



HAL
open science

Flux de virus entériques dans les eaux usées brutes et traitées d'une station d'épuration biologique

Dominique Rolland

► **To cite this version:**

Dominique Rolland. Flux de virus entériques dans les eaux usées brutes et traitées d'une station d'épuration biologique. *Ecologie, Environnement*. Université Paul Verlaine - Metz, 1981. Français. NNT : 1981METZ008S . tel-01775632

HAL Id: tel-01775632

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01775632>

Submitted on 24 Apr 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



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. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.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>

THÈSE

présentée à

L'UNIVERSITÉ DE METZ

en vue d'obtenir le titre de

DOCTEUR DE 3^e CYCLE D'ÉCOLOGIE

(Option Ecotoxicologie et Chimie de l'environnement)

par

Dominique ROLLAND

BIBLIOTHÈQUE UNIVERSITAIRE SCIENCES ET TECHNIQUES - METZ -	
N° Inv.	19810165
Cote	S1M3 8/8
Loc.	Magasin
Cat.	

SUJET :

**Flux de virus entériques dans les eaux usées
brutes et traitées d'une station d'épuration biologique**

Soutenue publiquement le 12 Juin 1981 devant la Commission d'Examen

MEMBRES DU JURY :

Président : **Monsieur le Professeur J.-M. PELT**
Juges : **Monsieur le Professeur D. BEYTOUT**
Monsieur le Professeur J.-C. BLOCK
Monsieur le Professeur J.-M. FOLIGUET
Monsieur le Professeur L. SCHWARTZBROD



A NOTRE PRESIDENT DE THESE

Monsieur le Professeur PELT

Il nous a fait le grand honneur de présider notre jury.

Nous l'en remercions vivement et nous lui exprimons notre respectueuse gratitude.

A NOS JUGES

Monsieur le Professeur BLOCK

Il nous a inspiré ce travail, nous a guidé et donné l'exemple d'une démarche scientifique rigoureuse.

Nous lui exprimons ici notre profonde reconnaissance.

Monsieur le Professeur BEYTOUT

Il nous a fait l'honneur de juger notre travail.

Qu'il nous soit permis de lui exprimer notre profonde gratitude.

Monsieur le Professeur FOLIGUET

Il nous a accueilli dans son laboratoire en nous prodiguant ses meilleurs conseils.

Qu'il soit assuré de notre respect et de notre considération.

Monsieur le Professeur SCHWARTZBROD

Il nous a fait l'honneur de juger ce travail.

Qu'il veuille bien trouver ici le témoignage de nos remerciements les plus sincères.

Nous remercions également

Monsieur le Docteur HARTEMANN

Tout au long de notre travail, il nous a apporté sa précieuse collaboration et nous l'en remercions vivement.

Mademoiselle BLECH

Monsieur MORLOT et Monsieur MAUGRAS

Ils nous ont apporté leur aide dévouée ainsi que leur sympathie.

Tous les membres du Laboratoire d'Hygiène qui ont contribué à l'élaboration de cette thèse, et plus particulièrement Monsieur et Madame JORET, Mesdemoiselles STOERKEL et CHAUVIN et Monsieur VILLEVAL.

Nos remerciements vont également à Mesdemoiselles QUILLE et VUILLAUME qui ont assuré la dactylographie de ce travail.

Ce travail a été rendu possible grâce à l'étroite collaboration qui s'est établie avec Monsieur FONTANEL et Monsieur CESAR pour l'étude sur la station d'épuration de Nancy, et l'aide technique dont nous a fait bénéficier Monsieur FEBREY du Service Régional d'Aménagement des Eaux de Lorraine.

A Dominique et Gwenaëlle

A toute ma famille

A tous mes amis

Ce travail a été réalisé au Laboratoire d'Hygiène et de
Recherche en Santé Publique de Nancy (Directeur : Pr. FOLIGUET)

Les essais préliminaires de ce travail ont été partiellement financés par le Ministère de l'Environnement.

SOMMAIRE

I	<u>INTRODUCTION.....</u>	1
II	<u>EXPERIMENTATION.....</u>	5
	1. LA STATION D'EPURATION.....	6
	1.1. Situation.....	6
	1.2. Mesure des débits.....	11
	1.3. Points de prélèvement.....	12
	2. MATERIEL ET METHODES.....	12
	2.1. Prélèvements.....	12
	2.2. Système de concentration des virus.....	13
	2.3. Technique d'élution des virus de la poudre de verre	16
	2.4. Traitement des liquides d'élution.....	17
	2.4.1. Neutralisation.....	17
	2.4.2. Décontamination.....	18
	2.4.3. Centrifugation.....	18
	2.4.4. Dilution partielle des liquides d'élution...	18
	2.5. Culture cellulaire.....	19
	2.5.1. Lignée cellulaire.....	19
	2.5.2. Milieu de culture.....	19
	2.5.3. Entretien de la souche cellulaire.....	20
	2.6. Préparation du stock de virus poliomyélitique.....	22
	2.7. Méthode de titrage des virus dans les liquides d'élution.....	23
	2.7.1. Titrage des virus par la méthode du nombre le plus probable (NPP).....	23
	2.7.2. Titrage des virus par la méthode des plages	25
	2.8. Analyses physico-chimiques.....	25
	2.8.1. pH.....	26
	2.8.2. Résistivité.....	26
	2.8.3. Turbidité.....	26
	2.8.4. Matières en suspension.....	26
	2.8.5. Demande biochimique en oxygène.....	26
	2.8.6. Demande chimique en oxygène.....	27
	2.8.7. Dosage des métaux.....	27
	2.8.8. Dosage du potassium et du sodium.....	27
	2.8.9. Dosage du calcium.....	27
	2.8.10. Dosage des matières oxydables à chaud par le permanganate de potassium.....	27

3.2.1.4.	Essai de détoxification par filtration sur membrane.....	54
3.2.1.5.	Essai de détoxification par extraction au chloroforme.....	54
3.2.1.6.	Essai de détoxification par passage sur résine.....	54
3.2.2.	Etude de la survie des virus dans les eaux usées.....	63
3.2.3.	Etude de la survie des virus dans les liquides d'élution.....	65
3.2.3.1.	Etude de la survie des virus dans les liquides d'élution avant neutralisation et stockage.....	65
3.2.3.2.	Etude de la survie des virus indigènes dans les liquides d'élution stockés à + 4°C et - 26°C.....	67
3.2.3.2.1.	Etude de la survie des virus indigènes dans les liquides d'élution stockés à +4°C.....	67
3.2.3.2.2.	Etude de la survie des virus indigènes dans les liquides d'élution stockés à - 26°C.....	68
3.2.4.	Comparaison de deux méthodes de titrage des virus indigènes dans les liquides d'élution	73
4.	ETUDE DES FLUX DE VIRUS DANS LES EAUX USEES BRUTES ET TRAITÉES SUR 24 HEURES.....	77
4.1.	Etude d'échantillonnage.....	77
4.1.1.	Etude de l'homogénéité d'un prélèvement homogénéisé.....	77
4.1.2.	Etude de l'hétérogénéité de la composition virale des eaux usées brutes.....	78
4.2.	Séquence des prélèvements et analyse des échantillons.....	81
4.3.	Résultats.....	82
4.3.1.	Mesure des débits.....	82
4.3.2.	Analyses physico-chimiques des eaux usées...	83
4.3.3.	Analyses bactériologiques des eaux usées....	88
4.3.4.	Analyses virologiques des eaux usées.....	90
4.3.5.	Expression des résultats des analyses physico-chimiques, bactériologiques et virologiques en flux instantané.....	90
4.3.6.	Etude de corrélation entre les flux des paramètres.....	95

4.3.7. Etude du rapport virus/coliformes fécaux....	98
4.3.8. Evaluation des temps de rétention de l'eau usée sur la station d'épuration.....	98
4.3.8.1. Evaluation théorique du temps de ré- tention.....	100
4.3.8.2. Evaluation empirique du temps de ré- tention.....	100
4.3.9. Efficacité d'épuration de la station de Nan- cy vis à vis de quelques paramètres physico- chimiques, bactériologiques et virologiques.	102
4.3.10. Comparaison des trois types de prélèvements effectués.....	104
III DISCUSSION.....	110
<hr/>	
1. OPTIMISATION DE LA METHODE DE CONCENTRATION SUR POUDRE DE VER- RE ET DE LA QUANTIFICATION DES VIRUS.....	111
1.1. Quantité de poudre de verre.....	112
1.2. Vitesse ascensionnelle de l'eau dans l'appareil....	113
1.3. Volume de l'échantillon.....	113
1.4. Efficacité de l'élution.....	114
1.5. Rendement de la méthode de concentration sur poudre de verre.....	116
1.6. Détoxication des liquides d'élution.....	117
1.7. Survie des virus.....	119
1.8. Comparaison de deux méthodes de titrage.....	121
2. ETUDE DES FLUX DE VIRUS DANS LES EAUX USEES BRUTES ET TRAITÉES DE LA STATION D'EPURATION DE NANCY.....	122
2.1. Homogénéité ou hétérogénéité d'un prélèvement ponc- tuel.....	123
2.2. Variation instantanée des concentrations.....	123
2.3. Variations horaires.....	124
2.3.1. Variations horaires dans les eaux usées bru- tes.....	124
2.3.2. Variations horaires dans les eaux usées traitées.....	131
2.3.3. Exploitation des résultats - Rendement d'é- puration.....	136
2.3.4. Comparaison des types de prélèvements réali- sés.....	142

<u>CONCLUSION</u>	146
<u>BIBLIOGRAPHIE</u>	150
<u>ANNEXE</u>	166

INTRODUCTION

Les eaux usées véhiculent un grand nombre de microorganismes pathogènes parmi lesquels les virus tiennent une place particulière. Excrétés en grand nombre dans les matières fécales (10^7 /g de selles selon GELDREICH, 1978), par les individus infectés ou porteurs sains, ces virus peuvent survivre très longtemps dans les eaux (BLOCK, à paraître).

Parmi les virus entériques les plus couramment isolés dans les eaux usées, il faut citer les entérovirus (virus de la poliomyélite, virus Coxsackie de type A et B, virus E.C.H.O.), les Réovirus, les Adénovirus (FOLIGUET et al, 1966). Ce spectre de virus isolés des eaux résiduaires est sans doute encore assez limité. En effet, la plupart des systèmes vivants utilisés pour les mettre en évidence (souriceaux nouveau-nés, systèmes cellulaires d'origine humaine ou simienne cultivés in vitro) joue un rôle sélectif vis à vis d'un ou plusieurs groupes ou sérotypes viraux particuliers. D'autres types de virus, qui ne sont pas encore à ce jour cultivables sur des systèmes vivants de laboratoire, et dont l'intérêt en Santé Publique aujourd'hui est manifeste (virus de l'hépatite, Parvovirus tels que le virus de Norwalk, ou encore Rotavirus) pourraient se retrouver dans les eaux usées, ces derniers ayant été récemment mis en évidence par des méthodes immunoenzymatiques ou la microscopie électronique (GERBA, 1980).

Les concentrations virales dans les eaux résiduaires rapportées dans la littérature (qui représentent essentiellement des entérovirus) varient beaucoup d'un auteur à l'autre : de 2 UFP/l (KELLY et SANDERSON, 1960) à 10^5 UFP/l (NUPEN et al, 1974). Ces écarts semblent recouvrir :

- des variations géographiques,
- des variations saisonnières,
- des différences dans les méthodes de mise en évidence (méthode de concentration, méthode de quantification, système cellulaire utilisé).

De par leur mode d'excrétion, les virions peuvent être libres ou sous forme d'agrégats adsorbés sur des matières en suspension, ou enrobés dans la matière organique. Cet état leur confère la pro-

priété d'être en partie éliminés par les procédés classiques d'épuration des eaux usées (décantation, réacteurs biologiques, etc...). Un grand nombre de virus échappent cependant au traitement d'épuration. Les concentrations virales retrouvées dans les eaux usées traitées varient là encore d'un auteur à l'autre : de 0,1 UFP/l (CLIVER, 1975) à 5 000 UFP/l (CHIN et al, 1967). Ainsi pour la station d'épuration de Nancy-Maxéville, qui traite quotidiennement 150 000 m³ d'eaux usées par jour, le rejet journalier dans la rivière Meurthe a été estimé à 3.10⁸ particules virales par SCHWARTZBROD et al (1979b). Malgré le facteur dilutif important, les phénomènes d'autoépuration du milieu naturel semblent jouer un faible rôle (BLOCK et al, 1979a ; DAHLING et SAFFERMANN, 1979) et des concentrations virales de l'ordre de 2,3 NPPUC/l ont pu être retrouvées plusieurs kilomètres en aval de ce rejet (ROLLAND et BLOCK, 1980). La tendance à l'urbanisation accélérée et l'assainissement collectif focalisent ces rejets dans le milieu naturel. Il en résulte une détérioration de la qualité des eaux de rivière dont l'utilisation pour la production d'eau potable ou à des fins récréatives (baignade) peut constituer alors un danger réel pour l'homme. Dans le cycle de l'eau, c'est donc au niveau des rejets des eaux usées traitées dans l'environnement que des contraintes peuvent être exercées en premier lieu pour la sauvegarde de notre environnement. Ce contrôle nécessite tout d'abord une bonne connaissance des rendements d'épuration des systèmes actuellement mis en oeuvre au point de vue rétention des virus. Les chiffres cités dans la littérature font état d'environ 60 à 90 % d'élimination par le traitement des boues activées (BERG, 1973c).

La relation existant entre ces abattements et les variations des autres facteurs physico-chimiques ou microbiologiques n'a été que très rarement décrite. La plupart de ces travaux sont entachés d'erreurs pour deux raisons essentielles :

- l'absence d'évaluation des rendements des techniques de concentration utilisées pour mettre en évidence les virus pour chaque type d'eau,
- la non synchronisation des prélèvements d'eau en fonction du temps de rétention des ouvrages (BERG, 1973b) et les variations importantes de virus pouvant survenir au cours d'une même journée (RAO et al, 1977).

Ce travail a donc eu deux buts essentiels :

- étudier les limites d'une méthode de concentration des virus par adsorption-élution sur poudre de verre décrite par SARRETTE et al (1977a) et modifiée par SCHWARTZBROD et LUCENA-GUTIERREZ (1978) et en optimiser les conditions d'application à l'analyse virologique des eaux usées ;
- étudier les flux de virus entériques en relation avec d'autres facteurs physico-chimiques (DBO_5 , DCO, MEST) et microbiologiques (coliformes thermorésistants) dans les eaux usées brutes et traitées de la station d'épuration par voie biologique de Nancy-Maxéville.

II. EXPERIMENTATION

1. LA STATION D'EPURATION

1.1. Situation

La station d'épuration de Nancy, située à Maxéville près de la rivière Meurthe traite les eaux usées de Nancy et de 12 communes du District Urbain de l'Agglomération Nancéienne, soit une population équivalente raccordée de 310 000 habitants.

Le réseau d'assainissement est un réseau unitaire. Trois collecteurs généraux drainent ces eaux usées vers la station d'épuration : le collecteur rive droite, le collecteur rive gauche et le collecteur Maxéville. Les dispositions topographiques de ces collecteurs représentés sur la figure 1 permettent d'apparenter l'ensemble du réseau des égouts à un arbre dont la station d'épuration serait placée à la base du tronc. Les eaux usées transitent dans ce réseau à des vitesses variant de 0,5 mètre à 1 mètre par seconde selon la pente des terrains. Ainsi, à partir du point le plus éloigné du réseau les eaux usées mettent environ deux heures trente minutes pour rejoindre la station d'épuration, ce qui est relativement court pour l'étendue du réseau d'assainissement. Les eaux usées ainsi collectées se rassemblent à l'ouvrage de prise de la station d'épuration. Le plan de cette station est présenté sur la figure 2 (les filières de traitement des boues et certains bâtiments techniques n'ont pas été représentés sur ce plan).

Les eaux usées suivent le schéma d'épuration suivant :

- Relèvement des eaux par vis d'Archimède.
- Prétraitement :
 - . dégrillage par grille verticale, écartement des barreaux 25 mm,
 - . dessablage, déshuilage en compartiment rectangulaire avec pont racleur et insufflation d'air pour le déshuilage,

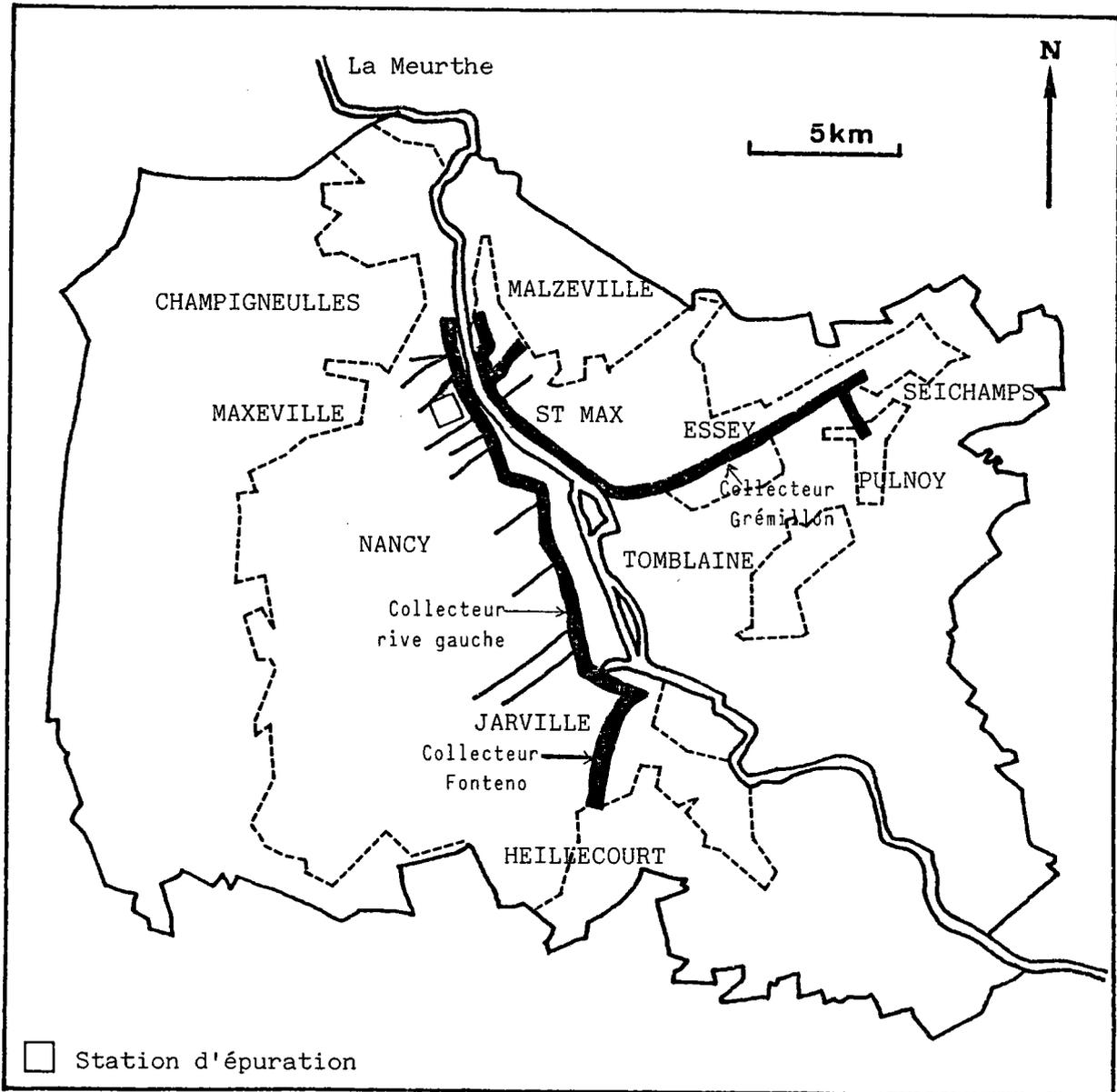


FIGURE 1 : Plan du réseau d'assainissement de l'agglomération nancéienne (seuls figurent les collecteurs principaux).

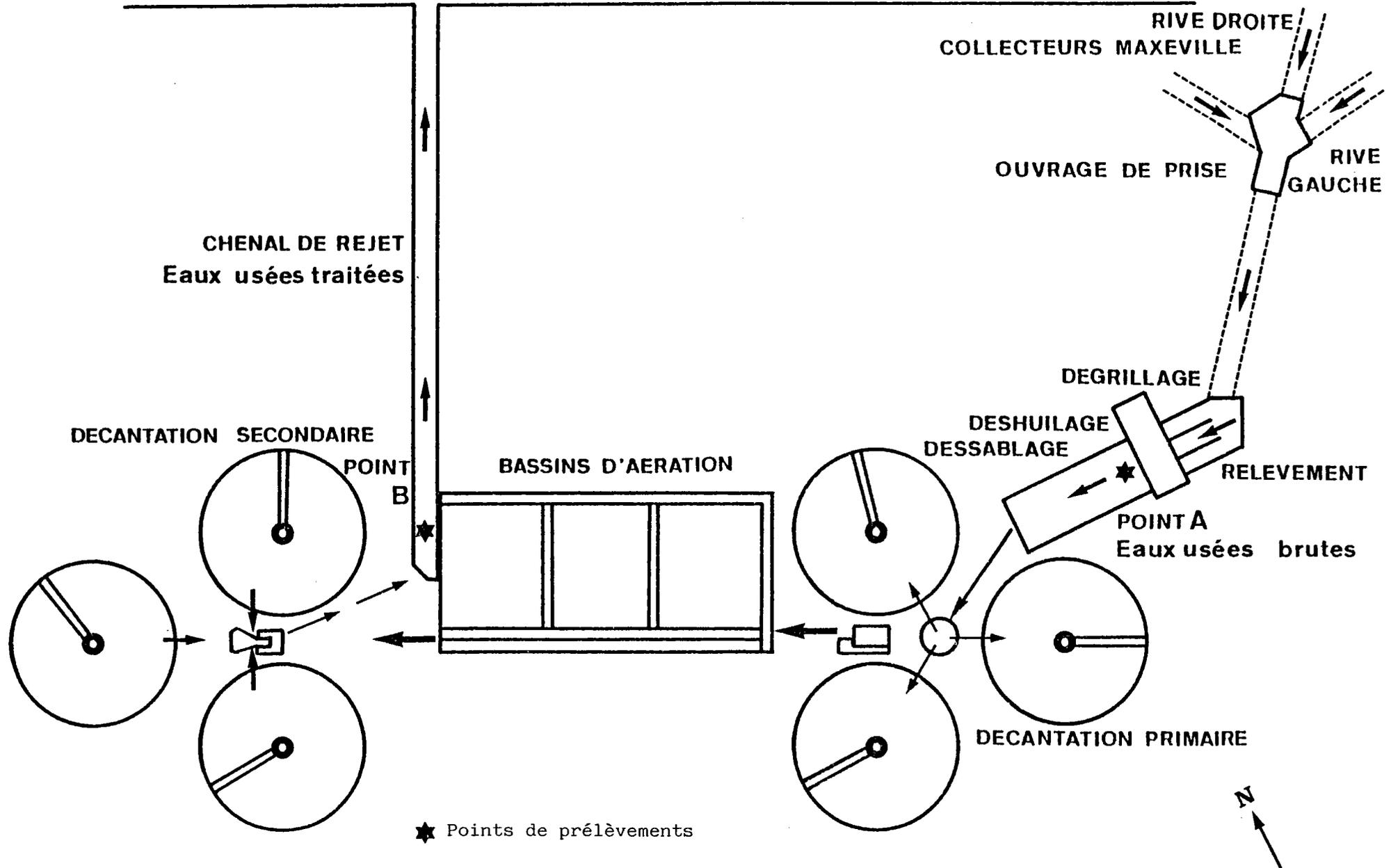


FIGURE 2 : Plan de la station d'épuration de Nancy-Maxéville et situation des points de prélèvements.

- . décantation primaire : elle est effectuée sur trois bassins circulaires de $3\ 880\ m^3$ chacun. L'eau décante en moyenne pendant 1 heure 48 minutes. Pour améliorer le rendement de la décantation primaire et rendre les boues primaires plus fluides, une partie des boues secondaires (environ 10 à 20 % selon le volume de boues biologiques produites dans les bassins d'aération) est renvoyée avec l'eau usée brute sur les décanteurs primaires.
- . épuration biologique : après décantation primaire, l'eau usée se répartit en trois bassins d'aération d'un volume total de $10\ 000\ m^3$. Le temps de séjour moyen dans les bassins d'aération est de 1 heure 33 minutes.
- . décantation secondaire : 3 décanteurs circulaires de $5\ 000\ m^3$ chacun reçoivent les effluents du bassin de boues activées. Après un temps de séjour moyen de 2 heures 20 minutes, les eaux clarifiées passent sur un seuil de jaugeage de débit et s'évacuent gravitairement en Meurthe par un chenal de rejet.
Les boues secondaires sont réintroduites en tête de bassins d'aération et l'excédent est renvoyé sur les décanteurs primaires.
Les boues fraîches extraites des décanteurs primaires sont soumises à un traitement de stabilisation : la digestion anaérobie, pendant quinze à vingt jours. Les boues sont ensuite pompées et dirigées vers les élutriateurs. Ce procédé de lavage des boues permet l'élimination des éléments colloïdaux qu'elles contiennent, facilite leur épaissement et évite le colmatage des toiles utilisées en filtration mécanique. L'eau de lavage des boues retourne en tête de station avec l'influent dans le bassin de pompage des vis d'Archimède.

Le temps moyen de rétention des eaux usées sur l'ensemble des bassins de la station est d'environ 4 à 6 heures.

	Année 1977 (février)	Année 1978 (novembre)	Année 1979 (novembre)	Année 1980 (avril)
Conditions météorologiques	pluvieux	beau temps	beau temps	orageux, sec
<u>Débit journalier traité Qj (m³/j)</u>	170 820	99 940	109 350	107 632
Q moyen m ³ /h	7 120	4 160	4 556	4 485
Q diurne m ³ /h	7 300	4 600	5 000	5 162
Q max m ³ /h	7 600	5 100	5 900	5 800
<u>Charges polluantes (*) traitées</u>				
DBO ₅ kg/j	21 300	16 600	13 120	11 833
DCO kg/j	50 900	30 700	28 868	30 244
MEST kg/j	27 800	15 600	10 169	9 471
<u>Traitement primaire</u>				
Conditions de fonctionnement				
Charges hydrauliques superficielles				
/Qm m ³ /m ² .h	1,88	1,1	1,20	1,18
/Qp m ³ /m ² .h	~ 2	1,35	1,56	1,53
Efficacité (%)				
/DBO ₅	36	44	42	23
/MEST	57	48,8	52	45
<u>Epuration biologique</u>				
Conditions de fonctionnement				
Charges polluantes traitées				
DBO ₅ kg/j	13 700	9 200	7 550	~ 9 150
Charge volumique du bassin d'aération				
kg DBO ₅ /m ³ .j	1,37	0,92	0,75	0,92
Charge massique de l'aération				
kg DBO ₅ /kg MS.j	0,39	0,34	0,5	0,28
Charges hydrauliques superficielles				
de clarification				
/Qm m ³ /m ² .h	1,7	1	1,09	1,07
/Qp m ³ /m ² .h	1,8	1,22	1,42	1,39
Efficacité du traitement biologique				
%/DBO ₅	91	80,4	78	89
%/MES	87	68,7	70,4	81
<u>Performances épuratoires globales de la station (%)</u>				
/DBO ₅	94	89	87,5	91
/DCO	84	87	87,8	82
/MES	94	84	85	81
<u>Caractérisation de l'eau traitée</u>				
teneurs en DBO ₅ (mg/l)	7	18	15	9
DCO (mg/l)	48	41	32	48
MEST (mg/l)	9	25	14	16

(*) Dans ces charges sont inclus (sauf pour la campagne de mesures 1980) les retours des digesteurs, épaisseurs et les filtrats de déshydratation mécanique par filtration sous vide.

TABLEAU 1 : Caractéristiques de traitement et performances de la station d'épuration de Nancy-Maxéville pour les années 1977, 1978, 1979 et 1980.
(D'après les bilans effectués par l'Institut de Recherches Hydrologiques de Nancy)

Sur le tableau 1 sont présentées les caractéristiques de traitement et les performances de la station d'épuration de Nancy-Maxéville pour les années 1977, 1978, 1979 et 1980 (d'après les bilans annuels effectués par l'Institut de Recherches Hydrologiques de Nancy) Les analyses ont été effectuées sur des échantillons composés sur 24 heures. Les débits journaliers traités ces trois dernières années (1978, 1979, 1980) ont été respectivement de l'ordre de $99\,940\text{ m}^3$ par jour, $109\,350\text{ m}^3$ par jour et $107\,632\text{ m}^3$ par jour. Ces valeurs restent donc inférieures à la capacité maximale admissible en épuration biologique de $239\,000\text{ m}^3$ par jour, garantissant ainsi un fonctionnement correct de la station d'épuration.

Les charges polluantes traitées sont en moyenne sur les trois dernières années de 13 tonnes par jour de DBO_5 , 30 tonnes par jour de DCO, 12 tonnes par jour de MEST, et les performances épuratoires globales de la station ont été en moyenne de 90 % pour la DBO_5 , 85 % pour la DCO et 83 % pour les MEST. Les caractéristiques de l'eau traitée ont été conformes aux normes de rejet ces quatre dernières années.

1.2. Mesure des débits

Pour les mesures de débits, nous avons utilisé le débitmètre de la station, installé dans le chenal de rejet.

Dans le chenal de rejet est placé un capteur de pression relative ou différentielle (type 785 Ha, Société d'Instrumentation Schlumberger, Nancy). Sous l'effet de la pression de l'eau, une membrane métallique ondulée déplace le noyau magnétique mobile d'un transformateur différentiel. Un démodulateur comportant les réglages de zéro et d'échelle, transforme les tensions alternatives induites dans le capteur en une tension continue proportionnelle à la mesure. Cette tension permet l'enregistrement des variations en fonction du temps, sur enregistreur à bande, et permet également de totaliser sur compteur numérique le volume d'eau traitée.

Pour l'étalonnage des mesures de débit, la hauteur de la lame d'eau mesurée au niveau de la pelle du seuil de jaugeage donne le débit correspondant selon le diagramme de NEYRPIC.

$$Q\text{ m}^3/\text{A} = \left[(0,41 + 0,10\text{ H/P})\text{ H} \sqrt{2g\text{H}} \right] \times L$$

L = largeur de seuil
P = hauteur de la pelle
H = hauteur de la lame
d'eau sur la pelle

L'enregistrement permet d'obtenir le débit d'eau traitée sortant de la station d'épuration. La station fonctionnant en gravitaire après le relevage des eaux en entrée, les variations de débit à l'entrée sont ressenties en sortie après un laps de temps de 5 minutes environ, correspondant au temps de réponse hydraulique. Le débit des eaux usées brutes en entrée de station peut donc être assimilé au débit des eaux traitées enregistré en sortie.

1.3. Points de prélèvement

Les eaux usées en entrée de la station ont été prélevées dans le bassin de dessablage après le poste de dégrillage, au point A sur la figure 2.

Les eaux traitées en sortie de station ont été prélevées dans le chenal de rejet avant la pelle de jaugeage, au point B sur la figure 2.

2. MATERIEL ET METHODES

2.1. Prélèvements

Trois types de prélèvements ont été effectués :

- des prélèvements manuels réalisés au trempé,
- des prélèvements "composés" sur 24 heures, d'une part en continu, et d'autre part, séquentiellement, à l'aide de pompes péristaltiques type WAB (PROLABO réf 08 115 000). Ces deux derniers types de prélèvements ont été utilisés uniquement lors de l'expérimentation du flux de virus dans les eaux usées brutes et traitées de la station d'épuration pendant 24 heures.

