
**(HA=0,006, 6 lampes, $C_0$=150 ppm, débit variable)**

- **Discussion sur les influences des différents paramètres opératoires**

Les influences constatées sont conformes à celles classiquement décrites dans la littérature pour la dégradation photocatalytique de COV (Jeong et al., 2005 ; Kim et al., 2004). A savoir que la réaction est favorisée par :

- une concentration initiale en polluant faible ;
- un flux de photons suffisamment important ;
- un temps de résidence élevé.

Quant à l'influence de l'hygrométrie, les règles générales n'existent pas. Ici, nous avons pu mettre en évidence un effet bénéfique de l'humidité. Cependant, certains auteurs ont observés l'apparition d'une adsorption compétitive entre le polluant et les radicaux hydroxyles, à forte hygrométrie, conduisant à un ralentissement du processus (Piera et al., 2002).

A partir de ces essais préalables, le fonctionnement correct du réacteur photocatalytique a pu être validé.

- **Cinétique de dégradation**

Par ailleurs, avec ces données expérimentales, il est possible de déterminer la cinétique de dégradation photocatalytique de l'éthanol. L'accès à la vitesse réactionnelle est un paramètre important en génie chimique, puisqu'elle permet d'estimer les taux de conversion d'un produit, de dimensionner des réacteurs ou encore d'ajuster certains paramètres opératoires pour optimiser le taux de conversion.

Avant toute chose, il convient de déterminer le régime d'écoulement du réacteur. Le calcul des nombres de Reynolds et Péclet permet la caractérisation de l'écoulement dans notre réacteur (diamètre = 10 cm, longueur = 55 cm, débit de travail de 20 $L.min^{-1}$) en termes de dispersion axiale notamment.

$$\mathrm{Re} = \frac{\rho\, Ud}{\mu} = 267$$

Dans ces conditions, l'écoulement est laminaire. Le coefficient de diffusion, qui intervient dans le nombre de Péclet axial peut être alors calculé par la relation (III.3-1) (Villermaux, 1995).

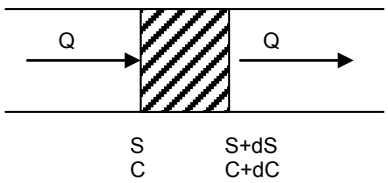
$$D_A = D_m + \frac{U^2 d^2}{192 D_m} \quad \textbf{(III.3-1)}$$

Avec $D_m$ : diffusion moléculaire = $11{,}9.10^{-6}$ $m^2.s^{-1}$ pour l'éthanol.

Ainsi

$$Pe = \frac{Ud}{D_A} = 3{,}1$$

L'écoulement présente donc une certaine dispersion axiale qu'il faudrait quantifier plus précisément par l'établissement d'une Distribution des Temps de Séjours (DTS). Cependant, dans un premier temps nous négligerons cette dispersion axiale et considérerons le réacteur comme un réacteur piston.




Soit

r la vitesse spécifique de disparition de l'éthanol ($mol.m_{TiO2}^{-2}.s^{-1}$)

C la concentration en éthanol ($mol.m^{-3}$)

S la surface de $TiO_2$ ($m^2_{TiO2}$)

Le bilan matière sur un élément dS de catalyseur s'écrit

$$F - r\,dS = F + dF$$

$$\Rightarrow \quad -r\,dS = dF = Q\;dC \qquad \textbf{(III.3-2)}$$

D'après la littérature, la cinétique de dégradation photocatalytique de l'éthanol est communément décrite par le modèle de Langmuir Hinshelwood (Nimlos et al., 1996 ; Sauer et al., 1996) :

$$r = \frac{kKC}{1+KC} \qquad \textbf{(III.3-3)}$$

avec k : la constante cinétique et K la constante d'adsorption
Par combinaison des deux dernières équations on aboutit à :

$$-\frac{kKC}{1+KC}dS = Q\;dC$$

$$\Rightarrow \quad \frac{1+KC}{kKC}dC = -\frac{1}{Q}dS$$

Qui après intégration donne :

$$\frac{1}{kK}\frac{\ln(Cs/Ce)}{Cs-Ce} + \frac{1}{k} = -\frac{S}{Q}\frac{1}{Cs-Ce} \qquad \textbf{(III.3-4)}$$

Ainsi, le tracé de $-\frac{S}{Q}\frac{1}{Cs-Ce}$ en fonction de $\frac{\ln(Cs/Ce)}{Cs-Ce}$ permet d'accéder aux deux constantes k (inverse de l'ordonnée à l'origine) et K (pente) (cf. figure III.3-9) :

$$k = 2.10^{-7}\ mol.m^{-2}.s^{-1}$$

$$K = 165\ m^3.mol^{-1}$$

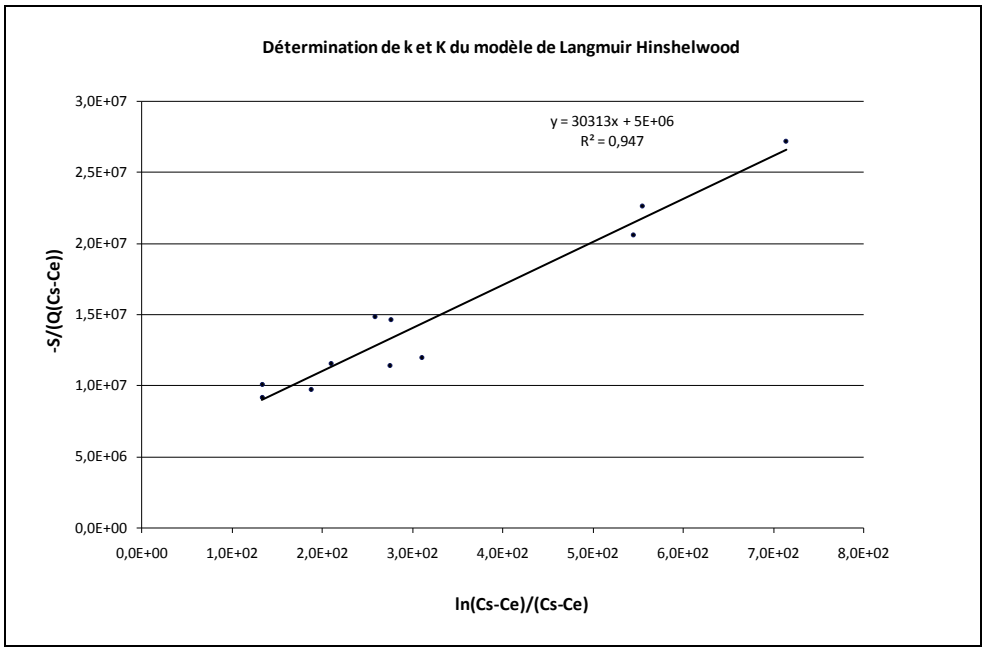



**Figure III.3-9 : Détermination des constantes k et K du modèle de Langmuir Hinshelwood**

Connaissant désormais k et K, l'estimation du taux de conversion (X) pour une concentration initiale donnée est possible par résolution du bilan matière :

$$-rdS = QdC$$

Or $C = C_0(1-X)$ et $r = \frac{kKC}{1+KC}$

Donc $$\frac{kK}{Q}\left[\frac{1-X}{1+KC_0(1-X)}\right]dS = dX$$

Ce qui après intégration donne

$$\frac{kK}{Q}S = -\ln(1-X) + KC_0X$$

La résolution de cette équation permet d'estimer le taux de conversion de l'espèce de concentration initiale $C_0$, connaissant les conditions opératoires tels que le débit et la surface de catalyseur. Elle permet également d'optimiser le temps de passage ou le volume du réacteur pour avoir une conversion maximale de l'espèce à dégrader.

## III.4 DEGRADATION PHOTOCATALYTIQUE DU BIOAEROSOL : QUELQUES REFLEXIONS

Cette partie a pour objectif d'apporter au lecteur des éléments de réponse pour la mise en place des essais futurs de dégradation photocatalytique du bioaérosol expérimental d'*E.coli* dans le réacteur présenté auparavant.

### III.4.1 CHOIX DU SUPPORT PHOTOCATALYTIQUE

L'approche batch a permis de conclure à la nécessité d'optimiser le contact entre la bactérie et le dioxyde de titane pour l'inactiver et la minéraliser par photocatalyse. Les bactéries ne présentant pas de propriétés diffusives probantes, une configuration du réacteur photocatalytique en flux traversant s'impose donc. Ainsi, le support photocatalytique placé perpendiculairement au flux à traiter doit permettre la rétention des microorganismes par filtration. L'étude bibliographique a présenté les différents mécanismes physiques de collecte de particules solides sur des filtres à fibres (diffusion brownienne, interception, impaction inertielle, gravitation et mécanismes électrostatiques). Concernant la filtration des bioaérosols, les mécanismes d'interception et d'impaction inertielle sont considérés comme les plus importants (Maus et al., 1997 ; Yu et al., 2008). Par la connaissance des caractéristiques du filtre (diamètre des fibres, compacité, épaisseur), du diamètre des particules et de la vitesse de filtration il est alors possible de calculer, de façon théorique, ces efficacités pour une classe de particules donnée. Cependant, la compacité des filtres n'est pas toujours disponible. Même s'il existe des corrélations pour la déterminer, la méconnaissance de ce paramètre reste un frein au calcul théorique des efficacités de filtration théoriques d'autant plus que ces modèles fournissent des résultats disparates. Pour remédier à ceci, la détermination expérimentale des efficacités de filtration globales est très souvent préconisée.
Afin de choisir le meilleur support photocatalytique pour nos tests avec le bioaérosol d'*E.coli*, nous avons donc mesuré les efficacités de filtration du support Ahlstrom et des filtres en

fibres de quartz QMA, conformément au mode opératoire décrit précédemment (cf. figure III.4-1).

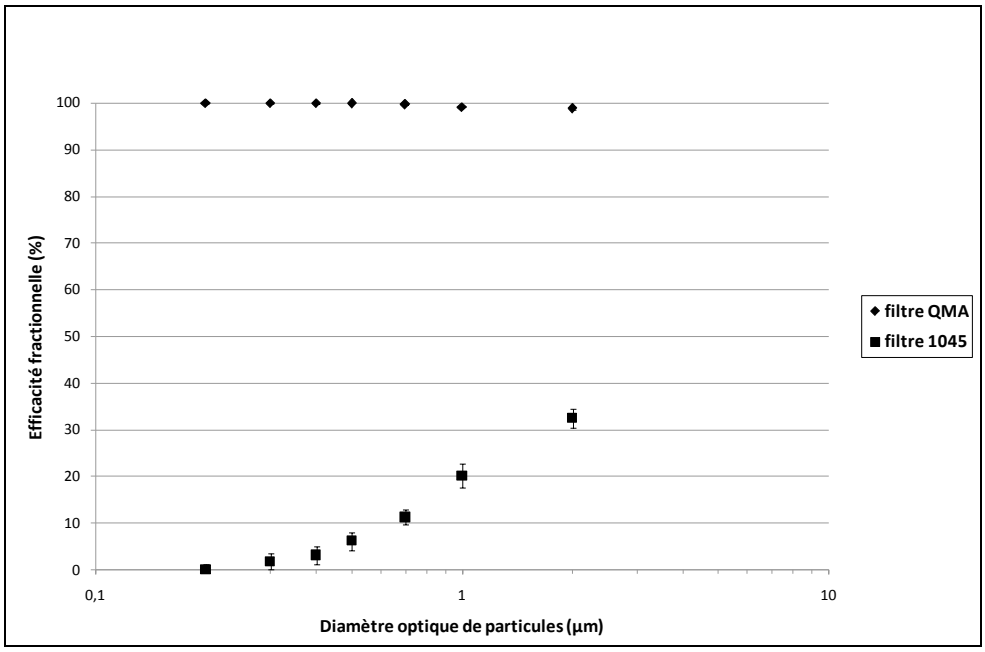



**Figure III.4-1 : Efficacité de filtration des supports photocatalytiques employés**

Il apparaît que seul le support QMA peut être employé comme media filtrant pour une configuration du réacteur en flux traversant, puisqu'il présente des efficacités de filtration supérieures à 98 % pour les diamètres de particules considérés. A l'opposé, le support Ahlstrom ne retient que très peu ce type de particules (< 35 %) et rappelons qu'il présente par ailleurs les efficacités d'inactivation les plus faibles. Ainsi, le support commercial ne sera pas employé pour les essais en régime continu.

### III.4.2 DEROULEMENT D'UN ESSAI

Les essais de dégradation photocatalytique d'un bioaérosol nécessitent une planification importante que ce soit pour la préparation du banc d'essais (nettoyage, stérilisation, montage-démontage) et la réalisation des expérimentations. Ce paragraphe a donc pour objectif de présenter, dans les grandes lignes, le cheminement d'une semaine d'essais.

| **ETAPE 1 : PREPARATION DU BANC D'ESSAIS** *(lundi)* |
|---|
| - **Autoclavage de stérilisation** du banc d'essais (cycle à 121 °C pendant 15 minutes) (cellule de génération+ conduit amont du réacteur+ réacteur+ conduit aval du réacteur)<br>- **Nettoyage du boitier** contenant les lampes avec un spray désinfectant<br>- **Montage du banc d'essais** dans des conditions aseptiques ; sous PSM ou à proximité d'une flamme pour certains éléments. Installation des supports photocatalytiques préalablement stérilisés (par autoclavage ou dépyrogénéisation) |
| **ETAPE 2 : ESSAI DE DEGRADATION PHOTOCATALYTIQUE D'UN BIOAEROSOL** (***mardi, mercredi, jeudi)*** |
| - Vérifications préalables<br>Etanchéité du banc d'essais par mesure des débits amont-aval<br>Balayage du banc d'essais avec de l'air exempt de particules (zéro particules) |

Mesure du bruit de fond en termes de particules
Génération d'eau ultrapure stérile (concentration numérique en particules et distribution granulométrique à $t_0$, puis détermination de la contamination initiale du banc, a priori nulle)
- Génération du bioaérosol d'*E.coli*
- Attente de la mise en régime
- Préchauffage des lampes (30 minutes environ)
- Tests photocatalytiques : avec génération continue du bioaérosol collecte et irradiation simultanées ou génération discontinue avec rétention sur les supports photocatalytiques puis irradiation
- Interruption de la génération du bioaérosol
- Enlèvement des supports photocatalytiques du réacteur, puis analyse*
- Génération d'eau ultrapure stérile
- Balayage du banc d'essais avec de l'air exempt de particules jusqu'à obtenir le « zéro » particules
- Arrêt des lampes

* Il est envisageable de réaliser des essais de dégradation sur plusieurs jours consécutifs (trois maximum) en mettant en place des procédures de décontamination autre que l'autoclavage comme la génération d'éthanol par exemple, sachant que des tests préliminaires permettront de valider ce protocole.

**ETAPE 3 : NETTOYAGE DU BANC D'ESSAIS**
***(vendredi)***

- Démontage du banc d'essais sous PSM
- Emballage des différents éléments dans des sacs à autoclave
- Autoclavage de destruction (cycle à 121 °C pendant 15 minutes)- 2 autoclaves en parallèle
- Lavage des différents éléments (lave vaisselle si possible selon l'encombrement)

Rappelons, qu'en parallèle, il est nécessaire de préparer les suspensions bactériennes utilisées pour la génération du bioaérosol (mardi, mercredi et jeudi) ce qui est explicité schématiquement par la figure III.4-2.

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| *Vendredi* | | Isolement | | |
| *Lundi* | **Préparation du banc d'essais** | Mise en culture | Isolement | |
| *Mardi* | **Essai de dégradation** | Suspension bactérienne pour la génération | Mise en culture | Isolement |
| *Mercredi* | **Essai de dégradation** | | Suspension bactérienne pour la génération | Mise en culture |
| *Jeudi* | **Essai de dégradation** | | | Suspension bactérienne pour la génération |
| *Vendredi* | **Nettoyage du banc d'essais** | | | |

**Figure III.4-2 : Planification des essais de dégradation photocatalytique d'un bioaérosol**

Ces quelques réflexions mettent en exergue que les essais de dégradation photocatalytique d'un bioaérosol expérimental sont denses, intrinsèquement et par la logistique qui doit être associée, pour assurer des conditions aseptiques notamment.

Par conséquent, la double approche, statique-dynamique, appliquée dans ce travail de thèse a permis d'alléger les essais, en dissociant les différents processus mis en jeu dans un tel procédé. Ainsi, les conclusions établies à partir des inactivations batch offrent donc de solides fondations à la construction des essais en mode continu.

# CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Initialement utilisée à des fins de dépollution chimique, la photocatalyse est une technique d'épuration dont les capacités bactéricides sont évoquées depuis quelques années. Classiquement envisagée par la communauté scientifique, voire par des industriels, pour purifier l'eau dans les pays fortement ensoleillés, le traitement photocatalytique des bioaérosols pour l'assainissement des espaces clos n'a été étudié que récemment. Cette technique présente un intérêt de principe certain, puisque les polluants peuvent être complètement minéralisés (si les conditions optimales sont réunies).

La littérature révèle que l'impact de la photocatalyse sur les bactéries n'est généralement quantifié qu'en termes de perte de viabilité - cultivabilité des agents biologiques. Cependant, il ne s'agit que du processus initial qui peut être poursuivi d'une transformation de la matière en sous-produits de dégradation puis en $CO_2$, $H_2O$ et autres espèces minéralisées… Ces étapes consécutives à la perte de viabilité-cultivabilité sont rarement étudiées alors que la toxicité des sous-produits peut s'avérer préoccupante, comme c'est le cas pour la dégradation photocatalytique de certaines espèces chimiques. Par ailleurs, cette transformation de la matière est nécessaire pour éviter tout développement de biofilms sur les supports photocatalytiques employés. En effet, l'apparition d'une telle structure bactérienne aurait pour conséquence l'inhibition de tout effet photocatalytique, en empêchant d'une part, le contact entre la bactérie et le $TiO_2$ et d'autre part, l'excitation du semi-conducteur par le flux lumineux.

Les travaux entrepris dans le cadre de cette thèse visent donc l'approfondissement des mécanismes mis en jeu dans un tel processus, afin d'étudier la pertinence de ce procédé d'épuration en tant que solution de prévention et de diminution du risque biologique associé aux bioaérosols, risque considéré comme émergent dans le nouveau plan Santé au Travail 2010-2014 du Ministère du Travail.

Pour répondre à cette problématique, une démarche expérimentale a été débutée par la conception et la mise en place d'un banc d'essais de dégradation photocatalytique de bioaérosols. L'étude des processus, par cette approche dynamique cumulant de nombreux mécanismes, semblait complexe en l'état. C'est pourquoi un découplage des phénomènes a été opéré avec pour objectif la compréhension des mécanismes (collecte, inactivation, transformation en espèces intermédiaires puis en $CO_2$…), facilitée par une approche batch isolant la réaction photocatalytique à proprement parler.

Si l'expérimentation réalisée sur une bactérie modèle, *E.coli,* a permis de confirmer la perte de viabilité-cultivabilité lors du processus photocatalytique, la contribution de certains paramètres opératoires a pu être mise en évidence de façon plus précise. En effet, des taux d'inactivation importants sont observés lorsque le contact entre la bactérie et le catalyseur est optimisé et que les durées d'irradiation sont importantes.

Le choix du support photocatalytique paraît donc essentiel puisqu'il doit assurer la fixation du catalyseur tout en permettant ce contact indispensable. La comparaison de différents supports photocatalytiques a montré que des supports commerciaux, efficaces pour traiter des gaz, sont complètement inadaptés au traitement des microorganismes, alors que leur emploi semblait envisageable en vue d'un développement pilote futur. Par ailleurs, par la structure même des bactéries (présence d'une membrane, poids moléculaire élevé…) les durées d'inactivation requises sont longues, parfois plusieurs heures pour observer un impact significatif. Ces durées peuvent être potentiellement réduites par l'optimisation du contact entre la bactérie et

le dioxyde de titane, la diminution de la charge initiale en bactéries ou encore l'augmentation du flux lumineux, paramètres qui pourraient faire l'objet d'une étude plus approfondie.

De manière plus précise, les mécanismes d'inactivation de bactéries par photocatalyse, étudiés essentiellement en phase liquide, font l'objet d'un état de l'art plus restreint en phase aéroportée. Menée par mise en culture des bactéries sur deux milieux nutritifs de composition distincte : un milieu classique et un milieu restrictif, la caractérisation du dommage engendré aux cellules a été explicitée. Les analyses ont montré que la perte de viabilité-cultivabilité observée sur le second milieu, contenant des sels inorganiques, est plus importante, conduisant à l'identification d'un dommage métabolique.

Entreprises pour répondre à un déficit d'informations, les expérimentations de minéralisation de bactéries par photocatalyse en réacteur fermé ont par ailleurs révélées que le processus, certes lent, est favorisé par une charge initiale en bactéries faible. L'influence d'autres paramètres opératoires tels que l'hygrométrie ou le flux lumineux n'a pas pu être montrée de façon probante et n'est, a priori, que secondaire. Les taux de minéralisation observés après 72 h restent inférieurs à 50 % (pour des charges initiales en bactéries importantes).

Etant donné ces résultats, il semble que la production d'espèces intermédiaires soit inévitable. *E.coli* étant une bactérie à Gram -, la lyse de sa paroi cellulaire peut conduire à la libération d'endotoxines dont les effets sanitaires sont préoccupants. A partir d'expérimentations préliminaires basées sur une solution d'endotoxines de référence, il apparaît que le processus photocatalytique puisse conduire à l'abattement de ces lipopolysaccharides. Cependant, des expérimentations complémentaires, avec modifications des protocoles opératoires, sont nécessaires pour considérer la dégradation couplée des bactéries et de leurs endotoxines.
Par ailleurs, l'étude générale des sous-produits de dégradation, de natures chimiques très variées, est aussi importante, même si sa réalisation n'est pas aisée. En effet, les moyens analytiques utilisés devront permettre l'identification et la quantification, dans le meilleur des cas, d'espèces aux propriétés très distinctes et aux teneurs peu élevées (ppb ?). Les technologies envisagées devront donc être non sélectives et sensibles, ce qui permet d'envisager la mise au point des protocoles d'analyse adaptés. L'utilisation de la spectrométrie de masse semble ainsi s'imposer pour déterminer les composés générés, qui devront être prélevés sur des supports adaptés. Cependant, la plupart de ces techniques requièrent des débits de prélèvement faibles sur des durées longues, pour favoriser les phénomènes d'adsorption. Ces essais paraissent donc difficilement réalisables dans un volume de prélèvement faible (300 mL) tel que celui utilisé pour les essais de minéralisation. Néanmoins, pour éviter ces contraintes d'échantillonnage, l'utilisation de la microextraction en phase solide (fibre SPME) pourrait être envisagée. Cette technique, encore peu utilisée, permet l'extraction et la concentration de composés qui sont à l'état de traces dans un milieu et doit faire l'objet d'un développement spécifique. Ainsi, la mise en place d'outils métrologiques adaptés à l'analyse de ces sous-produits de dégradation photocatalytique de bactéries devra être prochainement entreprise pour la compréhension approfondie des processus mis en jeu.

A partir des conclusions établies par l'approche batch, les essais de dégradation photocatalytique d'un bioaérosol pourront être effectués dans un réacteur continu. Les principaux éléments nécessaires à la mise en œuvre de ces essais ont été conçus dans ce travail de thèse. En effet, un générateur de bioaérosol, permettant de créer un aérosol bactérien d'*E.coli,* homogène stable et reproductible, a été mis au point à l'INRS. Il permettra l'alimentation d'un banc d'essais de dégradation photocatalytique équipé d'un réacteur, conçu

et fabriqué in situ, suivant un cahier des charges élaborés en début de thèse. Par ailleurs, les réflexions, quant au fonctionnement du banc d'essais, présentées dans ce manuscrit, permettront d'en faciliter la prise en main (choix du support photocatalytique le plus adapté, disposition dans le réacteur, déroulement d'un essai tests, procédure de nettoyage et stérilisation du banc d'essais…).

D'un point de vue industriel, cette technologie semble, a priori, envisageable pour traiter des effluents faiblement chargés, à condition de développer des supports photocatalytiques adaptés au traitement de polluants biologiques et de répondre à certaines interrogations qui subsistent. En effet, des innovations doivent être faites pour proposer des media filtrants permettant de supporter, de manière durable le catalyseur (problème d'érosion…), tout en assurant son contact avec les agents biologiques après collecte, sans pour autant générer de fortes pertes de charge. Les interrogations liées à la maintenance des dispositifs devront également être étudiées : tenue de ces supports dans le temps (fréquence de remplacement….), empoisonnement du catalyseur par des « sels » issus de la minéralisation des espèces biologiques (nécessité de lavages…), possible régénération des espèces biologiques lors de l'arrêt de l'irradiation. Par ailleurs, la chimie du processus de minéralisation, devra être étudiée plus précisément pour lever les suspicions liées à la génération potentielle de sous-produits. Les ingénieurs pourront ensuite intervenir pour dimensionner les dispositifs d'épuration en optimisant la charge du catalyseur, son irradiation ou encore l'écoulement, de manière à minéraliser rapidement les espèces biologiques.