Le matériel de prélèvement (seau de 10 litres, entonnoir, tuyau pour pompe, bidon polyéthylène de 22 litres) a été préalablement stérilisé avec de l'eau de Javel diluée, puis rincé avec une solution neutralisante de sulfite de sodium. Avant prélèvement dans les chenaux de la station d'épuration, seau et bidon ont été rincés une fois avec l'eau usée brute ou l'eau traitée. Les prélèvements au trempé ont

été réalisés à l'aide d'un seau plongé dans les eaux usées. Le contenu du seau est reversé en bidon de polyéthylène. Les échantillons ainsi prélevés ont été transportés au laboratoire à température ambiante en moins de 30 minutes et soumis immédiatement à l'analyse virologique

Selon le type d'expérimentation, des volumes de 20, 60, 80 et 220 litres d'eaux usées ont été prélevés. Pour les essais nécessitant des échantillons homogènes, les eaux usées ont été rassemblées en cuve et homogénéisées pendant 30 minutes par deux pompes. A partir de cette cuve ont été alors répartis des échantillons d'eaux usées d'un volume déterminé en bidon de polyéthylène.

2.2. Système de concentration des virus

Les virus ont été concentrés selon la technique de SARRETTE et al (1977) par filtration de l'eau acidifiée à pH 3,5 au travers d'un filtre dynamique de poudre de verre, suivie d'une élution à pH alcalin des virus retenus. Fonctionnant selon ce principe, l'appareil modifié de SCHWARTZBROD et LUCENA-GUTIERREZ (1978) a été choisi pour ses qualités fonctionnelles. Le schéma coté de l'ampoule à concentrer est présenté sur la figure 3.

Cet appareil est constitué de deux parties distinctes :

- l'ampoule proprement dite, constituée d'une colonne de verre de 5 cm de diamètre, 65 cm de longueur totale, munie de deux tubulures latérales et d'une chambre d'expansion sphérique de 16 cm de diamètre. Le volume total de cette ampoule est voisin de 3 litres ;
- une pièce, portant deux robinets et une tubulure latérale, qui se raccorde à la partie inférieure de l'ampoule au moyen d'un tuyau plastique autoclavable de 8 cm de long et au flacon de récupération du liquide d'élution.

Cet appareil à concentrer ainsi monté est placé sur un statif porte-objet d'une hauteur adéquate.

L'adsorbant employé est de la poudre de verre (Sovirel - 4585-10) obtenu par concassage de verre borosilicaté, puis tamisage entre 100 et 200 μm . L'observation microscopique de cette poudre révèle des cristaux de verre irréguliers aux formes diverses (figure 4).

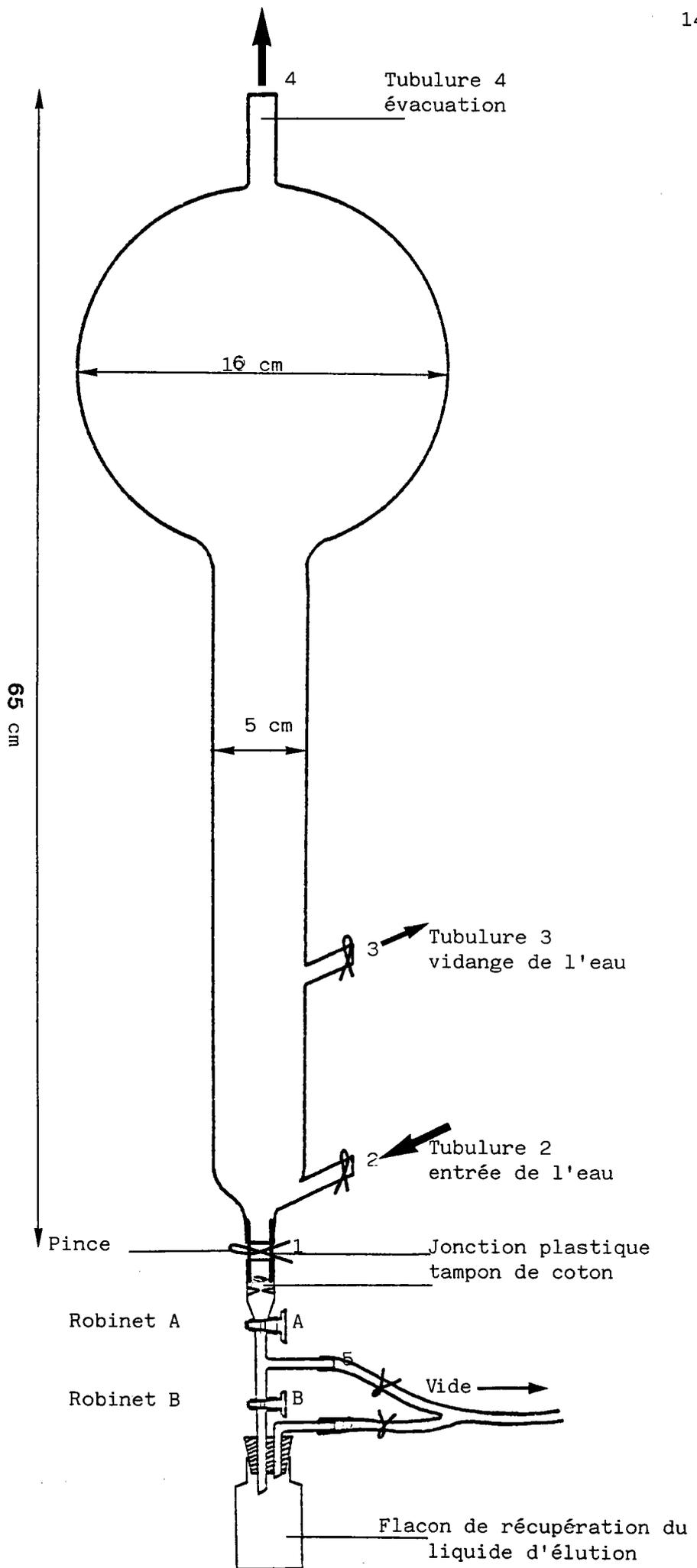


FIGURE 3 : Schéma côté de l'appareil à concentrer

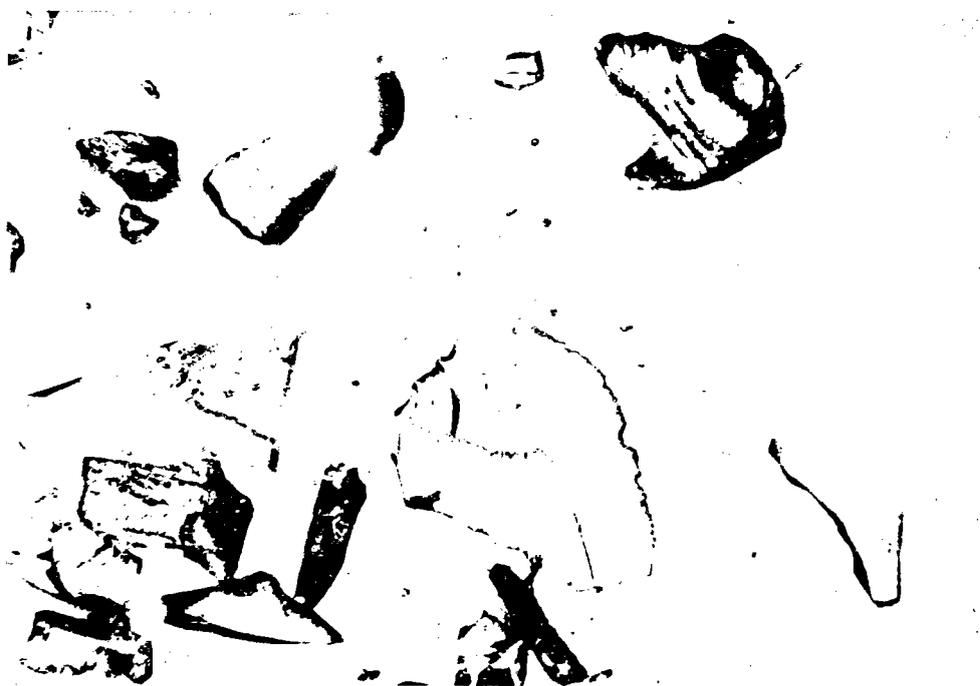
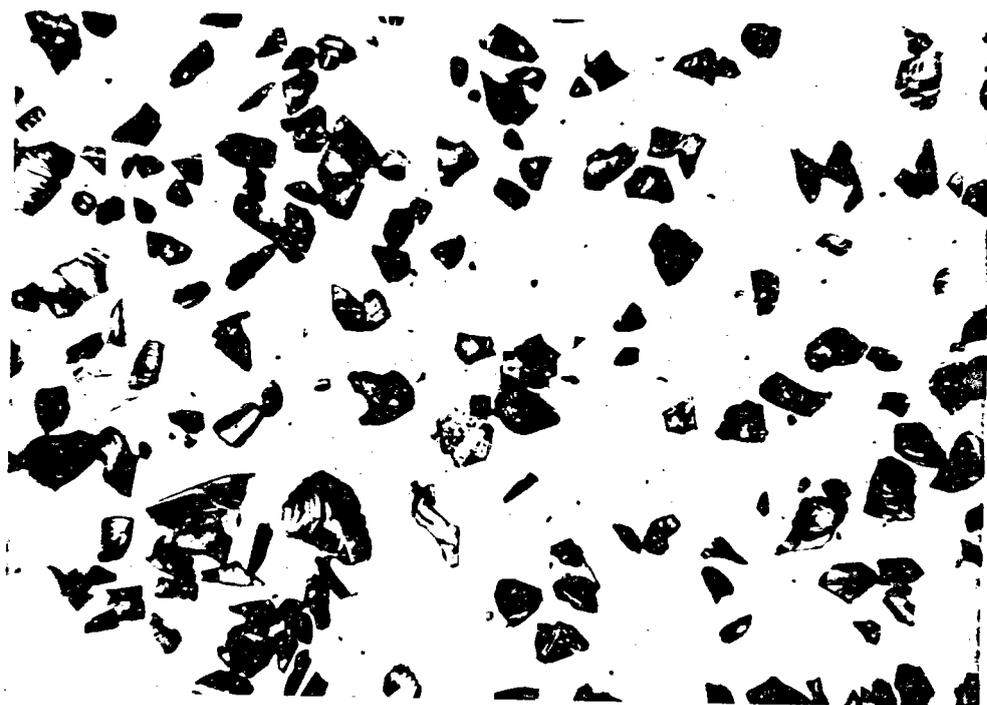


FIGURE 4 : Cristaux de verre (grossissement : x 50 et x 100).

Avant le montage des deux parties de l'appareil à concentrer, un tampon de coton est placé sur les pointes de verre de la pièce robinets pour retenir la poudre de verre lors de l'étape d'élution. Les deux parties, ampoules et pièce robinets sont reliées par le tuyau de plastique, qui est ensuite clampée (1). Les tubulures 2 et 3 sont également clampées pour permettre l'introduction d'une quantité de poudre de verre dans l'appareil à l'aide d'un entonnoir par la tubulure 4.

Les échantillons d'eau à concentrer sont acidifiés à pH 3,5 par ajout d'acide chlorhydrique technique (Prolabo réf 20 246 29) sous agitation constante par pompe. Une solution stérile de chlorure d'aluminium est également ajoutée à la concentration finale de 5.10^{-4} M. (x ml de solution de chlorure d'aluminium 0,5 M stérile pour x litres d'eau).

Les échantillons d'eau ainsi traités sont injectés par la tubulure 2 à la base de la colonne sous l'action d'une pompe à débit réglable (type Masterflex - Distributeur Bioblock - réf 87 217). Cela provoque la mise en suspension de la poudre de verre et la formation d'un filtre dynamique dans la colonne et la partie inférieure de la sphère.

L'eau s'échappe ensuite de l'ampoule par la tubulure 4 reliée à un tuyau d'évacuation. Après le passage de la totalité de l'échantillon, arrêt de la pompe et fermeture de la tubulure 2, la poudre de verre décante dans la partie basse de la colonne. L'ouverture de la tubulure 3 permet l'évacuation de l'eau de l'ampoule, l'eau restant au-dessus du lit de poudre de verre est éliminée par aspiration à l'aide d'un tuyau par cette même tubulure.

2.3. Technique d'élution des virus de la poudre de verre

Le liquide d'élution employé est un tampon glycine-soude 0,05 M à pH 11,5 préparé extemporanément à partir des produits suivants (quantité pour un litre) :

- glycine (Prolabo - réf 24 404 23)	3,75 g
- chlorure de sodium (Prolabo - réf 27 810 29)	2,92 g
- solution de soude 1 N (Prolabo Normadose - réf 32 066 60)	50 ml

Cette solution tampon est colorée par addition de quelques gouttes d'une solution stérile de rouge de phénol à 1 %.

Pour la phase d'élution, la jonction plastique est déclampée en 1 et la poudre de verre descend ainsi au niveau du tampon de coton. Le liquide d'élution (100 ml environ) est introduit par la tubulure 4, tout en rinçant les parois de l'ampoule et de la colonne. Puis, après ouverture du robinet A et du clamp de la tubulure 5, le vide est créé pour faire progresser le tampon glycine dans la colonne de poudre de verre. Un front d'élution se forme, repérable grâce à la coloration du tampon d'élution, plus ou moins net selon la turbidité et la couleur de l'échantillon.

Lorsque ce front d'élution atteint le tampon de coton, le robinet A est fermé ainsi que le clamp de la tubulure 5. Le clamp de la tubulure 6 est ouvert, de même que le robinet B.

A l'ouverture du robinet A et toujours sous l'effet du vide, le liquide d'élution est recueilli dans le flacon stérile.

Seuls les 35 premiers ml de liquide d'élution sont ainsi récupérés.

2.4. Traitement des liquides d'élution

Après leur récupération, les liquides d'élution vont subir en premier lieu une neutralisation, puis une décontamination. Ensuite, nous y avons ajouté une centrifugation et une dilution partielle des échantillons.

2.4.1. Neutralisation

Le pH des liquides d'élution récupérés après passage à travers la poudre de verre varie de 9 à 10,5 selon les types d'eaux concentrés. Immédiatement après leur récupération, les liquides d'élution sont neutralisés par ajout de solution d'acide chlorhydrique 1 N et 0,1 N jusqu'à pH 7,2. Le rouge de phénol présent prend à ce pH une teinte rose orangée bien visible si le liquide d'élution n'est pas trop turbide et coloré.

2.4.2. Décontamination

Les liquides d'élution sont décontaminés par le chloroforme selon la technique de BURAS (1974) et par ajout de solutions antibiotiques et d'antifongiques. Dans un premier temps, les liquides d'élution sont additionnés de chloroforme (Prolabo - réf 22 711 324) dans la proportion de 30 %, puis soumis à une agitation rapide sur agitateur magnétique pendant 30 minutes. Les émulsions obtenues sont décantées une nuit à + 4°C. Après quoi, la phase aqueuse supérieure est prélevée et le chloroforme résiduel encore présent est entraîné par un courant d'azote stérile barbotant pendant 30 minutes à température ambiante.

Pour garantir la stérilité microbiologique des liquides d'élution pendant leur conservation, 3 % d'une solution d'antibiotiques et 3 % d'une solution de fungizone leur sont additionnés. La composition de ces solutions est la suivante :

- Solution antibiotique :

Pour 1 ml eau distillée stérile :

Pénicilline (Sarbach)	100 000 U
Streptomycine (Specia)	$4,16 \cdot 10^{-3}$ g
Néomycine	$9 \cdot 10^{-3}$ g

- Solution de fungizone (Laboratoire Squibb)

Pour 1 ml de Hanks

Amphotericine B	0,1 mg
-----------------	--------

2.4.3. Centrifugation

Les liquides d'élution ont été soumis à une centrifugation de 10 000 g pendant 10 minutes à + 4°C, sur centrifugeuse Beckmann JB 21, afin de diminuer leur toxicité vis à vis des cultures cellulaires.

2.4.4. Dilution partielle des liquides d'élution

Après ajout de solutions antibiotiques aux liquides d'élution leur volume est d'environ 38 ml. Ce volume a toujours été complété

à 50 ml par ajout de MEM 2 fois concentré à 4 % de sérum foetal de veau décomplémenté, afin d'ajuster l'osmolarité des liquides d'élution à celle des milieux de culture cellulaire. Il a été tenu compte de cette dilution pour les calculs des titres viraux.

2.5. Culture cellulaire

2.5.1. Lignée cellulaire

Les analyses virologiques ont été effectuées sur une souche de cellules Buffalo Green Monkey (BGM) en lignée continue, provenant de rein de singes verts africains (Cercopithecus aethiops) (réf Gibco-Biocult H 4020). Cette souche cellulaire est entretenue au laboratoire par trypsination hebdomadaire. Les analyses virologiques ont été réalisées sur ces cellules entre le 80ème et le 135ème passage.

2.5.2. Milieu de culture

Le milieu de base employé est du "minimum essential medium" de Eagle (MEM) avec L glutamine et acides aminés non essentiels (réf Seromed 437 10) (Milieu deshydraté pour 10 litres).

L'eau bidistillée servant à la préparation des milieux de culture a été stérilisée par filtration sur membrane (1 bar). Les membranes ont été placées sur les supports de filtration (Sartorius 162 68) selon l'ordre suivant :

- Membrane de fibre de verre (Sartorius 13430)
- Membrane en nitrate de cellulose de 0,8 μm (Sartorius 11304)
- Membrane de dacron (Sartorius 13420)
- Membrane en nitrate de cellulose de 0,2 μm (Sartorius 11307)

L'ensemble, support et membranes, est stérilisé par autoclavage à 120°C pendant 20 minutes.

Le milieu dissous dans de l'eau bidistillée stérile est additionné de sérum de veau nouveau-né (réf Seromed 0123 et 0125), décomplémenté par la chaleur à 56°C au bain marie pendant 30 minutes, dans la proportion de 10 % pour les milieux de croissance, et de 2 % pour

les milieux d'entretien. Ces milieux sont tamponnés par addition de bicarbonate de sodium (réf Prolabo 27 778) dans la proportion de 1,12 gramme pour 1 litre de MEM 10 % et de 1,76 gramme pour 1 litre de MEM 2 %, et par addition de tampon Hepes 5 M (0,4 %) (réf Seromed 1612).

Les milieux de culture sont stérilisés par filtration sous pression d'azote 1 bar selon le même protocole décrit précédemment. Le milieu filtré est réparti en flacons de verre de 500 ml préalablement stérilisés par passage au four deux fois 90 minutes à 180°C.

Chaque série de quatre flacons est contrôlée par ensemencement de deux tubes de milieu au thioglycolate de sodium avec résazurine (réf Biomerieux 51 131) avec 2 ml du milieu. Un tube est incubé à température ordinaire, l'autre à l'étuve à 37°C. Les flacons bouchés et étiquetés sont stockés 8 jours à température du laboratoire. Après cette période, ils sont stockés à + 4°C si aucun trouble n'est apparu et si les tubes de contrôle sont restés négatifs.

Avant utilisation des milieux, il est ajouté à chaque flacon de 400 ml de milieu, 2 ml de la solution antibiotique, de composition suivante :

- Benzyl penicillinate de sodium 1 000 000 Unités
- Sulfate de streptomycine 1 g
- Eau distillée stérile 25 ml

Cette solution antibiotique répartie à raison de 2 ml en tube stérile est conservée au congélateur à - 26°C.

2.5.3. Entretien de la souche cellulaire

Les cellules BGM sont cultivées à 36°C en flacons ronds stériles de 490 cm² (réf Corning 25 130, distributeur Poly Labo Paul Block et Cie) ou en flacons de verre préalablement stérilisés au four à 180°C, mis en rotation sur rouleur pour bouteille à raison de 2 rotations par minute.

Le tapis cellulaire des bouteilles est trypsiné régulièrement tous les sept jours selon le protocole décrit dans le paragraphe suivant.

Après élimination du milieu de culture, le tapis cellulaire est lavé deux fois avec une solution tampon sans calcium ni magnésium dont la composition est la suivante :

- Chlorure de sodium	8 g
- Chlorure de potassium	0,2 g
- Hydrogénophosphate disodique (12 H ₂ O)	1,15 g
- Hydrogénophosphate dipotassique	0,2 g
- Eau distillée qsp	1 000 ml

pH : 7,3

Cette solution est stérilisée par autoclavage à 120°C pendant 20 minutes.

Le tapis cellulaire est ensuite mis en contact avec 30 à 50 ml de solution de trypsine pendant quelques minutes à l'étuve à 37°C jusqu'à décollement total des cellules des parois du flacon.

La solution de trypsine est préparée par dissolution de 2,5 g de trypsine (Difco réf 0152 13) et de 0,20 g d'E.D.T.A. (Merck réf 943) dans 1 000 ml de solution saline sans calcium ni magnésium. De plus 100 000 unités de Pénicilline G (Specia) et 0,2 g de Streptomycine (Specia) sont ajoutés à cette solution de trypsine. Le pH est d'environ 7,2-7,4. Cette solution est stérilisée par filtration sur membrane comme les milieux.

Les cellules sont récupérées et isolées de la solution de trypsine par centrifugation à 600 g pendant 5 minutes. Le culot cellulaire est remis en suspension dans du MEM 10 % et les cellules sont dénombrées à l'aide d'une cellule de Nageotte. Cette suspension cellulaire est ensuite diluée de façon adéquate et répartie dans les récipients de culture à raison de :

- 10^5 cellules/ml pour un tube avec 1 ml de milieu,
- $4 \cdot 10^5$ cellules/ml dans 7 ml de milieu dans un flacon de 25 cm²,
- $1,5 \cdot 10^5$ cellules/ml dans 70 ml de milieu dans un flacon de 150 cm²,
- $1,5 \cdot 10^5$ cellules/ml dans 150 ml de milieu dans un flacon rond de 490 cm².

Les flacons de culture cellulaire sont mis à incuber à l'étuve à 36°C et utilisés après 5 à 7 jours lorsque le tapis cellulaire est confluent. Pour les flacons ronds de culture cellulaire, le milieu de culture est remplacé après trois jours par du MEM 2 % jusqu'à la prochaine trypsination.

2.6. Préparation du stock de virus poliomyélitique

Deux souches de virus poliomyélitique ont été utilisées pour les expériences effectuées avec ajout de virus : une souche de virus poliomyélitique de type 1 souche Mahoney et une souche de virus poliomyélitique de souche vaccinale Sabin (origine : Centre Régional O.M.S. de référence des Entérovirus, Lyon).

Pour chaque souche, les stocks de virus ont été préparés par inoculation de la suspension de virus poliomyélitique à une culture de cellules BGM en tapis de 7 jours en flacon de 150 cm². La période d'incubation a été de 8 jours à 36°C pour obtenir une destruction totale du tapis. Ce flacon de culture a été congelé et décongelé deux fois de suite pour rompre les structures cellulaires et permettre ainsi la libération totale des particules virales dans le milieu. Les débris cellulaires présents sont éliminés par centrifugation du milieu à 5 000 g.

Pour monodisperser le stock de virus Mahoney, la suspension virale a été soumise à un traitement de désagrégation selon le protocole suivant inspiré par JAKUBOWSKI et al (1975) : deux membranes stériles de 50 mm de diamètre de porosité 0,45 µm (acétate de cellulose, Sartorius réf SM 111 06) et de 0,05 µm (nitrate de cellulose, Sartorius réf 113 28) sont prétraitées par filtration de 75 ml d'une solution stérile à 10 % de sérum de veau, le filtrat obtenu est rendu isotonique par addition de 7,5 ml de Earle 10 fois concentré. Dix millilitres de cette solution isotonique clarifiée sont utilisés pour traiter à nouveau les membranes. La suspension virale est filtrée deux fois de suite sur ces membranes ainsi préparées.

Le stock de virus souche Sabin a été monodispersé par traitement au fréon selon la technique décrite par SOBSEY et al (1978).

Dans un pot entouré de glace, 80 ml de suspension virale additionnée de 80 ml de fréon à température de + 4°C sont homogénéisés pendant deux minutes à 20 000 tours par minute. L'émulsion obtenue est centrifugée à 1 000 g pendant 15 minutes et le surnageant est réparti en tubes stériles à raison de 2 ml par tube.

Le titre du stock de virus poliomyélitique souche Mahoney était de $2,1 \cdot 10^7$ UFP/ml.

Le titre du stock de virus poliomyélitique souche Sabin était de $5,8 \cdot 10^8$ UFP/ml.

Pour chaque essai avec virus ajouté, le stock de virus utilisé a été retitré en parallèle avec les autres fractions de l'essai de manière à connaître le titre exact du stock de virus.

2.7. Méthode de titrage des virus dans les liquides d'élution

Selon les essais, deux techniques ont été utilisées pour connaître la quantité de virus présents dans les échantillons :

- la méthode du nombre le plus probable,
- la méthode des plages.

La méthode du nombre le plus probable en milieu liquide laisse, si un effet toxique apparaît, la possibilité d'un second et même d'un troisième passage pour confirmer un effet cytopathique. Cette méthode donne une estimation de la densité des particules virales.

La méthode des plages exige un tapis cellulaire dense et un bon état physiologique des cellules. Cette méthode permet un comptage direct des particules virales, mais les inoculums toxiques détruisent le tapis cellulaire sans possibilité de numération.

2.7.1. Titrage des virus par la méthode du nombre le plus probable (NPP)

Cette méthode mise au point par MAC GRADY (1915) avec les bactéries permet d'estimer la densité moyenne des particules virales sans effectuer de comptage direct. A partir de l'échantillon initial,

des dilutions au 1/10 sont effectuées (selon le titre présumé) et ensemencées sur des cultures cellulaires en flacon de 25 cm², en tapis confluent de 7 jours. Pour chaque dilution, cinq flacons ont été inoculés selon le protocole suivant. Le milieu de culture de chaque flacon a été éliminé par aspiration avec une pipette Pasteur stérile reliée à une trompe à vide avec fiole de garde. L'inoculum, 1 ml par flacon, a été introduit dans les flacons et laissé en contact avec le tapis cellulaire pendant une heure trente minutes à l'étuve à 36°C. Une agitation lente des flacons a été pratiquée toutes les quinze minutes pour augmenter les chances de fixation des virus sur les cellules du tapis. Après ce temps de contact, l'inoculum a été enlevé par aspiration et les tapis cellulaires ont été recouverts par 7 ml de milieu d'entretien MEM à 2 % de sérum de veau et ont été mis à incuber en étuve à 36°C. Cinq flacons par dilution ont été ainsi inoculés.

Le lendemain, une première observation des tapis cellulaires a été effectuée au microscope inversé pour noter les éventuels effets toxiques des inoculums sur les cellules. Après sept jours d'incubation une seconde lecture a été effectuée et les effets cytopathiques ont été notés.

Les flacons ont été ensuite congelés à - 26°C et décongelés dans leur position initiale avant d'effectuer un deuxième passage. Pour cela, un millilitre du milieu de chaque flacon a été inoculé sur un nouveau tapis cellulaire en flacon de 25 cm² selon le protocole décrit précédemment. Après sept jours d'incubation à l'étuve à 36°C, la recherche des effets cytopathiques a été effectuée. La destruction du tapis cellulaire d'un flacon révèle, si confirmation au deuxième passage, la positivité de ce flacon.

Les résultats ont été exprimés en nombre de flacons positifs pour trois dilutions successives. Le triplet obtenu a permis alors d'après les tables de DE MAN (1977) de connaître le nombre le plus probable des particules virales présentes dans un millilitre d'inoculum de la première dilution considérée dans le triplet. Les résultats sont exprimés en nombre le plus probable d'unités cytopathogènes (NPPUC).

2.7.2. Titration des virus par la méthode des plages

La technique des plages utilise des tapis cellulaires confluents en flacon de culture de 25 cm² de surface. L'étape de l'inoculation des suspensions virales et de leur dilution est identique à celle décrite précédemment en 2.7.1 . En règle générale, dix flacons ont été inoculés par échantillon et par dilution.

Le milieu gélosé d'entretien a la composition suivante :

- MEM 2 fois concentré avec sel de Hanks et L glutamine	41,5 ml
- Bicarbonate de sodium en solution à 3 % stérile	2 ml
- Chlorure de magnésium en solution à 1 % stérile	1 ml
- Lait stérile	1 ml
- Rouge neutre en solution stérile à 1 %	1,5 ml
- Gélose (réf Oxoid L 28) en solution stérile à 1,5 %	50 ml

Ce milieu gélosé est maintenu en fusion à une température de 42°C au bain marie et 6 ml de ce milieu sont coulés sur les tapis cellulaires. Après solidification du milieu, les flacons sont incubés retournés, à l'abri de la lumière, en étuve à 36°C. Les flacons sont observés quotidiennement et l'apparition des plages est repérée sur le fond de chaque flacon.

Après deux à trois jours, les tapis cellulaires reçoivent une nouvelle quantité de milieu gélosé (3 ml) de même composition, si l'état des cellules le requiert.

La somme des plages numérotées pour un échantillon donné exprime le nombre d'Unités Formant Plages (UFP) pour le volume inoculé.

2.8. Analyses physico-chimiques

Les analyses physico-chimiques des eaux et des liquides d'élution ont été effectuées au Service de Contrôle des Eaux du Laboratoire d'Hygiène.

2.8.1. pH

Les mesures de pH ont été effectuées à l'aide d'une électrode combinée (SODILAB réf 08 CA 1PB) reliée à un pH-mètre SCHOTT-GERATE type CG 818 (distributeur SODILAB).

2.8.2. Résistivité

Les mesures de résistivité ont été effectuées à l'aide d'un résistivimètre PHILIPS GM 4249 ; les résultats ont été exprimés en Ω /cm.

2.8.3. Turbidité

Les mesures de turbidité ont été effectuées à l'aide d'un turbidimètre HACH (modèle 2100) étalonné par rapport à un étalon en verre dépoli de 70 unités Jackson (JTU) (1 JTU = 12,5 gouttes de mastic). Les résultats ont été exprimés en JTU (Jackson Turbid Unit).

2.8.4. Matières en suspension

La mesure des matières en suspension a été effectuée selon la norme AFNOR T 90 105 par filtration de 100 ml d'échantillon sur filtre en fibre de verre de 5 cm de diamètre (Sartorius réf 13 400). Le poids des matières retenues par le filtre est déterminé, après séchage à 105°C, par pesée différentielle et le résultat est exprimé en mg/l.

2.8.5. Demande biochimique en oxygène

La mesure de la demande biochimique en oxygène (DBO) a été effectuée selon la norme AFNOR T 90 103 par incubation pendant cinq jours à 20°C et dans l'obscurité d'un volume de 250 ml d'échantillon et de ses dilutions. La mesure de l'oxygène dissous est effectuée avant et après incubation à l'aide d'une sonde à oxygène reliée à un analyseur d'oxygène OXI 39 et exprimée en mg O₂ consommé par litre.

2.8.6. Demande chimique en oxygène

La mesure de la demande chimique en oxygène (DCO) a été effectuée selon la norme AFNOR T 90 101 par oxydation d'une prise d'essai de 50 ml d'échantillon par un excès de dichromate de potassium en milieu acide, et en présence de sulfate d'argent et de sulfate de mercure. L'excès de dichromate de potassium est dosé par le sulfate de fer et d'ammonium. Les résultats ont été exprimés en mg/l.

2.8.7. Dosage des métaux

Les dosages des métaux suivants : fer, manganèse, aluminium, chrome, plomb, cuivre, zinc, ont été effectués par spectrophotométrie d'absorption atomique (appareil PERKIN ELMER N° 305) sans méthode d'ajout. Les résultats ont été exprimés en mg/l.

2.8.8. Dosage du potassium et du sodium

Les dosages du potassium et du sodium dans les échantillons ont été effectués par photométrie de flamme sur un photomètre Electro-
nest. Les résultats ont été exprimés en mg/l.

2.8.9. Dosage du calcium

Le dosage du calcium dans les échantillons a été effectué par complexométrie. Les résultats ont été exprimés en mg/l.

2.8.10. Dosage des matières oxydables à chaud par le permanganate de potassium

Le dosage des matières organiques oxydables à chaud par le permanganate de potassium a été effectué sur une prise d'essai de 50 ml (RODIER, 1978). Les résultats ont été exprimés en mg/l.

2.9. Analyse bactériologique

Pour la numération des coliformes fécaux thermorésistants à 44°C, deux méthodes de numération ont été utilisées :

- méthode en milieu liquide,
- méthode par filtration sur membrane.

2.9.1. Méthode en milieu liquide

Les milieux utilisés sont le bouillon lactosé au pourpre de bromocresol (B.C.P.) (Institut Pasteur réf 64 041), le bouillon lactosé bilié au vert brillant (réf IP 64 057) et de l'eau peptonée (réf 64 377). Ces milieux sont répartis en tubes à raison de 9 ml par tube et stérilisés 15 minutes à 120°C.

Dans un premier temps, à partir des échantillons, des dilutions successives au 1/10 ont été réalisées dans une eau physiologique stérile. Ces dilutions ont été inoculées dans trois tubes de milieu BCP à raison de 1 ml par tube. Ces tubes ont été incubés pendant 48 heures à 37°C. Le virage au jaune de l'indicateur et la production de gaz dans le tube de Durham révèlent la multiplication bactérienne. Pour la détermination des coliformes fécaux thermorésistants à 44°C, une seconde étape est nécessaire. A partir des tubes précédemment déterminés positifs, une öse a été réinoculée dans un tube de bouillon lactosé bilié et un tube d'eau peptonée.

Après 48 heures d'incubation à 44°C, la culture et le développement de gaz dans le bouillon lactosé bilié et la production d'indole (mise en évidence par le réactif d'Erlich Kowacs) dans le tube d'eau peptonée confirment la présence de coliformes fécaux thermorésistants à 44°C.

Le triplet formé par les nombres de tubes positifs de trois dilutions successives permet l'appréciation du nombre le plus probable (NPP) de coliformes fécaux présents dans l'échantillon à l'aide des tables de MAC GRADY (1915).

2.9.2. Méthode par filtration sur membrane

Le milieu utilisé est une gélose lactosée (Institut Pasteur réf 64 451) additionnée de 0,025 g/l de chlorure de triphényl tétrazolum (Merck réf 8380) et de 0,1 g/l de Tergitol 7 (réf BDH 5601446) et coulée en boîtes de Pétri plastique de 6 cm de diamètre. Les membranes filtrantes de 0,45 μm de porosité et 47 mm de diamètre (Sartorius réf 113 06) sont stérilisées par autoclavage à 115°C pendant 14 minutes. Les échantillons ont subi des dilutions au 1/10 dans du sérum physiologique stérile selon une charge bactérienne présumée. Pour chaque dilution, trois fois 5 ml ont été filtrés sur trois membranes. Trois dilutions successives sont ainsi filtrées sur membrane. Les membranes ont été placées sur la gélose et les boîtes de Pétri incubées retournées pendant 24 h à 44°C \pm 1°C. Après cette période d'incubation, les colonies jaunes orangées et fermentant le lactose (halo jaune sous la colonie) sont numérées. Le titre de la suspension bactérienne a été calculé pour la dilution permettant d'obtenir entre 0 et 90 colonies.

Les résultats ont été exprimés en nombre de coliformes thermorésistants par litre avec la limite de confiance de la méthode de numération.

2.10. Analyse mathématique des résultats

2.10.1. Moyenne - Variance - Ecart-type - Intervalle de confiance

A partir des comptages de colonies pour les analyses bactériologiques et de plages pour les analyses virologiques, effectués sur plusieurs boîtes (milieu bactérien ou tapis cellulaire) pour un inoculum donné, la moyenne, la variance et l'écart type des distributions ont été calculés à l'aide d'une calculatrice Texas Instrument TI 51 III :

- les moyennes ont été calculées par la moyenne arithmétique des résultats,
- la variance et l'écart type des distributions introduites ont été calculés selon les expressions suivantes :

$$\text{Variance (V)} = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}$$

\bar{x} = moyenne de la distribution

n = effectif de la distribution

(dans notre cas : nombre de boîtes inoculées par la numération d'un échantillon).

Le programme de calcul de variance appliqué par cette calculatrice est, en fait, une estimation de la variance ; (n - 1) au dénominateur étant un facteur de pondération (Statistiques Appliquées à l'Exploitation des Mesures, C.E.A., tome 1).

$$\text{Ecart type } (\sigma) : \sqrt{\frac{(x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

- Intervalle de confiance :

Les moyennes des résultats des numérations des échantillons bactériologiques et virologiques ont été encadrées d'un intervalle de confiance choisi au niveau de probabilité de 95 % (I.C. 95 %).

Lorsque la technique de numération par le nombre le plus probable a été utilisée, l'intervalle de confiance du résultat a été lu dans les tables statistiques de DE MAN (1977).

Lorsqu'une technique de comptage direct (plages et colonies) a été utilisée, l'intervalle de confiance de la moyenne des résultats a été calculé à l'aide de l'écart type de la distribution par l'expression :

$$\text{I.C. 95 \%} = \frac{\bar{x}}{\sqrt{n}} \times t \left(1 - \frac{\alpha}{2} \right)$$

Dans cette expression $t \left(1 - \frac{\alpha}{2} \right)$ est une variable de Student. Cette variable est lue dans les tables de Student pour la probabilité de 95 % et pour n - 1 degré de liberté (Statistiques appliquées à l'exploitation des mesures, C.E.A., tome 2, 1978).

L'intervalle de confiance présenté pour chaque résultat représente l'intervalle de confiance de la méthode de numération utilisée pour une expérience donnée, et non l'intervalle de confiance d'une moyenne résultant de plusieurs expériences identiques.

2.10.2. Régression linéaire et étude de corrélation

Les recherches de corrélation entre deux séries de résultats ont été effectuées sur calculatrice Texas Instrument TI 51 III.

Les programmes de cette calculatrice ont permis de déterminer les coefficients de corrélation, les pentes et l'ordonnée à l'origine des droites de régression selon les expressions mathématiques suivantes

$$\text{Coefficient de corrélation } (r) = \frac{\text{Cov} - (X,Y)}{\sigma_x - \sigma_y}$$

$$\text{Cov} (X.Y) = \sum \frac{X_i \times Y_i}{n}$$

$$\text{Pente de la droite de régression } a = \frac{\sum_i \sum_{x_i} (x_i - \bar{x}) (y_i - \bar{y})}{\sum n_i (x_i - \bar{x})^2}$$

3. EXPERIMENTATION PROPREMENT DITE

Avant d'appliquer le système de concentration des virus sur poudre de verre à l'étude des flux de virus en entrée et en sortie de stations d'épuration, nous avons cherché, dans un premier temps, à repréciser le choix de certains paramètres : quantité de poudre de verre, vitesse ascensionnelle, volume de l'échantillon d'eau usée, ainsi qu'à évaluer le rendement de cette méthode, l'efficacité de l'élution et la reproductibilité de la méthode avec des eaux usées.

Dans un second temps, nous nous sommes attachés à résoudre certains problèmes rencontrés lors de la quantification des virus, tels que la survie des virus dans les échantillons d'eaux usées et dans les liquides d'élution, la toxicité de certains liquides d'élution et le choix d'une méthode de titrage de virus.

Pour clarifier la présentation de cette première partie expérimentale, nous avons présenté, dans un même paragraphe, le protocole des essais et leurs résultats.

3.1. Optimisation de la méthode de concentration des virus.
Expérimentation et résultats

3.1.1. Choix d'une quantité de poudre de verre

Trois quantités de poudre de verre ont été expérimentées: 100 g, 150 g et 200 g. Des échantillons de 20 litres d'eaux usées brutes ont été concentrés à la vitesse de passage de 100 litres par heure. Les liquides d'éluion ont été titrés par la méthode des plages

Cette expérimentation a été reproduite trois fois. Les résultats sont présentés sur le tableau 2.

Quantité de poudre de verre	100 g	150 g	200 g
essai 1	39,9 \pm 5,0	43,9 \pm 5,3	45,3 \pm 6,7
essai 2	69,2 \pm 6,5	37,6 \pm 6,7	55,4 \pm 8
essai 3	50,7 \pm 3,8	51,7 \pm 2,5	31,4 \pm 2,8

TABLEAU 2 : Virus indigènes (UFP/1) isolés des eaux usées brutes (échantillons de 20 litres) après concentration sur différentes quantités de poudre de verre
 (\pm : intervalle de confiance à 95 % de la numération)

Au cours de ces trois essais, les résultats ne concordent pas puisqu'une quantité minimale de virus a été retrouvée dans le premier essai pour 100 g de poudre de verre, dans le deuxième essai pour 150 g et dans le troisième essai pour 200 g. Dans ces conditions, le choix d'une quantité optimale d'adsorbant peut difficilement être défini. Le paramètre quantité de poudre de verre ne semblant pas un facteur clé dans la concentration des virus, 150 g ont généralement été utilisés par la suite.

3.1.2. Choix d'une vitesse ascensionnelle de l'eau

Deux vitesses ascensionnelles ont été expérimentées : 50 litres par heure et 100 litres par heure. Les échantillons de 20 litres d'eaux usées brutes et d'eaux usées traitées ont été concentrés sur 150 g de poudre de verre. Les liquides d'élution ont été titrés par la méthode des plages. Cette expérimentation a été reproduite trois fois.

Les résultats sont présentés sur le tableau 3.

Vitesse ascensionnelle	Essai 1	Essai 2	Essai 3
50 l/h	27 \pm 6,1	200 \pm 35,6	4,5 \pm 2,1
100 l/h	21 \pm 8,6	500 \pm 75	5,5 \pm 2,3

TABEAU 3 : Virus indigènes (UFP/1) isolés des eaux usées brutes (échantillons de 20 litres) après concentration sur 150 g de poudre de verre à deux vitesses ascensionnelles de l'eau analysée
(\pm : intervalle de confiance à 95 % de la numération)

Pour deux essais sur trois, les quantités de virus indigènes concentrées à 100 litres par heure sont supérieures à celles obtenues à 50 litres par heure, mais dans un seul cas (essai 2), la différence entre les titres obtenus est significative. Dans la suite des essais, nous avons travaillé à la vitesse ascensionnelle de 100 litres par heure.

3.1.3. Choix du volume de l'échantillon

Trois volumes d'eaux usées ont été comparés : 20 litres, 10 litres et 5 litres. Les échantillons d'eaux usées brutes et d'eaux usées traitées ont été concentrés sur 150 g de poudre de verre à la vitesse ascensionnelle de 100 litres par heure. Parallèlement à ces

concentrations, les eaux usées ont été titrées par inoculation directe (10 ml), après avoir subi les mêmes traitements que les liquides d'élution (décontamination et centrifugation). Les liquides d'élution et les échantillons d'eaux ont été titrés par la méthode du N.P.P.

Cette expérimentation a été reproduite trois fois pour chaque type d'eaux usées. Les résultats sont présentés dans le tableau 4 pour les eaux usées brutes et le tableau 5 pour les eaux usées traitées.

Volume de l'échantillon	essai 1	essai 2	essai 3
Inoculation directe (10 ml)	200 (100 - 1 100)	800 (300 - 2 400)	200 (100 - 1 100)
5 l	5,75 (2,25 - 21,5)	325 (125 - 975)	20 (7,5 - 62,5)
10 l	4,25 (1,75 - 11,5)	75 (25 - 300)	75 (25 - 325)
20 l	17,5 (7,5 - 52,5)	275 (100 - 750)	12,5 (5 - 42,5)

TABLEAU 4 : Virus indigènes (NPPUC/1) isolés des eaux usées brutes après concentration d'échantillons de volumes différents sur poudre de verre et inoculation directe
() : intervalle de confiance à 95 % de la méthode de numération.

En ce qui concerne les trois essais effectués sur les eaux usées brutes (Tableau 4), les concentrations à partir d'échantillons de 20 litres donnent des résultats supérieurs dans l'essai 1 (mais la différence est non significative). Par ailleurs, l'inoculation directe de dix millilitres d'eaux usées brutes permet d'isoler des virus à des concentrations toujours supérieures à la concentration (dix fois plus pour l'essai 1, deux fois plus pour l'essai 2, trois fois plus pour l'essai 3) ; mais du fait de l'utilisation d'un titrage par la méthode du N.P.P., la différence n'est significative que pour l'essai 1.

Volume de l'échantillon	essai 1	essai 2	essai 3
Inoculation directe de 10 ml	0	0	0
5 l	0	1,75 (0,5 - 5,2)	2,75 (1 - 7,2)
10 l	0	1 (0,2 - 4,2)	0
20 l	0,5 (0,2 - 2,7)	0	0,5 (0,2 - 2,7)

TABLEAU 5 : Virus indigènes (NPPCU/1) isolés des eaux usées traitées après concentration d'échantillons de volumes différents sur poudre de verre et inoculation directe
 () : intervalle de confiance à 95 % de la méthode de numération.

En ce qui concerne les eaux traitées (Tableau 5), l'inoculation directe de 10 millilitres n'a pas permis d'isoler de virus. Ceux-ci ne sont mis en évidence qu'après concentration de 20 litres (essai 1), de 5 ou 10 litres (essai 2), de 5 ou 20 litres (essai 3). Lorsque des virus ont été retrouvés, les différences entre les titres ne sont pas significatives. Enfin, d'une manière surprenante, les analyses d'échantillons de 20 litres (essai 2) ou de 10 litres (essai 3) se sont révélées négatives alors que l'analyse de 5 litres d'eau était positive. Ces résultats nous portent à choisir des volumes inférieurs à 20 l pour la recherche des virus dans les eaux usées brutes et traitées. Pour certains essais, nous avons travaillé avec des volumes de 10 l. Cependant pour l'étude des flux de virus sur 24 h dans les eaux usées de Nancy, nous avons travaillé avec des échantillons de 20 l dans un souci d'homogénéité des résultats sur le plan national.

3.1.4. Etude de la perte en poudre de verre

Pour évaluer la perte en poudre de verre pouvant survenir lors de l'étape de concentration, 23 l d'eau déminéralisée ont été fil-

trés au travers de 150 g de poudre de verre à la vitesse de 100 litres par heure. A la sortie de l'ampoule, l'eau a été collectée dans 40 flacons de 500 ml. Sur chacun des flacons a été pratiquée une mesure des matières en suspension selon la méthode décrite en 2.8.4. En fin de concentration, il a été volontairement provoqué le passage de bulles d'air dans l'ampoule, ce passage d'air devant entraîner une perte plus importante de poudre de verre.

Les résultats sont présentés sur la figure suivante.

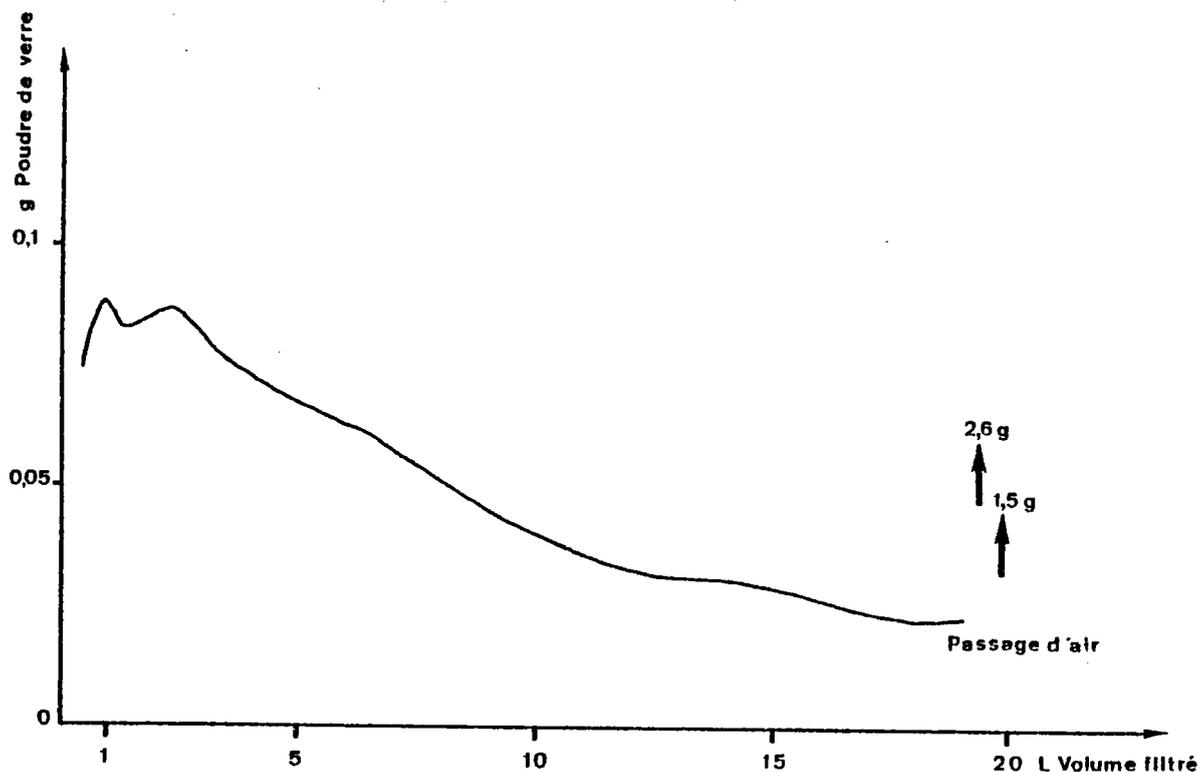


FIGURE 5 : Perte de poudre de verre en fonction du volume filtré au cours de la concentration virale

L'étude de la perte de poudre de verre au cours de la filtration dynamique des échantillons (débit 100 l/h) permet de montrer (Figure 5) une perte relativement importante en début de filtration (0,78 g pour 5 litres). Au cours du temps, le filtre dynamique semble

s'équilibrer tel que la perte de poudre de verre diminue (0,86 g pour les 10 litres suivants). Enfin, lors de l'arrêt de la filtration ou lors d'une déstabilisation accidentelle du lit de poudre de verre par passage indésirable de bulles d'air (schématisé par les flèches noires sur la Figure 5), il y a entraînement important de poudre de verre (1,8 à 2,6 g).

3.1.5. Etude de l'élution des virus de la poudre de verre

3.1.5.1. Cas particulier d'élution

Lors de concentration d'eaux usées brutes extrêmement chargées en MEST, l'étape d'élution peut être rendue difficile. En effet, les MEST décantées au-dessus du lit de poudre de verre forment une boue colmatant la colonne de poudre de verre. Avant l'étape d'élution, il a été tenté d'injecter le tampon d'élution au bas de la colonne comme l'eau à concentrer. A l'aide d'une pompe, le mélange poudre de verre - tampon d'élution est assuré par barbotage pendant 3 minutes. Les MEST sont ainsi dispersées dans le lit de poudre de verre et ne colmatent plus l'étape d'élution.

Pour comparer cette méthode d'élution à celle classique décrite précédemment en 2.3., nous avons concentré deux échantillons, homogénéisés, de 20 litres d'eaux usées brutes, sur 150 g de poudre de verre et au débit de 100 litres par heure.

La première ampoule a été éluee par élution directe classique (méthode décrite en 2.3.) et une fraction de 35 ml a été récupérée. La seconde ampoule a été éluee par injection de tampon glycine à la base de la colonne et 4 fractions successives de 35 ml ont été récupérées. Les liquides d'élution ont été titrés par la méthode du N.P.P. Les résultats sont présentés sur le tableau 6.

Elution "normale" descendante	Elution avec agitation par barbotage d'air			
	Fraction 1	Fraction 2	Fraction 3	Fraction 4
325 (125 - 975)	35 (15 - 87,5)	42,5 (17,5 - 115)	325 (125 - 975)	125 (50 - 425)

TABLEAU 6 : Virus indigènes (NPPUC/1) isolés des eaux usées brutes après concentration sur poudre de verre et élution des virus par deux techniques.
() : intervalle de confiance à 95 % de la méthode de numération

L'élution "normale" permet, dans ce cas, de récupérer 325 NPPUC de virus indigènes comparativement à la seconde technique d'élution pour laquelle les titres des fractions récupérées présentent une grande hétérogénéité. Dans cette technique, le mélange des quatre fractions (4 fois 35 ml) permettrait de récupérer 527 NPPUC, mais augmenterait considérablement le volume à inoculer aux cultures cellulaires. De plus, le titre maximal est observé dans la fraction 3.

Une étude plus approfondie de la technique d'élution normale a alors été réalisée pour montrer la répartition des virus élués dans la colonne du liquide d'élution.

3.1.5.2. Etude de la répartition de la population virale dans les fractions éluées.

Deux échantillons de 20 litres d'eaux usées brutes ont été concentrés sur 150 g de poudre de verre, à la vitesse de passage de 100 litres par heure. Lors de l'étape d'élution, trois fractions successives de 35 ml ont été récupérées. Après traitement, les liquides d'élution ont été titrés par la méthode des plages.

Les résultats sont présentés sur le tableau 7.

	Essai 1	Essai 2
Fraction 1 UFP / 1	17,5 \pm 8,7 (63,6 %)	113 \pm 14,3 (57,6 %)
Fraction 2 UFP / 1	8 \pm 8,3 (29 %)	52 \pm 14,3 (26,5 %)
Fraction 3 UFP / 1	2 \pm 3,3 (7,3 %)	31 \pm 17,2 (15,8 %)

TABLEAU 7 : Titre viral de trois fractions successives de 35 ml de liquide d'éluion (après concentration de l'échantillon de 20 litres d'eaux usées brutes)
(\pm : intervalle de confiance à 95 % de la méthode de numération)

Dans les deux essais, les populations virales entraînées par le liquide d'éluion diminuent de la fraction 1 à la fraction 3. Cependant, la fraction 1 ne contient que 57 à 63 % des virus indigènes récupérés en totalité.

3.1.6. Etude du rendement de la méthode de concentration des virus sur poudre de verre

Afin d'étudier le rendement de cette méthode de concentration des virus pour des eaux usées brutes et traitées, deux techniques ont été mises en oeuvre :

- d'une part, une quantité connue de virus poliomyélitique a été ajoutée à des échantillons d'eaux usées brutes et traitées,
- d'autre part, une technique d'épuisement, c'est à dire un même échantillon d'eaux usées brutes a été concentré successivement plusieurs fois de suite.

3.1.6.1. Etude du rendement de la méthode de concentration des virus sur poudre de verre avec ajout de virus poliomyélitique.

Pour cette expérimentation, 220 litres d'eaux usées brutes ont été homogénéisés en cuve pendant trente minutes. Cinquante millilitres d'eaux usées brutes ont été alors prélevés, et après avoir subi les traitements de décontamination décrits en 2.4., dix millilitres ont été titrés par la méthode des plages. Puis un millilitre du stock de virus poliomyélitique souche Sabin, soit $1,21.10^7$ virus, préalablement dilué dans 500 ml d'eau du robinet stérile, a été ajouté aux 220 litres d'eaux usées brutes. L'agitation a été maintenue à nouveau 30 minutes. Enfin, à partir de ce volume d'eaux usées, sept échantillons de 22 litres ont été répartis en bidons. Avant la concentration de ces échantillons, 50 millilitres ont été prélevés pour le titrage des virus poliomyélitiques ajoutés. Après avoir subi un traitement de décontamination décrit en 2.4., ces prélèvements ont été dilués à 10^{-4} et titrés par la méthode des plages.

Les sept échantillons de 22 litres ont été concentrés sur 150 g de poudre de verre, et au débit de 100 litres par heure. Les liquides d'élution ont subi les traitements décrits en 2.4. et ont été numérés par la méthode des plages après dilution à 10^{-2} .

Une expérimentation identique a été effectuée avec de l'eau usée traitée. La quantité de virus poliomyélitique souche Sabin ajoutée aux 220 litres d'eau traitée a été de $3,91.10^6$.

Le rapport entre la quantité de virus retrouvée par concentration et la quantité de virus mise dans les eaux a permis d'obtenir le rendement des concentrations.

Les résultats des études de rendement de la méthode de concentration sur poudre de verre par ajout de virus sont présentés dans le tableau 8 pour les essais réalisés avec l'eau usée brute, et dans le tableau 9 pour les essais réalisés avec l'eau usée traitée.

Essai	Virus indigène (inoculation directe de 10 ml UFP / 1	Virus ajoutés UFP/1	virus retrouvés par inoculation directe UFP/1	Volume concentré (1)	Virus retrouvés (concentration) UFP/1	Rendement (%) par rapport au virus ajoutés / virus retrouvés par inoculation directe	
1	0	$5,5 \cdot 10^4$	$1,38 \cdot 10^4$	22	$1,6 \cdot 10^3$	2,9	11,6
2	"	"	$2,26 \cdot 10^4$	"	$1,52 \cdot 10^3$	2,7	6,7
3	"	"	$2,1 \cdot 10^4$	"	$0,72 \cdot 10^3$	1,3	3,4
4	"	"	$2,7 \cdot 10^4$	"	$2,22 \cdot 10^3$	4	8,2
5	"	"	$3,1 \cdot 10^4$	"	$1,1 \cdot 10^3$	2	3,5
6	"	"	$2,26 \cdot 10^4$	"	$1,80 \cdot 10^3$	3,3	7,9
7	"	"	$1,57 \cdot 10^4$	"	$1,85 \cdot 10^3$	3,3	11,8

$\bar{M} =$ 2,8 7,6

TABLEAU 8 : Détermination du rendement de la méthode de concentration sur poudre de verre au cours de 7 essais réalisés avec des virus ajoutés à l'eau usée brute.

Essai	Virus indigène (inoculation directe de 23 ml UFP / l	Virus ajoutés UFP/l	Virus retrouvés par inoculation directe UFP/1	Volume concentré (1)	Virus retrouvés (concentration) UFP/1	Rendement (%) par rapport au Virus ajoutés Virus retrouvés par inoculation directe	
1	74	$1,78.10^4$	$0,24.10^3$	22	$1,95.10^2$	1	79
2	"	"	$1,95.10^3$	"	$1,36.10^2$	0,7	6,9
3	"	"	$1,23.10^3$	"	$3,66.10^2$	2	29,7
4	"	"	$0,24.10^3$	"	$2,7 .10^2$	1,5	110
5	"	"	$0,48.10^3$	"	$3,5 .10^2$	1,9	72
6	"	"	$0,97.10^3$	"	$2,75.10^2$	1,5	28
7	"	"	$0,41.10^3$	"	$2,9 .10^2$	1,6	59,6

$\bar{M} =$ 1,45 54,8

TABLEAU 9 : Détermination du rendement de la méthode de concentration sur poudre de verre au cours de 7 essais réalisés avec des virus ajoutés à l'eau usée traitée.

Dans les sept essais réalisés avec l'eau usée brute (Tableau 8), l'inoculation directe de 10 ml d'eau usée n'a pas permis la mise en évidence d'unités formant plaque. Sur la quantité de virus ajoutées ($5,5 \cdot 10^4$ UFP/litre d'eau usée), il n'en est retrouvé que deux fois moins environ sur les sept essais, de $1,38 \cdot 10^4$ à $3,1 \cdot 10^4$ UFP/litre. Pour sept essais de concentration de 22 litres d'eau usée, il a été retrouvé seulement de $0,72 \cdot 10^3$ à $1,85 \cdot 10^3$ UFP/litre, soit un rendement moyen de 2,8 % par rapport à la quantité de virus ajoutée, et de 7,6 % par rapport à la quantité de virus évaluée par inoculation directe avant concentration.

Les résultats des essais de rendement effectués sur l'eau usée traitée en présence de virus ajoutés (Tableau 9) peuvent être lus de la même façon.

L'inoculation directe de l'eau usée traitée (23 ml) a permis de mettre en évidence 74 UFP/litre. Une quantité 200 fois plus importante de virus a été ajoutée : $1,78 \cdot 10^4$ UFP/litre. Seuls $0,24 \cdot 10^3$ UFP/litre à $1,95 \cdot 10^3$ UFP/litre ont été retrouvés par inoculation directe, soit une disparition d'un facteur allant de 10 à 75 de ces virus ajoutés.

Après concentration de 22 litres d'eau usée traitée, la quantité de virus récupérée a varié de $1,36 \cdot 10^2$ à $3,66 \cdot 10^2$ UFP/litre. Le rendement de la méthode de concentration a été en moyenne pour les sept essais de 1,45 % par rapport à la quantité de virus ajoutée.

Ces mêmes rendements calculés à partir de la quantité de virus évaluée par inoculation directe ont donné des résultats plus élevés de 6,9 à 79 %, soit 54,8 % en moyenne.

3.1.6.2. Etude du rendement de la méthode de concentration par une méthode d'épuisement.

Dix litres d'eaux usées brutes ont été concentrés (cf 1.4.) sur 150 g de poudre de verre au débit de 100 litres par heure. En sortie d'ampoule, les eaux usées ont été recueillies dans un bidon, ainsi que les eaux restant dans l'ampoule après décantation de la poudre de verre. Sur ce nouvel échantillon d'eaux usées, une deuxième concentration a été effectuée dans les mêmes conditions que la première.

Lors d'un premier essai, trois concentrations successives ont ainsi été réalisées, et dans un deuxième et troisième essai, cinq concentrations successives.

Les liquides d'éluion obtenus ont subi les traitements décrits en 2.4. et ont été titrés par la méthode des plages.

Pour le calcul du rendement à partir de ces résultats, nous avons appliqué la méthode démontrée ci-après.

Nous avons supposé en premier lieu que le rendement de chaque concentration était identique et qu'aucune inactivation importante des virus n'est survenue. La quantité initiale de virus présents dans l'échantillon de départ a été notée X et la quantité de virus retrouvée après la concentration de rang i a été notée xi.

Le rendement r, pour une concentration donnée, s'exprime par 1, le quotient du nombre de virus retrouvés et du nombre de virus existant initialement dans l'échantillon

$$r = \frac{x_1}{X} \quad (1) \quad \text{d'où } x_1 = rX \quad (2)$$

pour la seconde concentration :

$$r = \frac{x_2}{X-x_1} \quad (3) \quad \text{d'où } x_2 = r(X-x_1) \quad \text{d'après (2)}$$

$$x_2 = rX(1-r) \quad (4)$$

pour la troisième concentration :

$$r = \frac{x_3}{X-x_1-x_2} \quad (5) \quad x_3 = r(X-x_1-x_2) \quad (6)$$

$$x_3 = r(X-rX-rX+r2X) \quad \text{d'après (2) et (4)}$$

$$x_3 = rX(1-r)^2$$

Nous pouvons donc en déduire l'équation générale :

$$x_n = rX(1-r)^{n-1}$$

Cette équation peut s'exprimer sous forme logarithmique :

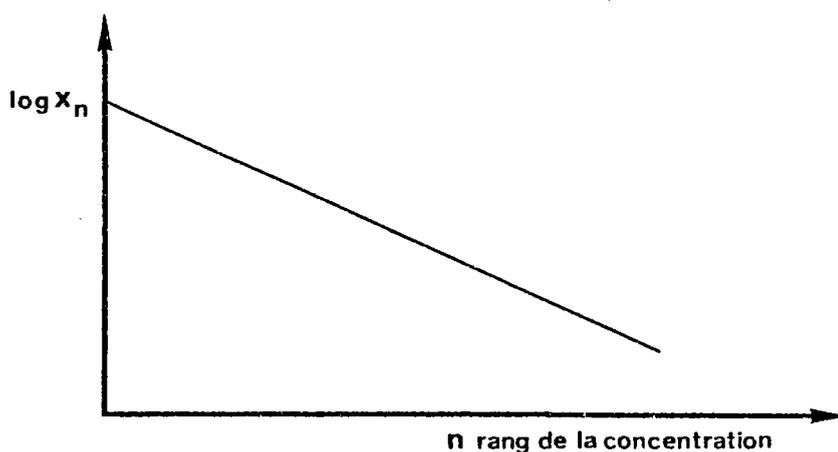
$$\log x_n = \log rX + (n-1) \log (1-r)$$

$$= \log rX + n \log (1-r) - \log (1-r)$$

$$= \log \frac{rX}{(1-r)} + n \log (1-r)$$

$$\log x_n = \log \frac{rX}{(1-r)} + n \log (1-r)$$

Nous obtenons donc une équation de la forme $y = ax+b$, qui, représentée en coordonnée logarithmique pour x_n , et coordonnée normale pour le rang de la concentration est une droite :



En coordonnées semi-logarithmiques, la pente de la droite est $\log(1-r)$ et l'ordonnée à l'origine $\log \frac{rX}{1-r}$.

Les résultats obtenus après concentrations successives ont subi les transformations mathématiques suivantes :

- expression des titres viraux en logarithme,
- calcul de la droite de régression entre le titre viral (en log) et le rang de la concentration,
- à partir des coordonnées de la droite de régression, pente et ordonnée à l'origine, le rendement et la quantité initiale de virus pouvant être concentrée sur poudre de verre ont été obtenus.