Pour finir, ce travail de thèse, interdisciplinaire, a permis d'engager une nouvelle thématique de recherche, tant pour l'INRS que pour le LRGP. Même si les expérimentations ont permis d'enrichir la connaissance sur l'action bactéricide de la photocatalyse, les perspectives de travail sont encore nombreuses avant de pouvoir utiliser la photocatalyse comme procédé d'épuration biologique propre et sûr.

# BIBLIOGRAPHIE

Abbott B. et Clamen A. The relationship of substrate, growth rate, and maintenance coefficient to single cell protein production. *Biotechnology and Bioengineering*, 1973, 15, 117-127.

AFNOR. Analyse microbiologique - Méthodes horizontales -Contrôle de la qualité des produits alimentaires. *Recueil des normes françaises.*, 1996, tome 1, 48-49.

Alberici R., Mendes M., Jardim W. et Eberlin M. Mass spectrometry on-line monitoring and MS2 product characterization of $TiO_2$/UV photocatalytic degradation of chlorinated volatile organic compounds. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 1998, 9, 1321-1327.

Alcion. *Alcion [en ligne]. Consulté le 12/05/2010.* 2010. http://www.alcion-env.com/fr/.

Alrousan D. M. A., Dunlop P. S. M., McMurray T. A. et Byrne J. A. Photocatalytic inactivation of *E.coli* in surface water using immobilised nanoparticle $TiO_2$ films. *Water Research*, 2009, 43, 47-54.

Ambroise D., Greff-Mirguet G., Görner P., Fabriès J. F. et Hartemann P. Measurement of indoor viable airborne bacteria with different bioaerosol samplers. *Journal of Aerosol Science*, 1999, 30, 699-700.

André J.-C. et Viriot M. Photochimie industrielle. *Support de cours ENSIC*, 1988, Chapitre I.

Auty M., Gardiner G., McBrearty S., O'sullivan E., Mulvihill D., Collins J., Fitzgerald G., Stanton C. et Ross R. Direct in situ viability assessment of bacteria in probiotic dairy products using viability staining in conjunction with confocal scanning laser microscopy. *Applied and environmental microbiology*, 2001, 67, 420-425.

Ávila P., Sánchez B., Cardona A., Rebollar M. et Candal R. Influence of the methods of $TiO_2$ incorporation in monolithic catalysts for the photocatalytic destruction of chlorinated hydrocarbons in gas phase. *Catalysis Today*, 2002, 76, 271-278.

Barka N., Qourzal S., Assabbane A., Nounah A. et Ait-Ichou Y. Factors influencing the photocatalytic degradation of Rhodamine B by $TiO_2$-coated non-woven paper. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 2008, 195, 346-351.

Baron P. A. et Willeke K. *Aerosol Measurement. Principles, Techniques and Applications.* Hoboken New Jersey: John Wiley and sons, 2001. 61-82. ISBN 978-0-471-78492-0.

Battley E. Calculation of the heat of growth of *Escherichia coli* K-12 on succinic acid. *Biotechnology and bioengineering*, 1991, 37, 334-343.

Bémer D., Régnier R., Callé S., Thomas D., Simon X. et Appert-Collin J. C. Filtration des aérosols-Performances des médias filtrants. *Hygiène et Sécurité du Travail- Cahiers de notes documentaires*, 2006, ND 2241-202-06, 7-21.

Benabbou A. K., Derriche Z., Felix C., Lejeune P. et Guillard C. Photocatalytic inactivation of *Escherichia coli.* Effect of concentration of $TiO_2$ and microorganism, nature and intensity of UV irradiation. *Applied Catalysis B: Environmental*, 2007, 76, 257-263.

Biowind. *Biowind, entrez dans un nouvel air [en ligne]. Consulté le 12/05/10.* 2010. http://www.biowind.fr.

Bolashikov Z. D. et Melikov A. K. Methods for air cleaning and protection of building occupants from airborne pathogens. *Building and Environment*, 2009, 44, 1378-1385.

Bousselmi L., Ghrabi A., Ghozzi K., Zayani G., Ennabli M., Geissen S., Weidemeyer A., Vogelpohl A., Bahnemann D. et Hufschmidt D. *Traitement des eaux usées de l'industrie textile par photocatalyse solaire pour réutilisation*. 2000. 1st International Conference on Wastewater Treatment and Reuse Adapted to the Mediterranean area, Tunis.

Burton N. C., Adhikari A., Grinshpun S. A., Hornung R. et Reponen T. The effect of filter material on bioaerosol collection of *Bacillus subtilis* spores used as a *Bacillus anthracis* simulant. *Journal of Environmental Monitoring*, 2005, 7, 475-480.

Caballero L., Whitehead K. A., Allen N. S. et Verran J. Inactivation of *Escherichia coli* on immobilized $TiO_2$ using fluorescent light. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 2009, 202, 92-98.

Callé S. *Influence des cycles de colmatage et de décolmatage sur l'évolution des médias filtrants utilisés en dépoussiérage industriel.* Thèse. Sciences. 2000. INP Lorraine.

CatRayon. *CD-Rom interactif pour l'évaluation des risques relatifs aux sources de rayonnement optique*. 2000. CD-Rom INRS.

Chen F., Yang X., Mak H. K. C. et Chan D. W. T. Photocatalytic oxidation for antimicrobial control in built environment: A brief literature overview. *Building and Environment*, 2010, 45, 1747-1754.

Cho M., Chung H., Choi W. et Yoon J. Linear correlation between inactivation of *E.coli* and OH radical concentration in $TiO_2$ photocatalytic disinfection. *Water Research*, 2004, 38, 1069-1077.

Choi W., Ko J., Park H. et Chung J. Investigation on $TiO_2$-coated optical fibers for gas-phase photocatalytic oxidation of acetone. *Applied Catalysis B: Environmental*, 2001, 31, 209-220.

Coleman H. M., Marquis C. P., Scott J. A., Chin S. S. et Amal R. Bactericidal effects of titanium dioxide-based photocatalysts. *Chemical Engineering Journal*, 2005, 113, 55-63.

Davies C. N. Sampling aerosols with a thin-walled tube. *Atmospheric Pollution*, 1977, 433-446.

Dunlop P. S. M., Byrne J. A., Manga N. et Eggins B. R. The photocatalytic removal of bacterial pollutants from drinking water. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 2002, 148, 355-363.

Duquenne P. et Greff-Mirguet G. L'échantillonnage et l'analyse des aérosols microbiens. *Hygiène et Sécurité du Travail- Cahiers de notes documentaires*, 2005, ND 2222-198-05, 23-28.

Epurae. *Epurae [en ligne]. consulté le 12/05/2010*. 2010. http://www.epurae.fr/.

Evans P. et Sheel D. W. Photoactive and bacterial $TiO_2$ thin films on stainless steel. *Surface and Coatings Technology*, 2007, 201, 9319-9324.

Fabian M. P., Miller S. L., Reponen T. et Hernandez M. T. Ambient bioaerosol indices for indoor air quality assessments of flood reclamation. *Journal of Aerosol Science*, 2005, 36, 763-783.

Faure M., Gérardin F., Zahraa O., Rastoix O. et André J.-C. Photocatalyse et applications en dépollution: quelques problèmes avant une industrialisation sûre? *Environnement, Risques & Santé*, 2009, 8, 335-342.

First M., Ridnick S. N., Banahan K. F., Vincent R. L. et Brickner P. W. Fundamental factors affecting upper-room ultraviolet germicidal irradiation - Part I. Experimental. *Journal of Occupational and Environmental Hygiene*, 2007, 4, 321-331.

Fischer G., Schwalbe R., Möller M., Ostrowski R. et Dott W. Species-specific production of microbial volatile organic compounds (MVOC) by airborne fungi from a compost facility. *Chemosphere*, 1999, 39, 795-810.

Fletcher L., Gaunt L., Beggs C., Shepherd S., Sleigh P., Noakes C. et Kerr K. Bactericidal action of positive and negative ions in air. *BMC microbiology*, 2007, 7, 32.

Foarde K., Hanley J., Ensor D. et Roessler P. Development of a method for measuring single-pass bioaerosol removal efficiencies of a room air cleaner. *Aerosol Science and Technology*, 1999, 30, 223-234.

Gallagher M., Gutsol A., Fridman A., Friedman G. et Dolgopolsky A. *Non-thermal plasma applications in air sterilization*. 2004. ICOPS 2004. The 31st IEEE International Conference on Plasma Science. Baltimore.

Goosen N. et Moolenaar G. Repair of UV damage in bacteria. *DNA repair*, 2008, 7, 353-379.

Görner P., Fabriès J., Duquenne P., Witschger O. et Wrobel R. Bioaerosol sampling by a personal rotating cup sampler CIP 10-M. *Journal of Environmental Monitoring*, 2006, 8, 43-48.

Goswami D. Y. Decontamination of ventilation systems using photocatalytic air cleaning technology. *Journal of Solar Energy Engineering*, 2003, 125, 359-365.

Goyer N., Lavoie J., Lazure L. et Marchand G. Les bioaérosols en milieu de travail : guide d'évaluation, de contrôle et de prévention. *Guide Technique IRSST*, 2001, T-23, 1-86.

Griffiths W. D., Bennett A., Speight S. et Parks S. Determining the performance of a commercial air purification system for reducing airborne contamination using model micro-organisms: a new test methodology. *Journal of Hospital Infection*, 2005, 61, 242-247.

Grinshpun S. A., Willeke K. et Kalatoor S. A general equation for aerosols aspiration by thin-walled sampling probes in calm and moving air. *Atmospheric Environment*, 1993, 27A, 1454-1470.

Gumy D., Morais C., Bowen P., Pulgarin C., Giraldo S., Hajdu R. et Kiwi J. Catalytic activity of commercial of $TiO_2$ powders for the abatement of the bacteria (*E. coli*) under solar simulated light: Influence of the isoelectric point. *Applied Catalysis B: Environmental*, 2006a, 63, 76-84.

Gumy D., Rincon A., Hajdu R. et Pulgarin C. Solar photocatalysis for detoxification and disinfection of water: Different types of suspended and fixed $TiO_2$ catalysts study. *Solar Energy*, 2006b, 80, 1376-1381.

Haas D., Posch J., Schmidt S., Wüst G., Sixl W., Feierl G., Marth E. et Reinthaler F. A case study of airborne culturable microorganisms in a poultry slaughterhouse in Styria, Austria. *Aerobiologia*, 2005, 21, 193-201.

Hamill N., Weatherley L. et Hardacre C. Use of a batch rotating photocatalytic contactor for the degradation of organic pollutants in wastewater. *Applied Catalysis B: Environmental*, 2001, 30, 49-60.

Hammer K., Carson C. et Riley T. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of Applied Microbiology*, 2001, 86, 985-990.

HCSP. *Recommandation de vigilance relative à la sécurité des nanoparticules d'argent*. Rapport. 2010. Haut Conseil de la Santé Publique.

Herrmann J. et Guillard C. Photocatalytic degradation of pesticides in agricultural used waters. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences-Series IIC-Chemistry*, 2000, 3, 417-422.

Hinds W. C. *Aerosol Technology. Properties, behavior, and measurment of airborne particles.* New York: John Wiley and sons, 1999. 182-205. ISBN 0-417-19410-7.

Ho J., Kournikakis B., Gunning A. et Fildes J. Submicron aerosol characterization of water by a differential mobility particle sizer. *Journal of Aerosol Science*, 1988, 19, 1425-1428.

Huang X., Wang H., Yin S., Chen X., Chen W. et Yang H. Sterilization system for air purifier by combining ultraviolet light emitting diodes with $TiO_2$. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 2009, 84, 1437-1440.

Huang Z., Maness P. C., Blake D. M., Wolfrum E. J., Smolinski S. L. et Jacoby W. A. Bactericidal mode of titanium dioxide photocatalysis. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 2000, 130, 163-170.

Ibanez J. A., Litter M. I. et Pizzaro R. A. Photocatalytic bactericidal effect of $TiO_2$ on *Enterobacter cloacae* comparative study with other Gram(-) bacteria. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 2003, 157, 81-85.

INRS. Conception des laboratoires d'analyses microbiologiques. *Brochure INRS*, 2007a, ED 999, 1-116.

INRS. Dépollution des eaux résiduaires. Guide pratique de ventilation n° 19. *Brochure INRS*, 2003, ED 820, 1-22.

INRS. Les risques biologiques en milieu professionnel. *Brochures INRS*, 2008, ED 6034, 1-52.

INRS. Particules émises par des moteurs diesel. Analyse du carbone par coulométrie. *Fiche métropol*, 2007b, Fiche 038, 1-6.

Jacoby W., Maness P., Wolfrum E., Blake D. et Fennell J. Mineralization of bacterial cell mass on a photocatalytic surface in air. *Environ. Sci. Technol*, 1998, 32, 2650-2653.

Jeong J., Sekiguchi K., Lee W. et Sakamoto K. Photodegradation of gaseous volatile organic compounds (VOCs) using $TiO_2$ photoirradiated by an ozone-producing UV lamp: decomposition characteristics, identification of by-products and water-soluble organic intermediates. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 2005, 169, 279-287.

Josset S. *Décontamination photocatalytique d'un bioaérosols contaminé par Legionella pneumophilia et autres agents biologiques. Contribution à la conception de dispositifs de décontamination de l'air*. Thèse scientifique. 2008. Université Louis Pasteur, Strasbourg.

Josset S., Hajiesmaili S., Begin D., Edouard D., Pham-Huu C., Lett M., Keller N. et Keller V. UV-A photocatalytic treatment of *Legionella pneumophila* bacteria contaminated airflows through three-dimensional solid foam structured photocatalytic reactors. *Journal of Hazardous Materials*, 2010, 175, 372-381.

Josset S., Taranto J., Keller N., Keller V., Lett M. C., Ledoux M. J., Bonnet V. et Rougeau S. UV-A photocatalytic treatment of high flow rate air contamined with *Legionella pneumophila*. *Catalysis Today*, 2007, 129, 215-222.

Jung J., Lee J. et Kim S. Thermal effects on bacterial bioaerosols in continuous air flow. *Science of the Total Environment*, 2009a, 407, 4723-4730.

Jung J., Lee J., Lee C., Kim S. et Lee B. Treatment of Fungal Bioaerosols by a High-Temperature, Short-Time Process in a Continuous-Flow System. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009b, 75, 2742.

Kemp P. C., Neumeister-Kemp H. G., Lysek G. et Murray F. Survival and growth of micro-organisms on air filtration media during initial loading. *Atmospheric Environment*, 2001, 35, 4739-4749.

Khurana A. *Ozone treatment for prevention of microbial growth in air conditioning systems*. Thèse. Sciences. 2003. Université de Floride.

Kikuchi Y., Sunada K., Iyoda T., Hashimoto K. et Fujishima A. Photocatalytic bactericidal effect of $TiO_2$ thin films: dynamic view of the active oxygen species responsible for the effect. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 1997, 106, 51-56.

Kim D. S. et Kwak S. Y. Photocatalytic inactivation of *E.coli* with mesoporous $TiO_2$ coated film using the film adhesion method. *Environmental Science and Technology*, 2009, 43, 148-151.

Kim M., Nam W. et Han G. Photocatalytic oxidation of ethyl alcohol in an annulus fluidized bed reactor. *Korean Journal of Chemical Engineering*, 2004, 21, 721-725.

Kim S. et Hong S. Kinetic study for photocatalytic degradation of volatile organic compounds in air using thin film $TiO_2$ photocatalyst. *Applied Catalysis B, Environmental*, 2002, 35, 305-315.

Kim S. H., Kwak S. Y., Sohn B. H. et Park T. H. Design of $TiO_2$ nanoparticle self-assembled aromatic polyamide thin-film-composite (TFC) membrane as an approach to solve biofouling problem. *Journal of Membrane Science*, 2003, 211, 157-165.

Ko G., First M. W. et Burge H. A. The characterization of upper-room ultraviolet germicidal irradiation in inactivating airborne microorganisms. *Environmental Health Perspectives*, 2002, 10, 95-101.

Krarnes J., Büttner H. et Ebert F. Submicron particle generation by evaporation of water droplets. *Journal of Aerosol Science*, 1991, 22, S15-S18.

Kuehn T. H., Pui D. Y. H., Vesley D., Kemp S. J., Streifel A., Marx J. et Alfred A. Bioaerosol collection and growth on filters used for building ventilation. *Journal of Aerosol Science*, 1994, 25, 19-20.

Lai K. M., Burge H. A. et First M. W. Size and UV germicidal irradiation susceptibility of *Serratia Marcescens* when aerosolized from different suspending media. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70, 2021-2027.

Li C. S., Hao M. L., Chang C. W. et Wang C. S. Evaluation of microbial samplers for bacterial microorganisms. *Aerosol Science and Technology*, 1999, 30, 100-108.

Li Y., Li X., Li J. et Yin J. Photocatalytic degradation of methyl orange by $TiO_2$-coated activated carbon and kinetic study. *Water Research*, 2006, 40, 1119-1126.

Lin C. Y. et Li C. S. Effectiveness of titanium dioxide photocatalyst filters for controlling bioaerosols. *Aerosol Science and Technology*, 2003, 37, 162-170.

Lin X., Reponen T. A., Willeke K., Grinshpun S. A., Foarde K. K. et Ensor D. S. Long-term sampling of airborne bacteria and fungi into a non-evaporating liquid. *Atmospheric Environment*, 1999, 33, 4291-4298.

Liu L., John B. et Yeung K. Non-UV germicidal activity of fresh $TiO_2$ and $Ag/TiO_2$. *Journal of Environmental Sciences*, 2009, 21, 700-706.

Liu L., John B., Yeung K. et Si G. Non-UV based germicidal activity of metal-doped $TiO_2$ coating on solid surfaces. *Journal of Environmental Sciences*, 2007, 19, 745-750.

Lydakis-Simantiris N., Riga D., Katsivela E., Mantzavinos D. et Xekoukoulotakis N. Disinfection of spring water and secondary treated municipal wastewater by $TiO_2$ photocatalysis. *Desalination*, 2010, 1, 351-355.

Macher J. et Hansson H. Personal size-separating impactor for sampling microbiological aerosols. *American Industrial Hygiene Association Journal*, 1987, 48, 652-655.

Mainelis G., Berry D., An H. R., Yao M., Devoe K., Fennel D. E. et Jaeger R. Design and performance of a single pass bubbling bioaerosol generator. *Atmospheric Environment*, 2005, 39, 3521-3533.

Marugán J., Hufschmidt D., Sagawe G., Selzer V. et Bahnemann D. Optical density and photonic efficiency of silica-supported $TiO_2$ photocatalysts. *Water research*, 2006, 40, 833-839.

Marugan J., Van Grieken R., Sordo C. et Cruz C. Kinetics of the photocatalytic disinfection of *Escherichia coli* suspensions. *Applied Catalysis B, Environmental*, 2008, 82, 27-36.

Maus R. et Umhauer H. Collection efficiencies of coarse and fine dust filter media for airborne biological particles. *Journal of Aerosol Science*, 1997, 3, 401-415.

Midoux N. Ecoulements diphasiques. *Support de cours ENSIC*, 2006, Chapitre III.

Möritz M., Peter H., Nipko B. et Rüden H. Capability of air filters to retain airborne bacteria and molds in heating, ventilating and air-conditioning (HVAC) systems. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 2001, 203, 401-409.

Nguyen N., Amal R. et Beydoun D. Photocatalytic reduction of selenium ions using different $TiO_2$ photocatalysts. *Chemical engineering science*, 2005, 60, 5759-5769.

Nimlos M., Wolfrum E., Brewer M., Fennell J. et Bintner G. Gas-phase heterogeneous photocatalytic oxidation of ethanol: pathways and kinetic modeling. *Environ. Sci. Technol*, 1996, 30, 3102-3110.

Nonami T., Hase H. et Funakoshi K. Apatite-coated titanium dioxide photocatalyst for air purification. *Catalysis Today*, 2004, 96, 113-118.

Noyce J. et Hughes J. Bactericidal effects of negative and positive ions generated in nitrogen on *Escherichia coli*. *Journal of electrostatics*, 2002, 54, 179-187.

Pal A., Min X., Yu L. E., Pehkonen S. O. et Ray M. B. Photocatalytic inactivation of bioaerosols by $TiO_2$ coated membrane. *International Journal of Chemical Reactor Engineering*, 2005, 3, 1-12.

Pal A., Pehkonen S. O., Yu L. E. et Ray M. B. Photocatalytic inactivation of airborne bacteria in a continuous -flow reactor. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 2008, 47, 7580-7585.

Pal A., Pehkonen S. O., Yu L. E. et Ray M. B. Photocatalytic inactivation of Gram-positive and Gram-negative bacteria using fluorescent light. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 2007, 186, 335-341.

Peccia J. et Hernandez M. UV-induced inactivation rates for airborne *Mycobacterium bovis* BCG. *Journal of Occupational and Environmental Hygiene*, 2004, 1, 430-435.

Peccia J., Werth H. M., Miller S. et Hernandez M. Effects of relative humidity on the ultraviolet induced inactivation of airborne bacteria. *Aerosol Science and Technology*, 2001, 35, 728-740.

Perry R. H. et Green D. W. *Perry's chemical engineers' handbook.* Singapore: McGraw-Hill, 1998. 5-48, 5-50. ISNN 0-07-049841-5.

Photocleanquartz. *Photocleanquartz, de l'air propre à l'air pur [en ligne]. Consulté le 12/05/2010*. 2010. http://www.photocleanquartz.com/.

Pibiri M., Goel A., Vahekeni N. et Roulet C. Indoor air purification and ventilation systems sanitation with essential oils. *International Journal of Aromatherapy*, 2006, 16, 149-153.

Piera E., Ayllón J., Doménech X. et Peral J. $TiO_2$ deactivation during gas-phase photocatalytic oxidation of ethanol. *Catalysis Today*, 2002, 76, 259-270.

Predicala B. Z., Urban J. E., Maghirang R. G., Jerez S. B. et Goodband R. D. Assessment of bioaerosols in swine barns by filtration and impaction. *Current Microbiology*, 2002, 44, 136-140.

Queffeulou A., Geron L., Archambeau C., Gall H., Marquaire P. et Zahraa O. Kinetic Study of Acetaldehyde Photocatalytic Oxidation with a Thin Film of $TiO_2$ Coated on Stainless Steel and CFD Modeling Approach. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 2010, 694-705.

Ray B. et Speck M. L. Freeze- injury in bacteria. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.*, 1973, 4, 161-213.

Renoux A. et Boulaud D. *Les aérosols. Physique et Métrologie.* Paris: Lavoisier Ted et Doc., 1998. 19-36. 2-7430-0231-X.

Reponen T., Willeke K., Ulevicius V., Grinshpun S. A. et Donnelly J. Techniques for dispersion of microorganisms into air. *Aerosol Science and Technology*, 1997, 27, 405-421.

Rincon A. G. et Pulgarin C. Effect of pH, inorganic ions, organic matter and $H_2O_2$ on *E.coli* K12 photocatalytic inactivation by $TiO_2$ Implications in solar water disinfection. *Applied Catalysis B: Environmental*, 2004a, 51, 283-302.

Rincon A. G. et Pulgarin C. Field solar *E.coli* inactivation in the absence and presence of $TiO_2$ : is UV solar dose an appropriate parameter for standardization of water solar disinfection? *Solar Energy*, 2004b, 77, 635-648.

Rincon A. G. et Pulgarin C. Photocatalytical inactivation of *E.coli* : effect of (continuous-intermittent) light intensity and of (suspended-fixed) $TiO_2$ concentration. *Applied Catalysis B: Environmental*, 2003, 44, 263-284.

Rincon A. G. et Pulgarin C. Use of coaxial photocatalytic reactor (CAPHORE) in the $TiO_2$ photo-assisted treatment of mixed *E.coli* and *Bacillus* sp. and bacterial community present in wastewater. *Catalysis Today*, 2005, 101, 331-344.

Rincon A. G., Pulgarin C., Adler B. et Peringer P. Interaction between *E.coli* inactivation and DBP-precursors - dihydroxybenzene isomers - in the photocatalytic process of drinking-water disinfection with $TiO_2$. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 2001, 139, 233-241.