Les résultats des trois essais de concentrations successives de 10 litres d'eaux usées brutes sont présentés dans le tableau 10. La reconcentration des eaux usées après une première concentration a permis de retrouver des particules virales dans tous les cas, même jusqu'à cinq concentrations successives. Le nombre de particules virales (virus indigènes retrouvés) en fonction du rang des concentrations successives, surtout pour le 2ème et le 3ème essai varient selon la forme d'une fonction $y = 1/x$, et tendent asymptotiquement vers zéro. Les trois résultats du premier essai sont insuffisants pour confirmer cette tendance. Lors du troisième essai, un palier est observé lors des trois premières concentrations : 4,75 ; 4,25 et 4,75 UFP par litre sont retrouvés pour la première, la deuxième

et la troisième concentration successive. Un phénomène de saturation des sites d'adsorption de la poudre de verre est à mettre en cause pour les trois premières concentrations.

La représentation graphique de ces résultats en coordonnées logarithmiques pour le nombre de particules virales retrouvées à chaque concentration sur la figure 6 révèle une variation linéaire de ces titres viraux selon le rang de la concentration. Les calculs de régression semi-logarithmique effectués sur ces résultats sont présentés sur le tableau 11. Les coefficients de corrélation entre ces résultats sont de - 0,985 ; - 0,98 et - 0,87 pour les premier, deuxième et troisième essais respectivement ; ces coefficients de corrélation sont significatifs au risque de 5 %. Dans ces conditions, l'application de la méthode de calcul du rendement exposée précédemment est possible. Les équations des droites de régression sont présentées d'une part en coordonnée logarithmique pour les calculs de rendements et d'autre part, en coordonnées arithmétiques pour permettre la représentation exacte de ces droites sur papier semi-logarithmique.

Calcul du rendement :

$$\log x_n = \log \frac{rX}{1-r} + n \log (1-r)$$

sous cette forme, nous avons : $\log (1-r)$ = pente de la droite

$$\frac{rX}{1-r} = \text{ordonnée à l'origine}$$

$$\text{1er essai : } \log (1-r) = - 0,096$$

$$\log \frac{1}{(1-r)} = 0,096$$

$$\frac{1}{(1-r)} = 1,24$$

$$1-r = \frac{1}{1,24} = 0,80$$

$$1-r = 0,80$$

$$-r = -1 + 0,80$$

$$r = 0,20$$

$r = 20 \%$

La quantité initiale de virus présents dans l'échantillon de départ (X) peut être déduite :

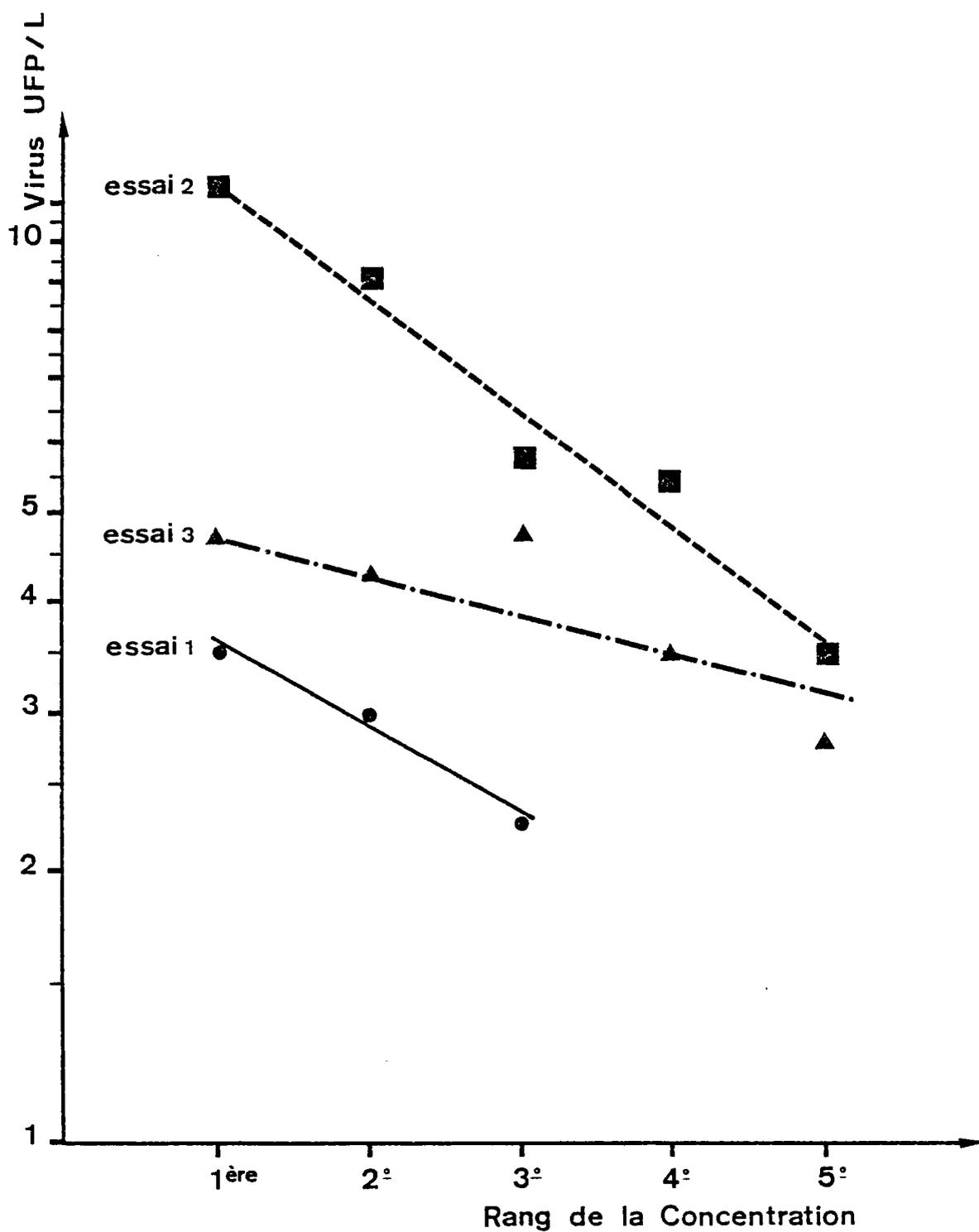


FIGURE 6 : Evaluation du rendement de la méthode de concentration sur poudre de verre par une technique d'épuisement : représentation graphique des droites de régression des résultats des essais avec l'eau usée brute.

	1er essai	2ème essai	3ème essai
Concentrations sucessives	UFP/l	UFP/l	UFP/l
1ère	3,5 \pm 3,2	11,5 \pm 5	4,75 \pm 2,34
2ème	3 \pm 2,1	9,26 \pm 3,5	4,25 \pm 1,57
3ème	2,25 \pm 1,8	5,75 \pm 2	4,75 \pm 2,34
4ème		5,5 \pm 2,9	3,5 \pm 1,71
5ème		3,5 \pm 2,25	2,75 \pm 1,59

\pm : intervalle de confiance de 95 % de la numération

TABLEAU 10 : Evaluation du rendement de la méthode de concentration sur poudre de verre par une technique dite d'épuisement avec des échantillons de 10 litres d'eaux usées brutes.

	1er essai	2ème essai	3ème essai
Concentrations successives	3	5	5
Coefficient de corrélation	- 0,985	- 0,98	- 0,87
Equation de la droite de régression (coordonnées logarithmiques)	$y = - 0,096 x + 0,65$	$y = - 0,126 x + 1,19$	$y = - 0,0558 x + 0,76$
Equation de la droite de régression (coordonnées arithmétiques)	$y = - 1,24 x + 4,46$	$y = - 1,33 x + 15,48$	$y = - 1,137 x + 5,75$

TABLEAU 11 : Coefficient de corrélation et équation des droites de régression (en coordonnées logarithmiques et arithmétiques) pour les trois essais de concentrations successives.

$$\log \frac{rX}{1-r} = 0,65$$

$$\frac{rX}{1-r} = 4,46$$

$$X = 17,84 \text{ UFP/l}$$

2ème essai $r = 25 \%$ $X = 46,4 \text{ UFP/l}$

3ème essai $r = 12 \%$ $X = 42,2 \text{ UFP/l}$

Pour le premier, deuxième et troisième essai, les rendements de la méthode de concentration ont été évalués respectivement à 20 %, 25 % et 12 %.

3.1.7. Etude de la reproductibilité de la méthode de concentration sur poudre de verre

Deux expérimentations ont été effectuées pour cette étude.

D'une part, 200 litres d'eaux usées brutes ont été homogénéisés en cuve pendant 30 minutes, puis 1 millilitre du stock de virus poliomyélitique souche Sabin, soit $1,2 \cdot 10^7$ virus, préalablement dilué dans 500 millilitres d'eau du robinet stérile, a été ajouté aux 200 litres d'eaux usées brutes. L'agitation a été maintenue à nouveau 30 minutes et 7 échantillons de 22 litres ont été prélevés et répartis en bidon. Les 7 échantillons ont été concentrés sur 150 g de poudre de verre et à 100 litres par heure, et les liquides d'élution ont été décontaminés selon le protocole décrit en 2.4. et titrés par la méthode des plages après dilution à 10^{-2} .

D'autre part, 60 litres d'eaux usées brutes ont été homogénéisés en cuve pendant 30 minutes et cinq échantillons de 10 litres ont été prélevés et répartis en bidon. Ces cinq échantillons ont été concentrés sur 150 g de poudre de verre à 100 litres par heure et les liquides d'élution ont été traités selon le protocole décrit en 2.4. et titrés par la méthode du NPP.

Les résultats des deux essais effectués avec des échantillons d'eaux usées brutes homogénéisés sont présentés dans le tableau 12.

Fractions concentrées	Eaux usées brutes + ajout de virus poliomyélitique UFP/1 Essai 1	Eaux usées brutes NPPUC/1 Essai 2
Fraction 1	$1,7 \cdot 10^3$	15
Fraction 2	$6,2 \cdot 10^3$	55
Fraction 3	$5,5 \cdot 10^3$	35
Fraction 4	$6,7 \cdot 10^3$	25
Fraction 5	$5 \cdot 10^3$	25
Fraction 6	$3,2 \cdot 10^3$	
Fraction 7	$4,3 \cdot 10^3$	
Moyenne	$4,65 \cdot 10^3$	31
Ecart type	$1,75 \cdot 10^3$	15,16

TABLEAU 12 : Titres viraux (UFP/1 et NPPUC/1) obtenus pour deux échantillons d'eaux usées brutes après concentration sur poudre de verre de 7 fractions de 22 litres (1er essai) et de 5 fractions de 10 litres (2ème essai) issues de ces échantillons homogénéisés.

Dans le premier essai, avec ajout de virus poliomyélitique, les titres viraux des fractions varient de $1,7 \cdot 10^3$ UFP/1 à $6,7 \cdot 10^3$ UFP/litre, soit un facteur de 3,9 entre ces deux résultats.

La moyenne des titrages de ces fractions est de $4,65 \cdot 10^3$ UFP/1, avec pour écart-type $1,75 \cdot 10^3$, ce qui représente en valeur relative un écart de 37 %.

Les résultats du second essai effectué sur virus indigènes seuls et avec des fractions de 10 litres sont voisins ; ils varient de 15 à 55 NPPUC/1, soit un facteur de 3,6 entre ces deux résultats.

3.2. Optimisation de la quantification des virus. Expérimentation et résultats

3.2.1. Essais de détoxification des liquides d'élution

Après concentration des eaux usées sur poudre de verre et élution des virus adsorbés, l'analyse virologique des liquides d'élution se heurte parfois à des problèmes de toxicité, quelque soit la méthode de numération choisie. En méthode liquide, le deuxième passage permet d'obtenir un résultat, mais pour la méthode des plages, un liquide d'élution toxique entraîne la mort du tapis en 18 heures ou quelques jours. La dilution des liquides d'élution au 1/2, 1/5 ou 1/10 atténue leur toxicité, mais entraîne également la perte de l'intérêt de la concentration, ou la nécessité d'augmenter le nombre de flacons à inoculer.

Pour ne pas être désarmés devant cette éventualité, plusieurs méthodes de détoxification des liquides d'élution ont été testées et comparées entre elles :

- ajout de sérum foetal de veau
- centrifugation
- filtration sur membrane
- extraction des liquides d'élution au chloroforme
- passage sur résine Amberlite X AD2.

Pour apprécier l'efficacité de ces traitements et évaluer la baisse de titre viral que pourraient occasionner ces traitements, nous avons effectué ces essais avec des virus indigènes et des virus ajoutés. De plus, ces essais ont été conduits pour la plupart en parallèle à partir de liquide d'élution stock, et l'ensemble des résultats a donc été regroupé dans un même paragraphe.

Enfin, avant les essais relatifs à ces méthodes, une étude physico-chimique et bactériologique des liquides d'élution a été entreprise.

3.2.1.1. Etude de la composition physico-chimique et bactériologique des liquides d'élution.

A partir de 60 litres d'eaux usées brutes, homogénéisés par deux pompes, un échantillon d'un litre est prélevé pour les analyses

physico-chimiques et bactériologiques de l'eau usée brute, et des échantillons de 20 litres, 10 litres et 5 litres ont été répartis dans les bidons de 20 litres. Ces échantillons ont été concentrés sur 150 g de poudre de verre à la vitesse de 100 litres par heure. La poudre de verre a été éluée avec un tampon glycine à pH 11,5 selon le protocole décrit en 2.3. et deux premières fractions de 35 ml ont été récupérées et neutralisées à pH 7,2.

Une manipulation identique a été effectuée avec un échantillon témoin de 20 litres d'eau déminéralisée. Les fractions des liquides d'éluotion ont été soumises à la recherche des coliformes thermo-résistants selon le protocole décrit en 2.9., et à l'analyse physico-chimique pour les dosages des éléments suivants : potassium, sodium, calcium, fer, manganèse, aluminium, chrome hexavalent, plomb, cuivre, zinc, matières organiques, selon les protocoles décrits en 2.8.

3.2.1.2. Essai de détoxication par ajout de sérum foetal de veau au liquide d'éluotion.

Après concentration de 20 litres d'eaux usées brutes, les cinquante premiers millilitres de liquide d'éluotion ont été recueillis et ont subi les traitements de décontamination décrits en 2.4.

Ce liquide d'éluotion a été ensuite réparti en quatre fractions de 12 ml. La première et la deuxième fractions ont reçu 0,6 ml de sérum foetal de veau (5 %) et l'une des deux 0,25 ml d'une dilution de stock de virus poliomyélitique souche Mahoney. Les deux autres fractions ont reçu 0,6 ml de solution de Earle pour compenser la dilution des deux premières fractions, et l'une des deux 0,25 ml de la même dilution du stock de virus poliomyélitique. Après homogénéisation, chacune de ces fractions a été diluée au 1/2 et au 1/4 par des volumes appropriés de milieu de culture MEM 2 % à double concentration.

3.2.1.3. Essai de détoxication par centrifugation.

Une centrifugation de 10 minutes à 10 000 g à + 4°C a été effectuée sur les liquides d'éluotion décontaminés. Le surnageant,

débarrassé des particules fines et des corps bactériens, a été prélevé avec précaution, et inoculé sur cultures cellulaires par la méthode des plages.

Lors de cinq essais, le culot obtenu a été remis en suspension dans un même volume de milieu de culture MEM 2 % que le surnageant, et titré parallèlement au surnageant par la méthode des plages, cette manipulation devant permettre d'apprécier la perte de particules virales par centrifugation des liquides d'élution.

3.2.1.4. Essai de détoxication par filtration sur membrane.

Comme la centrifugation, cette méthode a été mise en oeuvre pour éliminer des liquides d'élution les particules fines en suspension, et les débris bactériens. Les filtrations ont été effectuées sur membrane Sartorius 0,45 μm de porosité en acétate de cellulose. Ces membranes ont été prétraitées par passage de 50 ml de solution de Earle additionnée de 10 % de sérum de veau. Les filtrats ont été titrés par la méthode des plages.

3.2.1.5. Essai de détoxication par extraction au chloroforme.

Le liquide d'élution est soumis à cinq extractions successives en ampoule à décanter (Sovirel), volume à volume par du chloroforme. Après une minute d'agitation, la phase chloroformique est décantée puis la même quantité de chloroforme a été ajoutée pour une nouvelle extraction. Après la dernière extraction, le chloroforme restant a été éliminé par barbotage d'azote et les liquides d'élution ont été titrés par la méthode des plages.

3.2.1.6. Essai de détoxication par passage sur résine.

La résine Amberlite XAD2 (Rohm and Haas Company) a été choisie pour ses propriétés de concentration de produits organiques à l'état de traces.

Pour 50 ml de liquide d'élution à détoxifier, deux grammes de résine Amberlite XAD2 ont été activés dans 100 ml de méthanol, puis introduits dans une colonne de verre stérile de 1 cm de diamètre et de 15 cm de haut. Après un premier rinçage de la colonne au méthanol, des rinçages successifs ont été effectués avec des dilutions décroissantes de méthanol dans l'eau distillée, jusqu'à de l'eau distillée seule. Puis la résine a été prétraitée par passage de 5 ml de milieu MEM à 2 % de sérum de veau et le liquide d'élution a été passé sur la résine XAD2, puis récupéré dans un flacon stérile. Ces liquides d'élution ont été titrés par la méthode des plages.

Les résultats des analyses physico-chimiques et bactériologiques de l'eau usée brute et du témoin élution, ainsi que les variations de la composition physico-chimique et bactériologique des liquides d'élution (fractions 1 et 2) par rapport à ce témoin sont présentés dans le tableau 13 pour des échantillons filtrés de 5 litres, 10 litres et 20 litres.

Il peut être observé que les ions potassium, sodium, calcium et zinc ne sont pas retenus ou/et élués de la poudre de verre. Par contre, le fer, le manganèse, l'aluminium, le chrome hexavalent, le plomb, le cuivre, les matières organiques et les bactéries (E. coli) sont retenues dans le filtre dynamique après filtration d'eaux usées brute, et entraînés par le tampon d'élution. Le liquide d'élution témoin poudre de verre seule apporte un peu de fer, du plomb et du zinc.

	Eaux usées brutes	Témoin élution Fraction 1	Fraction 1 20 litres	Fraction 1 10 litres	Fraction 1 5 litres	Témoin élution Fraction 2	Fraction 2 20 litres	Fraction 2 10 litres	Fraction 2 5 litres
Potassium mg/l	10,8	14,9	0	0	0	8	0	0	0
Sodium mg/l	43	2200	0	0	0	2200	0	0	0
Calcium mg/l	81	10	0	0	0	10	0	0	0
Fer mg/l	2,26	0,26	+ 8,24	+ 12,84	+ 0,24	0,18	+ 1,32	+ 0,62	+ 0,32
Manganèse mg/l	0,105	0,002	+ 0,103	+ 0,073	+ 0,011	0,002	+ 0,009	+ 0,006	+ 0,006
Aluminium mg/l	0,60	0,088	+ 12,82	+ 10,72	+ 13,62	0,090	+ 2,75	+ 2,11	+ 10,51
Chrome VI mg/l	0,024	0	+ 0,345	+ 0,310	+ 0,062	0	+ 0,040	+ 0,018	+ 0,025
Plomb mg/l	0,008	0,170	+ 0,010	+ 0,030	+ 0,020	0,200	+ 0,055	+ 0,065	+ 0,015
Cuivre mg/l	0,007	0,035	+ 0,205	+ 0,155	+ 0,015	0,017	+ 0,029	+ 0,019	+ 0,018
Zinc mg/l	0	0,850	0	0	0	0,650	0	0	+ 0,17
Matière oxy- dable KMnO ₄ mg/l	30	154	+ 9	+ 2	+ 3	159	0	0	0
E. coli /ml	$9,5 \cdot 10^4$	0	+ $2,5 \cdot 10^6$	+ $9,5 \cdot 10^5$	+ $2,5 \cdot 10^5$	0	+ $4,5 \cdot 10^3$	+ $9,5 \cdot 10^3$	+ $4 \cdot 10^4$

TABLEAU 13 : Résultats des analyses physico-chimiques et bactériologiques d'une eau usée brute et du liquide d'élution témoin, et variations des concentrations des mêmes paramètres dans les fractions d'élution 1 et 2 obtenues après filtration de 5 litres, 10 litres ou 20 litres d'eaux usées.

La comparaison entre fraction 1 et fraction 2 montre que la première est le plus souvent beaucoup plus chargée : soit selon les essais de 1 à 20 fois plus de fer, de 3 à 20 fois plus de chrome, de 1 à 10 fois plus de cuivre, de 10 à 1000 fois plus d'E. coli. Il n'est donc pas étonnant que des effets toxiques apparaissent sur les tapis cellulaires d'autant plus que d'autres composés chimiques (détergents, phénols, hydrocarbures) sont susceptibles de se concentrer également sur la poudre de verre. Par ailleurs, nous avons remarqué que la turbidité des liquides d'élution était fonction du volume filtré. De même que les premières fractions d'élution sont toujours plus "sales" que les suivantes.

Les phénomènes de cytotoxicité souvent observés pour les fractions 1 peuvent a priori être éliminés par divers procédés. Les résultats des titrages virologiques de liquides d'élution "détoxifiés" par plusieurs méthodes sont présentés dans les tableaux 14, 15 et 16.

	Liquide d'élution brut	Liquide d'élution avec 5 % de sérum foetal de veau
non dilué	0,6 \pm 2,6 toxique en 3 jours	0 toxique en 3 jours
dilué au 1/2	8 \pm 9,23	9,2 \pm 9,6
dilué au 1/4	6,5 \pm 4,8	2,6 \pm 1,3

TABLEAU 14 : Titre viral (UFP/ml virus indigènes) des fractions d'un liquide d'élution toxique additionné ou non de 5 % de sérum foetal de veau.

(\pm) : intervalle de confiance à 95 % de la numération.

Tout d'abord, l'ajout de sérum foetal de veau dans la proportion de 5 % (Tableau 14) n'a pas atténué la cytotoxicité de la fraction du liquide d'élution inoculé sans aucune dilution, par rapport

à une fraction du même liquide d'élution sans ajout de sérum foetal de veau ; dans les deux cas, les tapis cellulaires ont été totalement détruits en trois jours. Par contre, la dilution au 1/2 des liquides d'élution ne s'est pas révélée toxique et les titres viraux des fractions sans et avec ajout de sérum foetal de veau sont respectivement de 8 UFP/ml et de 9,2 UFP/ml, mais sans différence significative entre ces résultats. Ces mêmes fractions diluées au 1/4 ont été également non toxiques, mais leur titre a été plus faible : 6,5 UFP/ml et 2,6 UFP/ml.

Les résultats concernant les autres traitements des liquides d'élution mis en oeuvre pour réduire leur cytotoxicité ont été rassemblés dans les tableaux 15 et 16.

Lorsque le liquide d'élution a été inoculé sans traitement et sans dilution sur culture cellulaire, un effet cytotoxique est survenu en 24 heures, interdisant toute numération. Les divers traitements appliqués ont permis de réduire cet effet cytotoxique, évalué ici en proportion de surface cellulaire détruite : 30 % pour la centrifugation et la filtration sur membrane, 50 % pour le passage sur résine et 10 % pour le traitement au chloroforme. Dans ce dernier cas, la numération des plages a pu être effectuée et a révélé 3,75 UFP/ml de liquide d'élution, ce qui est ici le maximum. Les titres viraux des fractions de liquide d'élution traitées par les autres méthodes sont plus faibles : 0,8 UFP/ml après passage sur résine, 0,25 UFP/ml après filtration sur membrane et 1,5 UFP/ml après centrifugation. Par ailleurs, la dilution au 1/5 et 1/10 de ces fractions traitées ou non comme précédemment permet de numérer une quantité plus importante de virus dans le cas de la fraction témoin non traitée (8 UFP/ml au 1/10), de la fraction centrifugée (11 UFP/ml au 1/10), de la fraction passée sur résine (10 UFP/ml) ; pour la fraction traitée par le chloroforme, seule la dilution au 1/5 donne un résultat supérieur (7 UFP/ml) aux autres fractions à cette même dilution. En effet, dans ce dernier cas, la dilution au 1/10 a donné un résultat assez faible. Quant à la fraction traitée par filtration sur membrane, aucune particule virale n'est apparue aux dilutions 1/5 et 1/10.

Traitement de détoxification Echantillon liquide d'élution	Sans traitement	Centrifugation	Filtration sur membrane	Résine	Chloroforme
Non dilué	Toxique 100 % en 24 h	1,5 ± 1,5 Toxicité : 30 %	0,25 ± 0,30 Toxicité : 30 %	0,8 ± 0,85 Toxicité : 50 %	3,75 ± 1,16 Toxicité : 10 %
Dilué au 1/5	7 ± 10,3 Toxicité : 70 %*	6 ± 3	0	5 ± 5,8	7 ± 7,1
Dilué au 1/10	8 ± 8,5	11 ± 8,3	0	10 ± 9,7	2 ± 3,2

TABLEAU 15 : Résultats (UFP/ml) de la quantité de virus indigènes retrouvés dans les fractions d'un liquide d'élution toxique détoxifiées par différents traitements.

(±) : intervalle de confiance à 95 % de la méthode de numération.

% : pourcentage de surface cellulaire détruite après 24 heures.

* : % toxicité après 4 jours.

Pour confirmer ces résultats, il a été effectué, d'une part, un essai identique pour un liquide d'élution peu toxique, avec et sans ajout de virus de laboratoire, et d'autre part, une analyse virologique des culots de centrifugation, des extraits chloroformiques et des éluats de résine.

Les résultats de ce deuxième essai de détoxication mené en double avec un ajout de virus poliomyélitique souche Mahoney sont présentés dans le tableau 16. Ce liquide d'élution étant peu toxique, il a été possible de numérer les plages sans avoir recours à des dilutions importantes. Dans l'essai avec virus indigènes seuls, le traitement au chloroforme et la centrifugation permettent d'obtenir pour ces fractions un titre viral environ deux fois supérieur à la fraction "témoin" non traitée (14,6 UFP/ml et 13,4 UFP/ml respectivement contre 7,4 UFP/ml pour la fraction témoin non traitée). Les titres viraux des fractions traitées par filtration sur membrane et par passage sur résine sont plus faibles que ceux obtenus par les traitements précédents (9,6 UFP/ml et 8,8 UFP/ml) ; mais ils restent cependant supérieurs au titre viral de la fraction "témoin" sans traitement: 7,4 UFP/ml. La dilution au 1/2 des fractions traitées par centrifugation et par le chloroforme a permis d'obtenir des titres viraux identiques aux mêmes fractions non diluées à 1 UFP/ml près, mais pour la fraction traitée par passage sur résine, le titre viral se situe à une valeur équivalente (12 UFP/ml). Au contraire, à cette dilution au 1/2, les titres viraux de la fraction non traitée et de la fraction traitée par filtration sont plus faibles que les titres obtenus sans dilution : 5,6 UFP/ml et 7,2 UFP/ml contre 7,4 UFP/ml et 9,6 UFP/ml respectivement.

L'ajout d'une quantité connue de virus poliomyélitique à ce liquide d'élution avant de subir ces traitements de détoxication fait apparaître une tendance identique aux résultats obtenus avec les virus indigènes seuls. Le traitement de centrifugation n'a pas modifié le titre viral de cette fraction (39,2 UFP/ml) par rapport au titre viral de la fraction témoin non traitée (39,4 UFP/ml). Le traitement au chloroforme s'est avéré moins intéressant puisque le

Détoxification	Sans traitement	Centrifugation	Filtration	Résine	CHCl ₃	Témoin virus
Liquide d'élution UFP/ml	7,4 ± 4,1	13,4 ± 3	9,6 ± 4,3	8,8 ± 3,3	14,6 ± 4,3	-
Liquide d'élution 1/2 UFP/ml	5,6 ± 3,7	14 ± 7	7,2 ± 5,2	12 ± 3,5	13,6 ± 5,9	-
Liquide d'élution + virus UFP/ml	39,4 ± 7,2	39,2 ± 7,5	22,8 ± 4,7	19 ± 1,2	29,4 ± 8,2	23,8 ± 6,8
Liquide d'élution 1/2 + virus UFP/ml	30,4 ± 6,2	26 ± 17,4	15 ± 3,9	27,6 ± 8,7	32 ± 5,8	11,9 ± 3,4

TABLEAU 16 : Résultats des quantités de virus indigènes et de virus ajoutés (UFP/ml) retrouvés dans les fractions d'un liquide d'élution après différents traitements de détoxification.

titre viral de cette fraction est de 29,4 UFP/ml ; les traitements par filtration sur membrane et par passage sur résine ont donné également des titres viraux légèrement plus faibles, respectivement 22,8 UFP/ml et 19 UFP/ml. Mais la dilution au 1/2, comme précédemment, réhabilite ces traitements, passage sur résine et traitement au chloroforme, par les titres viraux obtenus : 27,6 UFP/ml et 32 UFP/ml.

Le contrôle de l'efficacité de ces traitements de détoxification a été effectué par inoculation des culots de centrifugation, des extraits chloroformiques et des éluats de résine sur culture cellulaire.

Les résultats des analyses virologiques des culots de centrifugation sont présentés sur le tableau 17. Sur cinq essais effectués, deux se sont révélés positifs, mettant ainsi en évidence 9,2 % dans l'essai 1 et 50 % dans l'essai 2 des virus présents dans le liquide d'élution. Dans ce deuxième essai, le titre viral assez faible (0,1 UFP/ml) explique l'importance de ce résultat.

Quant aux extraits chloroformiques et aux éluats de résine, après évaporation des solvants et reprise des extraits obtenus par du milieu de culture MEM 2 %, leur inoculation sur cultures cellulaires a entraîné un effet cytotoxique rapide et total en 24 heures. L'inoculation sur cultures cellulaires des dilutions au 1/5 et au 1/10 de l'extrait chloroformique moins toxique a permis de mettre en évidence, d'une manière surprenante, 19 % et 50 % des virus.

	Essai 1	Essai 2	Essai 3	Essai 4	Essai 5
Virus indigènes retrouvés dans les culots de centrifugation	1,2 \pm 0,7	0,1 \pm 0,23	0	0	0
	9,2 %	50 %	0 %	0 %	0 %

TABLEAU 17 : Virus indigènes (UFP/ml) isolés du culot de centrifugation de cinq fractions de liquides d'élution. Les pourcentages expriment la proportion des virus indigènes présents dans le culot par rapport à ceux présents dans le surnageant et le culot.

3.2.2. Etude de la survie des virus dans les eaux usées

Après le prélèvement des échantillons d'eaux usées et leur retour au laboratoire, il peut s'écouler un temps variable avant leur concentration selon les temps de transport et les facteurs inhérents à l'organisation des laboratoires. Il était donc important de tester la survie des virus dans les eaux usées en fonction du temps.

Pour cela, cinq litres d'eaux usées brutes ont été prélevés et homogénéisés. Un échantillon de 1 litre a été prélevé et placé dans un bécher stérile et maintenu sous agitation constante. Huit fractions aliquotes de 50 ml ont été prélevées en flacons stériles et placées en chambre froide à + 4°C, sauf une fraction constituant le temps T_0 de l'essai. Aux 600 ml d'eaux usées restant, $1,4 \cdot 10^4$ virus poliomyélitiques souche Sabin ont été ajoutés (soit 1 ml du stock) et homogénéisés pendant cinq minutes.

Huit fractions de 50 ml ont été à nouveau prélevées et placées en chambre froide à + 4°C, sauf une fraction constituant le temps T_0 de l'essai.

Les deux fractions " T_0 " ont été neutralisées à pH 7,2 et immédiatement décontaminées selon le protocole décrit en 2.4. La fraction sans ajout de virus a été diluée au 1/2 par ajout de MEM 2 fois concentré et titré par la méthode des plages.

La fraction avec ajout de virus poliomyélitique souche Sabin a été diluée jusqu'à 10^{-3} et titrée par la méthode des plages.

Ces opérations ont été répétées pour les autres fractions à $T_0 + 2$ heures, $T_0 + 4$ heures, $T_0 + 8$ heures, $T_0 + 24$ heures, $T_0 + 48$ heures et $T_0 + 72$ heures. Pour $T_0 + 48$ h et $T_0 + 72$ h, les flacons de culture provenaient d'une trypsination différente de celle ayant fourni les flacons de cellules pour les premières fractions.

Une expérimentation identique a été menée avec un échantillon d'eau usée traitée. La quantité de virus poliomyélitique souche Sabin ajoutée a été dix fois moindre : $4 \cdot 10^3$ virus dans 600 ml d'eau usée traitée. Les fractions avec ajout de virus ont été diluées cette fois jusqu'à 10^{-2} .

Les résultats des essais de survie de virus indigènes et de virus ajoutés dans l'eau usée brute et l'eau usée traitée, stockées à + 4°C sont présentés dans le tableau 18.

Temps		0	2 h	4 h	8 h	24 h	48 h	72 h
Témoins Stock de virus ajouté (UFP/ml) x 10 ⁴		1,42 ± 0,3	-	-	-	1,9 ± 0,5	2,4 ± 0,6	2,8 ± 0,7
Virus ajouté à l'eau usée brute *		23,6	-	-	-	31,6	39,6	46,6
Eau usée brute	Virus indigènes (UFP/ml)	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1	0,2	0
	Virus ajoutés (UFP/ml)	20,2 ± 5,3	9,7 ± 5,3	11 ± 4,8	6,6 ± 2,8	21,8 ± 9	14,9 ± 6,8	12,1 ± 9,9
Virus ajoutés à l'eau usée traitée*		2,36	-	-	-	3,16	3,96	4,66
Eau usée traitée	Virus indigènes (UFP/ml)	0	0	0,1	0,1	0	0,1	0,1
	Virus ajoutés (UFP/ml)	4,4 ± 1,4	2,2 ± 0,7	4,4 ± 0,9	2,2 ± 0,7	2,2 ± 0,7	2,2 ± 0,7	8,8 ± 1,4

(-) : non titré

TABLEAU 18 : Survie des virus indigènes et des virus ajoutés à + 4°C dans une eau usée brute et une eau usée traitée en fonction du temps (en UFP/ml).

* Valeurs calculées

La quantité de virus indigènes présents dans l'eau usée brute et retrouvés par inoculation directe est assez faible : 0,1 à 0,2 UFP/ml entre le temps 0 de l'essai et 48 h. Après 72 h, aucune particule virale n'a été révélée.

L'ajout d'une quantité connue de virus à l'eau usée brute, soit 23,6 UFP/ml d'eau usée, donne une autre image de la survie des virus. Au cours des premières 8 heures de survie, le titre viral dans l'eau usée brute passe de 20,2 UFP/ml au temps 0 à 6,6 UFP/ml à T + 8 h. Mais le titrage à 24 h révèle à nouveau un titre viral élevé de 21,8 UFP/ml et qui, après 72 h, est encore de 12,1 UFP/ml.

Dans l'eau usée traitée, la quantité de virus indigènes présents est encore plus faible que précédemment : 0,1 UFP/ml maximum. A T₀, T + 2 h et T + 24 h, aucune particule virale n'a été décelée par inoculation directe d'eau usée traitée, mais à T + 4 h, T + 48 h et T + 72 h, 0,1 UFP/ml a été dénombrée.

La quantité de virus ajoutée pour l'essai en double a été de 2,3 UFP/ml d'eau usée traitée. Dans les premières 8 heures et après 24, 48 et 72 h, la survie des virus a été sinon égale, supérieure à la quantité de virus ajoutée au départ : respectivement depuis T₀ et jusqu'à T + 72 h, de 4,4 UFP/ml à 8,8 UFP/ml.

Durant cette même période d'expérimentation, le titre viral du stock de virus ajoutés n'a pas subi de baisse : 1,4 UFP/ml au temps 0 et 2,8 UFP/ml après 72 h de conservation à + 4°C.

Dans la limite de nos expérimentations, il n'apparaît donc pas d'inactivation brutale des virus dans les eaux usées brutes et traitées en 72 heures lors de la conservation des échantillons à +4°C.

3.2.3. Etude de la survie des virus dans les liquides d'élu-tion

L'étude de la survie des virus dans les liquides d'élu-tion a été envisagée sous deux aspects, d'une part, avant neutralisation et stockage des liquides d'élu-tion, d'autre part, lors de leur stockage à + 4°C et congelés à - 26°C.

3.2.3.1. Etude de la survie des virus dans les liquides d'élu-tion avant neutralisation et stockage

Un échantillon de 10 litres d'eaux usées brutes a été concentré sur 150 g de poudre de verre à la vitesse de 100 litres par heure.

Lors de l'étape d'élu-tion, 100 ml de liquide d'élu-tion ont été récupérés et répartis en deux fractions de 50 ml. Une des deux fractions a été immédiatement neutralisée à pH 7,2, constituant le témoin. A partir de cet instant T_0 , des prises d'essais de 10 ml ont été prélevées dans les deux fractions, neutralisée et non neutralisée. La prise d'essai de la fraction non neutralisée a été immédiatement neutralisée à pH 7,2.

Des prises d'essais identiques de 10 ml ont été effectuées dans la fraction témoin neutralisée et la fraction non neutralisée, pour des temps de $T_0 + 10$ mn, $T_0 + 20$ mn, $T_0 + 40$ mn et $T_0 + 60$ mn.

Ces prises d'essais ont ensuite été décontaminées selon le protocole décrit en 2.4. et titrées par la méthode des plages.

Les résultats de l'étude de la survie des virus indigènes dans les liquides d'élu-tion avant leur neutralisation sont présentés dans le tableau 19. Pour les prises d'essais non neutralisées, les pH ont été de 10,5 à T_0 et de 10,1 après 60 minutes. Pour les prises d'essais neutralisées, les pH ont varié de 7,2 à 7,4.

Temps en minutes	Liquides d'élu-tion non neutralisés (UFP/ml)	Liquides d'élu-tion immédiatement neutralisés (UFP/ml)
0	pH = 10,50 2 \pm 0,7	pH = 7,20 2,8 \pm 1,3
10	pH = 10,50 3,7 \pm 1,2	pH = 7,20 3,6 \pm 1,3
20	pH = 10,45 2 \pm 0,5	pH = 7,20 1,3 \pm 0,6
40	pH = 10,30 1,4 \pm 0,8	pH = 7,30 2 \pm 0,8
60	pH = 10,10 2,2 \pm 1,1	pH = 7,40 1,8 \pm 0,85

TABLEAU 19 : Survie des virus indigènes (UFP/ml) dans deux fractions d'un liquide d'élu-tion (eau usée brute) : une fraction non neutralisée et une fraction immédiatement neutralisée.

(\pm) : intervalle de confiance à 95 % de la numération.

Le titrage des fractions des liquides d'élution neutralisés en fonction du temps varie peu : 2 UFP/ml à T_0 , 2 UFP/ml à $T_0 + 20$ mn, et 2,2 UFP/ml à $T_0 + 60$ mn. Seul le titre des fractions neutralisées après 10 minutes et 40 minutes s'écarte de part et d'autre de cette valeur : 3,7 UFP/ml après 10 minutes et 1,4 UFP/ml après 40 minutes.

Mais pour les fractions du liquide d'élution immédiatement neutralisées après élution, leur titre varie également au cours du temps : 2,8 UFP/ml au temps 0 ; 3,6 UFP/ml après 10 minutes ; 1,3 UFP/ml après 20 minutes, puis 1,8 UFP/ml après 60 minutes.

Les intervalles de confiance des numérations se retrouvant aussi bien dans l'essai et dans le témoin en fonction du temps qu'entre l'essai et le témoin à un temps donné, il n'est pas possible de conclure à une inactivation des virus indigènes dans le liquide d'élution non neutralisé. Le pH réel des fractions, noté au moment précis de leur prélèvement, a montré une légère variation au cours du temps.

3.2.3.2. Etude de la survie des virus indigènes dans les liquides d'élution stockés à +4°C et - 26°C

Dans la pratique courante des laboratoires de biologie, les échantillons biologiques sont conservés, soit à + 4°C, soit congelés à - 26°C. Lors de deux expérimentations distinctes, ces deux possibilités de stockage des liquides d'élution ont été comparées.

3.2.3.2.1. Etude de la survie des virus indigènes dans les liquides d'élution stockés à +4°C

Cette expérimentation a été effectuée à partir de cinq concentrations d'échantillons différents de 10 litres d'eaux usées brutes à 100 litres par heure et sur 150 g de poudre de verre. Les liquides d'élution ont subi les traitements décrits en 2.4. Chacun de ces liquides d'élution a été réparti en tubes stériles à raison de 10 ml par tube.

Après un premier titrage immédiat par la méthode des plages d'une fraction aliquote de 10 ml, constituant ainsi le temps T_0 de l'expérience, ces liquides d'élution ont été placés en chambre froide à + 4°C. Après une semaine, 5 semaines et 11 semaines de conservation, des fractions aliquotes de 10 ml ont été titrées par la méthode des plages comme précédemment.

Les résultats de la survie des virus indigènes dans les liquides d'élution stockés en chambre froide à +4°C sont présentés dans le tableau 20.

Dans l'essai 1, nous assistons à une baisse de titre de 4,6 UFP/ml à 3,8 UFP/ml, soit 82 % du titre initial retrouvé pour une semaine de conservation à + 4°C. Cependant, les intervalles de confiance des méthodes de numération se recouvrent. Après 5 semaines, puis 11 semaines, seulement 0,2 et 0,6 UFP/ml respectivement ont été retrouvées, soit 13 % du titre initial après 11 semaines. Pour les autres essais (2, 3, 4 et 5), les résultats sont similaires. Après une semaine de conservation, 62 % à 100 % des titres initiaux sont retrouvés dans les fractions conservées à + 4°C, mais après 5 semaines dans les fractions des essais 2, 3 et 5, 0,1 UFP/ml sont décelées et dans l'essai 4, aucune. Les nombres de particules virales étant plus faibles dans ces 4 essais que dans l'essai 1, il n'est pas surprenant qu'aucune unité formant plage n'ait été dénombrée après 11 semaines de conservation à + 4°C. La conservation des liquides d'élution à + 4°C ne peut donc excéder une semaine dans nos conditions expérimentales.

3.2.3.2.2. Etude de la survie des virus indigènes dans les liquides d'élution stockés à - 26°C.

Pour cette expérimentation, trois échantillons différents de 20 litres d'eaux usées brutes ont été concentrés sur 150 g de poudre de verre et à 100 litres par heure. Lors de l'élution, les 55 premiers millilitres ont été récupérés pour chaque concentration et ont subi les traitements de décontamination décrits en 2.6.

Temps	Essai 1	Essai 2	Essai 3	Essai 4	Essai 5
To UFP/ml	4,6 \pm 2	3,7 \pm 1,4	2,3 \pm 0,8	2,2 \pm 1,16	1,4 \pm 0,9
To + 1 semaine UFP/ml	3,8 \pm 1,3	2,3 \pm 1,4	2 \pm 1,28	2,3 \pm 1,2	1,8 \pm 0,77
To + 5 semaines UFP/ml	0,2 \pm 0,3	0,1 \pm 0,23	0,1 \pm 0,23	0	0,1 \pm 0,23
To + 11 semaines UFP/ml	0,6 \pm 1,1	0	0	0	0

TABLEAU 20 : Survie des virus indigènes (UFP/ml) dans les liquides d'éluion stockés à + 4°C.

(\pm) : intervalle de confiance à 95 % de la numération.

Pour chaque liquide d'élution, ces 55 millilitres environ ont été répartis en tubes plastique stériles à raison de 6 ml par tube, soit 9 tubes. Quatre de ces tubes ont été placés au congélateur à $- 26^{\circ}\text{C}$, les cinq autres recevant 6 ml de MEM deux fois concentrés et donc dilués au $1/2^*$. Un de ces tubes dilués a été conservé pour un titrage immédiat par la méthode des plages décrite dans le paragraphe 2.7.2. , constituant ainsi le temps T_0 de l'expérimentation. Les quatre autres tubes dilués ont été placés au congélateur à $- 26^{\circ}\text{C}$. Aux temps $T_0 + 1$ semaine, $T_0 + 2$ semaines, $T_0 + 4$ semaines et $T_0 + 12$ semaines, pour chaque liquide d'élution, un tube non dilué et un tube dilué ont été tirés au hasard et décongelés. Le tube non dilué a alors été dilué par ajout de 6 ml de MEM deux fois concentré; les deux tubes ont été titrés comme précédemment par la méthode des plages et par la méthode du nombre le plus probable.

Une expérimentation identique a été effectuée pour trois liquides d'élution provenant de la concentration de trois échantillons de 20 litres d'eau traitée.

Les résultats de la survie des virus indigènes dans les liquides d'élution stockés à $- 26^{\circ}\text{C}$ sont présentés dans le tableau 21 pour les liquides d'élution provenant de concentration d'eaux usées brutes, et dans le tableau 22 pour ceux provenant de concentration d'eaux usées traitées.

Pour les trois liquides d'élution provenant de concentration d'eaux usées brutes (Tableau 21), après une semaine de congélation, le titre viral est plus élevé dans l'essai 1 et l'essai 3 dilués au moment de la numération. Cette même constatation peut être faite pour les essais 1bis et 3bis dilués avant la congélation.

Il faut attendre quatre semaines de stockage pour voir les titres viraux des liquides d'élution diminuer d'environ deux fois par rapport au titre viral initial.

Le dernier titrage effectué à 12 semaines permet de mettre en évidence de 0,6 à 2,6 UFP/ml dans les six essais, soit de 5 à 10 fois moins par rapport au titre viral initial. Entre les essais 1, 2 et 3 (fraction diluée au moment de la numération après dé-

* La concentration de sérum foetal de veau est de 2 % après la dilution au $1/2$.

Temps	Liquide d'éluion non dilué avant congélation			Liquide d'éluion dilué au 1/2 avant congélation		
	Essai 1	Essai 2	Essai 3	Essai 1bis	Essai 2bis	Essai 3bis
To	8,2 ± 1,6	13 ± 3,9	8,6 ± 2,6	8,2 ± 1,6	13 ± 3,9	8,6 ± 2,6
To + 1 semaine	13 ± 3	7,6 ± 2,26	10 ± 2,6	9 ± 2,9	10 ± 4,9	8,6 ± 1,6
To + 2 semaines	4,4 ± 3,6	7,6 ± 3,1	9,6 ± 6,4	5,2 ± 1,8	8,6 ± 1,6	7,8 ± 3,7
To + 4 semaines	4,8 ± 3,3	7 ± 2,5	5,4 ± 1,9	5,2 ± 2,7	6,2 ± 3,1	4,8 ± 3,8
To + 12 semaines	0,6 ± 1,1	1 ± 0,87	2,2 ± 2	2,6 ± 1,86	0,8 ± 1,08	1,4 ± 1,88

**TABLEAU 21 : Survie des virus indigènes (UFP/ml) dans les fractions de trois liquides d'éluion (eau usée brute) conservés, dilués ou non, par congélation à - 26°C.
(±) : intervalle de confiance à 95 % de la numération.**

Temps	Liquide d'élution non dilué avant congélation			Liquide d'élution dilué au 1/2 avant congélation		
	Essai 4	Essai 5	Essai 6	Essai 4bis	Essai 5bis	Essai 6bis
To	0,4 \pm 1,1	0	0,4 \pm 1,1	0,4 \pm 1,1	0	0,4 \pm 1,1
To + 1 semaine	2,2 \pm 2,2	0	0	0	0	0
To + 2 semaines	0	0,4 \pm 0,7	0	0	0	0
To + 4 semaines	0	0,2 \pm 0,5	0	0	0	0
To + 12 semaines	0	0	0	0	0	0

TABLEAU 22 : Survie des virus indigènes (UFP/ml) dans les fractions de trois liquides d'élution (eau usée traitée) conservés, dilués ou non, par congélation à - 26°C.
(\pm) : intervalle de confiance à 95 % de la numération.

congélation) et les essais 1bis, 2bis et 3bis (fraction diluée avant la congélation), aucune différence significative n'apparaît (étant donné l'intervalle de confiance des numérations).

Une expérimentation identique a été menée avec les trois liquides d'élution provenant de la concentration d'eaux usées traitées (Tableau 22). Ces fractions ont un titre viral assez faible : 0,4 UFP/ml pour les essais 4 et 6. L'inoculation des fractions de l'essai 5 se révèle positive à 2 semaines et 4 semaines de conservation à - 26°C. Dès la première semaine pour l'essai 6 et la deuxième semaine pour l'essai 4, les résultats de l'inoculation sont négatifs. Quant aux fractions des liquides d'élution identiques diluées au 1/2 avant congélation (essai 4bis, 5bis et 6bis), aucune inoculation n'a été positive, quelque soit la période de conservation.

3.2.4. Comparaison de deux méthodes de titrage des virus indigènes dans les liquides d'élution

Selon l'état physiologique des souches cellulaires et la toxicité du liquide d'élution, il n'a pas toujours été possible d'effectuer les titrages des liquides d'élution en plages et il a été fait recours à la méthode du nombre le plus probable.

Afin de comparer les résultats donnés par ces deux méthodes pour des inoculations de liquides d'élution, des titrages ont été effectués en parallèle à partir des mêmes liquides d'élution, au même moment, et sur des flacons de culture issus d'une même trypsination.

Pour vérifier le caractère viral des plages apparaissant sur les flacons de culture, il a été effectué 140 clonages selon la méthode décrite ci-après.

A l'aide d'une pipette pasteur effilée et recourbée en coude, des boudins de gélose en contact avec la plage suspecte ont été prélevés. Toutes les plages apparues sur le tapis cellulaire d'un flacon ont ainsi été clonées. Ces boudins ont été remis en suspension dans 1 ml de MEM à 2 % de sérum de veau. Ce prélèvement a été ensuite testé sur tube de culture cellulaire avec deux passages successifs.

Les couples de résultats concernant le titre viral de 44 liquides d'élution, évalués par la méthode des plages et par la méthode du nombre le plus probable sont présentés dans le tableau 23.

Essai	UFP/ml	NPPUC/ml	
1	2,7 ± 0,6	2,3	(0,9 - 8,6)
2*	2,1 ± 0,8	5	(2 - 15)
3	8,2 ± 1,6	22	(10 - 58)
4*	13 ± 3,9	28	(12 - 69)
5	8,6 ± 2,5	7	(3 - 21)
6	9 ± 2,9	5	(2 - 15)
7*	10 ± 4,8	22	(10 - 58)
8	8,6 ± 1,6	7	(3 - 21)
9	13 ± 3	5	(2 - 15)
10*	7,6 ± 2,2	8	(3 - 25)
11	10 ± 2,6	9	(4 - 25)
12	5,2 ± 1,8	3	(1 - 12)
13	8,6 ± 1,6	5	(2 - 17)
14	7,8 ± 3,7	5	(2 - 17)
15*	4,4 ± 3,6	9	(4 - 25)
16	7,6 ± 3,1	5	(2 - 17)
17	9,6 ± 4	5	(2 - 17)
18*	4,8 ± 3,3	7	(3 - 21)
19*	7 ± 2,5	11	(4 - 30)
20	5,4 ± 1,8	5	(2 - 17)
21*	5,2 ± 2,7	11	(4 - 30)
22*	6,2 ± 3	17	(7 - 48)
23*	4,8 ± 3,8	13	(5 - 39)
24	1,4 ± 1,3	1,1	(0,4 - 2,9)
25	1,2 ± 0,8	0,7	(0,2 - 2,1)
26	0,9 ± 0,7	< 0,2	
27	4,6 ± 2,8	0,2	(< 0,1 - 1,1)
28	3,7 ± 1,9	0,2	(< 0,1 - 1,1)
29	2,3 ± 1	< 0,2	
30	2,2 ± 1,6	0,2	(< 0,1 - 1,1)
31	1,4 ± 1,3	< 0,2	
32	0,6 ± 1,1	< 0,2	
33	1 ± 0,8	0,2	(< 0,1 - 1)
34	2,2 ± 1,9	0,8	(0,3 - 2,4)
35	2,6 ± 1,8	0,8	(0,3 - 2,4)
36	0,8 ± 1	0,2	(< 0,1 - 1,1)
37	1,4 ± 1,9	0,4	(0,1 - 1,5)
38	2 ± 1,1	< 0,2	
39*	0	0,4	(0,1 - 1,3)
40	2 ± 1,1	0,8	(0,3 - 2,4)
41	2,2 ± 2,1	< 0,2	
42	0,4 ± 0,67	< 0,2	
43	0,2 ± 0,5	< 0,2	
44*	0	0,2	(0,1 - 1,1)

TABLEAU 23 : Résultats du titrage de 44 liquides d'élution par la méthode des plages et par la méthode du nombre le plus probable

* Résultat NPPUC/ml > UFP/ml

(±) (-) : intervalle de confiance à 95 % de la numération.

Les 37 premiers essais concernent les liquides d'élution d'eaux usées brutes tandis que les essais 38 à 44 proviennent de liquides d'élution d'eaux usées traitées.

Sur les 44 couples de résultats, dans 13 cas, les résultats obtenus par la méthode du nombre le plus probable se sont avérés supérieurs avec des différences allant de 0,4 NPPUC/ml à 13,8 NPPUC/ml, soit seulement une proportion de 29,5 % de résultats plus élevés en faveur du NPP sur l'ensemble des 44 essais. Cette même proportion subsiste si les résultats sont considérés selon leur origine : 29,7 % des résultats en faveur du NPP pour les liquides d'élution d'eaux usées brutes et 28,5 % pour les liquides d'élution d'eaux usées traitées.

Une étude de corrélation entre ces deux séries de résultats a été effectuée. La figure 7 présente la répartition des nuages de points.

Le calcul de la corrélation existant entre ces 44 couples de valeurs a permis d'obtenir l'équation de la droite de régression $y = 1,28 x - 0,80$ et le coefficient de corrélation $r = 0,69$.

Une même étude de corrélation a été effectuée sur les seules valeurs (méthodes des plages et méthode du NPP) inférieures ou égales à 10. La droite de régression, calculée sur 36 couples de valeurs, a pour équation $y = 0,78 x - 0,32$ et le coefficient de corrélation $r = 0,81$. Avec les valeurs inférieures à 10 UFP/ml et 10 NPPUC/ml, la corrélation des résultats issus des deux méthodes de numération apparaît meilleure qu'avec l'ensemble des résultats.

Clonage et repiquage des plages des virus indigènes

Un nombre total de 140 plages a été clonné selon la technique décrite précédemment. Après deux passages aveugles sur culture cellulaire en tubes, seulement 92 clones ont donné un effet cytopathique positif, soit une proportion de 65,7 % de plages confirmées.

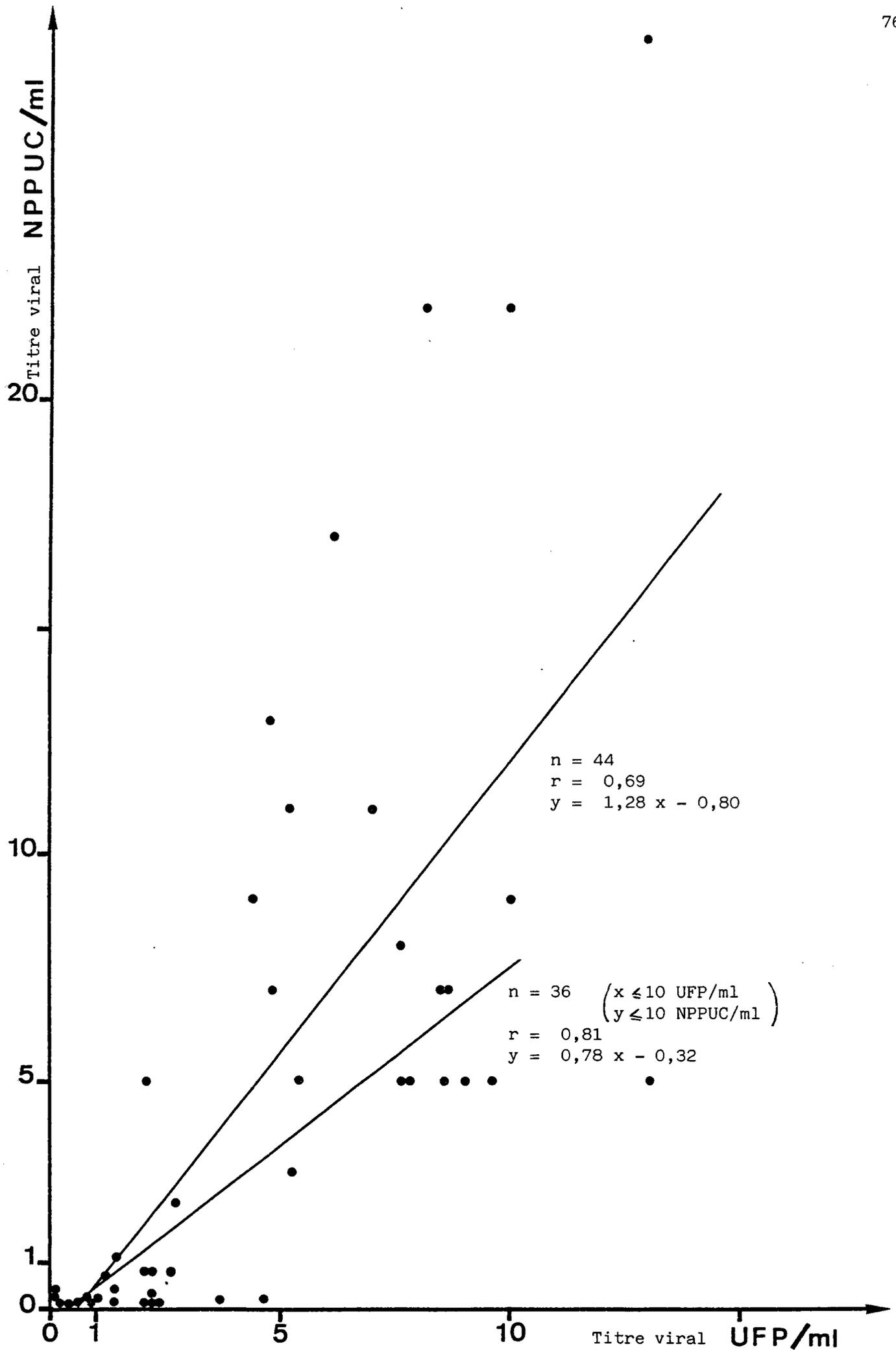


FIGURE 7 : Etude de corrélation entre deux méthodes de titrage : méthode des plages et méthode du nombre le plus probable.

4. ETUDE DES FLUX DE VIRUS DANS LES EAUX USEES BRUTES ET TRAITEES SUR 24 HEURES

Avant d'entreprendre l'étude sur 24 heures des flux viraux dans les eaux usées brutes et traitées de la station d'épuration de Nancy-Maxéville, nous avons tout d'abord réalisé une étude succincte d'échantillonnage pour estimer la représentativité des prélèvements.

Ensuite ont été exposées, d'une part, la séquence des prélèvements dans les eaux usées et, d'autre part, les analyses effectuées sur les échantillons. Les résultats des paramètres analysés ont été présentés, en premier lieu, exprimés en concentration, puis exprimés sous forme de flux. Ces dernières données nous ont permis de calculer les performances épuratoires de la station ; mais auparavant, nous avons abordé une question directement liée à ce calcul de rendement : l'estimation des temps de rétention sur la station d'épuration.

Enfin, nous avons comparé les informations recueillies selon les types de prélèvements effectués : prélèvements ponctuels et prélèvements composés en continu et séquentiellement.

4.1. Etude d'échantillonnage

Nous avons réalisé deux expérimentations sur des petits volumes d'eaux usées brutes. La première expérimentation a eu pour but d'apprécier la répartition des particules virales dans un même échantillon homogénéisé ; la seconde d'apprécier la représentativité d'un échantillon prélevé pour une période de temps donné.

4.1.1. Etude de l'homogénéité d'un prélèvement homogénéisé

A partir d'un échantillon de 20 litres d'eaux usées brutes en bidon, homogénéisé pendant 15 minutes à la pompe, dix fractions aliquotes de 100 ml ont été prélevées en flacons stériles. Sur ces fractions, des mesures de pH, de résistivité, de densité optique à 650 nm ont été effectuées, ainsi qu'une numération des germes totaux.

Sur le volume restant (50 ml), une analyse virologique par inoculation directe a été effectuée. Après décontamination selon le protocole décrit en 2.4., ces fractions ont été numérotées par la technique du NPP, à raison de 5 flacons de 25 cm² par dilution.

Les résultats des mesures effectuées sur les dix fractions de 100 ml d'un échantillon homogénéisé de 20 litres d'eaux usées brutes sont rassemblés dans le tableau 24. Les paramètres physico-chimiques mesurés : pH, résistivité, densité optique à 650 nm n'ont pratiquement pas varié, par exemple de 0,070 à 0,078 unités de densité optique. Les résultats des numérations totales des germes de ces fractions sont plus dispersés : de $1,6 \cdot 10^6$ germes/ml à $9,6 \cdot 10^6$ germes/ml, mais tout en restant près de la valeur moyenne $6,1 \cdot 10^6$ germes/ml. Ces écarts à la moyenne restent de l'ordre de grandeur de l'intervalle de confiance à 95 % de la méthode de numération. Les titres viraux des fractions ont été de 0,2 NPPUC/ml dans quatre cas, de 0,4 NPPUC/ml dans cinq cas ; une seule fraction s'est avérée négative.

4.1.2. Etude de l'hétérogénéité de la composition virale des eaux usées brutes

En entrée de station d'épuration, dix échantillons de 10 litres d'eaux usées brutes ont été prélevés à une minute d'intervalle. Sur chacun de ces prélèvements, un échantillon de 500 ml a été prélevé en flacon stérile et ramené au laboratoire. Ces prélèvements de 500 ml ont été homogénéisés dans un mixeur pendant une minute (Waring Blendor, Distributeur Poly Labo Paul Block réf 80 115). Des mesures de pH, résistivité, densité optique à 650 nm ont été effectuées comme précédemment. Enfin, pour l'analyse virologique, un volume de 50 ml de chaque fraction a été décontaminé selon la technique décrite en 2.4. et numéré par la technique du nombre le plus probable à raison de cinq flacons de 25 cm² par dilution.

Les résultats des analyses physico-chimiques et virologiques effectuées sur dix échantillons d'eaux usées brutes prélevés à une minute d'intervalle sont présentés dans le tableau 25. Les variations

Fraction	pH	Résistivité Ω/cm	Densité optique à 650 nm	Germes totaux / ml	Virus NPPUC/ml	Intervalle confiance à 95 % sur les titres viraux
1	7,75	1233	0,070	$8 \cdot 10^6 \pm 8,4 \cdot 10^6$	0,2	$< 0,1 - 1,1$
2	"	1226	0,071	$1,6 \cdot 10^6 \pm 2,8 \cdot 10^6$	0,4	0,1 - 1,7
3	"	1233	0,075	$3,6 \cdot 10^6 \pm 3,7 \cdot 10^6$	0,4	0,1 - 1,7
4	"	1233	0,073	$5,6 \cdot 10^6 \pm 7,2 \cdot 10^6$	0,4	0,1 - 1,7
5	"	1226	0,075	$9 \cdot 10^6 \pm 4,3 \cdot 10^6$	0,2	$< 0,1 - 1,1$
6	"	1233	0,071	$7,3 \cdot 10^6 \pm 2,8 \cdot 10^6$	0,4	0,1 - 1,5
7	"	1233	0,078	$9,6 \cdot 10^6 \pm 1,4 \cdot 10^6$	0,2	$< 0,1 - 1,3$
8	"	1226	0,074	$4,1 \cdot 10^6 \pm 4,3 \cdot 10^6$	$< 0,2$	
9	"	1226	0,074	$5,3 \cdot 10^6 \pm 5,1 \cdot 10^6$	0,4	0,1 - 1,5
10	"	1219	0,077	$7,3 \cdot 10^6 \pm 10 \cdot 10^6$	0,2	$< 0,1 - 1,1$

TABLEAU 24 : Mesures physico-chimiques (pH, résistivité, densité optique), virologiques et bactériologiques effectuées sur 10 fractions de 100 ml d'un échantillon homogénéisé de 20 litres d'eaux usées brutes.