Rizzo L. Inactivation and injury of total coliform bacteria after primary disinfection of drinking water by $TiO_2$ photocatalysis. *Journal of Hazardous Materials*, 2009, 165, 48-51.

Robertson J. M. C., Robertson P. K. J. et Lawton L. A. A comparison of the effectiveness of $TiO_2$ photocatalysis and UVA photolysis for the destruction of three pathogenic micro-organisms. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 2005, 175, 51-56.

Robine E., Lacaze I., Moularat S., Boissier M. et Ritoux S. Mesure des aérosols fongiques dans l'air: utilisation de l'ergostérol. *Revue Française d'Allergologie et d'Immunologie Clinique*, 2006, 46, 174-179.

Salie F., Scarpino P., Clark S. et Willeke K. Laboratory evaluation of airborne microbial reduction by an ultraviolet light positioned in a modified hollow ceiling fan blade. *American Industrial Hygiene Association Journal*, 1995, 56, 987-992.

Sato T., Koizumi Y. et Taya M. Photocatalytic deactivation of airborne microbial cells on $TiO_2$-loaded plate. *Biochemical Engineering Journal*, 2003, 14, 149-152.

Sauer M. et Ollis D. Photocatalyzed oxidation of ethanol and acetaldehyde in humidified air. *Journal of Catalysis*, 1996, 158, 570-582.

Sayilkan F., Asiltürk M., Kiraz N., Burunkaya E., Arpaç E. et Sayilkan H. Photocatalytic antibacterial performance of $Sn^{4+}$-doped $TiO_2$ thin films on glass substrate. *Journal of Hazardous Materials*, 2009, 162, 1309-1316.

Scarpino P. V., Jensen N. J., Jensen P. A. et Ward R. The use of ultraviolet germicidal irradiation (UVGI) in disinfection of airborne bacteria and rhinoviruses. *Journal of Aerosol Science*, 1998, 29, 777-778.

SCF. *Société Française de Chimie. Dioxyde de titane [en ligne]. Consulté le 22/03/2010.* 2010. http://91.121.18.171/sfc/Donnees/mine/tio2/textio2.htm.

Sichel C., Tello J., Cara M. d. et Fernandez-Ibanez P. Effect of UV solar intensity and dose on the photocatalytic disinfection of bacteria and fungi. *Catalysis Today*, 2007, 129, 152-160.

Simon X., Duquenne P. et Jeandidier V. *Cellule de génération d'aérosols et générateurs d'aérosols pourvu d'une telle cellule*. B 09-4922 FR. 22 décembre 2009.

Simon X., Duquenne P., Koehler V., Faure M. et Greff-Mirguet G. *Caractérisation physique et biologique d'un bioaérosol expérimental généré par bullage d'air à travers un film de suspension bactérienne*. 2009b. 24 ème Congrès Français sur les Aérosols. Paris.

Simon X., Duquenne P., Koehler V., Faure M., Piernot C. et Coulais C. *Evaluation des performances d'un générateur de bioaérosols expérimentaux*. 2010a. 25 ème Congrès Français sur les Aérosols. Paris.

Simon X., Duquenne P., Koehler V., Faure M., Piernot C. et Coulais C. Performances d'un générateur de bioaérosols expérimentaux. *Salles Propres*, 2010b, 67, 49-57.

Squinazi F. La pollution de l'air à l'intérieur des bâtiments. *Revue Française d'Allergologie et d'Immunologie Clinique*, 2002, 42, 248-255.

Stetzenbach L. D. Microorganisms and indoor air quality. *Clinical Microbiology Newsletter*, 1998, 20, 157-161.

Stewart S., Grinshpun S., Willeke K., Terzieva S., Ulevicius V. et Donnelly J. Effect of impact stress on microbial recovery on an agar surface. *Applied and Environmental Microbiology*, 1995, 61, 1232.

Su W. C. et Vincent J. H. Towards a general semi-empirical model for aspiration efficiencies of aerosols samplers in perfectly calm air. *Aerosol Science*, 2004, 35, 1119-1134.

Sun D. D., Tay J. H. et Tan K. M. Photocatalytic degradation of *E.coliform* in water. *Water Research*, 2003, 37, 3452-3462.

Sun L. et Bolton J. Determination of the quantum yield for the photochemical generation of hydroxyl radicals in $TiO_2$ suspensions. *J. Phys. Chem*, 1996, 100, 4127-4134.

Sunada K., Kikuchi Y., Hashimoto K. et Fujishima A. Bactericidal and detoxification effects of $TiO_2$ thin film photocatalysts. *Environ Sci Technol*, 1998, 32, 726–728.

Sunada K., Watanabe T. et Hashimoto K. Studies on photokilling of bacteria on $TiO_2$ thin film. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 2003, 156, 227-233.

Thu H., Karkmaz M., Puzenat E., Guillard C. et Herrmann J. From the fundamentals of photocatalysis to its applications in environment protection and in solar purification of water in arid countries. *Research on Chemical Intermediates*, 2005, 31, 449-461.

Ulevicius V., Peciulyte D., Juozaitis A. et Lugauskas A. Survival of airborne fungal propagules exposed to ultraviolet irradiation. *Journal of Aerosol Science*, 1999, 30, 815-816.

Ulevicius V., Willeke K., Grinshpun S. A., Donnelly J., Lin X. et Mainelis G. Aerosolization of particles from a bubbling liquid characteristics and generator development. *Aerosol Science and Technology*, 1997, 26, 175-190.

Van Dijken J. et Harder W. Growth yields of microorganisms on methanol and methane. A theoretical study. *Biotechnology and Bioengineering*, 1975, 17, 15-30.

Vidal A., Diaz A. I., Hraiki A. E., Romero M., Muguruza I., Senhaji F. et Gonzalez J. Solar photocatalysis for detoxification and disinfection of contaminated water : pilot plant studies. *Catalysis Today*, 1999, 54, 283-290.

Villermaux J. *Génie de la réaction chimique. Conception et fonctionnement des réacteurs.* Paris: Tec & Doc-Lavoisier, 1995. 181-197. 2-85206-759-5.

Vincent G., Marquaire P. et Zahraa O. Abatement of volatile organic compounds using an annular photocatalytic reactor: Study of gaseous acetone. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 2008, 197, 177-189.

Vohra A., Goswami D. Y., Deshpande D. A. et Block S. S. Enhanced photocatalytic disinfection of indoor air. *Applied Catalysis B: Environmental*, 2006, 65, 57-65.

Wang C. et Ying J. Sol- Gel Synthesis and Hydrothermal Processing of Anatase and Rutile Titania Nanocrystals. *Chem. Mater*, 1999, 11, 3113-3120.

Wang W. et Ku Y. Photocatalytic degradation of gaseous benzene in air streams by using an optical fiber photoreactor. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 2003, 159, 47-59.

Wang W., Silva C. et Faria J. Photocatalytic degradation of Chromotrope 2R using nanocrystalline $TiO_2$/activated-carbon composite catalysts. *Applied Catalysis B: Environmental*, 2007, 70, 470-478.

Wang Z., Reponen T., Grinshpun S. A., Gorny R. L. et Willeke K. Effect of sampling time and air humidity on the bioefficiency of filter samplers for bioaerosol collection. *Journal of Aerosol Science*, 2001, 32, 661-674.

Witschger O. *Etude théorique et expérimentales de facteurs physiques d'échantillonnage de polluants particulaires. Application aux capteurs à fentes annulaires*. Thèse. Sciences. 1996. Université de Paris XII.

Wolfrum E., Huang J., Blake D., Maness P., Huang Z., Fiest J. et Jacoby W. Photocatalytic oxidation of bacteria, bacterial and fungal spores, and model biofilm components to carbon dioxide on titanium dioxide-coated surfaces. *Environ. Sci. Technol*, 2002, 36, 3412-3419.

Yamamoto A. et Imai H. Preparation of titania foams having an open cellular structure and their application to photocatalysis. *Journal of Catalysis*, 2004, 226, 462-465.

Yang X. et Wang Y. Photocatalytic effect on plasmid DNA damage under different UV irradiation time. *Building and Environment*, 2008, 43, 253-257.

Yoon K., Byeon J., Park J., Ji J., Bae G. et Hwang J. Antimicrobial Characteristics of Silver Aerosol Nanoparticles against *Bacillus subtilis* Bioaerosols. *Environmental Engineering Science*, 2008, 25, 289-294.

Yu J. C., Tang H. Y., Yu J., Chan H. C., Zhang L., Xie Y., Wang H. et Wong S. P. Bactericidal and photocatalytic activities of $TiO_2$ thin films prepared by sol-gel and reverse

micelle methods. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 2002, 153, 211-219.

Yu K. P., Lee G. W. M., Lin S. Y. et Huang C. P. Removal of bioaerosols by the combination of a photocatalytic filter and negative air ions. *Aerosol Science*, 2008, 39, 377-392.

Zuo G., Cheng Z., Chen H., Li G. et Miao T. Study on photocatalytic degradation of several volatile organic compounds. *Journal of hazardous materials*, 2006, 128, 158-163.

# ANNEXES

# ANNEXE 1 : COMPORTEMENT ET CARACTERISTIQUES PHYSIQUES DES AEROSOLS

## I- DYNAMIQUE D'UNE PARTICULE DANS UN FLUIDE

### I.1-Cas du régime stationnaire

Une particule se déplace dans un fluide sous l'influence de forces de surface et de volume, dont les résultantes $F_S$ et $F_V$ sont équilibrées par la force d'inertie $F_I$ soit (cf. figure A.I-1) :

$$F_S + F_V = F_I \quad \textbf{(A.I- 1)}$$

La vitesse $u_{CD}$ représente la différence entre la vitesse de la phase continue $u_C$ et la vitesse de la phase dispersée $u_D$ :

$$u_{CD} = u_C - u_D \qquad \textbf{(A.I- 2)}$$

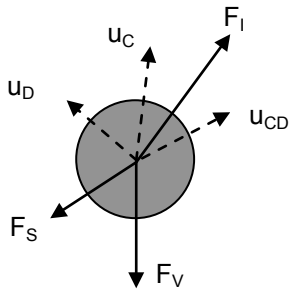



**Figure A.I- 1 : Forces exercées sur une particule et composantes de vitesse**

#### I.1.1- Forces de volume

Un champ de force est caractérisé localement par un vecteur a qui caractérise la force qui s'exerce sur l'unité de masse de milieu continu placé dans ce champ. Si l'on tient compte en particulier du champ de gravitation terrestre caractérisé par g, la force $F_V$ peut s'écrire sous la forme :

$$F_V = \rho_D V_P (a + g) \qquad \textbf{(A.I- 3)}$$

Dans cette relation, a rend compte des champs autres que la pesanteur.

#### I.1.2- Forces de surface

Les forces agissant sur une particule isolée en milieu infini, autres que les forces de volume sont les forces d'interaction entre le fluide et la particule.

- **La poussée d'Archimède**

La poussée d'Archimède ($F_A$) provient de la résultante des forces issues de la distribution hydrostatique des pressions. D'une façon générale, la distribution des pressions dans le fluide crée sur la particule une force de résultante $F_p$ telle que :

$$F_p = -V_p \nabla_p \quad \textbf{(A.I- 4)}$$

Dans un écoulement, la distribution des pressions est hydrostatique (pression motrice constante), perturbée par l'existence d'une distribution des vitesses et de frottements. Si l'on considère la partie de la force $F_p$ liée à la répartition hydrostatique des pressions, il vient :

$$\nabla_p = \rho_C g \qquad \textbf{(A.I- 5)}$$

$$\text{Et } F_A = -V_p \rho_C g \qquad \textbf{(A.I- 6)}$$

- **La force de traînée**

La force de traînée T est constituée de la projection sur la vitesse relative de la force de frottement $F_f$ (cf. figure A.I-2). Cette force est constituée de la force de pression provenant de la composante non hydrostatique du champ de pression, d'une part, et d'autre part de la résultante des forces de frottement tangentielles, issues de la viscosité du fluide et de l'évolution des vitesses induites par la présence de la particule. Si $A_p$ est le maître couple de la particule par rapport à la vitesse relative $u_{CD}$, on définit généralement le coefficient de traînée $C_X$ tel que :

$$C_{X0} = \frac{\dfrac{T}{A_P}}{\dfrac{1}{2}\rho_C |u_{CD}| u_{CD}} = \frac{\dfrac{T}{A_P}}{\dfrac{1}{2}\rho_C {u_{CD}}^2} \qquad \textbf{(A.I- 7)}$$

Plus formellement, le coefficient de traînée peut s'écrire sous la forme :

$$C_{X0} = \frac{\dfrac{T_0}{A_P}}{\dfrac{1}{2}\rho_C {u_{CD}}^2} = f(\mathrm{Re}_{P0} = \frac{\rho_C u_{CD} d_p}{\mu_C}) \qquad \textbf{(A.I- 8)}$$

L'indice 0 rappelle que la fraction de volume occupée par la phase dispersée tend vers 0.
Le coefficient de traînée est fréquemment déterminé par la mesure de la vitesse terminale de déplacement de la particule étudiée dans différents fluides. Il est également possible de prévoir la force de traînée et de portance par résolution numérique de l'écoulement dans la couche limite autour de la particule. En outre, des corrélations empiriques de $C_{X0}$ sont disponibles pour des particules sphériques, avec une bonne précision.

A titre d'exemple :

Selon Stokes, pour $\mathrm{Re}_{P0} \leq 1$,

$$C_{X0} = \frac{24}{\mathrm{Re}_{P0}} \qquad \textbf{(A.I- 9)}$$

Selon Brauer (1979), pour $\mathrm{Re}_{P0} \leq 3.10^5$

$$C_{X0} = \frac{24}{\mathrm{Re}_{P0}} + \frac{3{,}73}{{\mathrm{Re}_{P0}}^{1/2}} - \frac{4{,}83.10^{-3}\,{\mathrm{Re}_{P0}}^{1/2}}{1 + 3{,}00.10^{-6}\,{\mathrm{Re}_{P0}}^{3/2}} + 0{,}49 \qquad \textbf{(A.I- 10)}$$

Selon Haider et Levenspiel (1989), pour $\mathrm{Re}_{P0} \leq 3.10^5$

$$C_{X0} = \frac{24}{\mathrm{Re}_{P0}}(1 + A{\mathrm{Re}_{P0}}^{B}) + \frac{C}{1 + \dfrac{D}{\mathrm{Re}_{P0}}} \qquad \textbf{(A.I- 11)}$$

Avec A=0,1806 ; B=0,6459 ; C=0,4251 ; D=6881

Pour des particules non sphériques, comme les particules isométriques, Pettyjhon et Christiansen (1948) ont introduit dans les corrélations, le coefficient de sphéricité de Wadell $\Psi_S$ :

$$\Psi_S = \frac{Surface\ de\ la\ sphère\ de\ volume\ V_P}{Surface\ de\ la\ particule\ S_P} \quad \textbf{(A.I- 12)}$$

Haider et Levenspiel (1989), ont adapté les coefficients de la relation (A.I-11) en fonction de $\Psi_S$ :

$$\begin{aligned} A &= \exp(2{,}3288 - 6{,}4581\Psi_S + 2{,}4486\Psi_S{}^2) \\ B &= 0{,}0964 + 0{,}5565\Psi_S \\ C &= \exp(4{,}9050 - 13{,}8944\Psi_S + 18{,}4222\Psi_S{}^2 - 10{,}2599\Psi_S{}^3) \\ D &= \exp(1{,}4681 + 12{,}2584\Psi_S - 20{,}7322\Psi_S{}^2 + 15{,}8855\Psi_S{}^3) \end{aligned} \quad \textbf{(A.I- 13)}$$

- **La force de portance**

Lorsque la portance est induite par l'écoulement, on définit un coefficient de portance $C_Z$, analogue au coefficient de traînée et tel que pour une particule sphérique isolée :

$$C_{Z0} = \frac{\frac{P_0}{A_P}}{\frac{1}{2}\rho_C u_{CD}{}^2} = f(\mathrm{Re}_{P0} = \frac{\rho_C u_{CD} d_p}{\mu_C}) \quad \textbf{(A.I- 14)}$$

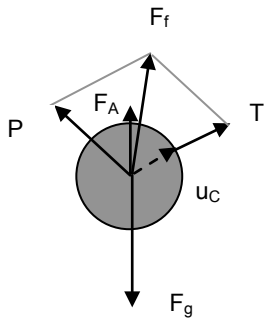



**Figure A.I- 2 : Forces agissant sur une particule en écoulement uniforme**

L'évaluation du coefficient de portance a été largement étudiée à faible nombre de Reynolds. Par contre, pour les valeurs modérées ou très grandes du nombre de Reynolds, aucune théorie générale n'existe pour prédire correctement le phénomène. L'apparition d'un sillage et de l'instationnarité de l'écoulement compliquent énormément le problème. Ainsi, les corrélations disponibles permettant de prédire le coefficient de portance ne concernent que le régime de Stokes et son voisinage immédiat.

Selon Harper et Chang (1968), dans un écoulement cisaillé, si le mouvement de la particule est colinéaire au mouvement du fluide, les forces de traînée et de portance sont alors définies à partir du Reynolds de cisaillement :

$$\frac{T}{3\pi\mu_C d_P u_{CD}} = 1 + 0{,}472\sqrt{\mathrm{Re}_\gamma} \ \textbf{ et } \ \frac{P}{3\pi\mu_C d_P u_{CD}} = 0{,}1715\sqrt{\mathrm{Re}_\gamma} \ \textbf{ avec } \ \mathrm{Re}\,\gamma = \frac{\gamma\rho_C d_P{}^2}{\mu_C} \ \textbf{(A.I- 15)}$$

### I.1.3- Cas particulier : la sédimentation d'une particule sphérique

La sédimentation est un phénomène de déplacement pour les particules dont le diamètre est supérieur à 1 µm. Les forces d'interaction qui s'exercent sur une particule isolée en milieu

infini se limitent à un couple et une force résultante (cf. figure A.I-3). Sauf dissymétrie très prononcée, le couple finit par s'aligner avec la direction de l'écoulement. Ainsi, seules la traînée et une force extérieure (gravité, accélération…) interviennent pour produire un mouvement relatif de la particule dans le fluide.

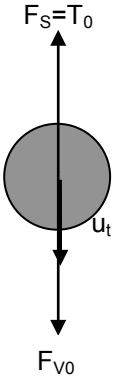



**Figure A.I- 3 : Déplacement relatif stationnaire d'une particule sous l'influence de la gravité et des frottements**

Ainsi, pour une particule sphérique soumise à la gravitation terrestre, l'égalité des forces de pesanteur (incluant la poussée d'Archimède) et de frottement en chute verticale, conduit à la notion de vitesse terminale de déplacement ($u_t$). Le bilan de force s'écrit :

$$F_{v0} = \frac{\pi d_P^{\,3}}{6} g\Delta\rho = T_0 = C_{X0t} \frac{\pi d_P^{\,2}}{4} \frac{1}{2} \rho u_t^{\,2} \qquad \textbf{(A.I- 16)}$$

Il est possible de s'affranchir du coefficient de traînée en introduisant le nombre d'Archimède tel que :

$$C_{X0t}\,\mathrm{Re}_t^{\,2} = \frac{4}{3}\frac{g d_P \Delta\rho}{\rho_C u_t^{\,2}}\left(\frac{\rho_C u_t d_P}{\mu_C}\right)^2 = \frac{4}{3}\frac{\rho_C \Delta\rho d_P^{\,3}}{\mu_C^{\,2}} = \frac{4}{3} Ar \qquad \textbf{(A.I- 17)}$$

$$Ar = \frac{\rho_C g \Delta\rho d_P^{\,3}}{\mu_C^{\,2}} = \frac{3}{4} C_{X0t}\,\mathrm{Re}_t^{\,2} \qquad \textbf{(A.I- 18)}$$

## I.2- Effets d'instationnarité

### I.2.1- Terme de masse virtuelle

Une particule qui se déplace dans un fluide entraîne du liquide dans son mouvement (cf. figure A.I-4). Lors d'une accélération relative de ce mouvement, la particule doit fournir une force correspondante à l'inertie du volume entraîné, volume qui représente généralement la fraction $C_E$ du volume de la particule. La masse de ce volume est la masse virtuelle. Sans entrer dans le détail, l'introduction du terme de masse virtuelle demeure incontournable pour la compréhension des phénomènes instationnaires produits en régime transitoire par le déplacement d'une particule dans un fluide.

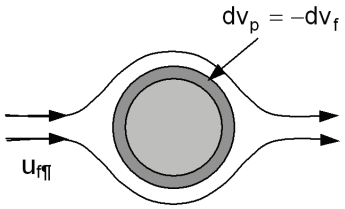



**Figure A.I- 4 : Modification de volume d'une particule dans un écoulement**

- **Pression moyenne exercée sur une particule immergée**

Si une particule, placée dans un écoulement, modifie son volume de $dv_p$ alors le travail des forces de pression accroît l'énergie cinétique du fluide. Ainsi, si la particule conserve sa forme, la pression moyenne surfacique $\langle Pi \rangle$ qui s'exerce sur la particule est :

$$\langle Pi \rangle = p_0 - \frac{1}{2}\rho_C u_{CD}{}^2 (1 + C_E) \qquad \textbf{(A.I- 19)}$$

La résolution de l'écoulement à potentiel des vitesses autour de la sphère permet d'interpréter l'expression de la vitesse tangentielle, qui placée dans l'équation de Bernoulli conduit à l'expression de la pression surfacique de la sphère. La pondération superficielle de cette pression comparée à l'expression (A.I-19) fournit la valeur $C_E = 0,5$.

- **Force exercée sur une particule dans un écoulement non uniforme en l'absence de viscosité et de forces de volumes**

Sans considérer les forces de volume (poids par exemple) et les forces de frottement (traînée), la force résultante induite par la pression et l'inertie, pour une sphère en situation de perturbation avec $C_E = 0,5$ s'écrit :

$$F_E = C_E \rho_C V_P \frac{du_{CD}}{dt} \quad \textbf{(A.I- 20)}$$

Cette force est appelée traînée de masse virtuelle.

### I.2.2- Force de Basset

Elle traduit l'effet de l'accélération sur le développement de la couche limite, à savoir que ce n'est pas seulement l'importance de la couche limite qui qualifie la force de frottement mais également la façon dont elle a été créée. Cette force est une force de mémoire. Elle est fournie par Basset (1961) sous la forme :

$$F_B = C_B \frac{3}{2}\sqrt{\pi \mu_C \rho_C}\, d_P{}^2 \int_{-\infty}^{t} \frac{du_{CD}(\lambda)}{d\lambda} \frac{d\lambda}{\sqrt{t-\lambda}} \qquad \textbf{(A.I- 21)}$$

Le coefficient $C_B$ qui vaut 1 en régime de Stokes a été généralisé pour les grandes valeurs du nombre de Reynolds par Odar et Hamilton (1964) sous la forme :

$$C_A = \frac{d_P}{u_{CD}{}^2} \frac{du_{CD}}{dt} \qquad C_B = 0,48 + 0,52\left(\frac{C_A}{1 + C_A}\right)^3 \qquad \textbf{(A.I- 22)}$$

## II- CARACTERISTIQUES PHYSIQUES DES AEROSOLS

### II.1- Dimensions statistiques des aérosols

Les théories de la physique des aérosols sont établies, le plus souvent, pour des particules sphériques. Malheureusement, les aérosols rencontrés habituellement sont loin d'avoir cette forme idéale. Afin de définir les dimensions de ces particules, plusieurs diamètres statistiques ont été définis.

#### II.1.1- Les différents diamètres utilisés

- **Le diamètre de Martin**

C'est la distance moyenne d'une droite divisant la particule en deux surfaces égales $S_1$ et $S_2$, suivant une direction donnée.

- **Le diamètre de Feret**

C'est la distance moyenne séparant deux points opposés de l'aérosol, suivant une direction donnée fixée.

- **Le diamètre de Stokes $d_s$**

C'est le diamètre d'une sphère ayant la même vitesse de chute et la même vitesse spécifique que la particule considérée.

- **Le diamètre aérodynamique $d_{ae}$**

C'est le diamètre d'une sphère ayant la même vitesse de chute que la particule, et une masse spécifique égale à 1 $g.cm^{-3}$.
Dans le cas d'une particule quelconque, on montre que :

$$d_{ae} = \sqrt{\frac{\rho}{\chi}} d_{50} \quad \textbf{(A.I- 23)}$$

avec ρ : la masse spécifique de l'aérosol
χ : le facteur de forme dynamique de l'aérosol (cf paragraphe suivant)
$d_{50}$ : le diamètre médian en masse de la distribution granulométrique des aérosols.

- **Le diamètre du volume équivalent $d_{ev}$**

C'est le diamètre de la sphère possédant la même masse m que la particule, et la masse volumique ρ du matériau.

$$d_{ev} = \left[ \frac{m}{(\pi/6)\rho} \right]^{1/3} \quad \textbf{(A.I- 24)}$$

- **Le diamètre projeté**

C'est le diamètre d'un cercle possédant la même surface que la particule examinée.

#### II.1.2- Les facteurs de forme

Il est donc possible de ramener tout aérosol à une particule sphérique à l'aide des diamètres statistiques qui viennent d'être définis. Seulement, les écarts entre ces différents diamètres sont d'autant plus grands que la forme de la particule s'écarte fortement de celle d'une sphère. La notion de facteur de forme est donc de grande importance pour appréhender le

comportement d'un aérosol quelconque, et corréler des analyses dimensionnelles réalisées à l'aide de processus différents.

- **Les facteurs de forme géométriques**

Si $d_p$ est la dimension de la particule considérée, de surface $S_p$ et de volume $V_p$, on peut définir deux facteurs de forme géométriques $\alpha_s$ et $\alpha_v$ à l'aide des deux relations :

$$S_p = \alpha_s d_p^2 \qquad V_p = \alpha_p d_p^3 \qquad \textbf{(A.I- 25)}$$

avec : $\alpha_s$ : le facteur de forme en surface (= $\pi$ pour une sphère)
$\alpha_v$ : le facteur de forme en volume (= $\pi/6$ pour une sphère)

- **Le facteur de forme dynamique $\chi$**

Il se définit comme le rapport entre la force de traînée sur la particule non sphérique et celle sur une particule sphérique de même volume et d'égale vitesse limite de sédimentation.

$$\chi = \frac{\rho_p}{\rho_m}\left(\frac{d_{ev}}{d_s}\right)^2 \qquad \textbf{(A.I- 26)}$$

$\chi > 1$ et $\chi = 1$ pour une sphère
avec $\rho_p$ : la masse spécifique de l'aérosol
$\rho_m$ : la masse spécifique du matériau
$d_{ev}$ : le diamètre équivalent en volume
$d_s$ : le diamètre de Stokes

- **Le coefficient de sphéricité**

C'est le rapport entre la surface de la sphère de même volume et la surface de la particule. Egal à 1 pour la sphère, il est inférieur à 1 pour les autres formes.

## II.2- Les lois mathématiques de distributions granulométriques

### II.2.1- Etablissement d'une granulométrie

L'aérosol qu'on rencontre le plus souvent est polydispersé, c'est-à-dire composé de particules de tailles différentes. Il faut donc trouver une interprétation statistique susceptible de caractériser sa distribution granulométrique. Il faut d'abord commencer par classer les résultats des mesures, en découpant l'intervalle dimensionnel s'étendant de la plus petite à la plus grosse particule en classe de largeurs $\Delta d_{pi}$. On dénombre ainsi le nombre $\Delta N_i$ de particules comprises dans chacun des intervalles $\Delta d_{pi}$. La représentation graphique (cf figure A.I-5) résultante est l'histogramme de distribution. La surface de chacun des rectangles correspondant aux différents $\Delta d_{pi}$ est proportionnelle à la fréquence observée, donc au nombre de particules dans chaque classe.

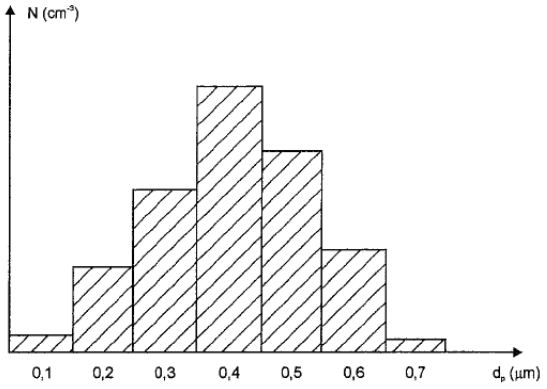



**Figure A.I- 5 : Histogramme d'une distribution granulométrique**

### II.2.2- Distribution cumulée

Dans de nombreux cas, il peut être intéressant de connaître le nombre de particules de dimensions inférieures ou supérieures à une certaine limite $d_0$. On utilise alors une distribution granulométrique cumulée obtenue en dénombrant toutes les particules de dimensions inférieures (ou supérieures) à $d_0$, et en portant sur un graphique, le résultat en fonction de dp. Ainsi, l'ordonnée est : $N_j = \sum_{t=1}^{j} N_1$, $N_1$ étant le nombre de particules comprises dans l'intervalle $d_{p,t}$-$d_{p,t-1}$, l'abscisse étant égale à $d_j$.
La figure A.I-6 illustre une distribution cumulée ascendante définie par :

$$f_1(d_p) = \int_0^{d_o} f(d_p)\, d\, d_p \qquad \textbf{(A.II- 1)}$$

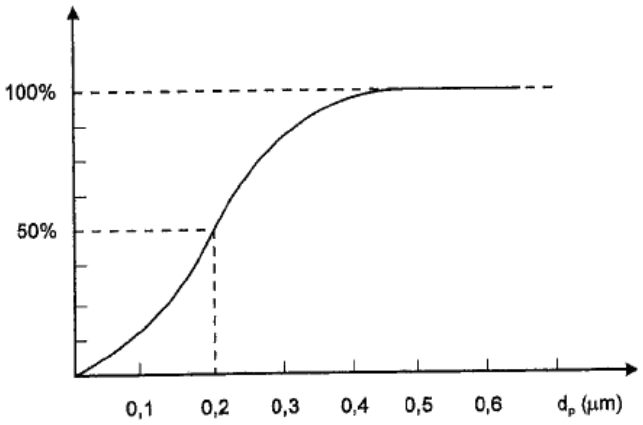



**Figure A.I- 6 : Distribution cumulée**

$f_1(d_p)$ est la fraction de particules de dimensions inférieures à une valeur donnée. On voit que sur une telle courbe, il est très facile de déterminer le diamètre médian en nombre, qui est le diamètre tel que 50 % des particules ont des dimensions supérieures, tandis que 50 % ont des dimensions plus petites.

### II.2.3- Paramètres caractéristiques des distributions granulométriques

- Moyenne arithmétique *:* lorsqu'on observe $N_i$ particules de dimension $d_i$

$$\overline{d_p} = \frac{\sum N_i d_i}{\sum N_i} \qquad \textbf{(A.I- 27)}$$

- Moyenne géométrique :

$$N\sqrt{d_i N_i} \ avec \ N = \sum N_i \qquad \textbf{(A.I- 28)}$$

- Médiane : valeur de la variable autour de laquelle les observations se partagent par moitié ;
- Mode : valeur de la variable pour laquelle il y a la plus grand nombre d'observations ;
- Etendue de la granulométrie étudiée : différence entre la plus faible et la plus forte des valeurs observées ;
- Variance ou fluctuation :

$$\sigma^2 = \frac{\sum N_i (d_i - \overline{d_i})^2}{\sum N_i} \qquad \textbf{(A.I- 29)}$$

- Ecart type (ou déviation standard) : $\sigma$
- Ecart type relatif :

$$\frac{\sigma}{\overline{d_p}} \qquad \textbf{(A.I- 30)}$$

- Interquartile : différence entre les valeurs de $d_p$ auxquelles correspondent 75 et 25 % d'observations plus petites ou plus grandes.

### II.2.3- Loi de distribution normale ou gaussienne

Il s'agit d'une loi statistique représentative de la distribution granulométrique très peu souvent rencontrée en physique des aérosols. Elle s'exprime par la relation :

$$f(d_p) = \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} \exp\left[ -\frac{(d_p - \overline{d_p})^2}{2\sigma^2} \right] \qquad \textbf{(A.I- 31)}$$

La figure A.I-7 représente la distribution de fréquence N=f($d_p$). La courbe correspondante est symétrique et la moyenne arithmétique, la moyenne et le mode sont confondus. Par ailleurs, 68 % des particules ont des dimensions comprises entre -σ et +σ, alors 95 % sont entre -1,96σ et +1,96σ.

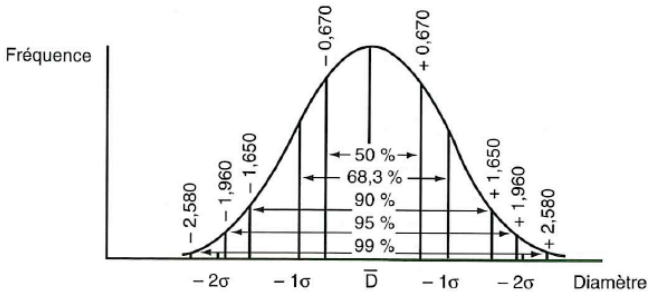



**Figure A.I- 7 : Représentation de la loi normale**

### II.2.4- Loi de distribution log-normale

C'est la loi la plus fréquemment observée au cours des mesures granulométriques. L'expression mathématique de la loi log-normale est donnée par l'équation A.I-32.

$$f(d_p) = \frac{1}{\log \sigma_g \sqrt{2\pi}} \exp\left[ -\frac{(\log d_p - \log d_g)^2}{2(\log \sigma_g)^2} \right] \qquad \textbf{(A.I- 32)}$$

$d_g$ est le diamètre géométrique moyen (ou diamètre moyen en nombre), défini par :

$$\log d_g = \frac{\sum \Delta N_i \cdot \log d_i}{\sum \Delta N_i} \qquad \textbf{(A.I- 33)}$$

$\sigma_g$ est l'écart type géométrique tel que :

$$\log \sigma_g = \sqrt{\frac{\sum \Delta N_i (\log d_i - \log d_g)^2}{\sum \Delta N_i}} \qquad \textbf{(A.I- 34)}$$

La figure A.I-8 indique l'allure de la fonction f(dp) en fréquence. 68,2 % des particules ont des dimensions comprises entre $d_g/\ \sigma_g$ et $d_g \sigma_g$.

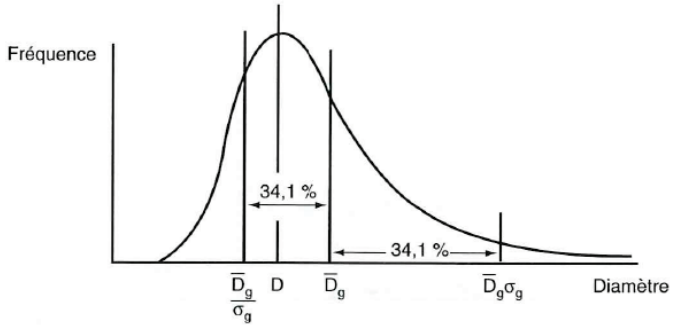



**Figure A.I- 8 : Représentation de la loi log-normale**

La figure A.I-9 représente la courbe $\frac{dN}{dd_p} = f(d_p)$ d'écart type $\sigma_g$=2, sur laquelle figure en nombre, en surface et en masse, les diamètres médians, moyens ainsi que le mode.

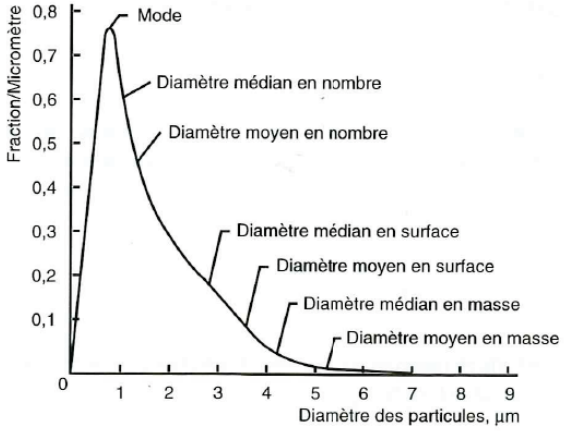



**Figure A.I- 9 : Différents diamètres caractéristiques d'une distribution log-normale**

Le lecteur trouvera de plus amples informations sur d'autres lois mathématiques dans l'ouvrage de Renoux et al., 1998).

# ANNEXE 2 : CARACTERISTIQUES OPTIQUES DE LA LAMPE, DES SUPPORTS PHOTOCATALYTIQUES ET DES AUTRES MATERIAUX

- **Poids du photon lié à la loi d'émission de la lampe avec réglette**

Les lois d'émission de la lampe avec réglette ont été déterminées expérimentalement avec un radiophotomètre ILT1400-A, capteur UVA # 28704 (International Light Technologies, Massachusetts, USA) selon les trois directions de l'espace : theta, phi et z et permettent de pondérer les photons lancés selon les lois d'émissions déterminées par des courbes de tendance.

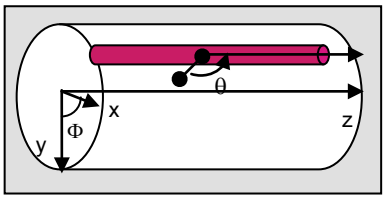



**Figure A.II- 1: Repères associés au dispositif**

*Expression du profil selon theta (axial)* déterminé à partir de la figure A.II.2 *:*

Pour $\theta \in [0 ; 2\pi]$, $y_\theta = \sin^2(\theta)$

*Expression du profil selon phi (radial)* déterminé à partir de la figure A.II.2 *:*

Pour $\Phi \in [0 ; 2\pi/3]$ et $\Phi \in [4\pi/3 ; 2\pi]$, $y_\Phi = 1$

Pour $\Phi \in [2\pi/3 ; 8\pi/9]$, $y_\Phi = -1{,}5142\Phi + 6{,}5623$

Pour $\Phi \in [8\pi/9 ; \pi]$ et $\Phi \in [\pi ; 10\pi/9]$ , $y_\Phi = 0$

Pour $\Phi \in [10\pi/9 ; 4\pi/3]$, $y_\Phi = 1{,}5142\Phi - 7{,}7091$

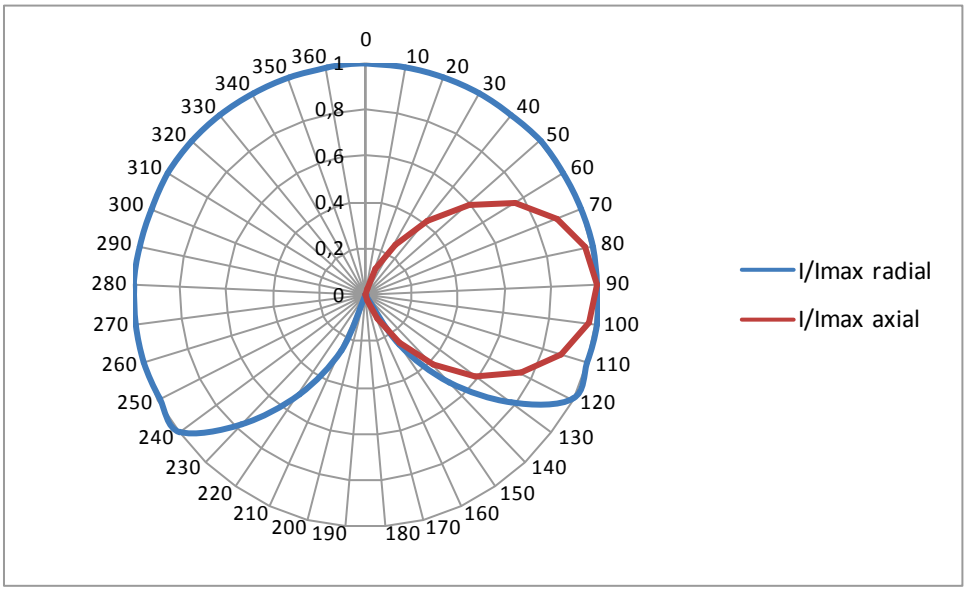



**Figure A.II- 2: Loi d'émission expérimentale selon thêta (axial) et phi (radial)**

*Expression du profil selon z* déterminé à partir de la figure A.II.3.

Pour $z < L/2 - z_L/2$ et $z > L/2 + z_L/2$, $y_z = 0$

Pour $z < L/2 - z_L/2 + 0{,}157 z_L$, $y_z = 4{,}32 * ((z - L/2 + z_L/2)/z_L) + 0{,}32$

Pour $z > L/2-z_L/2+0,843z_L$, $y_z = -4,32*((z-L/2+z_L/2)/z_L)+4,64$
Sinon $y_z = 1$

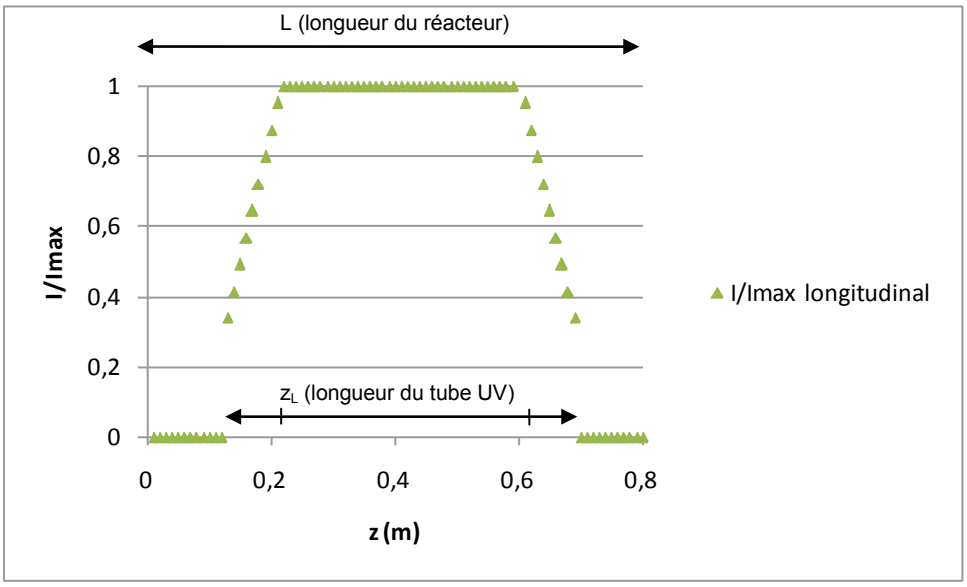



**Figure A.II- 3: Loi d'émission expérimentale selon z (longitudinal)**

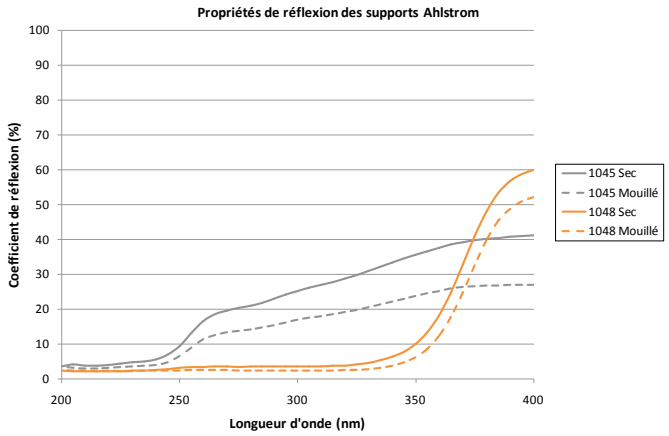
Le poids global d'un photon est déterminé par la combinaison des poids selon les trois directions de l'espace : $y=y_\Phi*y_\theta*y_z$

- **<u>Devenir des photons lorsqu'ils rencontrent le support photocatalytique</u>**

Les photons émis par lampe peuvent rencontrer le support photocatalytique dont les propriétés optiques ont été déterminées expérimentalement par l'utilisation d'un spectroradiomètre UV/Vis/NIR Lambda 950 (PerkinElmer, Courtaboeuf, France), pour des longueurs d'onde entre 200 et 400 nm, sachant que nous ne considérerons que la portion 300-400 nm puisque le spectre de la lampe utilisée ne s'étend que sur cette plage de longueur d'onde.
A partir de données expérimentales, il est possible de déduire des courbes de tendance pour déterminer les coefficients de réflexion, absorption et transmission en fonction des différents supports photocatalytiques (mouillés) et de la longueur d'onde.

*Support Ahlstrom 1048 mouillé*

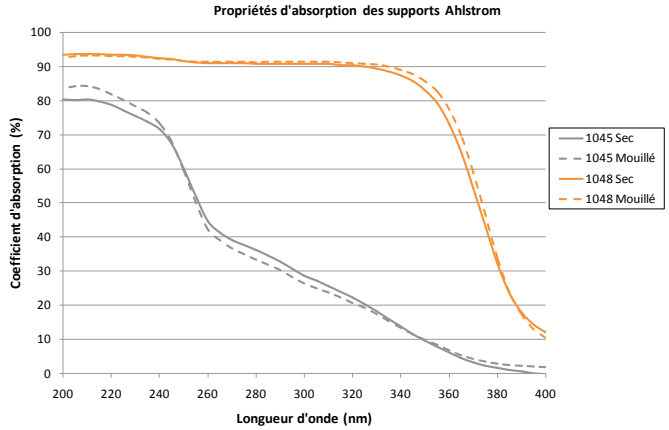
➢ <u>Réflexion</u>




Si $\lambda \leq 350$nm
Coef_reflexion=0,06354*λ-17,36
Si 350 nm $\leq \lambda \leq$380 nm
Coef_reflexion=1,153*λ-400,3
Sinon
Coef_reflexion=0,6092*λ-190,1

**Figure A.II- 4: Coefficient de réflexion du support Ahlstrom**

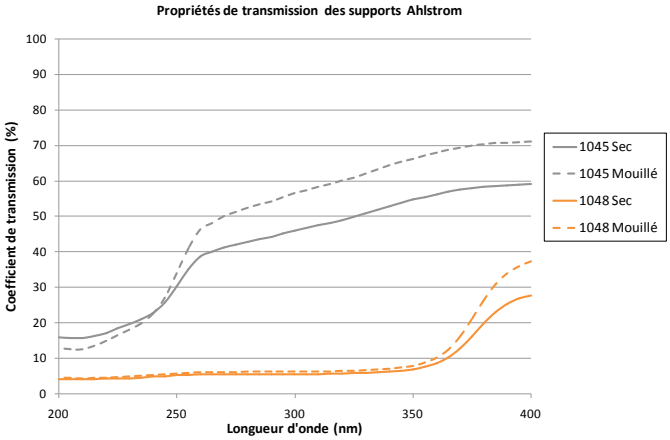
➢ Absorption




Si λ≤355nm
Coef_abs=-0,1302*λ+132,1
Si 355 nm ≤λ≤385 nm
Coef_abs=-2,051*λ+815
Sinon
Coef_abs=-0,8827*λ+362,6

**Figure A.II- 5: Coefficient d'absorption du support Ahlstrom**

➢ Transmission

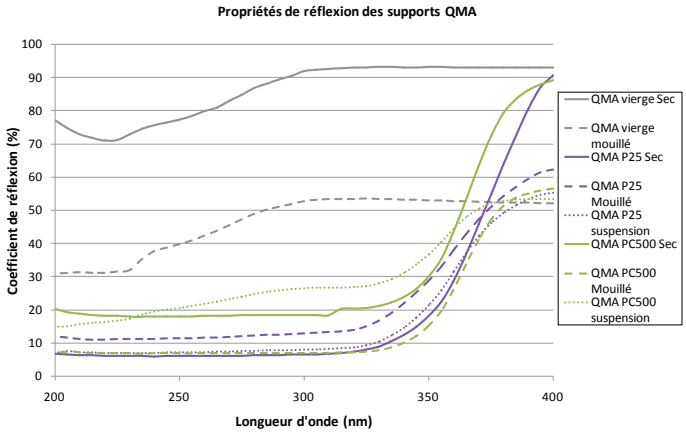



Coef_transmission=100-(coef_reflexion+coef_abs)

**Figure A.II- 6: Coefficient de transmission du support Ahlstrom**

*Supports QMA P25 et PC500 mouillés*

➢ Réflexion




**QMA imprégné P25**
Si λ≤330nm
Coef_reflexion=0,1121*λ-21,44
Si 330 nm ≤λ≤370 nm
Coef_reflexion=0,7757*λ-241,1
Sinon
Coef_reflexion=0,50048*λ-138,2