Echantillon	pH	Résistivité /cm	Densité optique à 650 nm	Virus NPPUC/ml	Intervalle de confiance à 95 %
1	7,84	1267	0,141	0,2	< 0,1 - 1,1
2	7,89	1288	0,120	0,2	< 0,1 - 1,1
3	7,81	1288	0,170	0,2	< 0,1 - 1,1
4	7,92	1281	0,110	0,2	< 0,1 - 1,1
5	7,85	1274	0,130	0,2	< 0,1 - 1,1
6	7,94	1274	0,100	< 0,2	
7	7,96	1281	0,100	< 0,2	
8	7,92	1288	0,113	0,2	< 0,1 - 1,1
9	7,93	1281	0,110	< 0,2	
10	7,83	1281	0,169	0,4	0,1 - 1,7

TABLEAU 25 : Mesures physico-chimiques (pH, résistivité, densité optique à 650 nm) et titre viral (NPPUC/ml) de dix échantillons d'eaux usées brutes prélevés à une minute d'intervalle.

entre les résultats des analyses effectuées sur ces échantillons sont plus fréquentes. Les mesures de densité optique à 650 nm traduisent la turbidité des échantillons et ont varié de 0,100 à 0,170 unités de densité optique ; le pH et la résistivité des échantillons sont stables. Le titre viral des échantillons reste groupé autour d'une valeur : 0,2 NPPUC/ml (dans 6 cas). Dans l'échantillon 10, le titre viral est double : 0,4 NPPUC/ml, mais trois échantillons n'ont révélé aucun effet cytopathique sur culture cellulaire.

4.2. Séquence des prélèvements et analyse des échantillons

L'expérimentation sur le terrain a été conduite le mercredi 23 et le jeudi 24 avril 1980. Nous avons effectué trois types de prélèvements dans les eaux usées brutes et les eaux usées traitées sur les 24 heures de l'expérimentation :

- 13 prélèvements ponctuels de 22 litres, réalisés au trempé à l'aide d'un seau, toutes les deux heures pendant 24 heures dans les eaux usées brutes et traitées ;
- 1 prélèvement en continu par pompe, collectant un échantillon de 22 litres sur 24 heures dans les eaux usées brutes et traitées ;
- 1 prélèvement séquentiel par pompe, soit 15 minutes de prélèvement par pompe, collectant un échantillon de 22 litres sur 24 heures dans les eaux usées brutes et traitées

Pour respecter le temps moyen de rétention des eaux usées sur l'ensemble de la station d'épuration, un décalage de 4 heures a été observé entre le début des prélèvements d'eaux usées brutes et le début des prélèvements d'eaux usées traitées. Ainsi, les prélèvements dans les eaux usées brutes ont été effectués du mercredi matin à 6 heures jusqu'au lendemain jeudi 6 heures, et dans les eaux usées traitées, du mercredi matin à 10 heures jusqu'au lendemain 10 heures.

Les prélèvements effectués dans la journée ont été transportés au laboratoire en 45 minutes environ. Ces échantillons ont subi en premier lieu une homogénéisation, puis un litre d'eau usée a été prélevé pour les analyses physico-chimiques (DBO_5 , DCO, MEST, turbidité,

résistivité, pH) et un litre pour les analyses bactériologiques (Coli-formes thermorésistants). C'est donc sur un échantillon de 20 litres que la recherche des virus a été effectuée. Les liquides d'élution résultant de la concentration des prélèvements ont été décontaminés immédiatement après élution selon les méthodes décrites en 2.4. Ils ont été conservés 72 heures à + 4°C avant leur inoculation sur culture cellulaire. La numération des virus dans les liquides d'élution a été effectuée selon la méthode des plages décrite en 2.7.2.

Les analyses bactériologiques, physico-chimiques et virologiques ont été effectuées le plus rapidement possible. Les échantillons ne pouvant être concentrés dès leur arrivée au laboratoire ont été stockés en chambre froide à + 4°C. Dans tous les cas, ils ont été analysés dans les 24 heures suivant l'heure de leur prélèvement.

4.3. Résultats

4.3.1. Mesure des débits

Les mesures de débits, enregistrées en continu, en sortie de station d'épuration, par l'intermédiaire d'un capteur de pression, sont rassemblées pour chaque heure et exprimées en débit instantané litre/seconde, et présentées en annexe sur le tableau I. Ces mesures de débit seront utilisées ultérieurement pour le calcul des flux de pollution.

La variation de ces débits pendant la durée de l'expérimentation a été représentée sur la figure 8. Quatre pointes de débit sont apparues sur ces 24 heures de mesures : de 10 h à 12 h avec le débit maximal de 2 140 litres par seconde, à 15 h : 2 050 litres par seconde, de 20 à 21 h : 1 850 litres par seconde et à 3 h : 1 500 litres par seconde. Le débit minimal (1 200 litres par seconde) a été enregistré entre 24 h et 2 h.

Le relevé des compteurs volumétriques au début et à la fin de l'expérimentation a permis de connaître le volume de l'eau traitée par la station d'épuration pour 24 heures. De 6 h du matin le 23 avril 1980 à 6 h du matin le 24 avril 1980, 146 096 m³ d'eaux usées sont

passés sur la station d'épuration ; et de 10 h du matin le 23 avril 1980 au lendemain 10 h, 146 208 m³ d'eau sont passés sur la station d'épuration. Ces volumes correspondent à un débit moyen pour cette période de l'année.



FIGURE 8 : Débits d'eaux usées traitées enregistrés dans le chenal de rejet de la station d'épuration de 6 h le 23.04.1980 à 10 h le 24.04.1980.

4.3.2. Analyses physico-chimiques des eaux usées

Les résultats des analyses physico-chimiques (pH, résistivité, turbidité, MEST, DBO₅ et DCO) effectuées pour chaque prélèvement sont présentés en annexe dans le tableau II pour les eaux usées brutes et dans le tableau III pour les eaux usées traitées.

Les variations en fonction des heures de prélèvements de ces paramètres physico-chimiques dans les eaux usées brutes et traitées ont été représentées sur la figure 9 pour le pH, figure 10 pour la résistivité, figure 11 pour la turbidité, figure 12 pour les MEST, figure 13 pour la DBO_5 et figure 14 pour la DCO.

Le pH dans les échantillons d'eaux usées a varié de 7,5 à 8,0 sur les 24 heures sans schéma particulier. Dans les échantillons d'eaux usées traitées, le pH a varié de 7 à 7,7 sans particularité également.

La résistivité des eaux usées brutes (Figure 10) a été maximale dans les échantillons à 6 h du matin (1 571 Ω /cm) et 1 585 Ω /cm) Entre 8 h et 8 h le lendemain, elle oscille entre 1 223 Ω /cm et 1 473 Ω /cm. Pour les échantillons d'eaux usées traitées, la résistivité a été du même ordre, variant de 1 223 Ω /cm à 1 585 Ω /cm.

La variation de la teneur de matières en suspension des échantillons d'eaux usées brutes a présenté deux maxima sur 24 heures: à 12 h (198 mg/l) et entre 22 et 24 h (142 à 144 mg/l). Dans l'échantillon de 18 h, une légère augmentation de la teneur en MEST peut être remarquée. Les valeurs minimales de MEST ont été observées dans les prélèvements de 6 h à 8 h du matin (19 mg/l et 48 mg/l respectivement).

En ce qui concerne les mesures de turbidité, de DBO_5 et de DCO effectuées sur les échantillons, les valeurs maximales ont été enregistrées pratiquement aux mêmes heures de prélèvement.

Pour les mesures de turbidité, deux maxima, entre 10 h et 14 h (80 JTU) et 22 h (90 JTU) et comme pour les mesures de matières en suspension, le prélèvement de 18 h présente une légère augmentation de turbidité.

Pour les mesures de DBO_5 et DCO (Figures 13 et 14), deux maxima : entre 10 h et 14 h (201 et 241 mg/l en DBO_5 et 407 mg/l et 497 mg/l en DCO) et à 22 h (161 mg/l en DBO_5 et 351 mg/l en DCO). Entre les mesures de DCO et de DBO_5 , il existe un rapport de deux environ pour les échantillons d'eaux usées brutes, et de trois à quatre pour les échantillons d'eaux usées traitées.

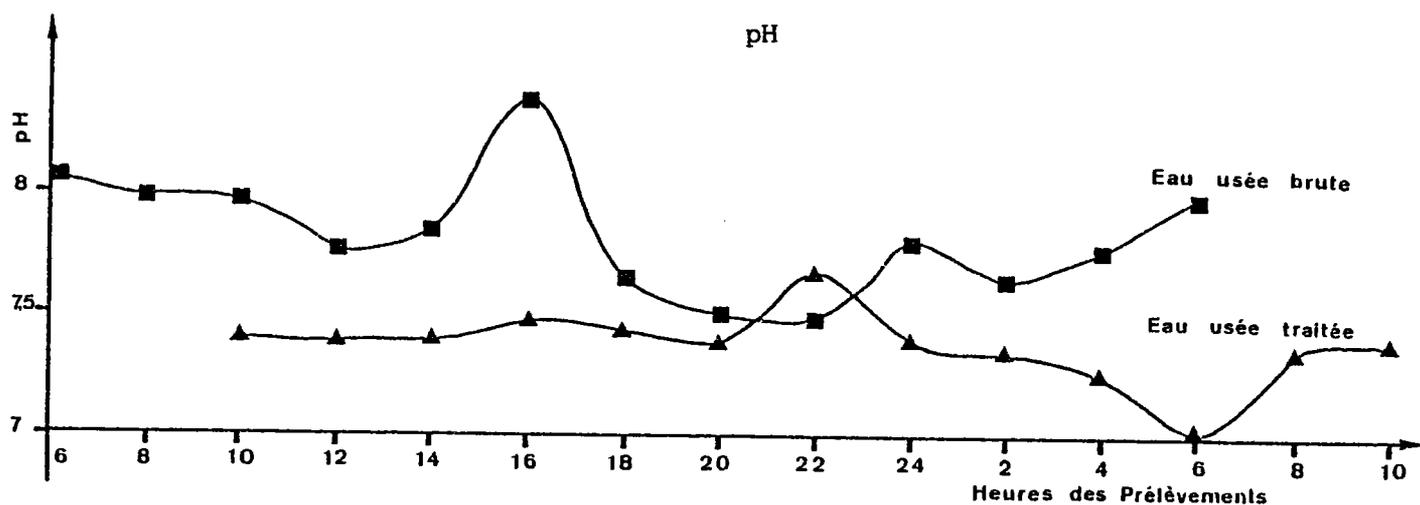


FIGURE 9 : pH des échantillons d'eaux usées brutes et d'eaux usées traitées prélevés toutes les deux heures pendant 24 heures.

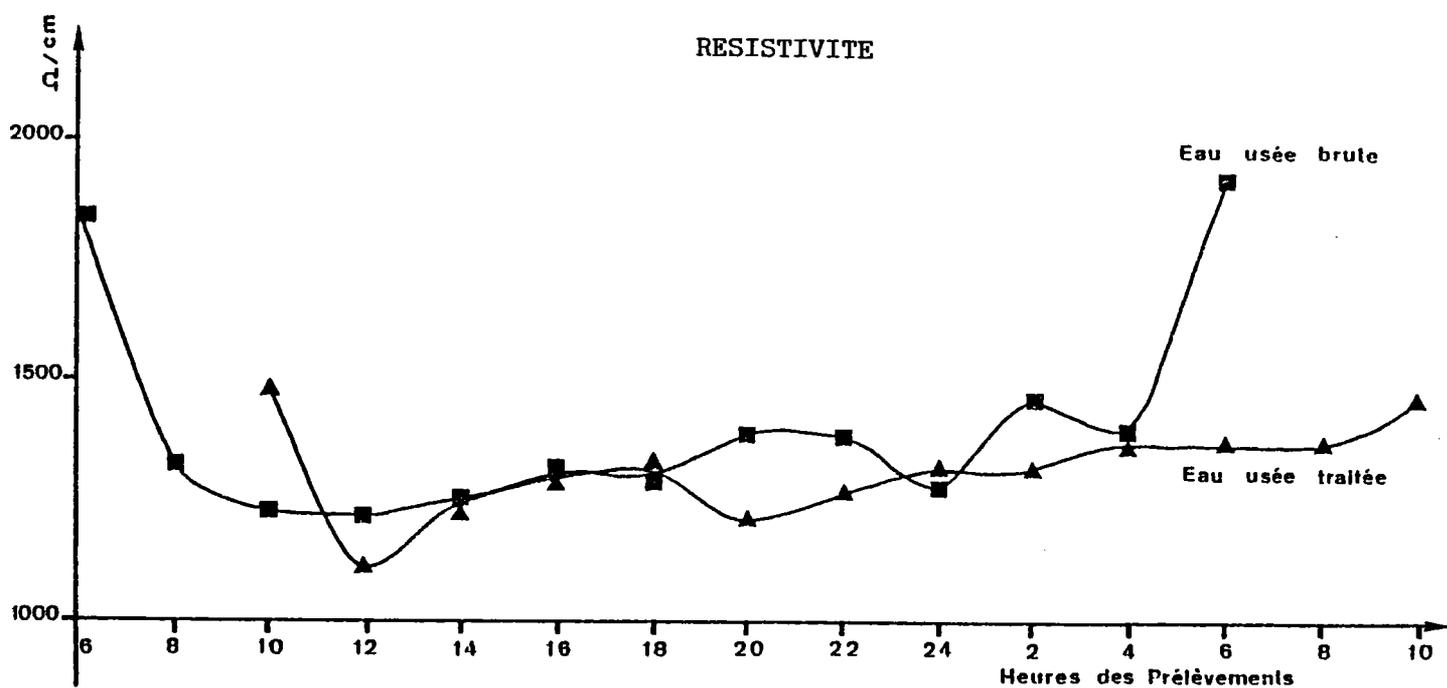


FIGURE 10 : Résistivité des échantillons d'eaux usées brutes et d'eaux usées traitées prélevés toutes les deux heures pendant 24 heures.

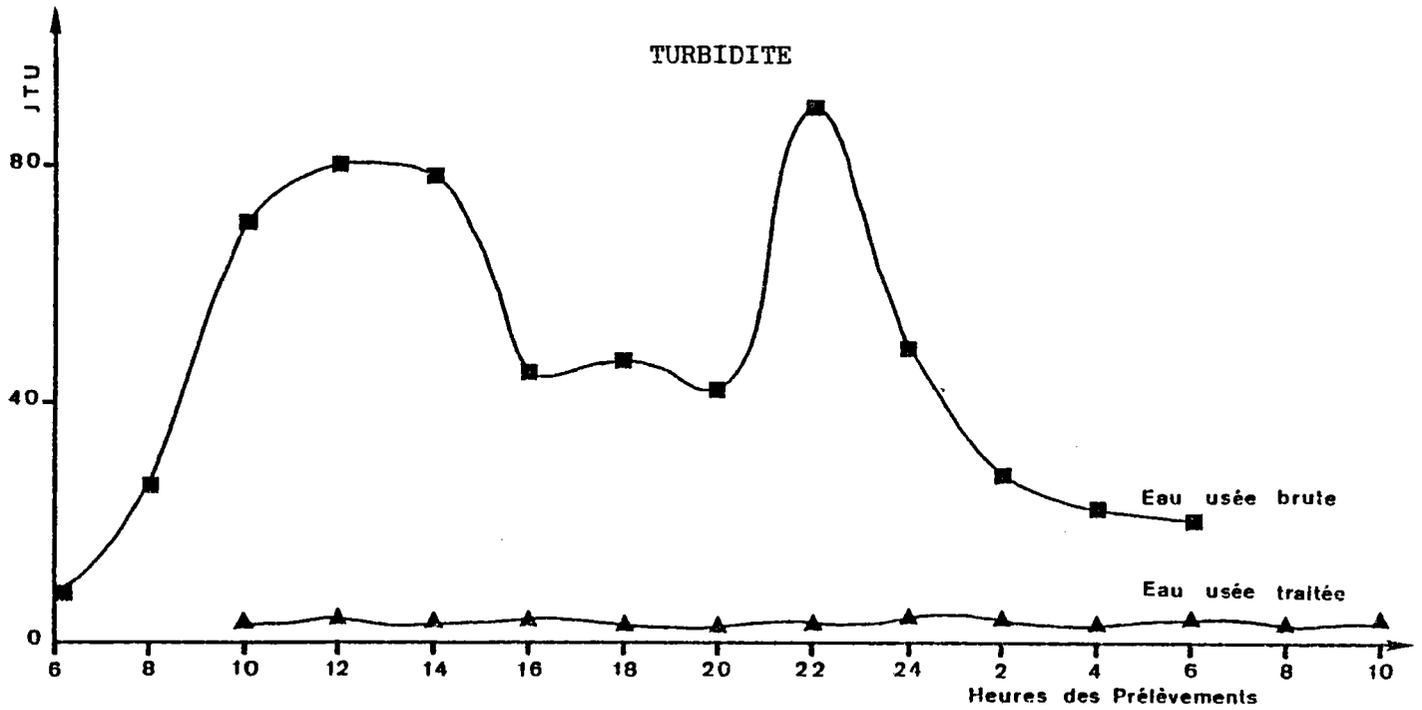


FIGURE 11 : Turbidité des échantillons d'eaux usées brutes et d'eaux usées traitées prélevés toutes les deux heures pendant 24 heures.

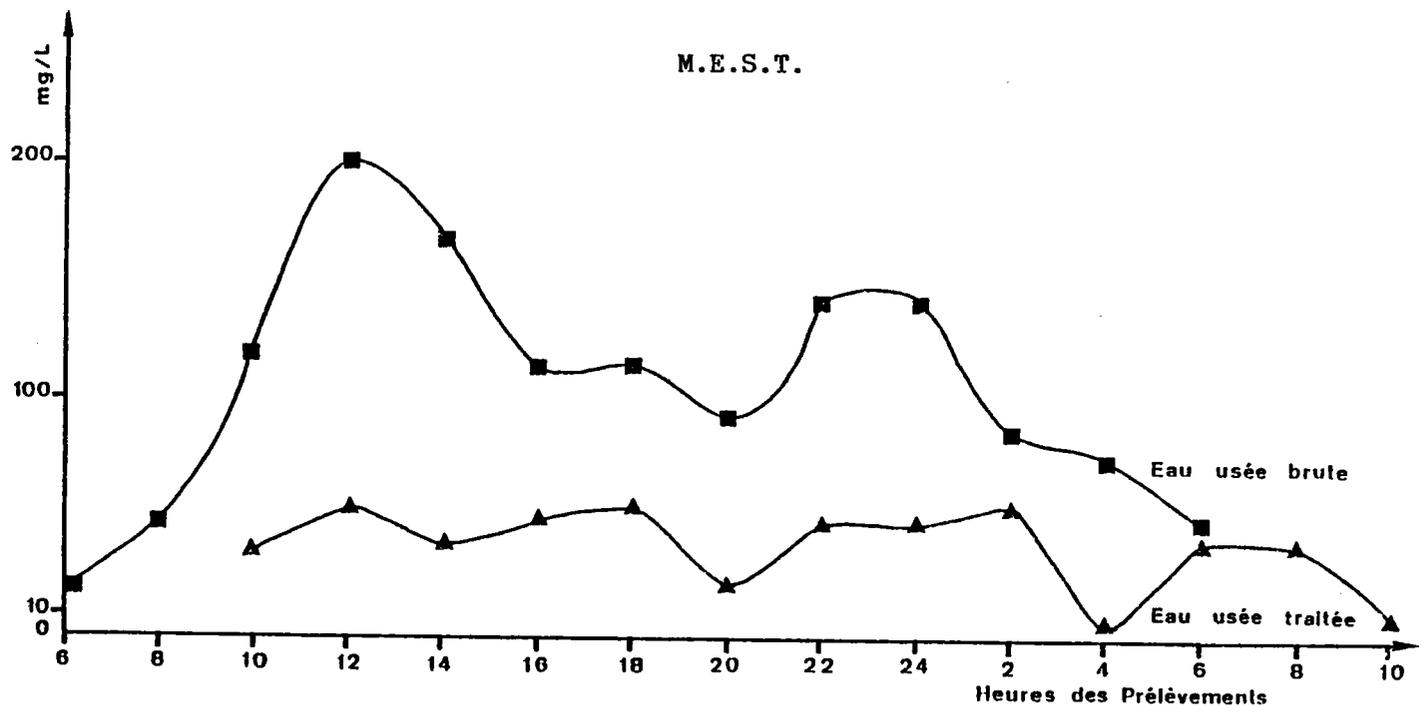


FIGURE 12 : Matières en suspension totales des échantillons d'eaux usées brutes et d'eaux usées traitées prélevés toutes les deux heures pendant 24 heures.

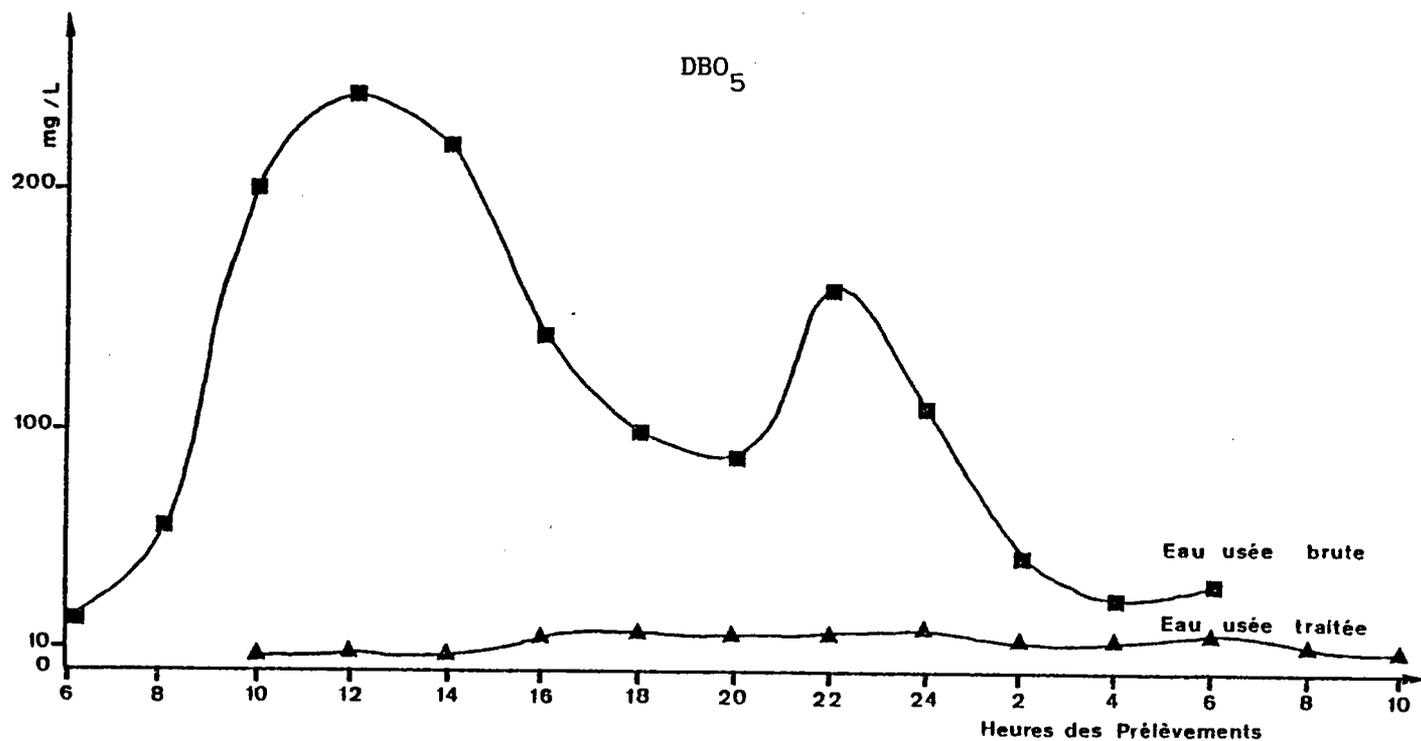


FIGURE 13 : DBO₅ des échantillons d'eaux usées brutes et d'eaux usées traitées prélevés toutes les deux heures pendant 24 heures.

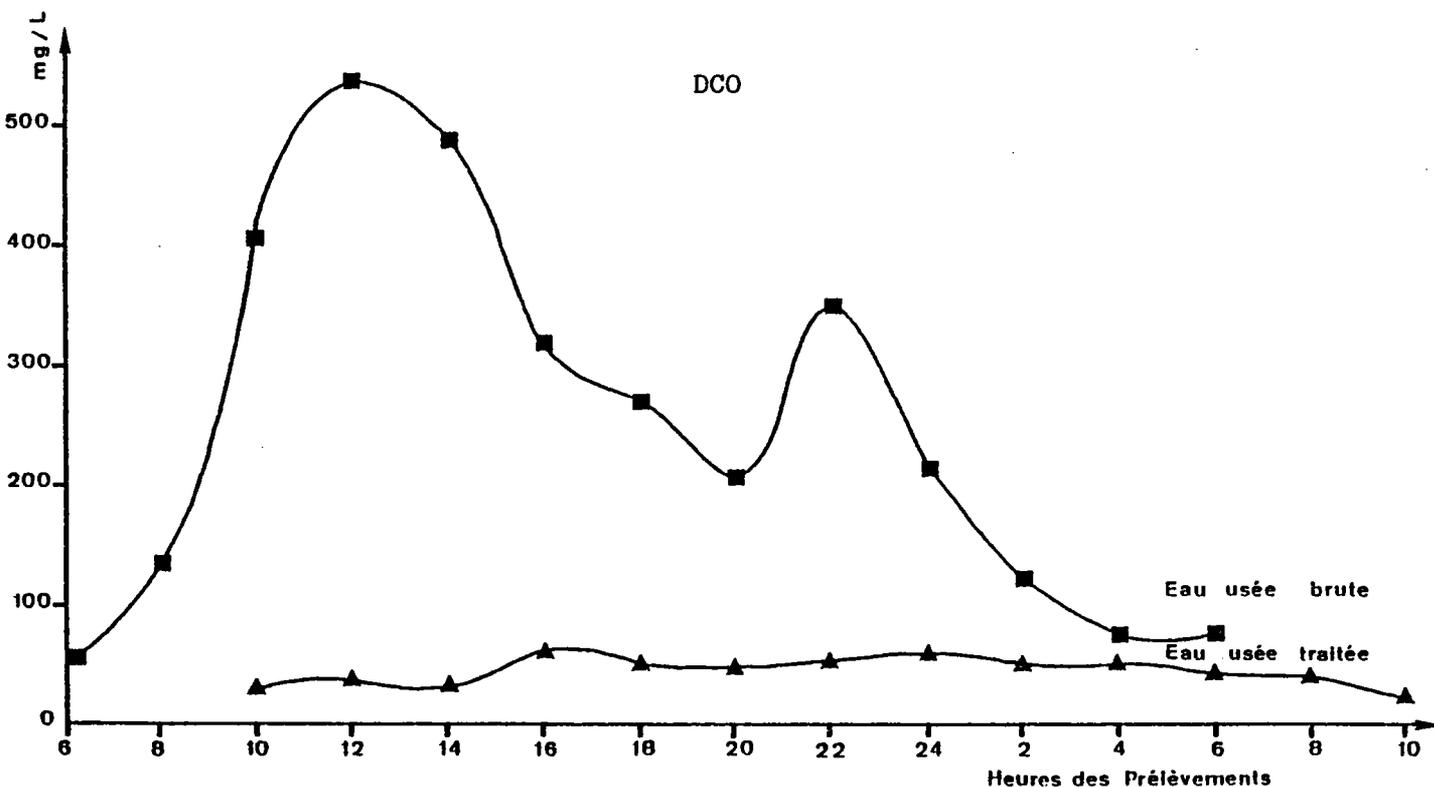


FIGURE 14 : DCO des échantillons d'eaux usées brutes et d'eaux usées traitées prélevés toutes les deux heures pendant 24 heures.

La variation de ces mêmes paramètres pour les échantillons d'eaux usées traitées, représentée sur les mêmes figures, a été pratiquement inexistante. Les valeurs moyennes de ces paramètres physico-chimiques des échantillons d'eaux usées traitées ont été pour les MEST : 38,8 mg/l, pour la turbidité : 3,6 JTU, pour la DBO_5 : 12,7 mg/l et pour la DCO : 45,1 mg/l.

4.3.3. Analyses bactériologiques des eaux usées

Les résultats des analyses bactériologiques effectuées sur les prélèvements ont été présentés en annexe dans le tableau IV pour les échantillons d'eaux usées brutes et traitées. Les variations de ces concentrations de coliformes ont été présentées sur la figure 15 pour les échantillons d'eaux usées brutes et sur la figure 16 pour les eaux usées traitées.

Les variations de la concentration en coliformes thermorésistants des échantillons d'eaux usées brutes (Figure 15) ont été semblables aux variations observées pour les paramètres physico-chimiques des échantillons d'eaux usées brutes (MEST, turbidité, DBO_5 , DCO). Deux pointes principales apparaissent à 12 heures ($216 \cdot 10^6$ coliformes/l) et à 24 heures ($183,7 \cdot 10^6$ coliformes/l). La légère pointe de 18 heures a été également retrouvée. Les concentrations minimales ont été observées dans le prélèvement de 6 h du matin ($26 \cdot 10^6$ et $31 \cdot 10^6$ coliformes par litre).

Quant aux concentrations de coliformes thermorésistants dans les échantillons d'eaux usées traitées (Figure 16), elles varient d'un facteur 20 selon les heures de prélèvement, contrairement aux paramètres physico-chimiques qui restent presque constants quelque soit l'heure de prélèvement. La concentration maximale ($21,2 \cdot 10^6$ coliformes/l) a été notée à 18 heures. Ensuite la concentration en coliformes décroît avec deux paliers jusqu'à 10 h du matin : $0,4 \cdot 10^6$ et $0,83 \cdot 10^6$ coliformes/l avant d'augmenter exponentiellement jusqu'à 18 heures.

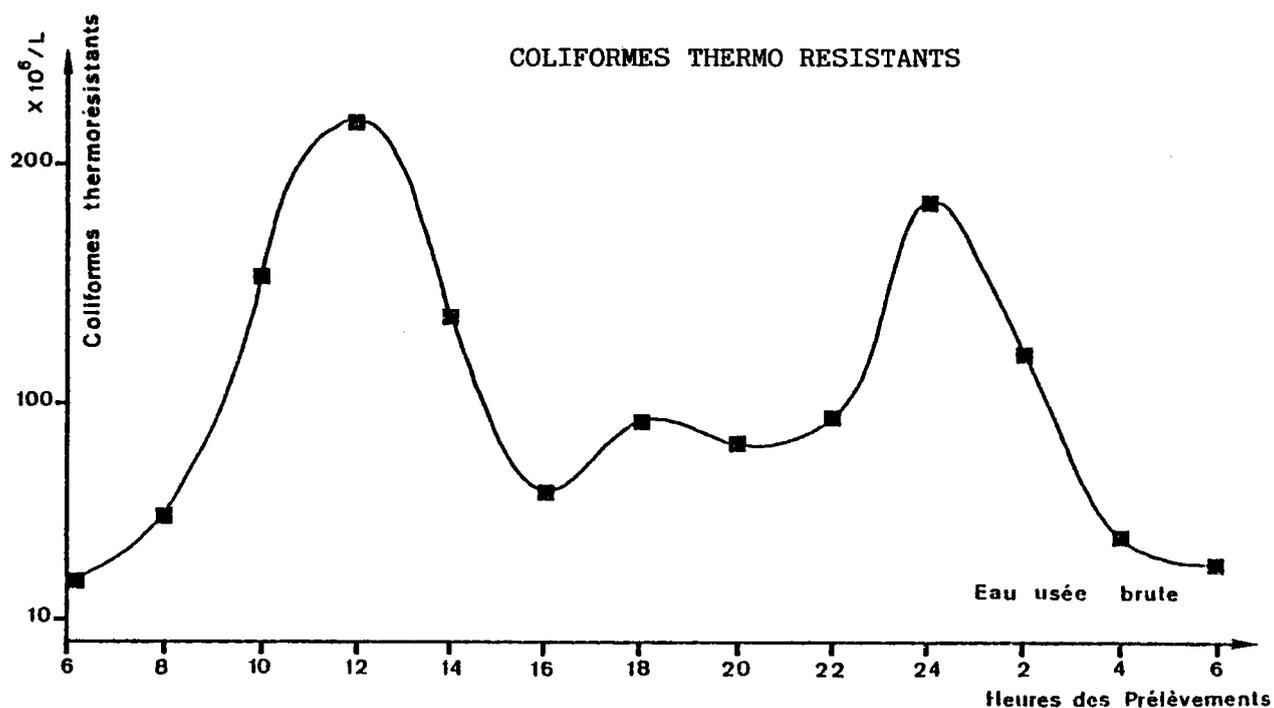


FIGURE 15 : Concentration des coliformes thermorésistants dans les échantillons d'eaux usées brutes prélevés toutes les deux heures pendant 24 heures.