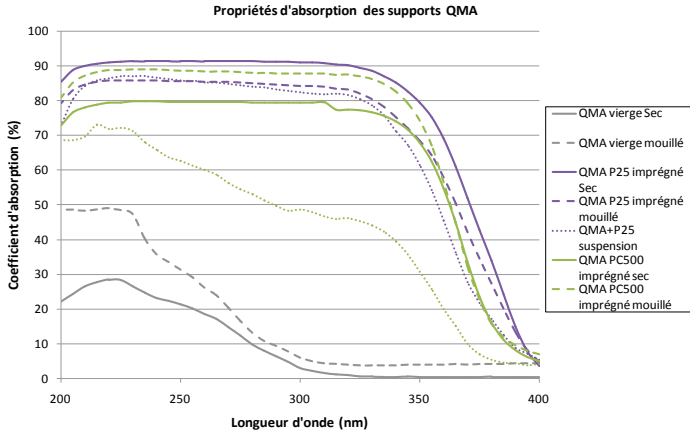
**QMA imprégné PC500**
Si λ≤350nm
Coef_reflexion=0,1344*λ-34,81
Si 350 nm ≤λ≤380 nm
Coef_reflexion=1,275*λ-431,7
Sinon
Coef_reflexion=0,2568*λ-45,58

**QMA +P25 suspension**
Si λ≤330nm
Coef_reflexion=0,07*λ-13.2751
Si 330 nm ≤λ≤370 nm
Coef_reflexion=0,811*λ-260,3
Sinon
Coef_reflexion=0,430*λ-115,4

**QMA + PC500 suspension**
Si λ≤340nm
Coef_reflexion=0,098*λ-3,661
Si 340 nm ≤λ≤375 nm
Coef_reflexion=0,636*λ-185,5
Sinon
Coef_reflexion=0,05*λ+33,6970

**Figure A.II- 7 : Coefficient de réflexion des supports QMA**

➢ Absorption




**QMA imprégné P25**
Si λ≤350nm
Coef_abs=-0,3038*λ+178,3
Sinon
Coef_abs=-1,366*λ+547,7

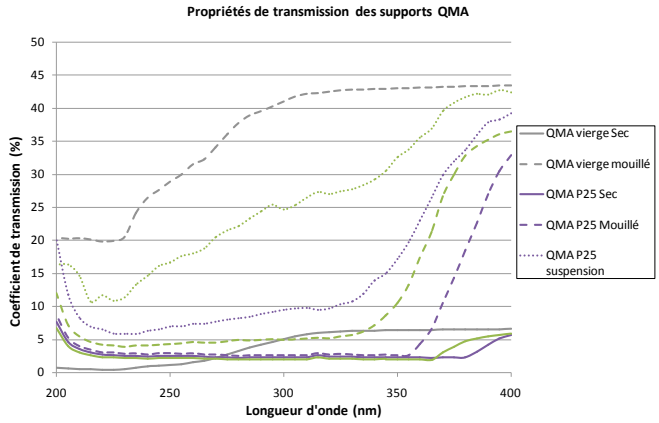
**QMA imprégné PC500**
Si λ≤350nm
Coef_abs =-0,2263*λ+158,4
Si 350 nm ≤λ≤380 nm
Coef_abs =-2,057*λ+795,6
Sinon
Coef_abs =-0,4391*λ+181,7

**QMA + P25 suspension**
Si λ≤330nm
Coef_abs=-0,105*λ+114,5
Sinon
Coef_abs=-1,194*λ+475,4

**QMA + PC500 suspension**
Si λ≤330nm
Coef_abs =-0,138*λ+89.95
Si 330 nm ≤λ≤375 nm
Coef_abs =-0,890*λ+341,1
Sinon
Coef_abs =-0,112*λ+48,68

**Figure A.II- 8: Coefficient d'absorption des supports QMA**

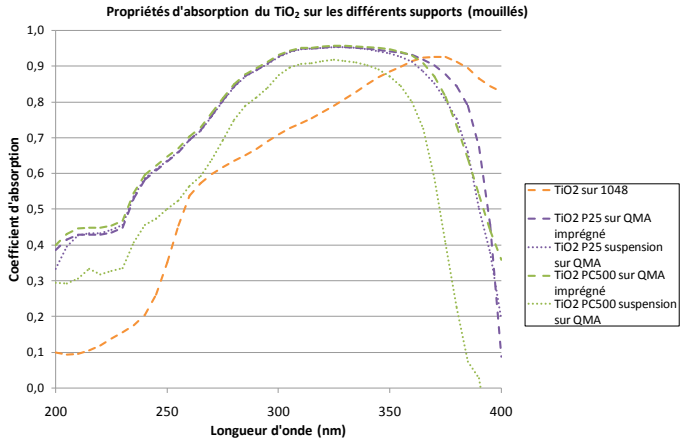
➢ Transmission




**Pour chacun des supports**
Coef_transmission=100-(coef_reflexion+coef_abs)

**Figure A.II- 9: Coefficient de transmission des supports QMA**

*Absorption du dioxyde de titane sur chacun des supports*




**Sur Ahlstrom**

Si λ≤370nm

$Abs_TiO_2=0,003340*\lambda-0,2927$

Sinon

$Abs_TiO_2=-0,003626*\lambda+2,2813$

**Sur QMA imprégné P25**

Si λ≤385nm

$Abs_TiO_2=-0,001205*\lambda+1,335$

Sinon

$Abs_TiO_2=-0,04640*\lambda+18,71$

**Sur QMA imprégné PC500**

Si λ≤370nm

$Abs_TiO_2=-0,0005872*\lambda+1,136$

Sinon

$Abs_TiO_2=-0,01766*\lambda+7,429$

**Sur QMA + P25 suspension**

Si λ≤375nm

$Abs_TiO_2=-0,0012471*\lambda+1,344$

Sinon

$Abs_TiO_2=-0,024867*\lambda+10,184$

**Sur QMA + PC500 suspension**

Si λ≤350nm

$Abs_TiO_2=-0,00009229*\lambda+0,93039$

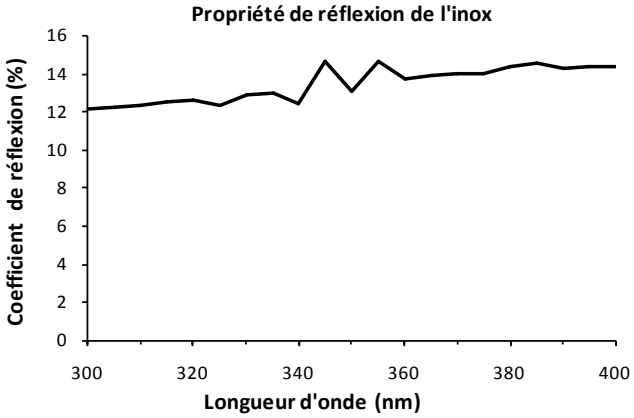
Sinon

$Abs_TiO_2=-0,023015*\lambda+9,0245$

**Figure A.II- 10 : Coefficient d'absorption du dioxyde de titane**

- **<u>Devenir des photons lorsqu'ils rencontrent l'inox</u>**

On considère que l'inox ne transmet pas la lumière, par conséquent tout ce qui n'est pas réfléchi est absorbé.




Coef_reflexion_inox=0,14

**Figure A.II- 11 : Coefficient de réflexion de l'inox**

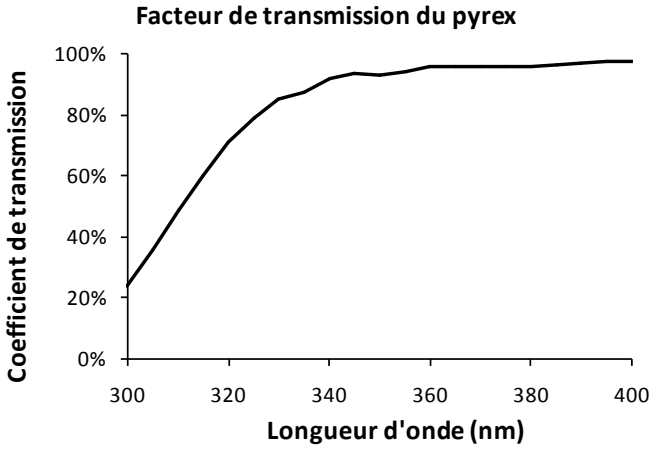
## <u>MINERALISATION DES BACTERIES PAR PHOTOCATALYSE : ADAPTATION DE LA SIMULATION</u>

La simulation du flux lumineux disponible pour la minéralisation des bactéries est basée sur celle utilisée pour l'inactivation en tenant compte de la présence du réacteur fermé en inox et du couvercle en pyrex.

Ainsi Flux photonique pour la minéralisation=

flux photonique pour l'inactivation × coefficient dû à l'inox × coefficient dû au pyrex

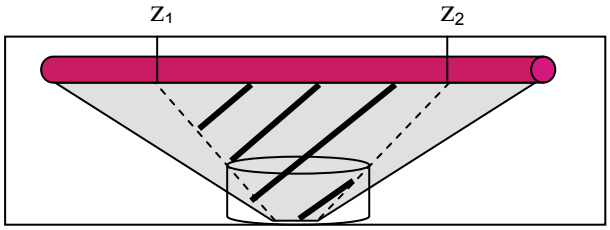
Concernant le pyrex, la figure A.II-12 montre que ce matériau transmet 90 % du spectre qui nous intéresse (autour de 365 nm).



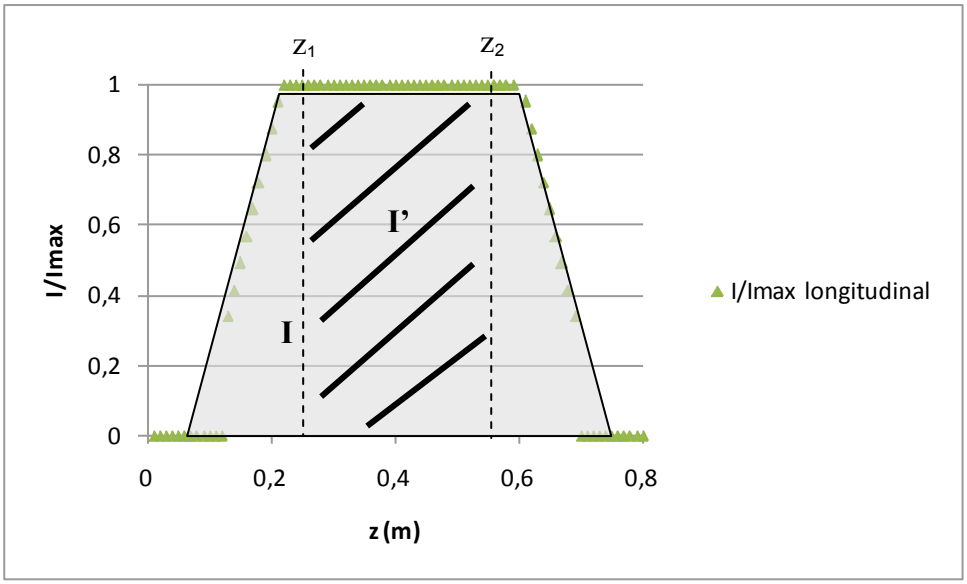

Coef_transmission_pyrex=0,9

**Figure A.II- 12 : Coefficient de transmission du pyrex**

La figure A.II-13 explique le calcul du coefficient dû à l'inox.




Comparé aux essais d'inactivation, le support photocatalytique ne reçoit donc qu'une partie de l'intensité de la lampe (hachurée) par rapport aux essais de minéralisation (grisée). Il est possible de calculer le rapport de ces deux intensités par détermination de l'air sous la courbe de la figure A.II-3.




Le coefficient dû à l'inox est donc le rapport de I sur I' et vaut 0,32.

# ANNEXE 3 : ANALYSES MICROBIOLOGIQUES COMPLEMENTAIRES. PROTOCOLES EXPERIMENTAUX.

## I. Analyse de la flore totale

Le dénombrement des bactéries totales est réalisé par microscopie à épifluorescence après un marquage par colorant spécifique, le DAPI.
Le marquage est réalisé selon les étapes suivantes :

- **Etape 1** : compléter le volume de l'échantillon destiné aux essais DAPI à 10 mL avec du tryptone sel stérile. Mélanger et agiter au vortex. Réserver 1 mL sur les 10 mL en vue d'une dilution éventuelle.
- **Etape 2** : Préparer la solution de DAPI de travail (5 $\mu g.mL^{-1}$) en diluant le contenu d'un tube de 500 µL de DAPI à 100 $\mu g.mL^{-1}$ dans 9,5 mL d'eau p.p.i. [§§]
- **Etape 3** : Ajouter au 9 mL restant, 1 mL de solution de DAPI à 5 $\mu g.mL^{-1}$. Concentration finale dans l'échantillon à 0,5 $\mu g.mL^{-1}$. Mélanger au vortex. Laisser en contact avec le colorant pendant 10 minutes à l'abri de la lumière.
- **Etape 4** : Préparer la rampe de filtration : entonnoir/grille/joint/tulipe et membrane de polycarbonate noire pour observation (47 mm) (face brillante dessus). Serrer à l'aide des pinces.
- **Etape 5** : Au terme de la période de contact, agiter, filtrer un à un chaque échantillon sur une membrane noire. Rincer avec deux volumes de 10 mL de tryptone sel ou d'eau stérile ultrapure.
- **Etape 6** : Placer la membrane sur une lame d'observation en verre dans une boîte de Petri et laisser sécher à l'air ambiant 2 à 3 minutes à l'obscurité.
- **Etape 7** : Réhydrater la membrane en déposant 20 µL de glycérine tamponée au centre de cette dernière, puis déposer une lamelle. Couper la partie de la membrane qui dépasse de la lamelle.
- **Etape 8** : Entourer les boites de papier aluminum pour les maintenir à l'obscurité. Lire les lames au plus vite, sinon les placer à 4°C au réfrigérateur.

Le dénombrement est réalisé par microscopie à épifluorescence à l'aide du logiciel Histolab. Pour que le résultat soit statistiquement valide, un nombre d'environ 400 cellules doit être compté.

## II. Analyse des endotoxines

Chaque échantillon (support photocatalytique) est transféré dans un tube Greiner (stérile et apyrogène) de 50 mL contenant 20 mL d'eau p.p.i. stérile et apyrogène. Les tubes sont agités pendant 60 minutes à 2000 rpm. L'étape d'extraction est complétée par une étape de centrifugation à 2000 g pendant 10 minutes à 4 °C.

La quantité d'endotoxines est dosée par la méthode au Lysat d'Amébocytes de Limule (LAL), méthode cinétique et chromogénique. La procédure employée utilise le kit LAL-Kinetic-QCL ™ commercialisé par la société Lonza.

Le dosage des endotoxines est réalisé sur deux exemplaires de solutions décrites dans le tableau A.III-1 :

[§§] p.p.i : pour préparation injectable

| Solutions | Descriptions | Nombre d'exemplaires |
|---|---|---|
| Echantillon | Solution à doser | 2 |
| Echantillon dopé | Solution à doser à laquelle est ajoutée 10 µL de solution d'endotoxines à 5 $UE.mL^{-1}$ | 2 |
| Gamme étalon | Solution d'endotoxines à<br>0,005 $UE.mL^{-1}$<br>0,05 $UE.mL^{-1}$<br>0,5 $UE.mL^{-1}$<br>5 $UE.mL^{-1}$<br>50 $UE.mL^{-1}$ | <br>2<br>2<br>2<br>2<br>2 |
| Témoin négatif | Eau p.p.i. | 2 |

**Tableau A.III- 1 : Solutions analysées lors du dosage LAL**

La gamme étalon est préparée à partir d'endotoxines lyophilisées et d'eau p.p.i. disponibles dans le kit LAL-Kinetic-QCL $^{TM}$, conformément aux indications du fournisseur. Ce kit utilise des flacons d'endotoxines lyophilisées d'*Escherichia coli* 055 :B5 et de l'eau p.p.i. Le flacon reconstitué est ensuite agité pendant 15 minutes au vortex à 2500 rpm.
La gamme étalon d'endotoxines est préparée dans des tubes en verre, par dilutions successives au $10^{ème}$ dans l'eau p.p.i., de la solution d'endotoxines à 50 $UE.mL^{-1}$.

Le dosage se déroule en sept étapes :

- **Etape 1** : préparation de la gamme étalon ;
- **Etape 2** : préparation des échantillons. Les extraits sont dilués successivement au $10^{ème}$ dans l'eau p.p.i. ;
- **Etape 3** : distribution de la gamme étalon, des échantillons, des témoins dans la plaque de microtitration dans les puits appropriés selon le plan de plaque défini, à raison de 100 µL par puits ;
- **Etape 4** : pré-incubation de la plaque de microtitration : incubation à 37° C pendant 10 minutes dans le lecteur ;
- **Etape 5** : préparation du réactif LAL : à l'aide du flacon lyophilisé du réactif LAL contenu dans le kit, le réactif est reconstitué en ajoutant un volume précis d'eau p.p.i. selon les indications du fournisseur. Le mélange est ensuite homogénéisé délicatement.
- **Etape 6** : distribution du LAL dans la plaque de microtitration. Le réactif LAL est distribué à l'aide d'un distributeur Combityp, dans les puits, à raison de 100 µL par puits. La réaction s'initie dès lors que le réactif est mis en contact avec une solution contenant des endotoxines. La distribution doit donc être régulière et sa durée ne doit pas excéder 90 secondes.
- **Etape 7** : incubation et lecture : la plaque est immédiatement incubée sans son couvercle dans le lecteur de plaque à 37° C. Le lecteur, piloté par le logiciel Win-QCL$^{TM}$ est paramétré de façon à effectuer une lecture de la densité optique de chaque puits à 405 nm toutes les 150 secondes.

La validité du dosage n'est valable que si certaines conditions sont satisfaites notamment :

- Le résultat pour le témoin négatif (blanc) ne doit pas dépasser le niveau du point d'étalonnage le plus bas (0,005 $UE.mL^{-1}$) ;

- La valeur du coefficient de corrélation de la courbe d'étalonnage doit être supérieure ou égale à 0,98.

Pour un même échantillon, les résultats du dosage ne sont valables que si les conditions suivantes sont satisfaites :

- Le coefficient de variation, calculé à partir des résultats du dosage obtenus pour deux répétitions d'un même échantillon, est inférieur ou égal à 10 % ;
- La valeur de recouvrement des endotoxines à partir des ajouts dosés doit être comprise entre 50 et 150 % de la quantité initialement introduite.

Si ces conditions ne sont pas satisfaites, le dosage doit être refait.

Les interférences sont mesurées à partir des ajouts dosés. Si les ajouts ne sont pas compris entre 50 et 150 %, il y a des interférences. Il faut donc diluer les échantillons afin de les lever.

# ANNEXE 4 : BANC D'ESSAIS DE DEGRADATION PHOTOCATALYTIQUE DE BIOAEROSOLS

Un banc d'essais de dégradation photocatalytique d'un bioaérosol a été élaboré en vue d'étudier l'efficacité de ce procédé et de caractériser les sous-produits gazeux et particulaires engendrés par un tel processus. La conception du dispositif expérimental a du être menée en intégrant de multiples contraintes liées à la manipulation de microorganismes (asepsie, encombrement…).

- **Local de travail et confinement du banc d'essais**

Un laboratoire a spécialement été aménagé pour cette étude et plus généralement pour la thématique de recherche sur les bioaérosols sur laquelle travaille l'INRS depuis quelques années. Il fonctionne en légère dépression (30 Pa) et l'apport d'air propre est assuré par une ventilation mécanique associée à une filtration haute efficacité. Le local a été conçu en prenant en compte des exigences spécifiques liées à la manipulation de microorganismes rassemblées dans un document édité par l'INRS (INRS, 2007a). Ces éléments concernent notamment la mise en conformité des murs, plafonds, sols, éclairages et l'aménagement des pièces.

Par ailleurs, pour assurer une protection de l'opérateur, du produit et de l'environnement, le banc d'essais sera confiné sous un poste de sécurité microbiologique (PSM) de type II, dont le principe de fonctionnement est schématisé sur la figure A.IV-1.



**Figure A.IV- 1: PSM de type II**

Dans les PSM de type II, l'air du laboratoire est aspiré par l'ouverture du PSM et passe sous le plan de travail par des orifices placés près de l'ouverture. Cette aspiration empêche la sortie des polluants vers l'opérateur. L'air qui passe sous le poste de travail est aspiré derrière l'enceinte vers le haut du PSM. Une partie de cet air est rejetée, après filtration à très haute efficacité, à l'extérieur du bâtiment ou dans le laboratoire (recyclage) ; l'autre partie étant soufflée verticalement dans l'enceinte. Le flux unidirectionnel vertical limite la contamination croisée des produits manipulés dans le PSM et leur contamination par les polluants présents d'air du laboratoire.

Les dimensions du PSM devront être les plus grandes possibles en imposant une largeur de 180 cm (taille standard la plus élevée). L'ouverture de la vitre frontale devra être adaptée à l'installation d'un banc d'essai encombrant, une ouverture pivotante étant préférable. Face à ces différentes contraintes, un cahier des charges a été élaboré et une consultation des fournisseurs organisée pour le choix du PSM le plus approprié.

- **Conception du dispositif expérimental**

Le dispositif expérimental doit permettre l'étude paramétrique de l'inactivation photocatalytique d'un bioaérosol test et la caractérisation des sous-produits gazeux et particulaires engendrés par un tel processus. Le schéma de principe du banc d'essais est représenté en figure A.IV-2. Ce dispositif est donc composé de deux éléments majeurs : le générateur de bioaérosols et le réacteur photocatalytique.

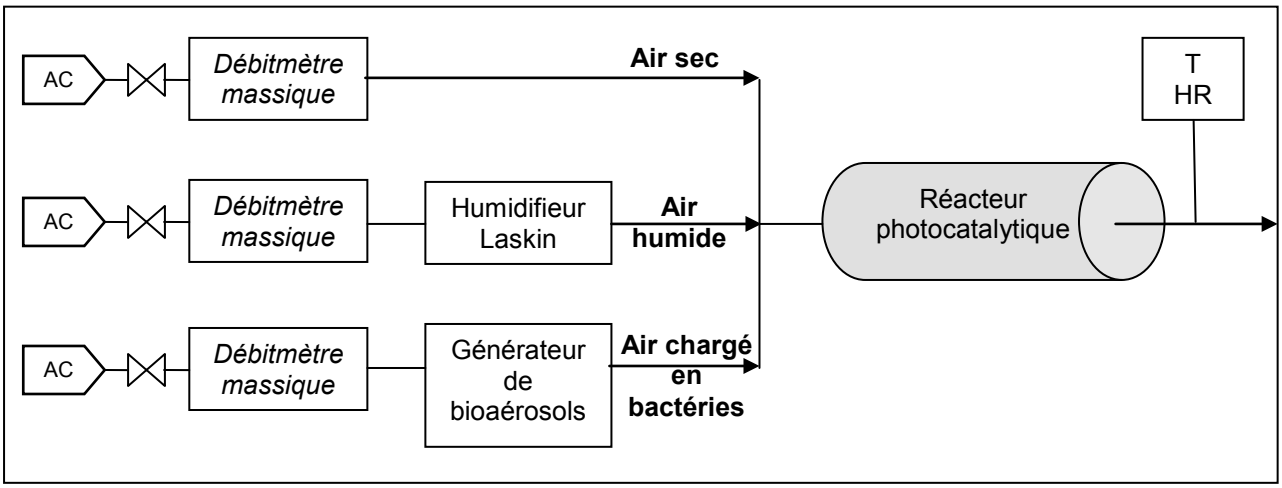



**Figure A.IV- 2 : Schéma de principe du banc d'essais de dégradation photocatalytique de bioaérosols**

De nombreuses contraintes techniques liées à la manipulation des microorganismes et au confinement sous PSM ont été rencontrées. Le tableau A.IV.1 récapitule le cahier des charges établi pour la conception du banc d'essais dont les différents éléments sont présentés en figure A.IV-3. Les plans détaillés du banc d'essais sont présentés en figure A.IV-4.



Générateur de bioaérosols

Système d'humidification



Réacteur photocatalytique

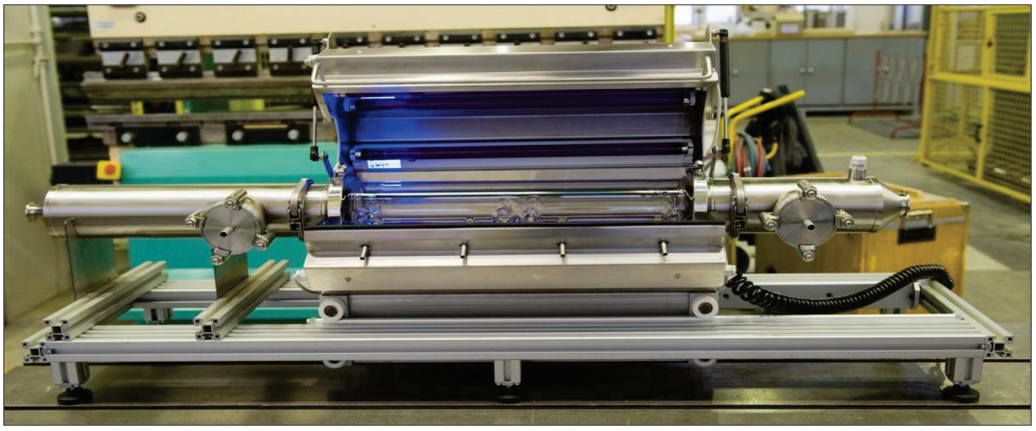


**Figure A.IV- 3 : Eléments du banc d'essais de dégradation photocatalytique de bioaérosols**

**CAHIER DES CHARGES** :
Conception d'un banc d'essais de dégradation photocatalytique d'un bioaérosol

**Choix des matériaux**

- autoclavables (attention aux dimensions des autoclaves) ou facilement nettoyables
- très peu rugueux (pour éviter l'encrassement et par conséquent l'accumulation de microorganismes)
- compatibles avec une irradiation UVA externe

➥ utilisation d'inox et de pyrex

**Air comprimé**

- parfaitement propre et exempt de microorganismes

➥ système de filtration adapté (préfiltre à 5 µm, desséchant, filtre final à 0,01 µm)

**Humidification de l'air**

- système permettant d'humidifier à 90 % d'humidité relative, 10 $L.min^{-1}$ d'air sec

➥ utilisation d'un générateur Laskin (soufflage d'air sec à travers une buse immergée dans l'eau ultrapure stérile) réalisé en inox et autoclavable

**Génération du bioaérosol** (Simon et al., 2010a)

- homogène dans un espace donné et une atmosphère contrôlée (température, hygrométrie)
- stable pendant une période de temps donnée
- de caractéristiques physiques et microbiologiques connues
- répétable et reproductible
- de niveaux de concentrations représentatifs de ceux rencontrés en entreprise (pour l'INRS)

➥ réalisation d'un générateur de biaoérosol inspirée par le LSA de Mainelis et al., 2005

**Réacteur photocatalytique**

- taille cohérente avec une stérilisation par autoclavage (H=58 cm, L=40 cm au plus)
- irradiation externe radiale pour une meilleure répartition du flux lumineux et pour que les lampes ne soient pas au contact des bactéries
- possibilité de modifier la disposition du catalyseur (flux traversant, flux léchant simple ou en étoile (—, ×, ∗))
- possibilité d'ouvrir le réacteur sous PSM pour retirer les supports photocatalytiques dans des conditions stériles
- filtration finale (HEPA) avant rejet dans le PSM

**Débits de travail**

- 0- 30 $L.min^{-1}$ en minimisant les problèmes de sédimentation des particules

**Support photocatalytique**

- permettant une inactivation significative des microorganismes
- permettant une filtration des microorganismes (si configuration en flux traversant)

**Prélèvements amont/aval**

- prélèvements physiques (concentration numérique et distribution granulométrique) prélèvements biologiques (concentration en flore viable et cultivable, en flore totale…)
- respecter si possible les contraintes d'isocinétisme et/ou s'assurer que les efficacités d'échantillonnage sont supérieures à 95 % pour les tailles de particules envisagées

➥sonde de prélèvement horizontale de 10 mm de diamètre, coudée à 90°

**Taille du dispositif global**

- adaptée aux dimensions du PSM (en compromis avec un écoulement correct dans le réacteur) et à son bon fonctionnement.

**Tableau A.IV- 1 : Aide à la conception du banc d'essais de dégradation photocatalytique de bioaérosols**

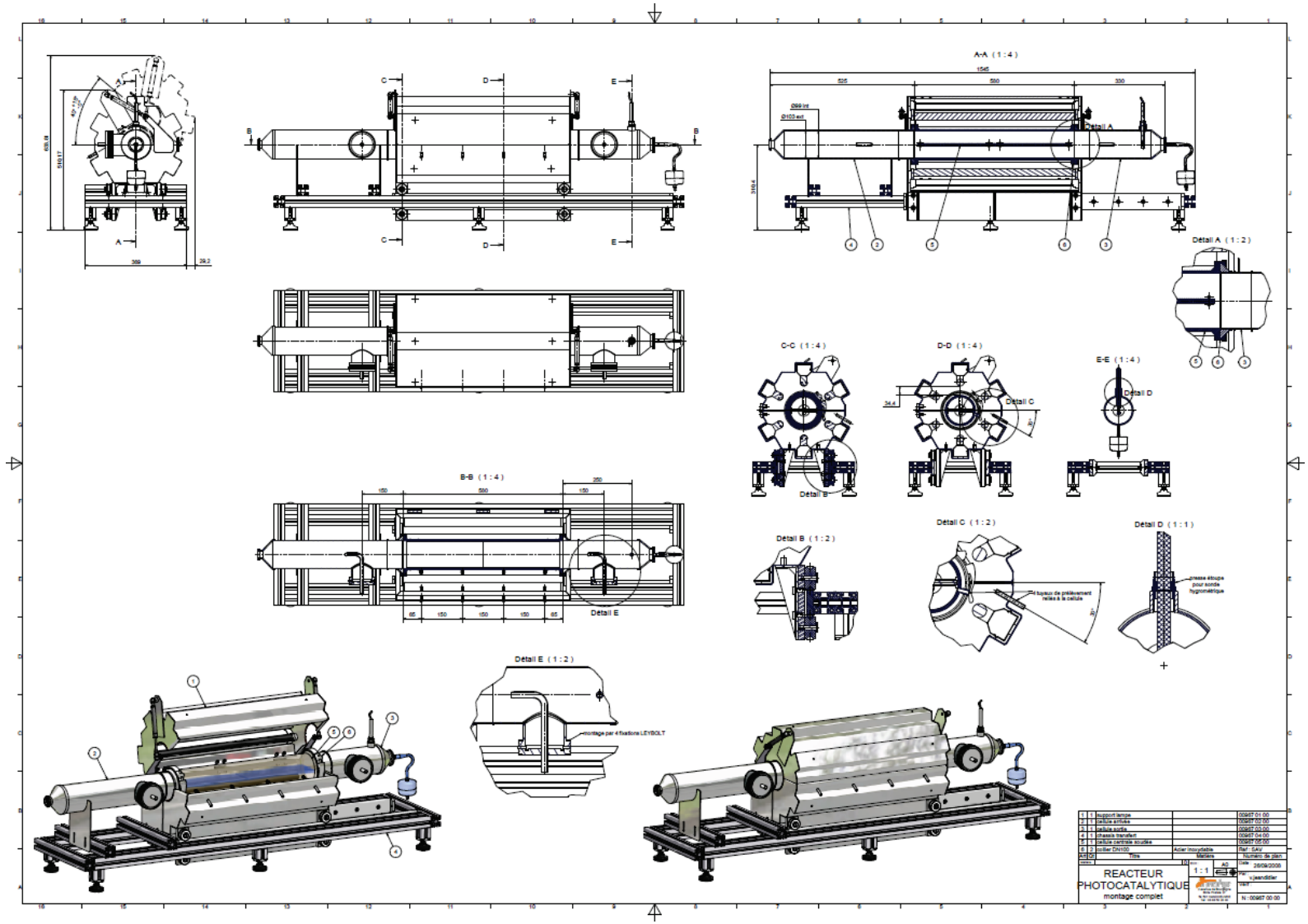
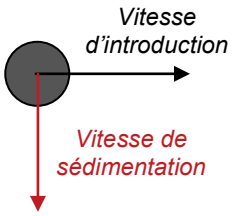



**Figure A.IV- 4: Plans détaillés du banc d'essais**

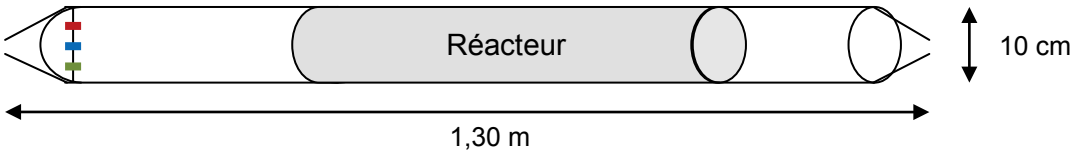
- **<u>Ajustement du débit pour éviter les problèmes de sédimentation</u>**

Il est possible de représenter les trajectoires des microorganismes dans le banc d'essais en fonction de leur taille, de leur vitesse d'introduction et de leur position initiale dans le réacteur en supposant qu'elles ne sont soumises qu'aux seules forces de gravité (cf. chapitre 1). Le tableau A.III-2 rassemble les différents paramètres testés.

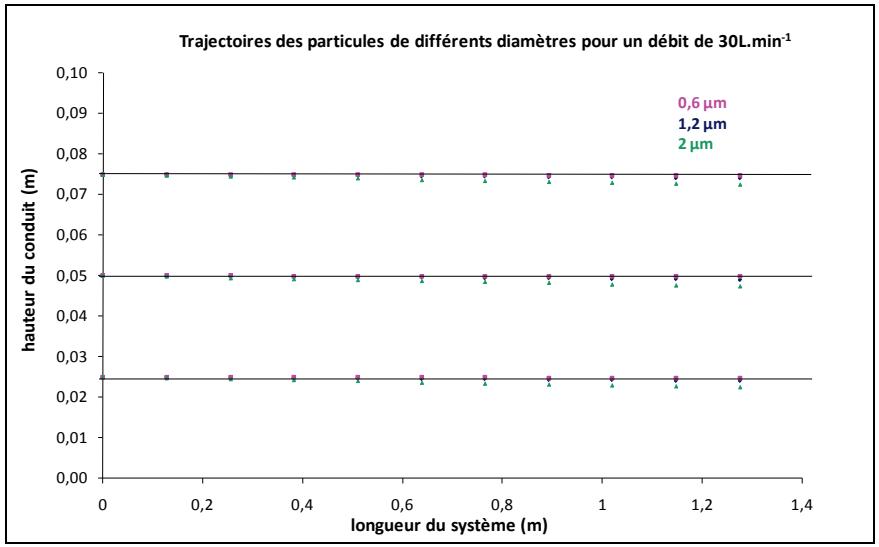


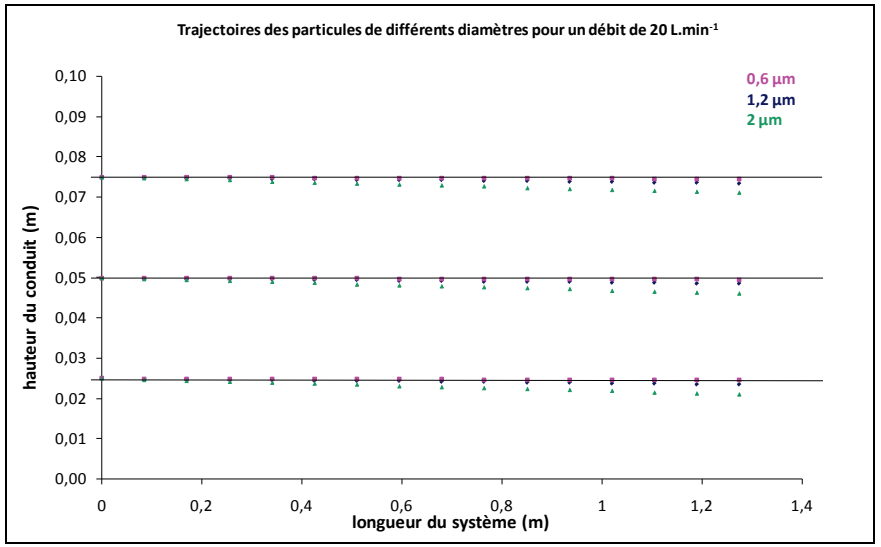

| | |
|---|---|
| Débit d'introduction (L.min$^{-1}$),<br>*Vitesse d'introduction (m.s$^{-1}$)* | 30 ; 20 ; 10 ; 5<br>*6,37.10$^{-2}$ ; 4,25.10$^{-2}$ ; 2,12.10$^{-2}$ ; 1,06.10$^{-2}$* |
| Position initiale de la particule à l'entrée du banc |  cylindre de 10 cm de diamètre<br>Positionnement à<br>**7,5**, **5** et **2,5** cm de hauteur |
| Taille des particules (distribution granulométrique de la suspension bactérienne établie au compteur coulter-diamètre équivalent en volume) | Diamètre minimal=0,6 µm<br>Diamètre médian=1,2 µm<br>Diamètre maximal=2 µm |

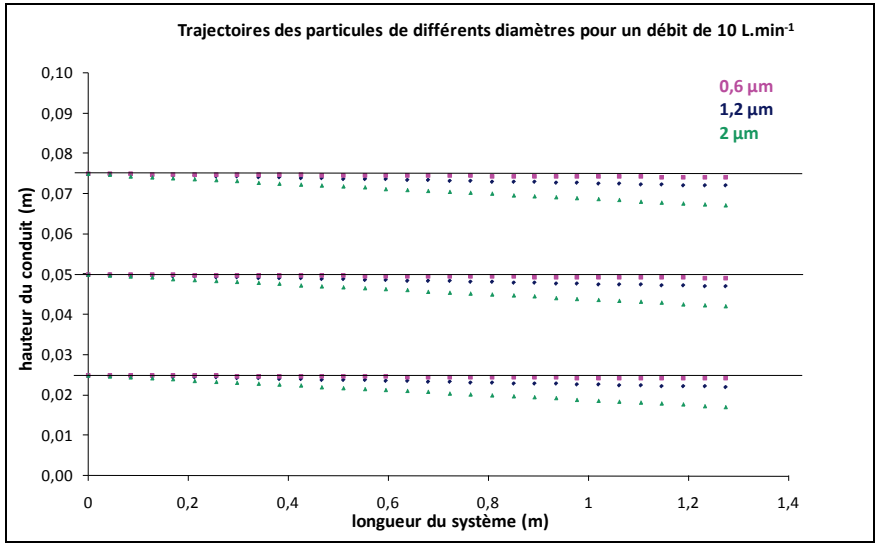
**Tableau A.IV- 2 : Configurations testés pour identifier un problème de sédimentation**




La figure A.IV-5, représente l'évolution des trajectoires des particules dans le réacteur pour les différentes configurations. Les plus fortes sédimentations sont observées pour les faibles débits et pour les particules les plus grosses. Ainsi, il est déconseillé de travailler à un débit de 5 L.min$^{-1}$, même si l'utilisation d'un faible débit favorise un temps de passage long et par conséquent un contact avec le catalyseur plus élevé. Par conséquent, les configurations en flux léchant ne sont a priori pas optimales pour dégrader des bactéries d'autant plus que ce sont des espèces peu diffusantes.



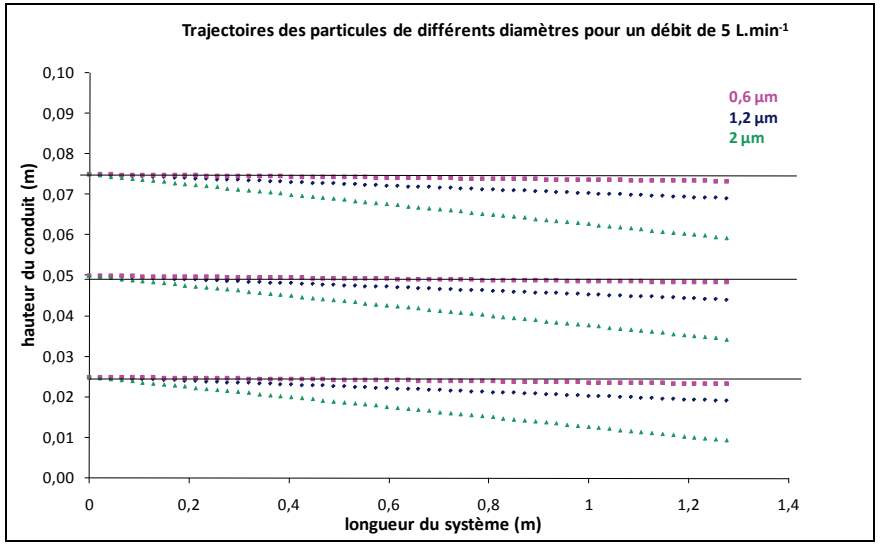




**Figure A.IV- 5 : Trajectoires des particules dans le banc d'essais en fonction de différents débits d'introduction**

- **Efficacité d'échantillonnage des aérosols**

Le calcul de l'efficacité d'échantillonnage du bioaérosol, en tant que combinaison des efficacités d'aspiration et de transport à travers un coude à 90°, peut se faire par l'application de corrélations théoriques présentées dans le chapitre 1.

Toutefois, il convient de déterminer le rapport d'isocinétisme R pour les différents types de prélèvements envisagés, sachant que les sondes de prélèvement présentent un diamètre de 10 mm. Pour éviter tout phénomène de sédimentation, le calcul sera établi pour un débit en amont du capteur de 30 $L.min^{-1}$.

| | | Débit de prélèvement | R |
|---|---|---|---|
| ➢ Physiques : | compteur optique à particules Grimm | 1,2 $L.min^{-1}$ | 0,25 |
| ➢ Biologiques : | cassette | 2 $L.min^{-1}$ | 0,15 |
| | impinger | 12,5 $L.min^{-1}$ | 0,02 |

Les valeurs de R sont inférieures à l'unité ce qui place le prélèvement en conditions de superisocinétisme : il est possible que les particules de tailles élevées ne soient pas parfaitement échantillonnées, ce qui est vérifiable par le calcul des efficacités d'échantillonnage.

Données nécessaires pour l'application des corrélations

$\rho_D$=1000 $kg.m^{-3}$ (phase dispersée : bactéries)
$\mu_C$=1,8.$10^{-5}$ Pa.s (phase continue : air)
$d_{ae} \in$ [0,5 ; 20] µm
$\delta$=0,01 m

La figure A.IV-6 représente les efficacités d'aspiration, pour les différentes techniques envisagées et l'efficacité de transport à travers un coude à 90°. Selon les trois corrélations utilisées pour le calcul des efficacités d'aspiration, les résultats diffèrent ; la relation de Grinshpun et al (1993) étant défavorable pour les débits d'aspiration élevés. A priori, la taille du bioaérosol d'*E.coli* est inférieure à 15 µm, ce qui laisse envisager une efficacité d'aspiration tout à fait convenable (supérieure à 90 % dans la plupart des cas). De même pour les diamètres de particules considérés, le transport de l'aérosol à travers le coude n'engendrera pas de pertes significatives.

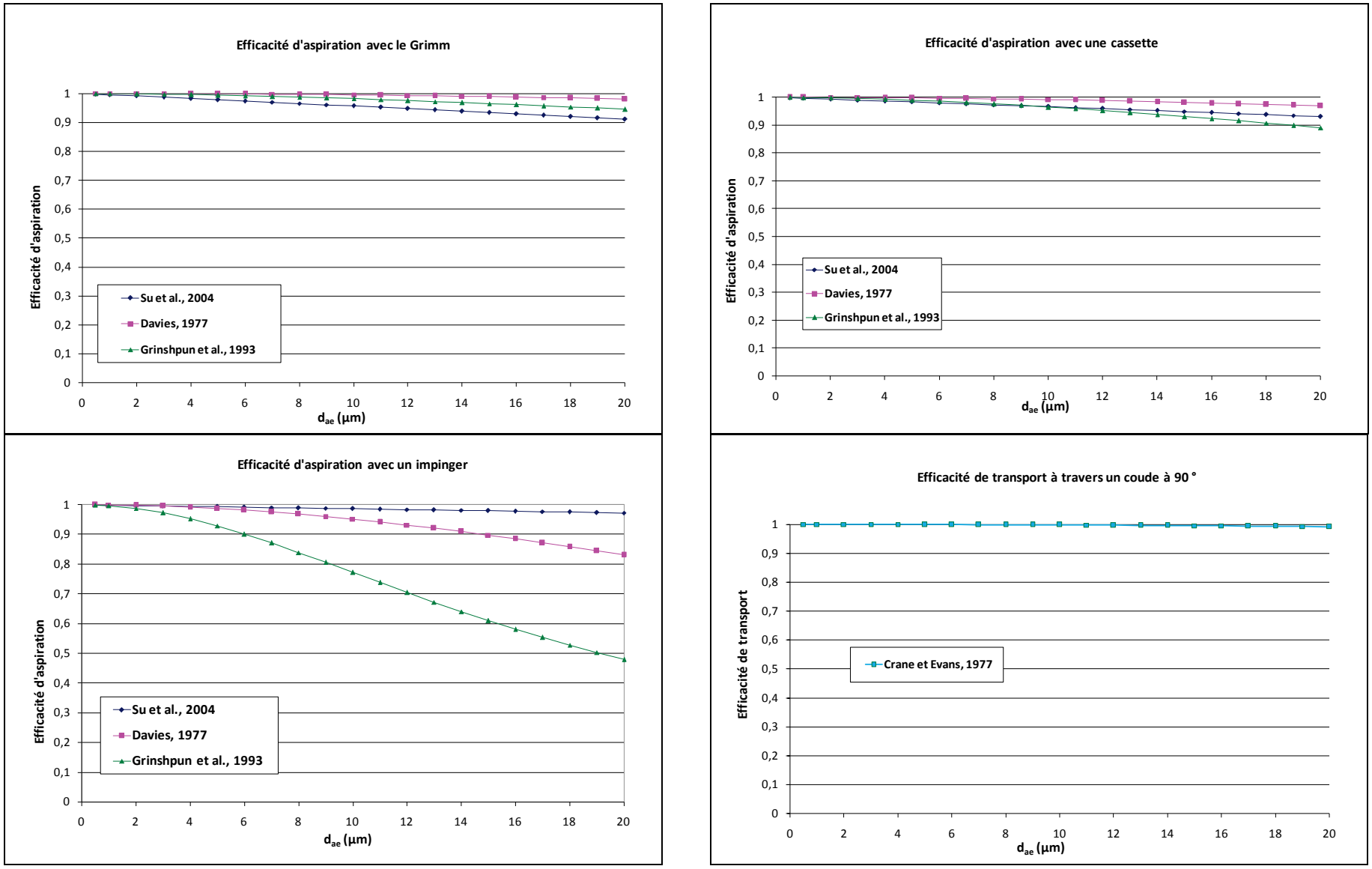
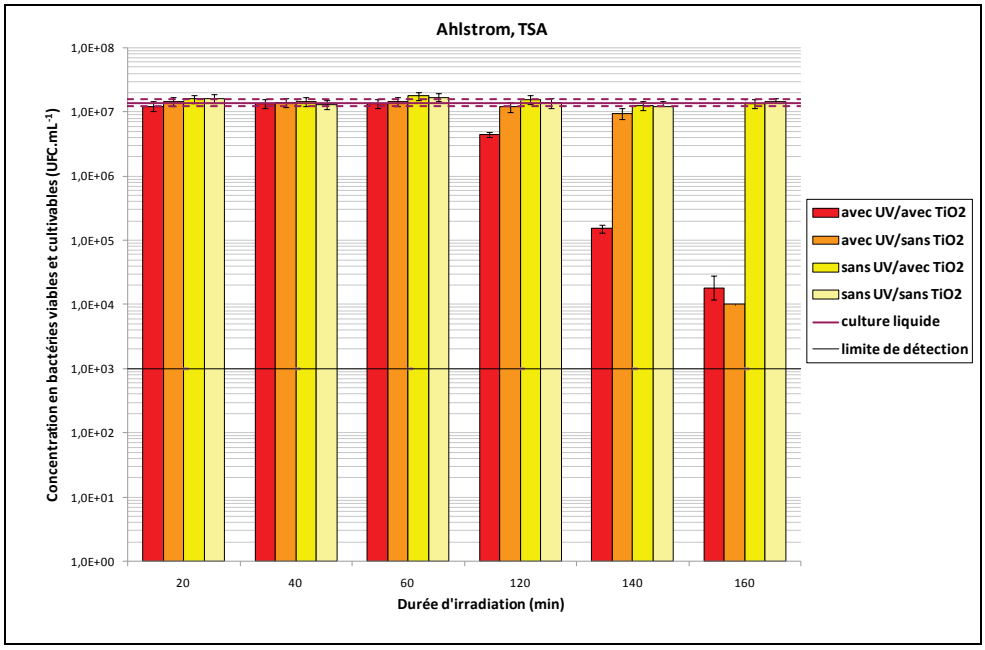
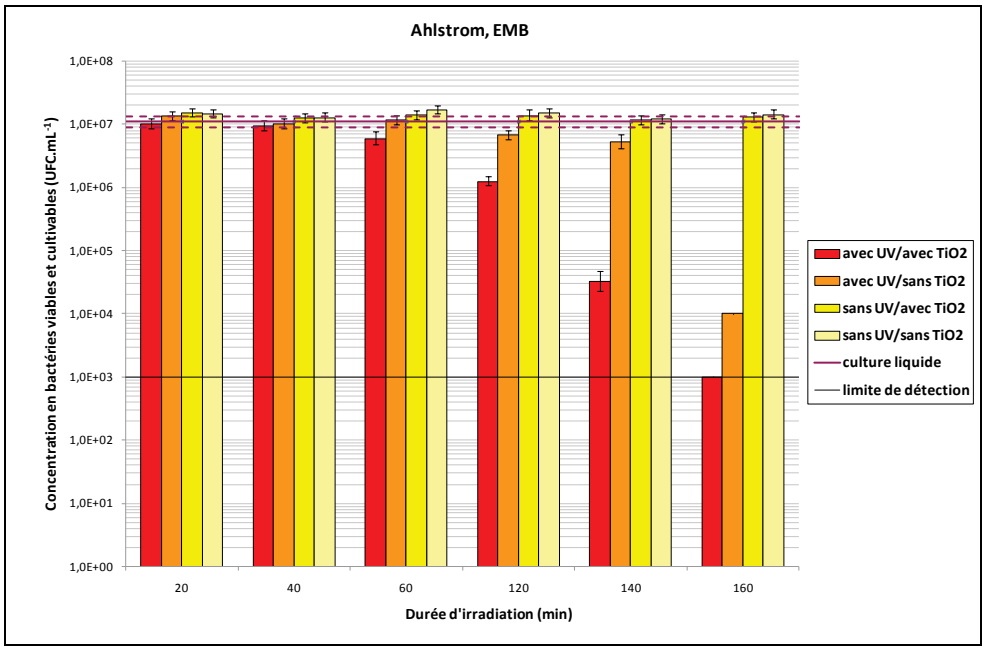