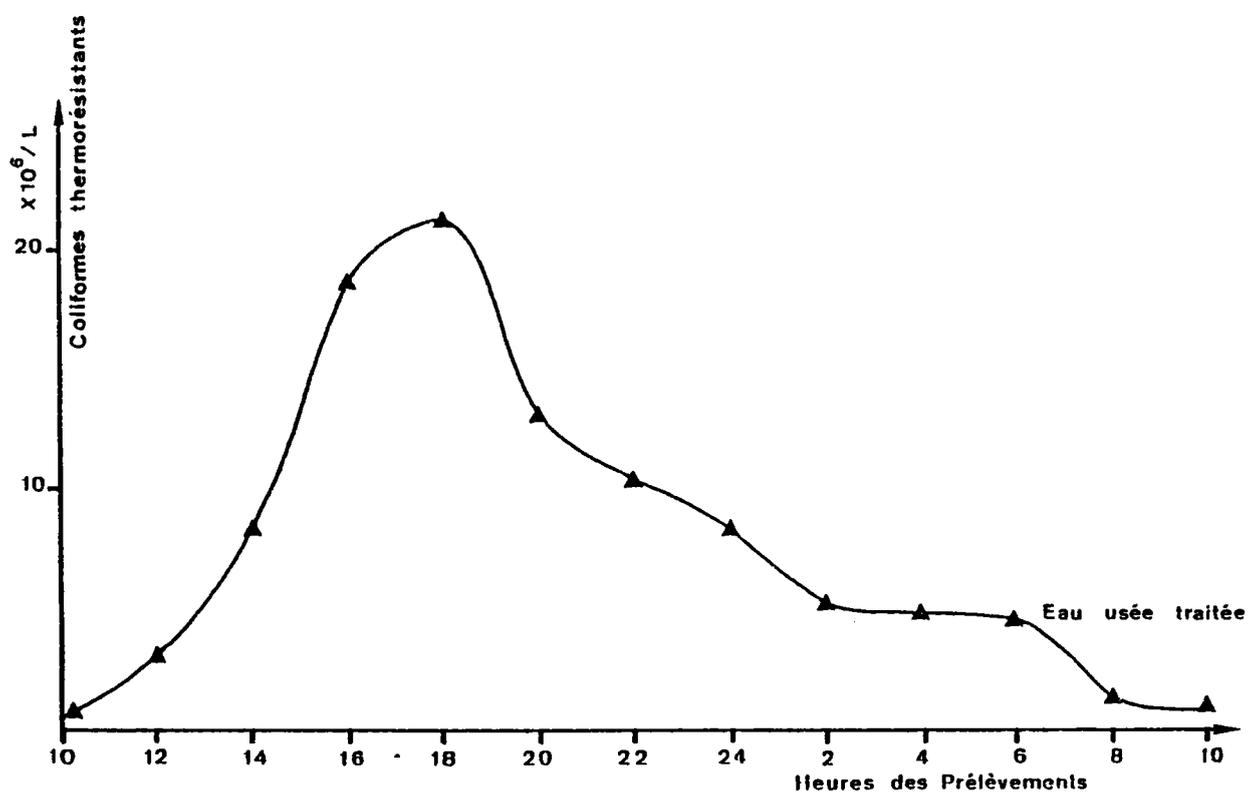


FIGURE 16 : Concentration des coliformes thermorésistants dans les échantillons d'eaux usées traitées prélevés toutes les deux heures pendant 24 heures.

4.3.4. Analyses virologiques des eaux usées

Les titres viraux des échantillons prélevés sur 24 heures ont été présentés en annexe dans le tableau V pour les échantillons d'eaux usées brutes et traitées.

Les variations des titres viraux des échantillons en fonction de l'heure du prélèvement ont été représentées sur la figure 17 pour les échantillons d'eaux usées brutes et sur la figure 18 pour les échantillons d'eaux usées traitées.

Pour les échantillons d'eaux usées brutes, trois pointes de concentration apparaissent pour les heures de prélèvements suivantes : de 10 h à 14 h (maximum : 23,5 UFP/l) ; à 10 h : 17,75 UFP/l ; à 24 h : 31,75 UFP/l. Les liquides d'élution relatifs aux échantillons de 14 h, 16 h et 22 h se sont avérés particulièrement toxiques sur les cultures cellulaires ; ces liquides d'élution ont été détoxifiés par traitement au chloroforme et par passage sur résine XAD 2 selon les protocoles décrits en 3.2.1. Les résultats de ces traitements de détoxification sont présentés en annexe dans le tableau VI. La détoxification par traitement au chloroforme n'ayant occasionné aucune baisse du titre viral, nous avons utilisé les résultats de ce traitement.

Pour les échantillons d'eaux usées traitées, un pic majeur de 18 h à 20 h (6,75 UFP/l) et un deuxième pic à 24 h (3,25 UFP/l) apparaissent. Entre 8 h et 10 h du matin, aucune particule virale n'a été mise en évidence dans les échantillons prélevés pendant cette période.

4.3.5. Expression des résultats des analyses physico-chimiques, bactériologiques et virologiques en flux instantané

A partir des relevés de débits instantanés (résultats présentés en 4.3.1.) et des résultats des analyses physico-chimiques (4.3.2.), bactériologiques (4.3.3.) et virologiques (4.3.4.), les flux instantanés de chaque paramètre ont été calculés pour chaque prélèvement. Les flux des paramètres à un instant donné ont été obtenus par le produit des concentrations des paramètres dans l'échantillon prélevé à l'instant par le débit enregistré à ce même instant.

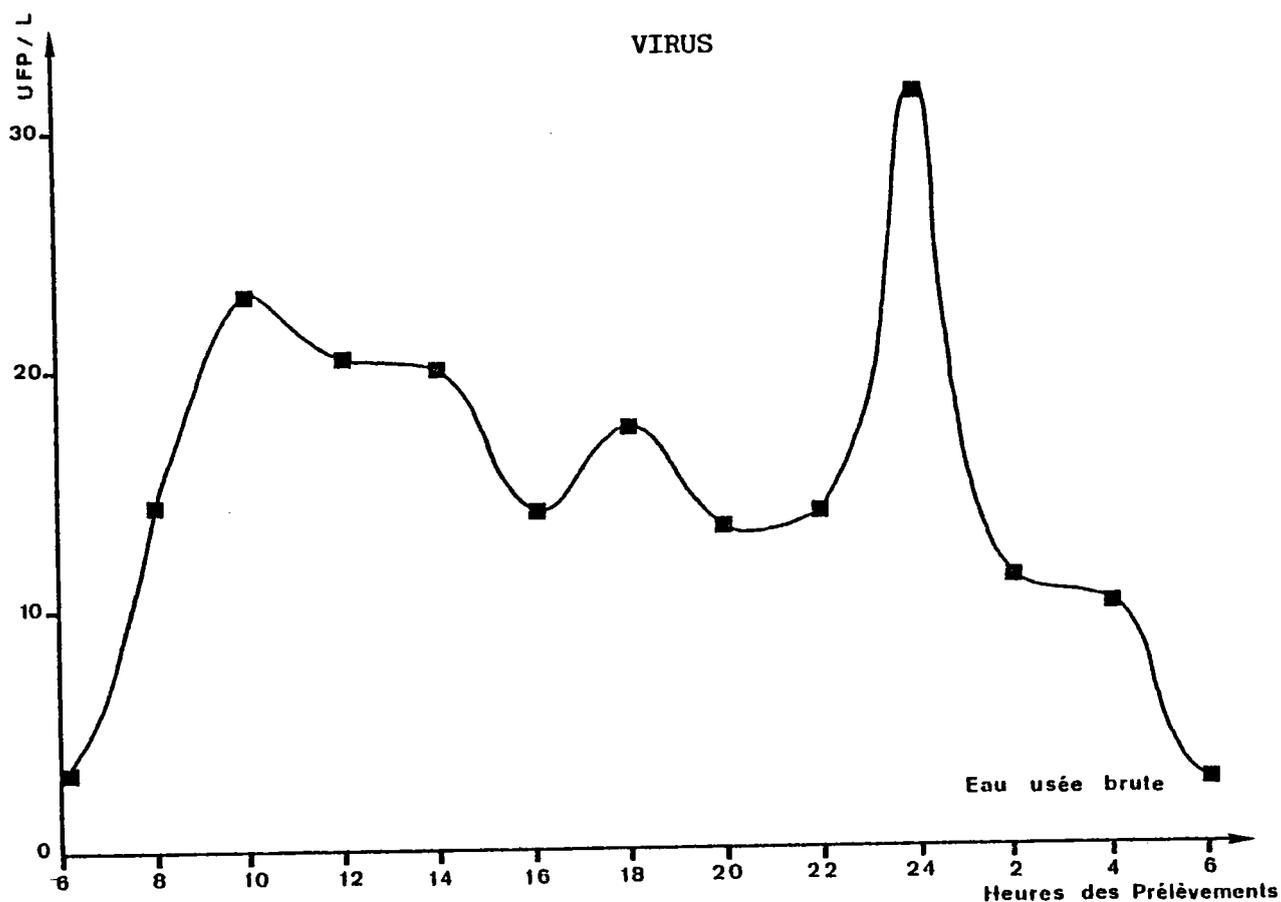


FIGURE 17 : Concentrations virales dans les échantillons d'eaux usées brutes prélevés toutes les deux heures pendant 24 heures.

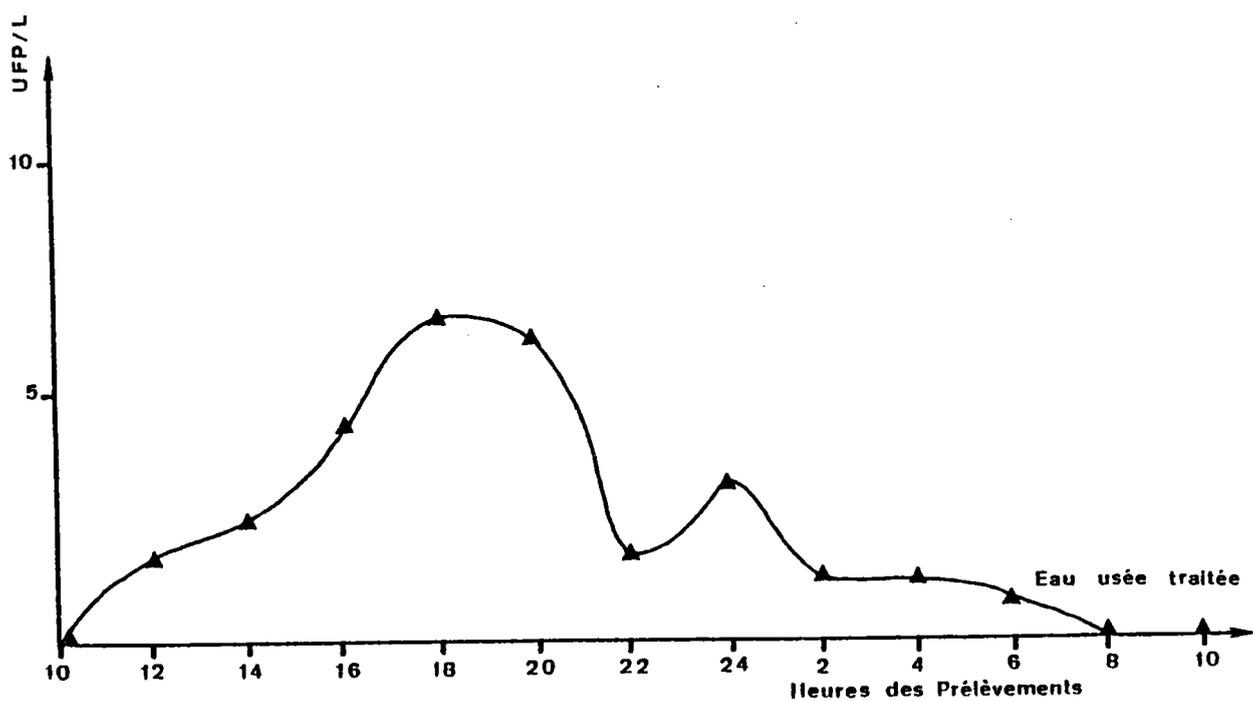


FIGURE 18 : Concentrations virales dans les échantillons d'eaux usées traitées prélevés toutes les deux heures pendant 24 heures.

Les débits relevés sur la bande d'enregistrement ont été exprimés en litre par seconde. Les flux des paramètres ont par conséquent été exprimés en unité de masse par seconde pour les paramètres physico-chimiques (DBO_5 , DCO, MEST) et pour les paramètres microbiologiques en nombre de virus et coliformes thermorésistants par seconde.

Les mesures de pH et de résistivité n'ont pas été exprimées sous forme de flux compte tenu de leur intérêt limité pour notre sujet. Par contre, nous avons exprimé les mesures de turbidité sous forme de flux, bien que ce nouveau résultat ait une valeur plus virtuelle que réelle.

Les résultats ont été présentés en annexe sur le tableau VII pour les eaux usées brutes et sur le tableau VIII pour les eaux usées traitées. Les variations de ces flux instantanés ont été représentées en fonction des heures de prélèvement sur la figure 19 pour les eaux usées brutes et sur la figure 20 pour les eaux usées traitées.

Cette représentation graphique, la plus explicite, suppose qu'aucune variation importante ne soit survenue dans les concentrations et les flux entre deux heures de prélèvements. Nous savons que cela n'est pas exact car les variations de débit sur la station sont rapides et fréquentes. Nous aurions pu représenter les variations de concentration et de flux des paramètres en fonction du temps sous forme d'histogramme, les histogrammes représentant en largeur un intervalle de temps de 2 heures, avec pour centre de l'intervalle l'instant de prélèvement, et en hauteur les concentrations ou les flux des paramètres. Mais cette dernière proposition ferait "extrapoler" les résultats des analyses effectuées pour un échantillon prélevé à un instant t à un intervalle de temps de deux heures. Etant donné les erreurs sur les analyses elles-mêmes, le faible volume d'échantillon analyse par rapport à la masse d'eau passant chaque seconde sur la station d'épuration, et l'hétérogénéité du milieu des eaux usées, l'intégration des résultats à un intervalle de temps de deux heures n'apporterait aucune information intéressante, masquerait la réalité et serait de lecture plus délicate.

Sur la figure 19, deux pics principaux apparaissent pour tous les paramètres étudiés et d'une manière absolument synchrone entre 10 h et 14 h et entre 22 h et 2 h.

FIGURE 19 : Variations des flux des différents paramètres pendant 24 heures (eau usée brute)

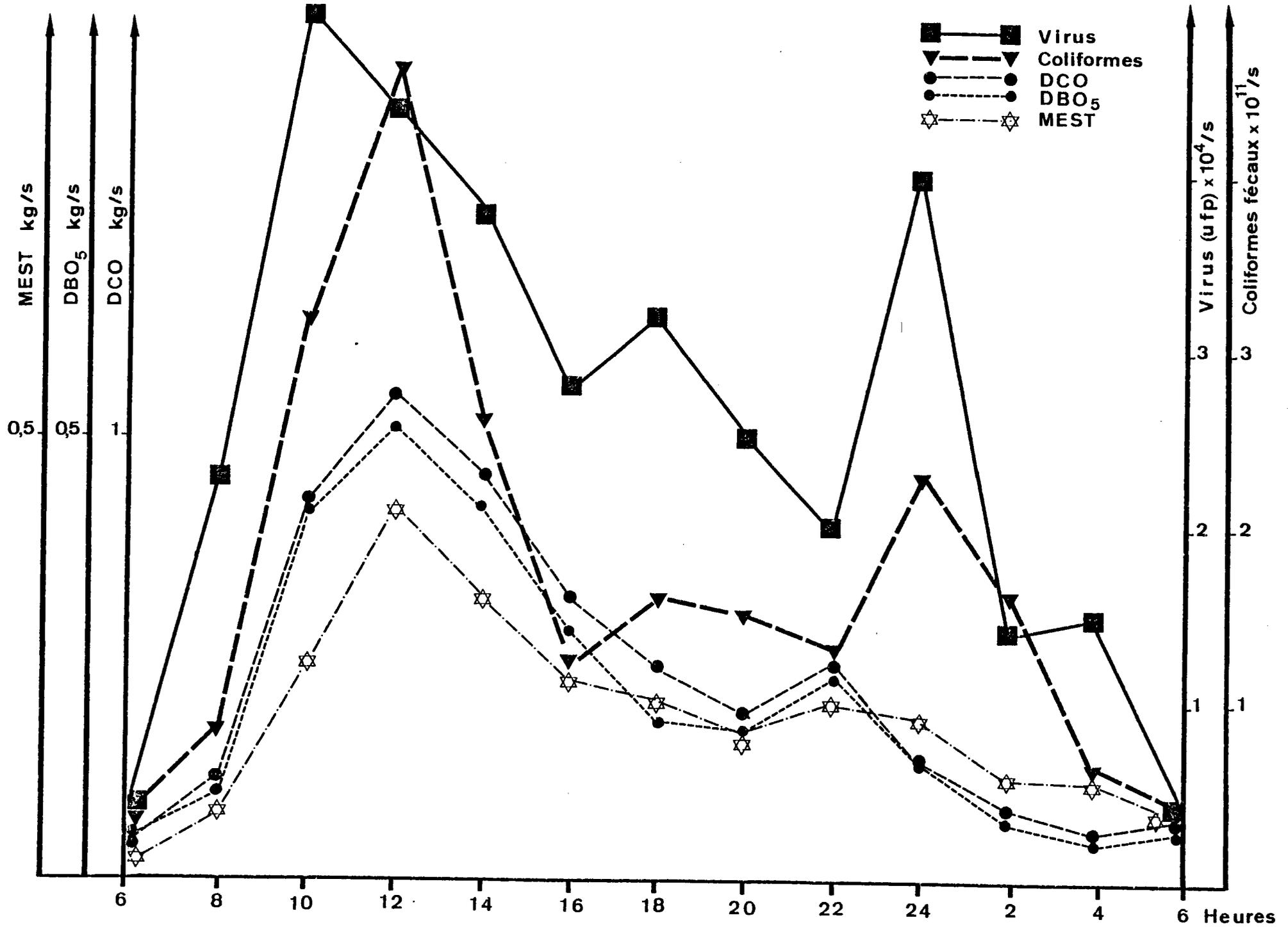
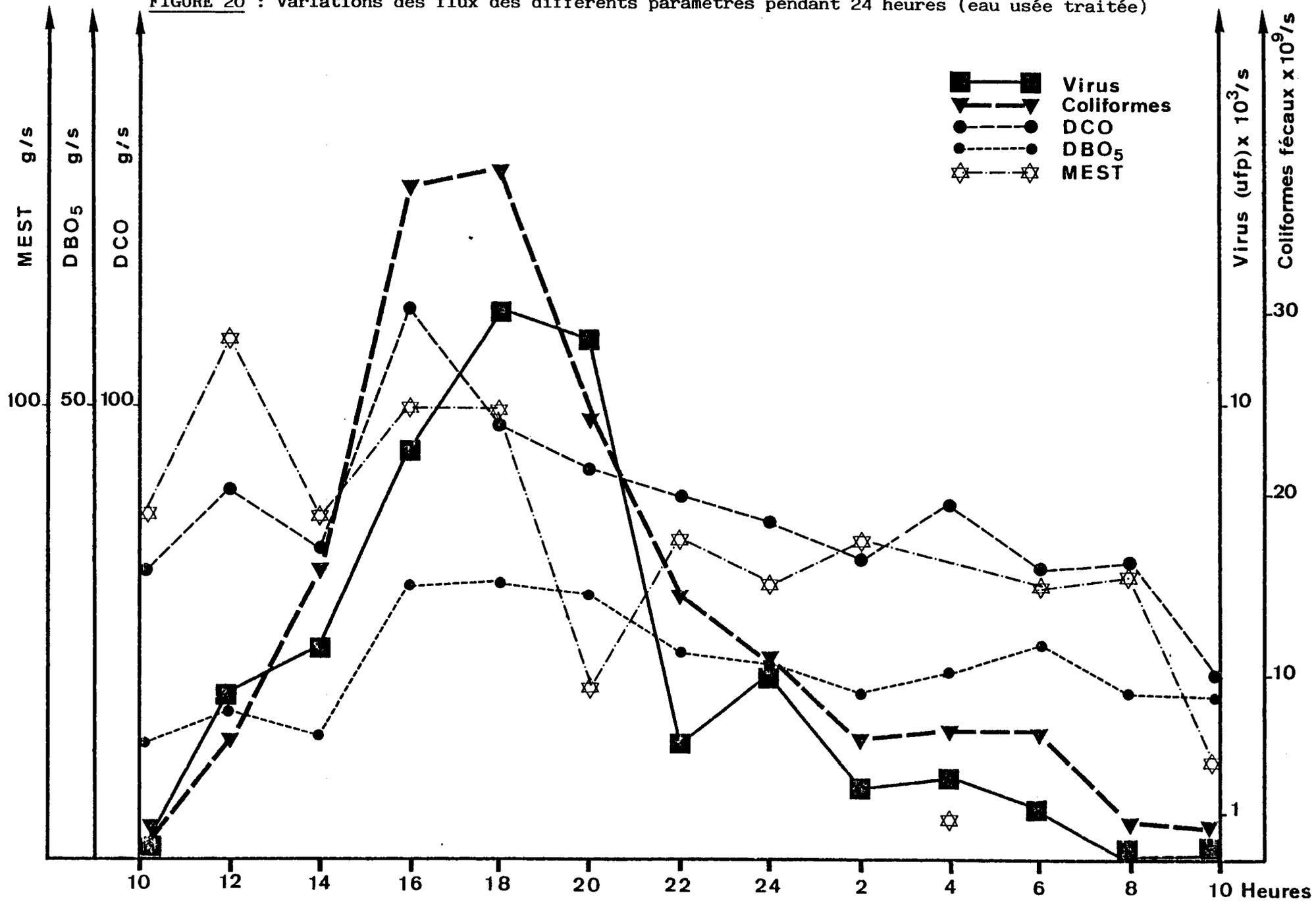


FIGURE 20 : Variations des flux des différents paramètres pendant 24 heures (eau usée traitée)



De 6 h du matin à 12 h, maxima de la pointe, le flux de charge polluante a été multiplié par 16,6 pour la DBO_5 , par 15 pour la DCO et les MEST, par 11 pour les coliformes thermorésistants et par 10 pour les virus, tandis que dans le même temps, le débit a augmenté d'un facteur 1,4 seulement. Ces flux ont décliné jusqu'à 20 h, d'environ 2/3, puis une pointe s'est amorcée vers 22 h pour les flux de DCO et DBO_5 , et vers 24 h pour les flux de coliformes et de virus, ces deux pointes étant décalées. L'augmentation du flux des MEST a été plus discrète dans le même temps. Contrairement à la première pointe des flux où les débits enregistrés entre 22 h et 24 h décroissent et atteignent leur valeur minimale (1 260 l/s à 24 h). Après cette seconde pointe, les flux ont décliné pour retrouver les valeurs minimales entre 4 h et 6 h du matin.

A 18 h apparaît une légère pointe pour les flux de virus et de coliformes thermorésistants ; par contre, aucune variation pour les flux des paramètres DBO_5 , DCO et MEST. Cette observation reste donc à confirmer.

A la lecture de la figure 20, les variations des flux des paramètres étudiés dans les eaux usées traitées apparaissent moins synchrones que pour les eaux usées brutes. Cependant, après une première pointe, peu apparente des flux de MEST, DCO et DBO_5 , la pointe la plus importante pour les virus et les coliformes thermorésistants est survenue entre 16 h et 18 h. Après quoi, ces valeurs de flux décroissent sans variation remarquable jusqu'aux valeurs minimales à 10 h du matin.

4.3.6. Etude de corrélation entre les flux des paramètres

Les coefficients de corrélation calculés pour les séries de flux des paramètres sont présentés sur le tableau 26 pour les eaux usées brutes et le tableau 27 pour les eaux usées traitées.

Il apparaît ainsi, pour les eaux usées brutes, que les flux de tous les paramètres DBO_5 , DCO, MEST, turbidité, coliformes fécaux et virus sont corrélés au risque de 1 %.

	Flux DBO_5	Flux DCO	Flux MEST	Flux turbidité	Flux coliformes thermorésistants	Flux virus
Flux DBO_5	1,00	0,99	0,94	0,96	0,87	0,82
Flux DCO		1,00	0,95	0,96	0,86	0,82
Flux MEST			1,00	0,93	0,90	0,81
Flux turbidité				1,00	0,84	0,79
Flux coliformes thermorésistants					1,00	0,86
Flux virus						1,00

TABLEAU 26 : Coefficient de corrélation entre les flux des paramètres virus, Coliformes, DBO_5 , DCO, MEST, turbidité dans les eaux usées brutes.

	Flux DBO ₅	Flux DCO	Flux MEST	Flux turbidité	Flux coliformes thermorésistants	Flux virus
Flux DBO ₅	1,00	0,70*	0,08	- 0,012	0,80*	0,77*
Flux DCO		1,00	0,50	0,11	0,84*	0,75*
Flux MEST			1,00	0,24	0,39	0,31
Flux turbidité				1,00	0,11	0,17
Flux coliformes thermorésistants					1,00	0,92*
Flux virus						1,00

TABLEAU 27 : Coefficient de corrélation entre les flux des paramètres virus, coliformes, DBO₅, DCO, MEST, turbidité pour les eaux usées traitées.

* Coefficient de corrélation significatif au risque de 1 %.

Dans les eaux usées traitées, les seules corrélations significatives au risque de 1 % ont été observées entre les flux des paramètres DBO_5 , DCO, coliformes fécaux et virus. Les flux de MEST et de turbidité ne sont corrélés à aucun autre flux de paramètre, excepté une corrélation significative au risque de 1 % entre les flux de DCO et de MEST.

4.3.7. Etude du rapport virus / coliformes fécaux

Nous avons effectué le rapport des résultats concentration de virus / concentration de coliformes thermorésistants pour chaque échantillon d'eau usée brute et d'eau usée traitée. Ces résultats sont présentés sur le tableau 28.

Dans les eaux usées brutes, le rapport virus / coliformes thermorésistants varie de 1 particule virale pour 1.10^7 coliformes à 1 particule virale pour $4,3.10^6$ coliformes. Dans les eaux usées traitées, le rapport varie de 0 à 1 particule virale pour $6,2.10^6$ coliformes.

4.3.8. Evaluation des temps de rétention de l'eau usée sur la station d'épuration

Etant donné les variations importantes des flux des paramètres dans les eaux usées brutes et traitées, le temps de rétention des eaux usées sur la station est un facteur à prendre en considération pour le calcul des rendements d'épuration. Nous avons donc déterminé ce temps de rétention de deux manières :

- d'une part, par un calcul théorique à partir du débit des eaux usées,
- d'autre part, par une méthode empirique, utilisant les variations de concentration d'un paramètre dans les eaux usées brutes et traitées.

Heure de prélèvement	Eau usée brute	Eau usée traitée
	Virus / Coliformes thermorésistants x 10 ⁶	
6	1 / 8,2.10 ⁶	
8	1 / 3,6.10 ⁶	
10	1 / 6,6.10 ⁶	0
12	1 / 10,5.10 ⁶	1 / 1,7.10 ⁶
14	1 / 6,8.10 ⁶	1 / 3,3.10 ⁶
16	1 / 4,5.10 ⁶	1 / 4,1.10 ⁶
18	1 / 5,2.10 ⁶	1 / 3,1.10 ⁶
20	1 / 6 .10 ⁶	1 / 2,1.10 ⁶
22	1 / 6,7.10 ⁶	1 / 5,8.10 ⁶
24	1 / 5,8.10 ⁶	1 / 2,6.10 ⁶
2	1 / 10,7.10 ⁶	1 / 4,1.10 ⁶
4	1 / 4,3.10 ⁶	1 / 3,8.10 ⁶
6	1 / 11,4.10 ⁶	1 / 6,2.10 ⁶
8		0
10		0

TABLEAU 28 : Rapport $\frac{\text{Virus (UFP/l)}}{\text{Col. therm. x } 10^6 \text{ (/l)}}$ dans les échantillons d'eaux usées brutes et traitées en fonction des heures de prélèvements.

4.3.8.1. Evaluation théorique du temps de rétention

Le temps de rétention des eaux usées sur la station d'épuration varie avec le débit des eaux usées. Connaissant les volumes des bassins (décantation primaire, boues activées et décantation secondaire) et les mesures de débits au cours des 24 heures d'expérimentation, le temps de rétention théorique a été calculé pour chaque heure. Les résultats exprimés en heure et minute sont présentés sur le tableau 29.

Au cours des 24 heures d'expérimentation, le temps de rétention théorique sur la station d'épuration a varié de 4 heures et 45 minutes (à 12 heures) à 8 heures et 29 minutes (à 24 heures).

Les variations des temps de rétention ainsi calculés sont inversement proportionnelles aux variations du débit.

4.3.8.2. Evaluation empirique du temps de rétention

Pour cette évaluation empirique du temps de rétention, nous avons choisi pour traceur la variation des flux de virus dans les eaux usées brutes et traitées. En effet, ce sont les seuls paramètres, avec les coliformes thermorésistants, qui ont présenté encore des variations de charges sur 24 heures, et que les virus ne se sont pas multipliés par le traitement d'épuration biologique. Il faut cependant supposer que les variations de concentration observées dans les eaux usées traitées ne sont que la résultante des variations de concentration dans les eaux usées brutes et que donc, il n'y a pas de relargage de virus lors d'un stade de traitement.

Nous avons alors recherché la meilleure corrélation pouvant exister entre les flux de virus dans les eaux usées brutes et dans les eaux usées traitées pour les deux séries de résultats non décalés dans le temps, puis décalés de 2 heures, 4 heures, 6 heures et 8 heures.

Pour les séries non décalées et décalées de 2 heures, les résultats des analyses virologiques effectuées en sortie de 8 h à 10 h le jeudi ont été reportés en début de journée du mercredi. Cela a permis de chercher les corrélations pour un nombre identique de couples de valeurs et l'utilisation de séries de résultats identiques en nombre.

Heure	Débit	Temps de rétention
6	1 480	6 h 52
7	1 480	6 h 52
8	1 620	6 h 16
9	1 880	5 h 24
10	2 100	4 h 50
11	2 100	4 h 50
12	2 140	4 h 45
13	1 950	5 h 13
14	1 900	5 h 21
15	2 050	4 h 57
16	2 000	5 h 05
17	1 900	5 h 21
18	1 800	5 h 39
19	1 760	5 h 47
20	1 830	5 h 33
21	1 850	5 h 30
22	1 410	7 h 13
23	1 330	7 h 39
24	1 260	8 h 04
1	1 200	8 h 29
2	1 300	7 h 50
3	1 500	6 h 47
4	1 470	6 h 55
5	1 440	7 h 03
6	1 480	6 h 52
7	1 500	6 h 47
8	1 680	6 h 03
9	1 850	5 h 30
10	2 000	5 h 05

TABLEAU 29 : Temps de rétention théorique sur la station d'épuration (volume total de 36 640 m³) en fonction du débit de l'eau usée.

Les coefficients de corrélation existant entre les séries de résultats de flux viraux en entrée et en sortie pour des décalages de 0 h à 8 h sont présentés sur le tableau 30. La significativité des coefficients de corrélation a été donnée pour 1 %, 2 %, 5 % et 10 % de risque.

La seule corrélation significative au risque de 5 % et même de 2 % apparaît avec un décalage de 6 heures entre les séries des résultats de flux de virus dans les eaux usées brutes et traitées. Au risque de 10 %, il existe également une corrélation positive pour un décalage de 4 heures.

Décalage entrée-sortie	0 h	2 h	4 h	6 h	8 h
Coefficient de corrélation (n = 12)	0,141	0,387	0,563	0,658	0,426
Significativité au risque de 1 %	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
Significativité au risque de 2 %	N.S.	N.S.	N.S.	S.	N.S.
Significativité au risque de 5 %	N.S.	N.S.	N.S.	S.	N.S.
Significativité au risque de 10 %	N.S.	N.S.	S.	S.	N.S.