**Figure A.IV- 6 : Efficacités de prélèvement**

# ANNEXE 5 : INACTIVATION D'*E.COLI* SUR DIFFERENTS SUPPORTS-CONFIGURATIONS TEMOINS

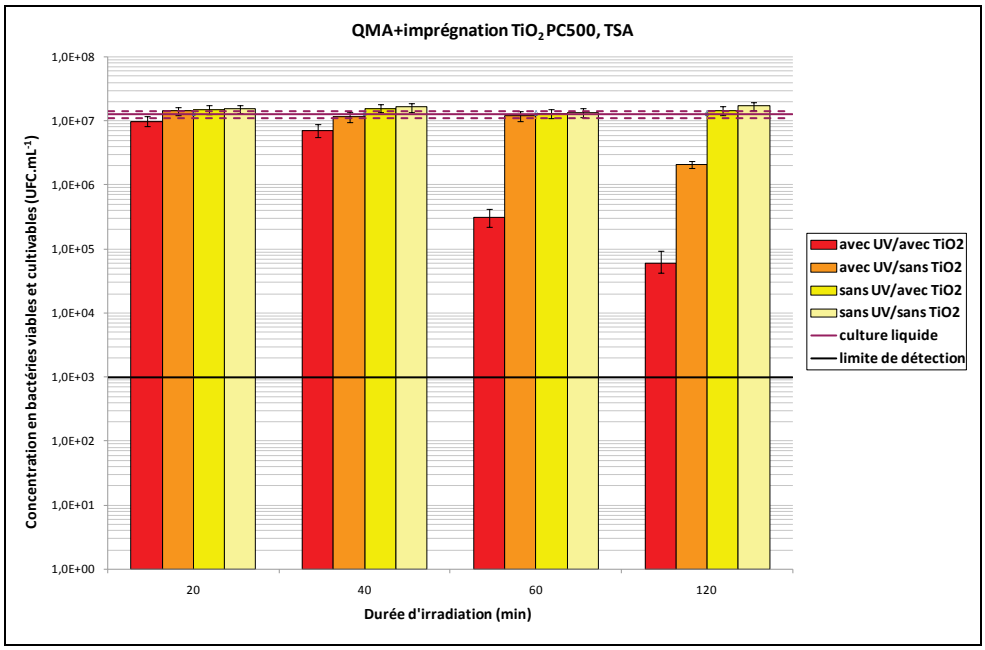
- **Ahlstrom**

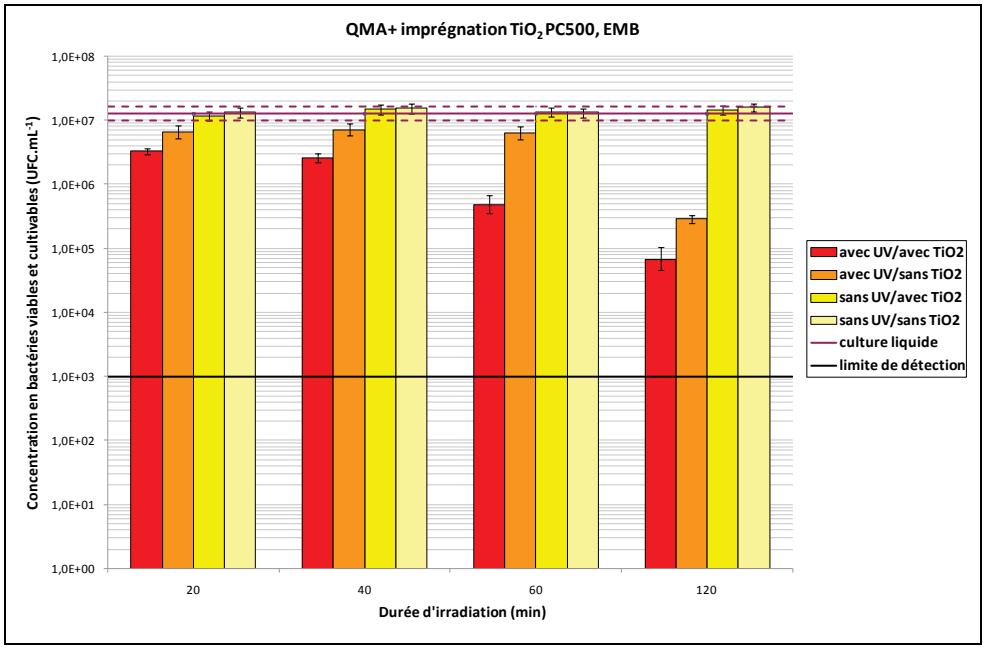


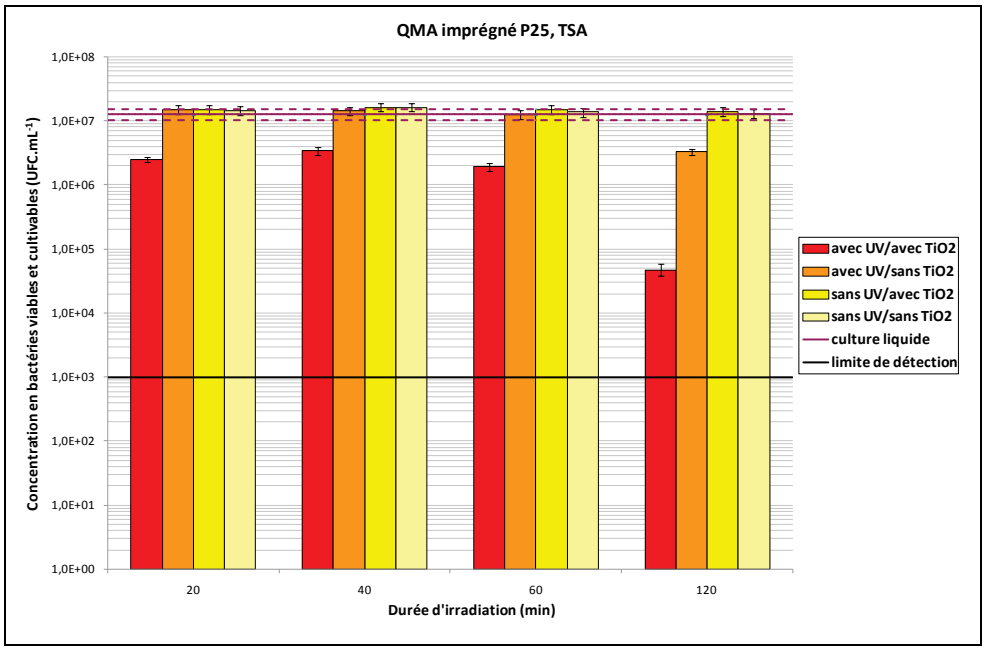

L'effet des UVA seuls commence à apparaître de manière significative pour une durée d'irradiation maximale de 2h40. Remarquons par ailleurs, que cet effet peut être lié à un début d'assèchement des supports qui devient total après 3h d'irradiation.

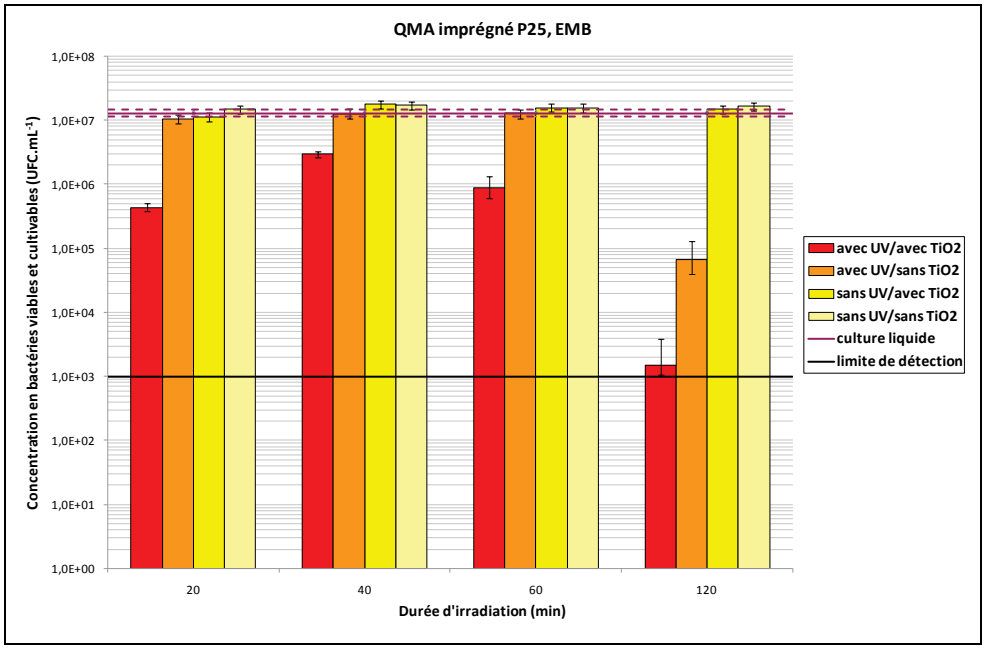
- **Imprégnation PC500**



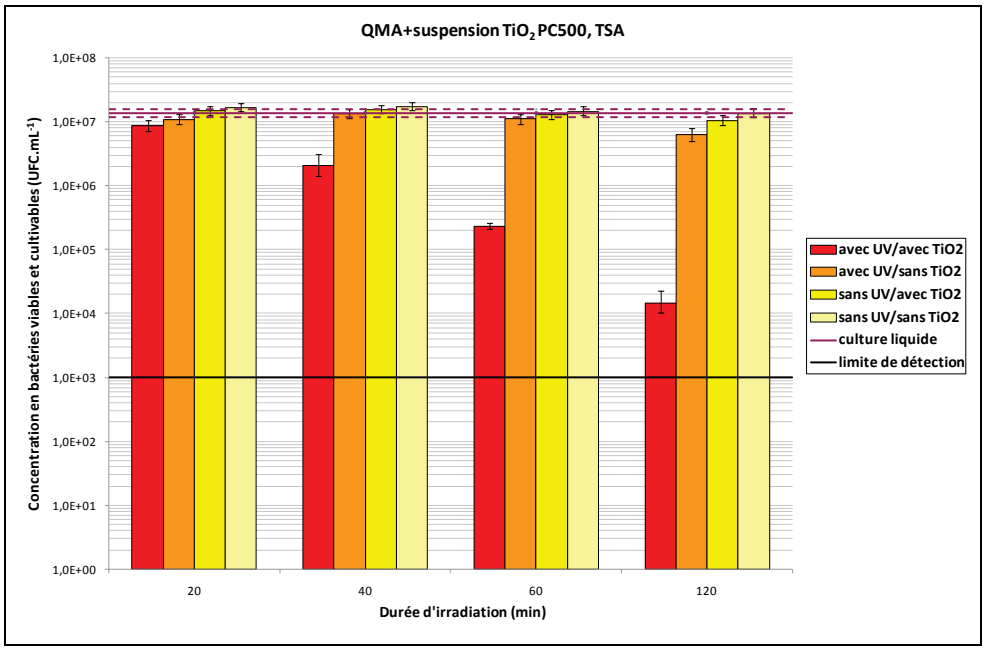



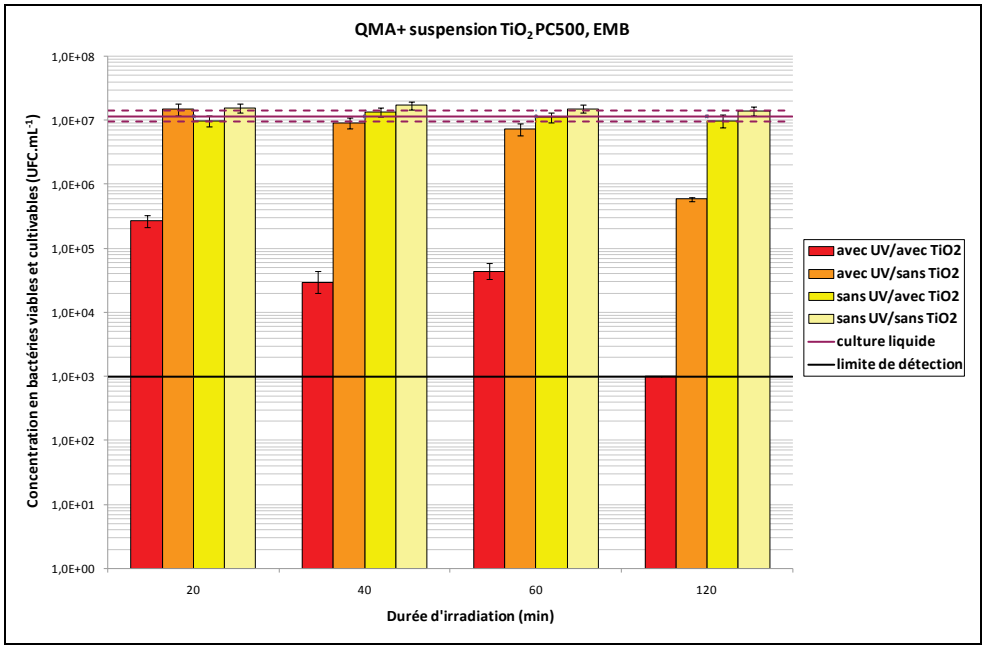
- **Imprégnation P25**



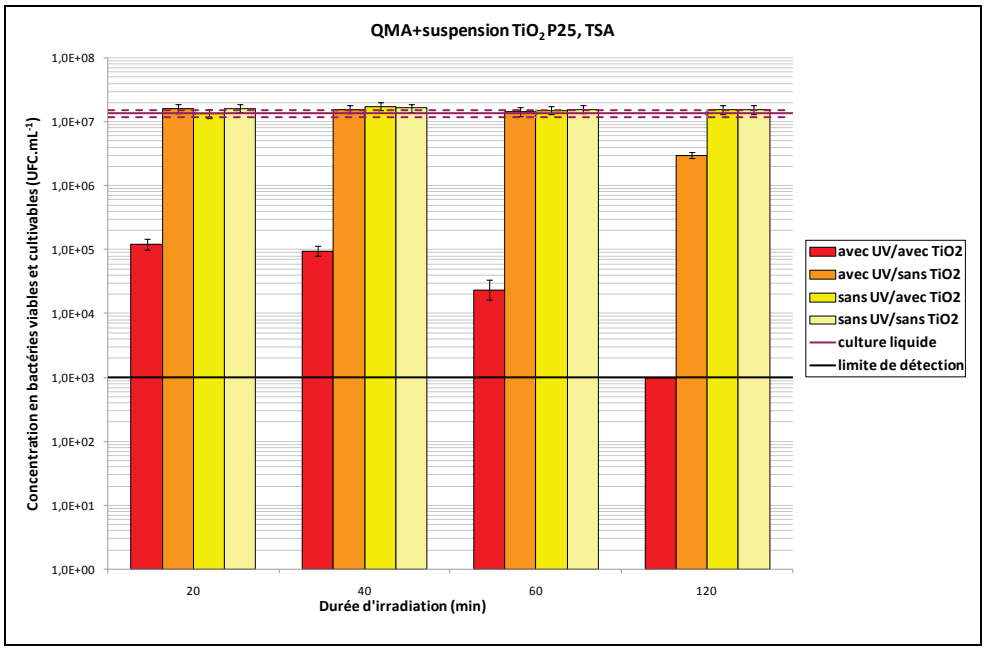



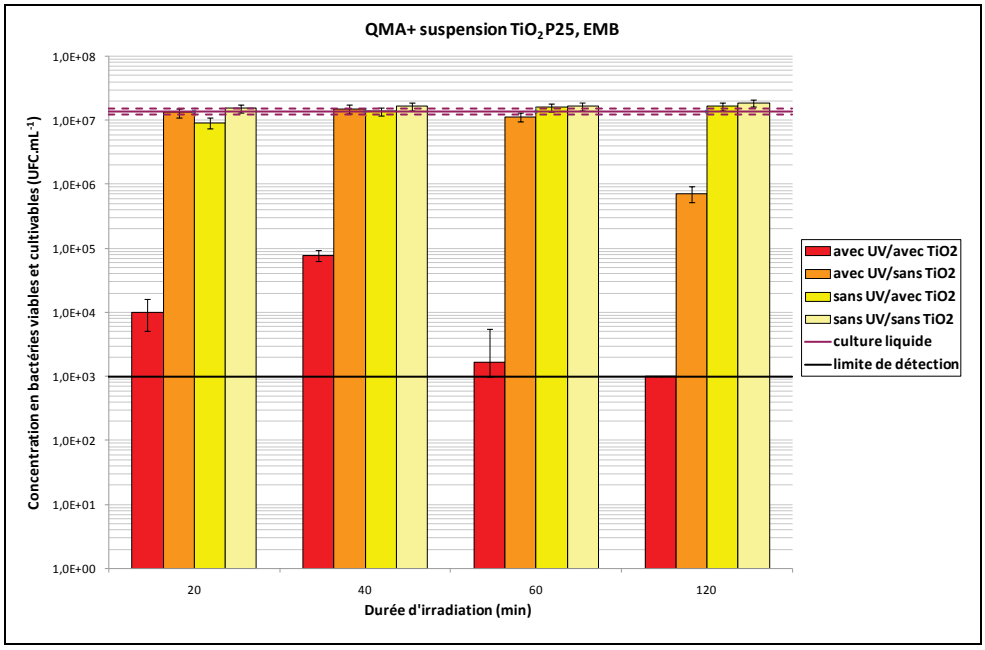
- **Suspension PC500**



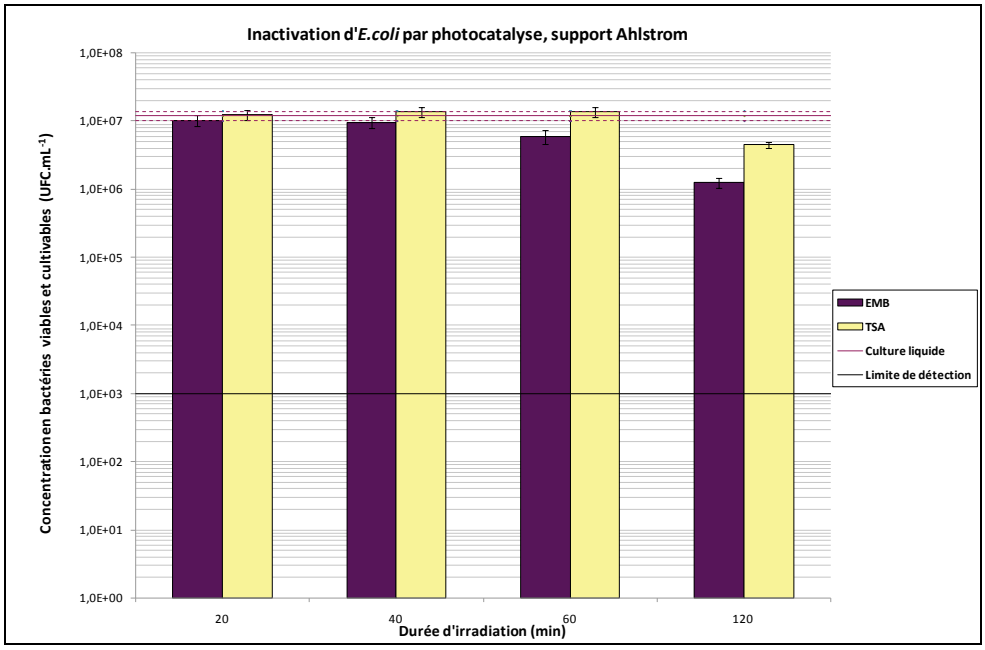
- **Suspension P25**



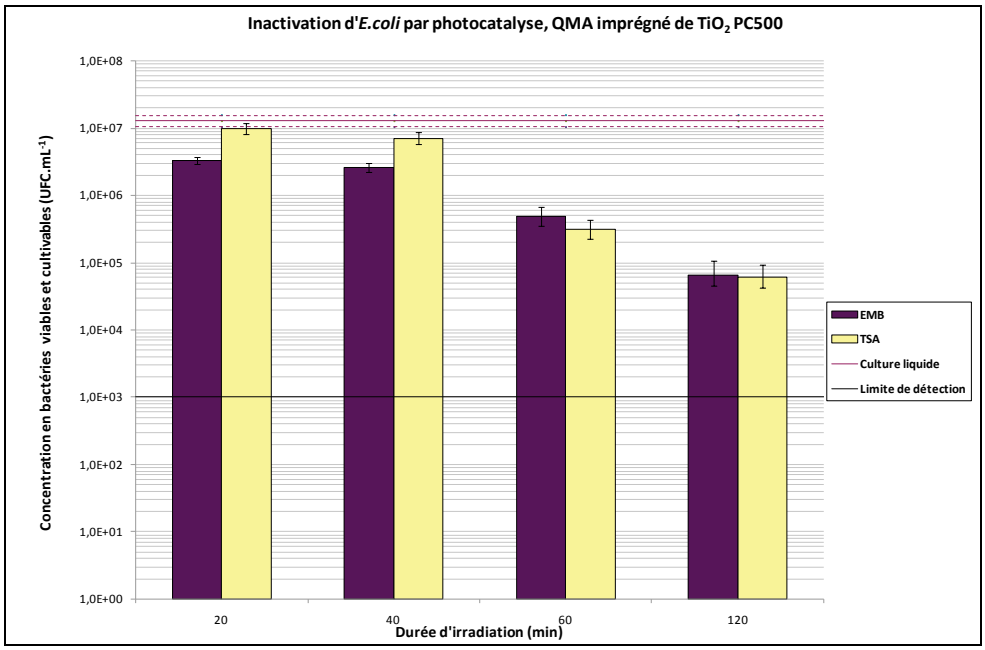



# ANNEXE 6 : INACTIVATION D'*E.COLI* SUR DIFFERENTS SUPPORTS-INFLUENCE DU MILIEU DE CULTURE

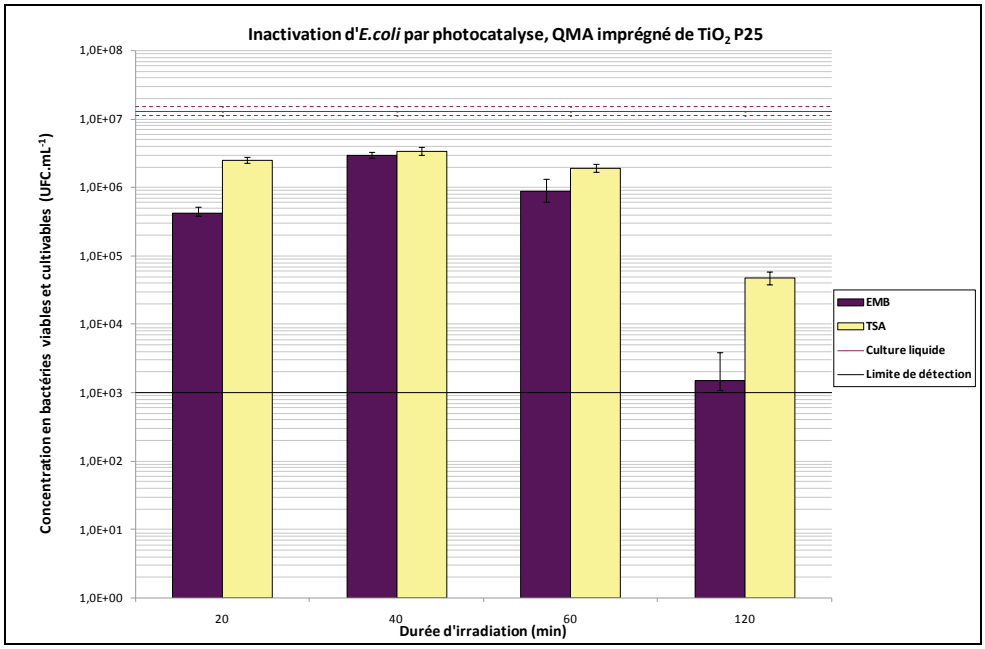
- **Ahlstrom**



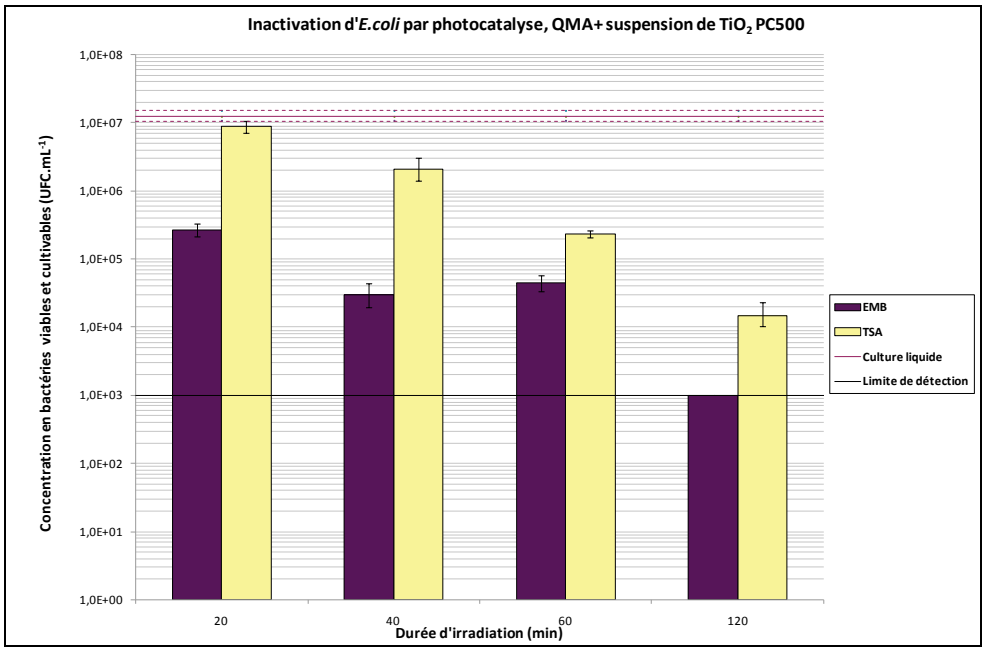

- **Imprégnation PC500**



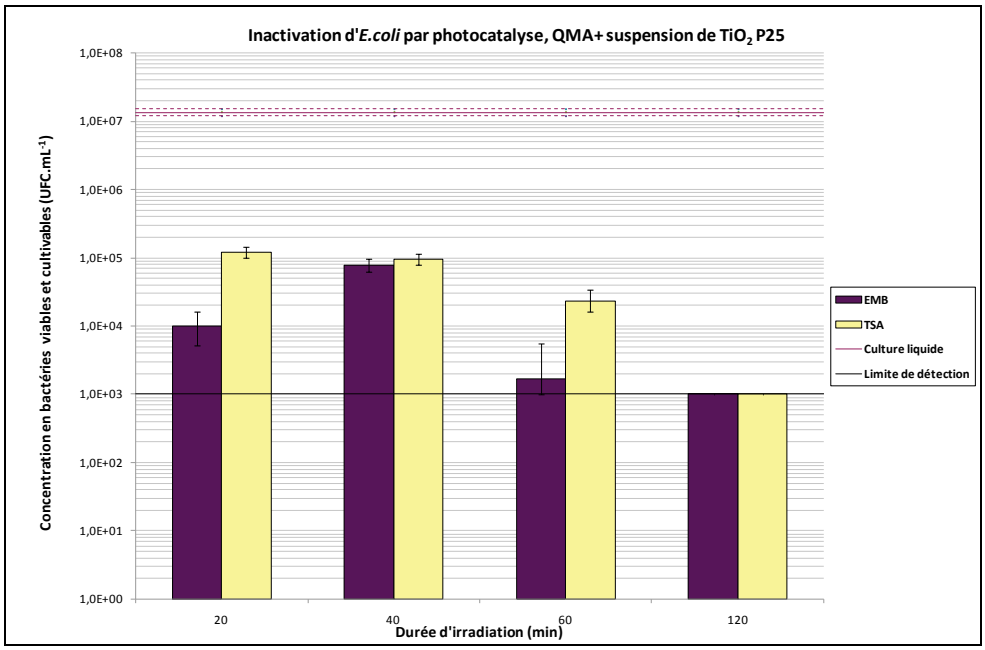
- **Imprégnation P25**




- **Suspension PC500**

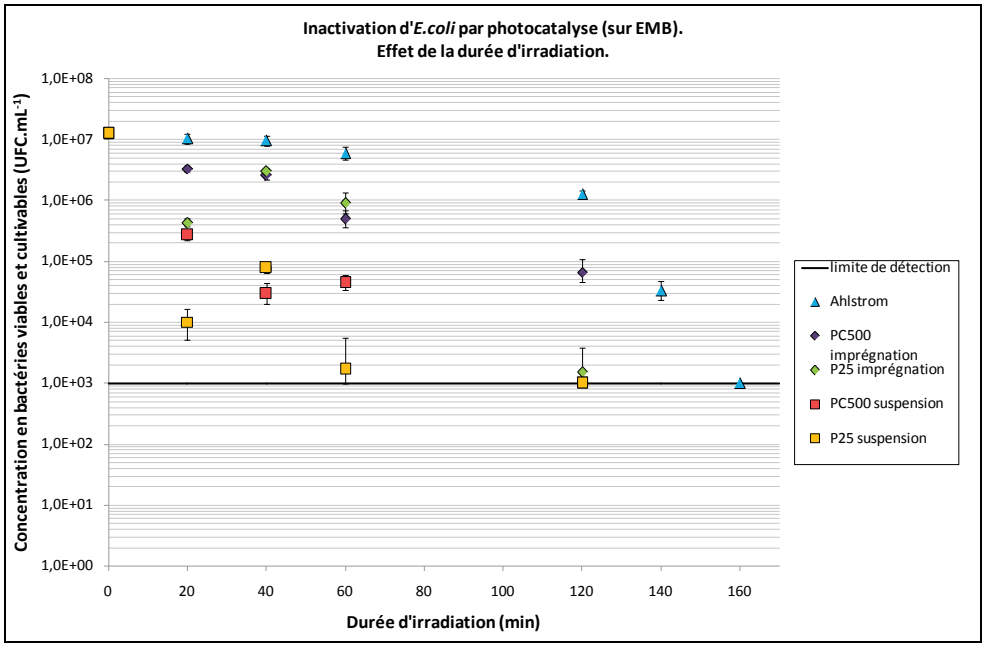


- **<u>Suspension P25</u>**

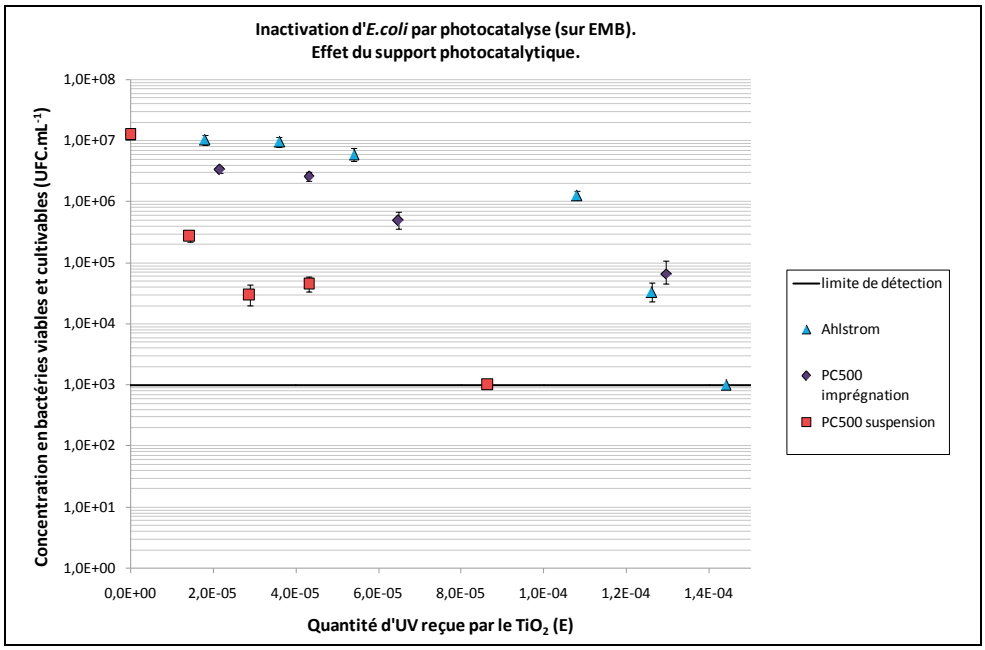


# ANNEXE 7 : DENOMBREMENTS SUR EMB- GRAPHES RECAPITULATIFS

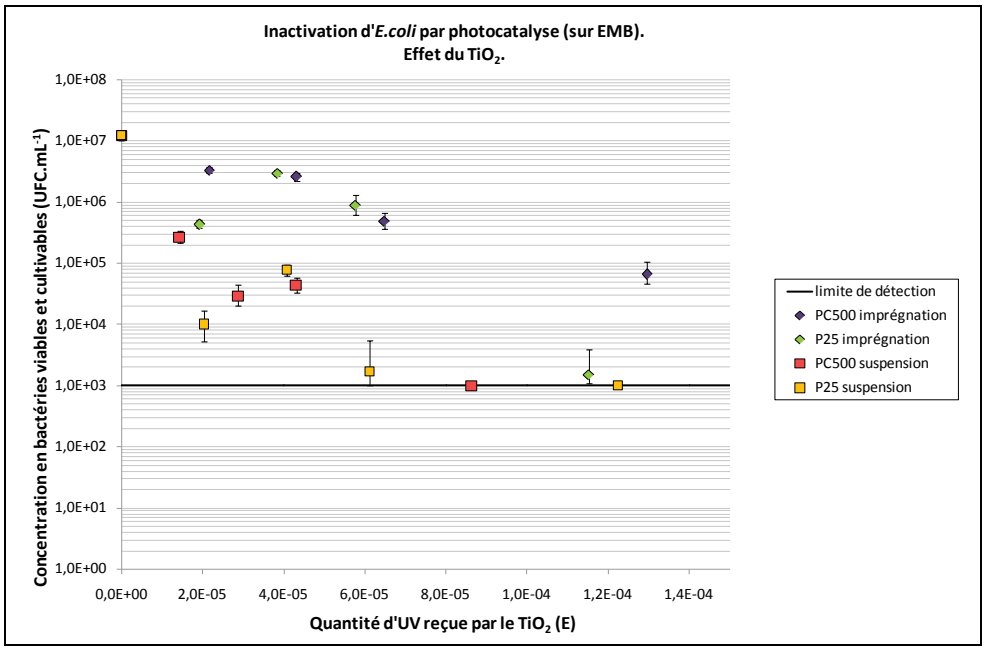
- **Effet de la durée d'irradiation**



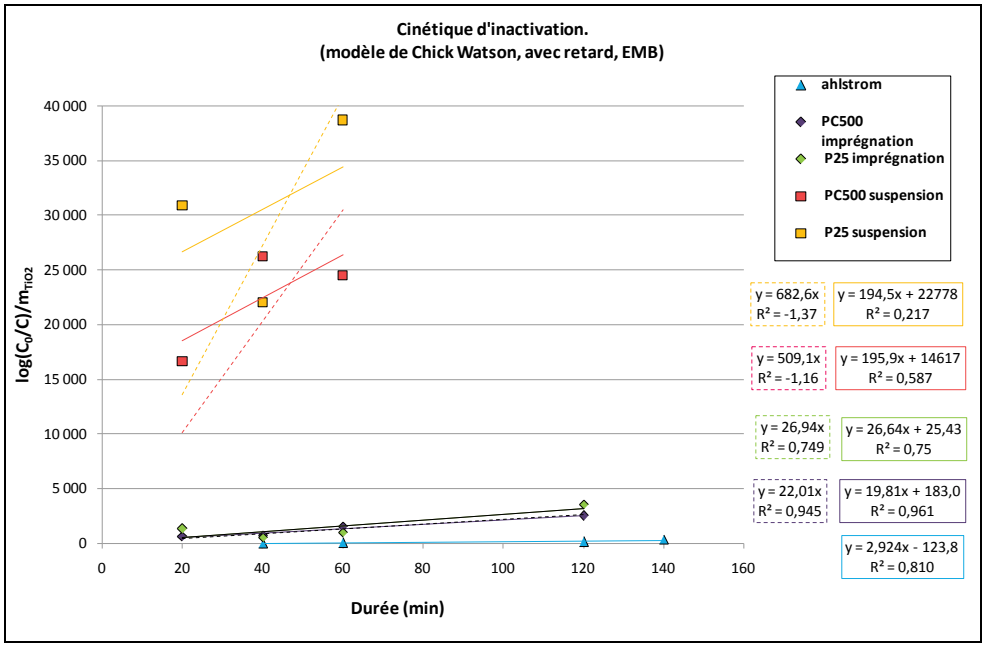

- **Effet du support photocatalytique**



- **Effet du $TiO_2$**

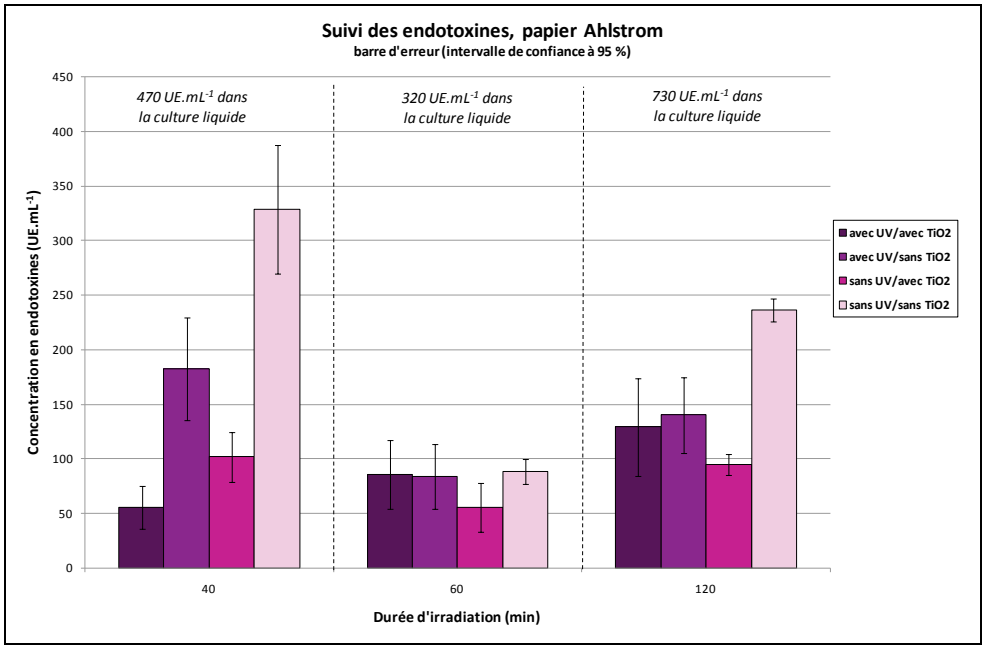



- **Cinétique d'inactivation**

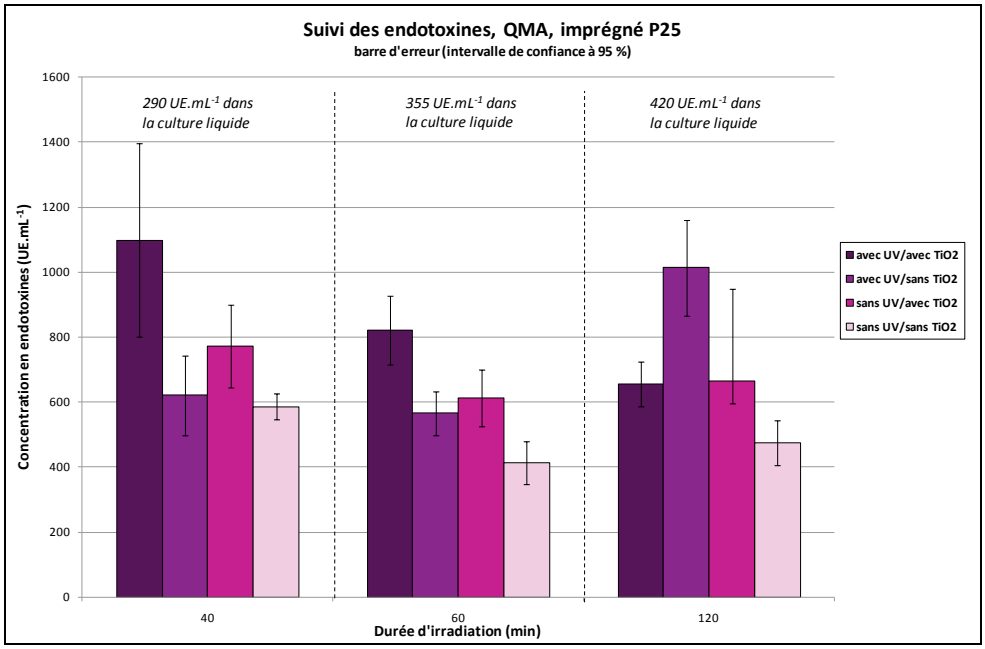


# ANNEXE 8 : MESURE DES ENDOTOXINES SUITE A L'INACTIVATION D'*E.COLI*

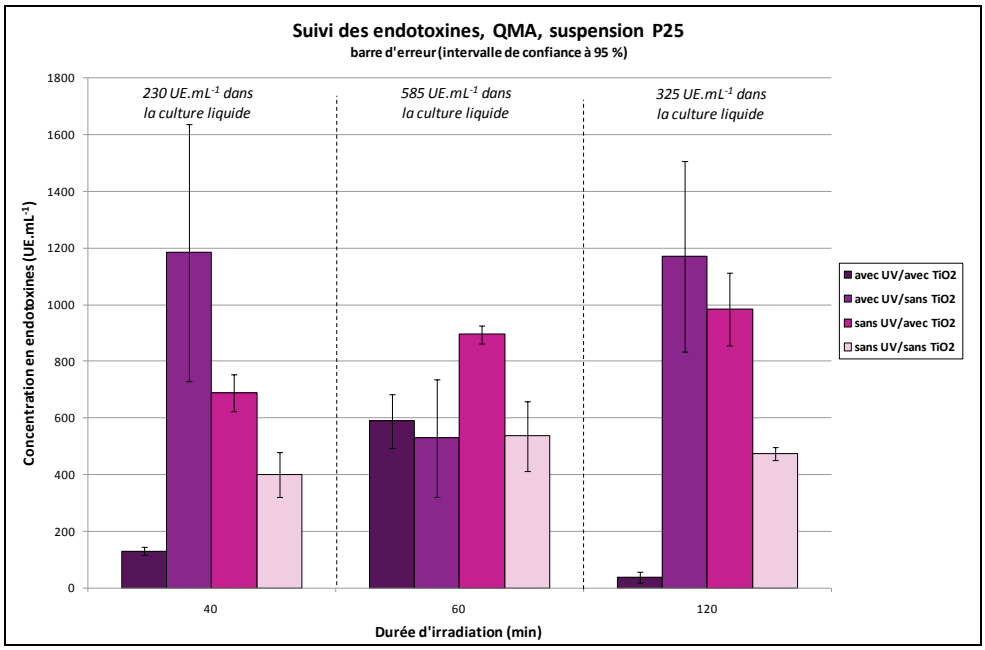
- **Ahlstrom**




- **Imprégnation P25**



- **<u>Suspension P25</u>**



INSTITUT NATIONAL
POLYTECHNIQUE
DE LORRAINE

AUTORISATION DE SOUTENANCE DE THESE
DU DOCTORAT DE L'INSTITUT NATIONAL
POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

**o0o**

VU LES RAPPORTS ETABLIS PAR :
**Madame Chantal GUILLARD, Directeur de Recherche, IRCELYON, Villeurbanne**

**Madame Laurence LE COQ, Professeur, EMN, Nantes**

Le Président de l'Institut National Polytechnique de Lorraine, autorise :

**Madame FAURE Marie**

NANCY BRABOIS
2, AVENUE DE LA
FORET-DE-HAYE
BOITE POSTALE 3
F - 54501
VANDŒUVRE CEDEX

à soutenir devant un jury de l'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE, une thèse intitulée :

**"Purification de l'air ambiant par l'action bactéricide de la photocatalyse"**

en vue de l'obtention du titre de :

DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

Spécialité : **« Génie des Procédés et des Produits »**

Fait à Vandoeuvre, le 09 novembre 2010
Le Président de l'I.N.P.L.,
F. LAURENT

TEL. 33/03.83.59.59.59
FAX. 33/03.83.59.59.55

## Résumé

*Purification de l'air ambiant par l'action bactéricide de la photocatalyse*

Cette étude s'inscrit dans le cadre de l'amélioration des connaissances sur la dégradation photocatalytique des bioaérosols bactériens. La photocatalyse est une technique d'épuration basée sur l'excitation d'un semi-conducteur par un rayonnement le plus généralement ultraviolet. Cette technologie permet, en théorie, de minéraliser pas à pas les polluants. Or, si les conditions optimales ne sont pas réunies, la minéralisation incomplète peut conduire à des sous-produits de dégradation de toxicité potentiellement préoccupante.
L'objectif de ces travaux a donc été d'apporter des éléments de compréhension quant aux mécanismes de dégradation photocatalytique d'un bioaérosol bactérien modèle d'*E.coli,* où de nombreux phénomènes sont couplés. Ainsi, pour distinguer les différents processus mis en jeu, deux approches expérimentales ont été menées. La première, nommée approche « batch », a permis d'isoler la réaction photocatalytique, à proprement parler, en étudiant les étapes d'inactivation, de libération de sous-produits et de minéralisation progressive. La seconde, appelée approche « dynamique » a permis quant à elle la mise en place d'un dispositif expérimental adapté à la dégradation photocatalytique d'un bioaérosol d'*E.coli*.
Les capacités de la photocatalyse à inactiver et minéraliser des espèces bactériennes ont pu être démontrées. Les paramètres clés d'une dégradation efficace ont été mis en évidence et ont permis de décrire les verrous indispensables à une industrialisation sûre du procédé.



Mots clés : photocatalyse, *E.coli*, inactivation, dommage métabolique, minéralisation, endotoxines, bioaérosol.



## Abstract

*Ambient air purification by bactericidal action of photocatalysis*

This study comes within the scope of improving knowledge concerning the photocatalytic degradation of bacterial bioaerosol. Photocatalysis is a purification technology generally based on the excitation of a semiconductor by an ultraviolet radiation. This technology can, in theoretical ways, mineralize pollutants step by step. However, if optimal conditions are not gathered, this mineralization is incomplete and can lead to the formation of potentially toxic by-products.
The aim of this work was therefore a better understanding of the mechanisms of photocatalytic degradation of a bacterial bioaerosol of *E.coli*, where numerous phenomenon are linked. Thus, to distinguish the different processes, two experimental approaches were used. The first one, called "batch approach", allowed to consider the photocatalytic reaction itself, by studying the steps of inactivation, by-products formation and progressive mineralization. The second one, named "dynamic approach", consisted to design an experimental setup suited to the photocatalytic degradation of a bioaerosol of *E.coli*. The abilities of photocatalysis to inactivate and mineralize bacteria could be demonstrated. The key parameters of an efficient degradation were highlighted and allowed to underline the problems to solve before having a safe industrialization of the photocatalysis.



Keywords : photocatalysis, *E.coli*, inactivation, metabolic injury, mineralization, endotoxins, bioaerosol.