TABLEAU 30 : Coefficient de corrélation et significativité des corrélations pour des séries de flux de virus en entrée et en sortie de station d'épuration avec un décalage de 0 h, 2 h, 4 h, 6 h et 8 h.

4.3.9. Efficacité d'épuration de la station de Nancy vis à vis de quelques paramètres physico-chimiques, bactériologiques et virologiques.

Les calculs des rendements d'épuration de la station pour les paramètres DBO_5 , DCO, MEST, turbidité, coliformes thermorésistants et virus ont été effectués par intégration graphique des résultats sur 24 heures de l'étude.

Pour cela, les surfaces correspondant aux variations des flux des paramètres dans les eaux usées brutes et traitées sur 24 heures ont été évaluées par pesée et l'expression suivante donne le rendement d'épuration :

Exemple :

$$\text{Rendement d'épuration (DBO}_5\text{) (\%)} = \left(1 - \frac{\text{Poids surface flux de DBO}_5\text{ eau épurée}}{\text{Poids surface flux de DBO}_5\text{ eau brute}}\right) \times 100$$

Ces rendements d'épuration correspondent à un temps de rétention de 4 heures, ce qui est le décalage observé entre les prélèvements dans les eaux usées brutes et traitées.

Les résultats sont présentés sur le tableau 31.

	DBO ₅	DCO	MEST	Turbidité	Coliformes thermorésistants	Virus
Rendement d'épuration (%)	90	83,5	66	92,4	92	84,3

TABLEAU 31 : Rendements d'épuration des paramètres DBO₅, DCO, MEST, turbidité, coliformes thermorésistants et virus, intégrés sur 24 heures et avec un temps de rétention de 4 heures.

Pour les paramètres physico-chimiques, les rendements d'épuration de la DBO₅, de la DCO et de la turbidité ont été respectivement de 90 %, 83,5 % et 92,4 %. L'élimination des matières en suspension a été moins performante : 66 %. Le paramètre turbidité n'est généralement pas présenté lors des bilans d'épuration, mais il est parfois considéré pour les traitements tertiaire des eaux usées. Les coliformes thermorésistants subissent un abattement de 92 % après épuration, soit environ 2 logarithmes ; pour les virus, cette élimination est moindre : 84,3 %.

4.3.10. Comparaison des trois types de prélèvements effectués.

Dans le protocole d'échantillonnage des eaux usées établi pour cette étude des flux de pollution sur 24 heures, trois types de prélèvements ont été réalisés :

- prélèvement ponctuel (au trempé) de 22 litres toutes les deux heures, en entrée et en sortie,
- prélèvement pompé en continu, collectant un échantillon de 22 litres sur 24 heures, en entrée et en sortie,
- prélèvement pompé séquentiellement 15 minutes par heure, collectant un échantillon de 22 litres sur 24 heures en entrée et en sortie.

Les résultats des analyses physico-chimiques, de la numération des coliformes thermorésistants et des virus de ces trois types d'échantillons ont été présentés sur les tableaux 32 pour les eaux usées brutes et 33 pour les eaux usées traitées.

Dans ces tableaux, les résultats concernant les échantillons ponctuels sur 24 heures ont été présentés sous deux formes : d'une part, les valeurs minimales et maximales des paramètres observés sur les 24 heures, et d'autre part, les valeurs moyennes obtenues par intégration graphique des variations des concentrations de ces paramètres sur 24 heures.

Pour les eaux usées brutes, les résultats des paramètres pH, résistivité et turbidité sont très voisins selon les trois types de prélèvements. Les résultats des autres paramètres étudiés dans les échantillons pompés séquentiellement et en continu restent du même ordre de grandeur que les résultats moyens des échantillons ponctuels intégrés sur 24 heures, avec cependant des différences de 25 % pour la DBO_5 , 24 % pour la DCO, 28 % pour les MEST, 48 % pour les coliformes thermorésistants et 42 % pour les virus. Ces écarts plus importants pour les coliformes thermorésistants et les virus sont explicables compte tenu des dilutions importantes nécessaires à la numération des bactéries dans les eaux usées et de l'étape de concentration des virus, ainsi que de leur révélation sur les systèmes cellulaires.

		Prélèvement pompé séquentiellement	Prélèvement pompé en continu	Prélèvement au trempé		Valeur inté- grée sur 24 h
				Etendu des valeurs sur 24 heures		
pH		7,5	7,6	7,5	--- 8,0	7,82
MEST	mg/l	130	150	19	--- 198	109
Résistivité	Ω/cm	1390	1390	1223	--- 1505	1377
Turbidité	J.T.U.	48	45	8	--- 90	49,6
DBO ₅	mg/l	116	91	21	--- 241	121
DCO	mg/l	228	204	50	--- 531	266
Coliformes thermo- résistants	10 ⁶ /l	54,3	134,4	26,8	--- 216,2	104
Virus	UFP/l	27	17,25	2,75	--- 31,75	15,8

TABLEAU 32 : Résultats des analyses physico-chimiques, bactériologiques et virologiques des échantillons d'eaux usées brutes prélevés par pompage séquentiel et en continu sur 24 heures.

		Prélèvement pompé séquentiellement	Prélèvement pompé en continu	Prélèvement au trempé	
				Etendu des valeurs sur 24 heures	Valeur inté- grée sur 24 h
pH		7,7	7,8	7,0 --- 7,4	7,35
MEST	mg/l	47	1	11 --- 55	40,5
Résistivité	Ω /cm	1390	1390	111,2 --- 14,87	1300
Turbidité	J.T.U.	3,2	3,7	2,8 --- 4,5	3,23
DBO ₅	mg/l	8	11	6 --- 17	13
DCO	mg/l	22	24	20 --- 61	47
Coliformes thermo- résistants	10 ⁶ /l	12,7	9,33	0,4 --- 21,2	8,5
Virus	UFP/l	4,2	6,5	0 --- 6,75	2,7

TABLEAU 33 : Résultats des analyses physico-chimiques, bactériologiques et virologiques des échantillons d'eau traitée prélevés par pompage séquentiel et en continu sur 24 heures.

Les prélèvements séquentiels et en continu ont donné des résultats inférieurs aux résultats moyens des prélèvements ponctuels intégrés sur 24 heures pour le pH, la turbidité, la DBO₅ et la DCO. Par contre, pour les paramètres MEST et résistivité, ces résultats sont supérieurs. Enfin, pour les coliformes thermorésistants et les virus, les résultats issus des deux types de prélèvements composés encadrent les résultats des échantillons ponctuels intégrés sur 24 heures.

Lors de l'inoculation aux cultures cellulaires des liquides d'élution issus des prélèvements séquentiels et en continu, aucun effet cytotoxique n'est apparu, contrairement à certains liquides d'élution issus des prélèvements ponctuels.

Nous pouvons suivre le même schéma de comparaison des résultats avec les eaux traitées ; nous avons observé également des différences entre les résultats des échantillons prélevés en continu et séquentiellement et les résultats des échantillons ponctuels intégrés sur 24 heures : 6 % pour le pH, 14 % pour les MEST, 7 % pour la résistivité, 13 % pour la turbidité, 39 % pour la DBO₅, 54 % pour la DCO, 33 % pour les coliformes thermorésistants et 59 % pour les virus.

L'obstruction du tuyau d'aspiration de la pompe collectant l'échantillon en continu n'a pas permis d'apprécier correctement le taux de MEST présent et ce résultat a été extrêmement faible.

Dans ce cas, pour les échantillons prélevés séquentiellement et en continu, les résultats des paramètres pH, MEST, résistivité et turbidité sont supérieurs à ceux des prélèvements ponctuels intégrés sur 24 heures. Il apparaît l'inverse pour les paramètres DBO₅, DCO, coliformes thermorésistants et virus.

A partir des résultats des paramètres analysés dans les échantillons prélevés en continu et séquentiellement sur 24 heures, nous pouvons calculer les rendements d'épuration de ces paramètres pour les 24 heures de l'étude. Pour chaque type de prélèvement et chaque paramètre, nous avons calculé le rendement d'épuration selon l'expression :

$$\text{Rendement d'épuration} = \left(1 - \frac{\text{Valeur du paramètre eau usée traitée}}{\text{Valeur du paramètre eau usée brute}} \right) \times 100$$

Un décalage de 4 heures a été observé entre la prise d'échantillon dans les eaux usées brutes et les eaux usées traitées ; ces calculs de rendement correspondent donc à un temps de rétention de 4 heures sur la station d'épuration.

Les résultats de rendements d'épuration ont été comparés aux résultats de rendements évalués par intégration des résultats obtenus par échantillonnages ponctuels sur 24 heures. Le tableau 34 rassemble ces trois types de résultats.

	% moyen d'élimination sur 24 heures	% d'élimination prélèvement séquentiel	% d'élimination prélèvement en continu
MEST	66	63,8	-
Turbidité	92,4	93,3	91,7
DBO ₅	90	93,1	88
DCO	83,5	90,3	88,2
E. coli	92,1	76,6	93
Virus	84,3	84,4	62,3

TABLEAU 34 : Comparaison des rendements d'épuration obtenus par trois méthodes d'échantillonnage des eaux usées.

Les rendements d'épuration des paramètres MEST, turbidité, DCO et DBO₅ évalués selon les trois types de prélèvements sont très proches et les différences absolues n'excèdent pas 6,3 %.

Pour les paramètres coliformes thermorésistants et virus, les résultats sont particuliers : dans le cas des coliformes thermorésistants, les prélèvements en continu donnent un rendement très proche (93 %) de celui obtenu par intégration des résultats des prélèvements ponctuels (92,1 %) ; le résultat obtenu avec les prélèvements séquentiels est plus faible : 76,6 %.

Dans le cas des virus, ce sont les prélèvements en continu qui donnent un rendement plus faible (62,3 %) que ceux calculés avec les prélèvements séquentiels et ponctuels intégrés sur 24 heures (84,4 % et 84,3 % respectivement).

Il faut en fait accorder à ce tableau de comparaison une importance relative. En effet, les différences constatées entre les résultats des paramètres pour les trois types de prélèvements d'eaux usées brutes et d'eaux usées traitées se compensent dans le meilleur des cas, ou alors s'ajoutent en accentuant les écarts. Par exemple, pour le prélèvement en continu, la concentration virale dans les eaux usées brutes est faible (17,25 UFP/l), et dans les eaux usées traitées elle est la plus élevée des trois types de prélèvements (6,5 UFP/l). Par conséquent, le calcul du rendement avec ces valeurs donne un rendement faible : 62,3 %.

III. DISCUSSION

La discussion de nos résultats comportera deux parties distinctes :

- optimisation de la méthode de concentration sur poudre de verre et de la quantification des virus,
- étude des flux de virus dans les eaux usées brutes et traitées de la station d'épuration de Nancy.

1. OPTIMISATION DE LA METHODE DE CONCENTRATION SUR POUDRE DE VERRE ET DE LA QUANTIFICATION DES VIRUS

Avant l'application d'une méthode de concentration des virus à l'étude des flux de virus dans les eaux usées brutes et traitées d'une station d'épuration, nous avons cherché à apprécier les conditions et les limites d'utilisation de cet outil de travail en analysant principalement des eaux usées brutes.

En premier lieu, les paramètres techniques relatifs à la méthode de concentration ont été étudiés :

- quantité de poudre de verre,
- vitesse de passage de l'eau,
- volume de l'échantillon,
- rendement de l'élution,
- rendement de la méthode de concentration,
- reproductibilité de la méthode de concentration.

Puis les problèmes inhérents à l'analyse virologique des eaux usées et à la mise en évidence des virus ont été abordés :

- détoxification des liquides d'élution,
- survie des virus dans les eaux usées et les liquides d'élution,
- comparaison de deux méthodes de titrage des virus indigènes dans les liquides d'élution.

1.1. Quantité de poudre de verre

Dans nos essais, le paramètre quantité de poudre de verre (100, 150 et 200 g) n'est pas apparu comme un facteur déterminant. Au contraire, LUCENA GUTIERREZ (1979) a déterminé une quantité optimale de 150 g de poudre de verre pour concentrer les virus à partir d'échantillons de 25 litres d'eaux usées traitées. Pour cet auteur, une quantité plus importante (250 g par exemple) de poudre de verre offrirait sans doute un nombre de site d'adsorption plus important, mais rendrait l'étape d'élution plus difficile.

Sur le tableau 35 sont rassemblées les quantités de poudre de verre utilisées pour différents types d'eaux par les auteurs employant cette méthode et il n'apparaît pas un rapport quantité de poudre / volume filtré bien défini. Pour la concentration des eaux usées brutes et traitées, nous avons choisi de travailler avec 150 g de poudre de verre pour 20 litres, soit un rapport de 7,5 g/l.

Auteurs	Type d'eau	Volume de l'échantillon l	Quantité de poudre de verre g/l
Sarrette <u>et al</u> (1977b)	Eau du robinet	10	5
Vilagines <u>et al</u> (1979)	Eau de rivière (Seine)	500	3
Schwartzbrod et Lucena-Gutierrez (1978)	Eau du robinet	50	3
Schwartzbrod <u>et al</u> (1979b)	Eaux usées brutes et traitées	25	6
Finance <u>et al</u> (1981)	Eau de mer (Barcelone)	20	7,5
Hugues (1981)	Eau usée traitée	{ 10	10
		{ 100	1
	Eau de mer	{ 10	10
		{ 20	5
		{ 60	1,6

TABLEAU 35 : Quantité de poudre de verre utilisée selon le volume et le type d'eau par différents auteurs.

1.2. Vitesse ascensionnelle de l'eau dans l'appareil

Les résultats de ces expérimentations sont assez hétérogènes et il est assez surprenant d'observer qu'une vitesse ascensionnelle de 100 litres par heure donne des résultats au moins équivalents que pour une vitesse de 50 litres par heure. En effet, à vitesse supérieure, l'eau passe plus rapidement au travers du filtre dynamique et les chances d'adsorption des particules virales sur la poudre de verre devraient être diminuées. Il doit en être de même pour les composés et matières en suspension pouvant entrer en compétition avec les sites d'adsorption des particules virales. Dans ses essais, LUCENA GUTIERREZ (1979) peut travailler avec le même appareil à des débits de 80 litres par heure, ainsi que HUGUES (1981) qui peut atteindre 200 litres par heure lorsque l'eau est peu chargée en matières en suspension.

La perte en poudre de verre à la vitesse de 100 litres par heure est négligeable en quantité, 2 à 3 % si les conditions opératoires sont respectées, c'est à dire éviter le passage de bulles d'air en fin de manipulation.

1.3. Volume de l'échantillon

Cette fois encore, nos résultats n'apparaissent pas homogènes. Néanmoins, dans certains cas, les volumes de 5 litres ou 10 litres d'eaux usées brutes et traitées peuvent être optimaux pour la détection des virus. LUCENA GUTIERREZ (1979) et HUGUES (1981) ont fait également ces observations et déterminent un volume optimal de 10 litres pour les eaux usées traitées. Nous avons montré, d'une part, qu'il y avait adsorption et élution de différents ions et molécules sur la poudre de verre (fer, chrome, cuivre, matières organiques) et, d'autre part, que les quantités retenues augmentaient lorsque le volume filtré augmentait. De la même façon, la coloration de la poudre de verre et la turbidité des liquides d'élution sont d'autant plus prononcées que le volume filtré a été important. Les bactéries sont aussi retenues sur la poudre de verre et cela ne nous surprend pas puisque de

précédents résultats avaient fait apparaître leurs possibilités d'adsorption et élution sur des microfibres de verre (BLOCK et ROLLAND, 1979) Il reste à savoir si l'adsorption de ces molécules (matières en suspension et bactéries) se fait au détriment des virus, comme l'ont souligné FARRAH et al (1976), décrivant une concentration des acides humiques sur des filtres adsorbant les virus. Les expérimentations de WALLIS et MELNICK (1967) et SOBSEY et al (1973) ont mis en évidence l'interférence des composés (organiques et anioniques) présents dans les eaux usées avec l'adsorption des virus. L'ajout d'ions aluminium à la concentration optimale de 5.10^{-4} M selon FARRAH et al (1976), FLOYD et al (1978), WALLIS et SHARP (1972a,b,c) a pour but de limiter l'interférence des matières organiques sur l'adsorbant et également de favoriser l'adsorption des virus en créant des liaisons entre les particules virales et les charges de l'adsorbant.

Cependant l'augmentation du volume d'un échantillon est envisageable lorsque l'on cherche à diminuer l'hétérogénéité du milieu.

Selon VILAGINES et al (1979), l'adsorption de cette méthode à la concentration d'un volume de 500 litres d'eau de rivière permet certes d'augmenter le nombre d'échantillons positifs par rapport à l'analyse virologique de 10 litres seulement, mais dans la majorité des essais, la concentration d'un volume 50 fois supérieur ne multiplie pas le titre viral trouvé par 50, mais seulement par 31 dans le meilleur des cas.

La disparité entre les résultats obtenus lors de nos expérimentations quantité de poudre de verre, vitesse ascensionnelle et volume de l'échantillon, révèle l'existence d'autres paramètres influençant l'adsorption et qui ne sont pas encore maîtrisés dans les limites actuelles des conditions opératoires de cette méthode de concentration sur poudre de verre.

1.4. Efficacité de l'élution

L'étape d'élution de cette méthode de concentration pose certains problèmes.

En premier lieu, avec des eaux fortement chargées en matières en suspension (eaux usées brutes), il se produit un colmatage de la colonne de poudre de verre. Ce problème a été également constaté par HUGUES (1981).

En second lieu, l'élution des virus de la poudre de verre n'est jamais totale. Nous avons montré que seulement 60 % des virus indigènes sont présents dans la première fraction de 35 ml. En travaillant avec des eaux potables et des virus ajoutés, SCHWARTZBROD et LUCENA-GUTIERREZ (1978) retrouvent 88 % des virus dans la première fraction de 25 ml, et SARRETTE et al (1978) 96 % dans les premiers 25 ml. Nos résultats suggèrent donc à nouveau l'interférence des matières en suspension et des molécules organiques lors de la mise en oeuvre de cette technique d'élution de la poudre de verre.

Après passage au travers de la colonne de poudre de verre, le pH du tampon d'élution varie de 9,5 à 10,5 maximum selon les eaux usées brutes ou traitées. Selon METCALF et al (1974), le pH du liquide d'élution doit être supérieur à 10,5 pour être assuré d'une élution correcte des virus. Cela explique donc les faibles rendements de l'élution obtenus avec des eaux usées qui abaissent le pH des liquides d'élution, phénomène observé dans une moindre mesure avec des eaux potables (JORET et al, 1980a).

Enfin l'utilisation d'un tampon glycine soude à pH 11,5 peut entraîner a priori l'inactivation de certaines souches virales. Plusieurs auteurs ont vérifié l'importance de cette inactivation. Ainsi METCALF et al (1974) décrivent une faible inactivation du poliovirus 1 à pH 11,5 en 10 minutes ; JAKUBOWSKI et al (1975) note au moins 50 % de perte du titre viral avec du poliovirus 1 en 3 minutes ; FOLIGUET et al (1978) observent un abattement de 2 logarithmes en 30 minutes pour le poliovirus 1 et en 40 minutes pour le virus Coxsackie B3. Les Adénovirus de type SV 11 et les Rotavirus sont eux aussi inactivés en moins de 5 minutes pour les pH supérieurs à 10 (FIELDS et METCALF, 1975 ; JACOBS et SOBSEY, 1978). Par contre, LUCENA-GUTIERREZ (1979) n'observe aucune inactivation virale du poliovirus 1 à ce même pH en 5 minutes.

Dans les conditions normales, l'élution n'excède pas 5 minutes, sauf si la poudre de verre est quelque peu colmatée. Mais nos résultats montrent qu'un liquide d'élution peut rester 60 minutes à pH 10,5 environ sans baisse de titre viral par rapport à un liquide d'élution immédiatement neutralisé.

1.5. Rendement de la méthode de concentration sur poudre de verre

La détermination d'un rendement d'une méthode de concentration en virologie des eaux s'effectue classiquement avec des ajouts dosés. C'est ce que nous avons réalisé, dans un premier temps, avec des échantillons d'eaux usées brutes et traitées, et les rendements moyens obtenus ont été de 7,6 % et 54,8 % respectivement. Les rendements observés avec les eaux usées traitées sont comparables avec ceux obtenus par SCHWARTZBROD et LUCENA-GUTIERREZ (1978), ainsi que SARRETTE et al (1978). En ce qui concerne les eaux usées brutes, les faibles rendements obtenus sont imputables en grande partie à une compétition d'adsorption entre virus et composés des eaux usées au niveau des sites d'adsorption sur la poudre de verre. De plus, l'adsorption immédiate des virus sur les matières en suspension, ou leur agrégation spontanée lors d'ajouts dosés limite l'intérêt de cette technique pour déterminer le rendement.

L'étude des concentrations successives d'un même échantillon d'eaux usées brutes et l'application d'une méthode de calcul basée sur la régression linéaire seules permettent d'évaluer le rendement de cette méthode de concentration avec des virus indigènes de 12 à 25 %, valeurs assez modestes. Par ailleurs, pour les eaux usées brutes, l'inoculation directe s'avère toujours meilleure que la concentration de volumes de 5, 10 ou 20 litres et, comme l'a montré SCHWARTZBROD et al (1979b), il existe un facteur 10 entre l'inoculation directe et la concentration sur poudre de verre.

L'étude de la reproductibilité de cette méthode de concentration a fait apparaître des écarts maxima de 3,6 % entre les titres viraux malgré l'homogénéisation de l'eau. Pour d'autres méthodes de concentration utilisant des medias filtrants, la reproductibilité des concentrations serait meilleure et fluctuerait d'un facteur 1,25 (JORET et al, 1981). Ces écarts importants rejoignent l'hétérogénéité des résultats des essais poudre de verre, vitesse ascensionnelle et volume de l'échantillon et confirment l'hypothèse de paramètres non maîtrisés.

1.6. Détoxication des liquides d'élution

Le rôle néfaste des composés organiques lors de l'étape de concentration et d'élution des virus de la poudre de verre a déjà été discuté précédemment. Les composés adsorbés sur la poudre de verre et élués avec le tampon glycine (métaux lourds, hydrocarbures*, détergents*) provoquent des effets toxiques sur les tapis cellulaires. Ces effets toxiques ont déjà été mesurés pour les phénols par POTTENGER et al (1980).

C'est un problème auquel on se heurte lors de la mise en évidence des particules virales sur cultures cellulaires, et plusieurs auteurs en font état (LAVERAN et al, 1974 ; BURAS, 1974 ; SCHMIDT et al, 1978 ; RAO, 1977). En analyse de routine, avec des eaux usées non concentrées, notre laboratoire rencontre ces problèmes pour 3 à 5 % des échantillons environ.

Pour tenter d'éliminer, au mieux de réduire ces effets toxiques, différentes techniques peuvent être employées.

L'ajout de sérum foetal de veau a été proposé comme ayant un effet protecteur des cellules (SCHMIDT et al, 1978 ; KOTT et al, 1978).

La dilution des échantillons permet d'atténuer les effets toxiques, mais si l'on désire inoculer la totalité de l'échantillon, le nombre de flacons de cellules à inoculer augmente, ainsi que l'intervalle de confiance de la numération.

La centrifugation des échantillons à inoculer est également pratiquée par certains auteurs à différentes vitesses (RAO, 1972 ; FATTAL et al, 1974).

Le chloroforme nous est apparu intéressant à essayer en vertu de son emploi en chimie organique et comme solvant d'extraction des molécules organiques et micropolluantes des eaux (WEBB, 1978). De plus, la décontamination des liquides d'élution s'effectue déjà au chloroforme selon la technique de BURAS (1974), et ce solvant est inactif à l'encontre des entérovirus (FELDMANN et WANG, 1961).

* Résultats non rapportés

Les résines Amberlite XAD 2 sont depuis quelques années très employées dans le domaine de la recherche et analyses des molécules organiques, micropolluants et composés toxiques (JUNK et al, 1974; REES et AU, 1979 ; UEMATZU, 1979 ; BERKANE et al, 1977 ; CHENG, 1977) et leur aptitude à isoler ces molécules est importante. Le caractère hydrophobe de ce type de résine polymérique n'ayant a priori aucune propriété d'adsorption vis à vis de macromolécules protéiniques telles que les virus, nous a permis d'envisager son emploi pour détoxifier les liquides d'élution. Des essais préliminaires effectués avec une souche de poliovirus Hyl. 1.254 ont montré que la résine amberlite XAD 2, prétraitée avec du Earle ou une solution de MEM à 2 % de sérum de veau ne retenait pas les particules virales (résultats non rapportés).

Les expérimentations réalisées nous ont permis de classer ces méthodes en fonction de leur faculté à détoxifier les liquides d'élution vis à vis des cultures cellulaires d'une part, et d'autre part, en fonction de la baisse du titre viral qu'elles peuvent occasionner.

Ainsi l'ajout de sérum foetal dans la proportion de 5 % ne permet pas de réduire dans nos expérimentations l'effet toxique des liquides d'élution. En fait, le sérum foetal ne peut avoir un rôle détoxifiant que si les molécules toxiques se conjuguent aux protéines du sérum (albumine par exemple) ou si les composants du sérum jouent un rôle d'écran protecteur sur le tapis cellulaire.

Par contre, la dilution des liquides d'élution au 1/2, 1/5 et 1/10 selon les cas, permet d'éliminer l'effet toxique sur les tapis cellulaires. Le passage sur résine XAD 2 réduit la toxicité de 50% environ et il est probable que ses propriétés d'adsorption ne s'adressent pas à tous les composés toxiques présents dans les liquides d'élution (métaux lourds, sels toxiques).

La centrifugation pratiquée à 10 000 g pendant 10 minutes et la filtration sur membrane de porosité 0,45 μ m permet une réduction de toxicité de 70 %. L'effet détoxifiant de ces deux techniques s'explique principalement par l'élimination de particules toxiques (corps bactérien...) en suspension dans les échantillons.

Enfin, l'extraction par le chloroforme des liquides d'élution permet l'obtention d'inoculum très peu toxique. Récemment STARCK et al (1981) ont montré la supériorité du fréon sur le chloroforme et l'éther pour la détoxification d'échantillons toxiques sans que cette technique altère le titre viral de ces échantillons.

En ce qui concerne l'effet de ces méthodes sur le titre viral de l'échantillon, la filtration sur membrane entraîne une perte de 34 % à 93 % du titre en virus indigènes, malgré l'utilisation de membrane en acétate de cellulose prétraitée. Le passage sur résine XAD2 engendre une perte de 10 à 40 % des virus selon les essais et la dilution. Par contre, la centrifugation et l'extraction au chloroforme, non seulement n'entraînent pas de perte de virus, mais encore permettent d'obtenir un titre viral plus élevé que le témoin non traité lui-même.

Même si ces deux dernières méthodes semblent être les plus satisfaisantes pour détoxifier des liquides d'élution toxiques, nous ne pouvons dégager "la meilleure technique de détoxification", dans la mesure où les méthodes exposées peuvent être efficaces chacune vis à vis d'un type de toxicité et sont donc, dans ce cas, complémentaires les unes des autres.

1.7. Survie des virus

La survie des virus dans les échantillons d'eaux ou les liquides d'élution est une préoccupation permanente pour les laboratoires de virologie dans la mesure où il existe un délai de quelques heures entre la prise des échantillons et leur inoculation sur cultures cellulaires. Il peut s'agir du transport des échantillons, de l'organisation et emploi du temps du laboratoire et enfin de la disponibilité des cultures cellulaires.

Beaucoup de facteurs affectent la survie des virus : facteur physique tout d'abord tel que la lumière, la température, la physico-chimie du milieu de conservation, et les phénomènes d'agrégation et d'adsorption. Puis les facteurs biotiques : activités biologiques du milieu (bactéries, enzymes) et les différents types de virus.

Dans nos expérimentations, nous nous sommes intéressés au facteur température qui joue un rôle déterminant. Nous avons montré en premier lieu que dans les eaux usées brutes et traitées, stockées à + 4°C pendant trois jours, il n'apparaissait pas d'inactivation des virus ajoutés. CLARKE et al (1964) et BERG et al (1967) ont déjà montré la survie de plusieurs souches virales (poliovirus, virus ECHO 7, ECHO 12, Coxsackie A9) dans des eaux d'égouts. La conservation de nos liquides d'élution à + 4°C est sans problème pendant au moins une semaine. Au delà le titre viral commence à chuter. D'ailleurs JORET et al (1981a) ont montré récemment qu'en présence d'une solution d'extrait de boeuf à 3 % pH 7,5 la survie des virus adsorbés sur des filtres en microfibrilles de verre pendant 24 heures à température ordinaire, plus 24 heures à + 4°C, était équivalente à la survie des virus concentrés sur filtres dans les mêmes conditions et congelés à - 26°C.

Cependant, les résultats présentés par RAO et al (1977) incitent à la prudence puisque ces auteurs observent une perte de 25 à 40 % de virus indigènes dans des eaux usées brutes en 48 h de stockage à + 8°C. Par contre, pour des liquides d'élution en extrait de boeuf 3 %, ils n'observent aucune variation des titres en 7 jours de stockage à + 8°C tandis qu'à une température ordinaire, le titre viral chute. SIGEL et al (1976) ont montré l'excellente survie du poliovirus 1 dans les matières fécales conservées à - 20°C et + 4°C pendant 28 jours, alors qu'à température ordinaire, le titre chute en 7 jours.

Il a été démontré que la présence de matières organiques dans les eaux d'estuaire et de sédiments était un facteur déterminant pour la survie des virus (CLARKE et al, 1956 ; METCALF et STYLES, 1967 ; SMITH et GERBA, 1978 ; LABELLE et GERBA, 1980a,b) et on peut penser qu'un effet similaire survient pour les eaux usées et les liquides d'élution. Cependant la présence de détergent et d'ammoniaque a été démontrée néfaste à la survie des entérovirus et des rotavirus (WARD et ASHLEY, 1978).

D'après nos expérimentations, la congélation des liquides d'élution ne constitue pas une solution idéale après 4 semaines, le titre viral diminuant de 50 % environ, et après 3 mois, le titre viral ayant chuté d'un logarithme. Des observations similaires ont été relatées par LUND (1973) sur le stockage des échantillons à - 26°C. L'ajout de milieux de culture MEM avec une concentration finale de 2 % de sérum foetal de veau n'a pas amélioré la survie des virus dans

nos liquides d'élution stockés à - 26°C. VOS et KAALEN (1965), cités par MERYMAN (1966) lors d'investigations sur les agents cryoprotecteurs de cellules trouvent une faible protection avec ajout de sérum.

Les expérimentations de RIGHTSEL (rapporté par GREIFF et al, 1966) soulignent l'importance des basses températures (de - 70°C à - 197°C) pour la survie des stocks de virus sans baisse de titre pendant 6 mois au moins. Pour cet auteur, l'inactivation des particules virales est engendrée par des modifications physiques associées à des altérations de la structure cristalline des protéines virales, ainsi que des modifications chimiques dues à la concentration des solutés produits par la congélation. En particulier pour les virus à ARN, EIGNER et al (rapporté par GREIFF et al, 1966) ont évalué le temps de demi-vie de molécules d'ARN à 21 jours à + 5°C. Sur la base de cette réaction, et en vertu de l'énergie thermique du système, à - 20°C, le temps de demi-vie serait de 177 jours et à - 180°C de 340 000 jours. En fait, la présence de solutés et autres molécules chimiques accélèrent les réactions d'inactivation. Il serait donc utile d'ajouter au liquide d'élution avant stockage des agents cryoprotecteurs tels que le glycérol, dimethylsulfoxyde (DMSO) (ASHWOOD et SMITH, 1961 ; GREIFF et MYERS, 1961) et le "PPA" (Parker Davis Additive) : lactobionate de calcium et sérum albumine humaine (GREIFF et al, 1964).

1.8. Comparaison de deux méthodes de titrage

Les études comparatives effectuées entre deux méthodes de numération (la méthode des plages et la méthode du nombre le plus probable) ont montré la faible différence existant entre les résultats de l'une et l'autre méthode, tout au moins pour les liquides d'élution ayant un titre viral peu élevé (1 à 28 NPPUC/ml).

Le choix pour l'une ou l'autre méthode est délicat, d'autant plus qu'elles peuvent être considérées complémentaires sur le plan de l'isolement des virus et de la confirmation des effets cytopathiques. Lorsque l'analyse virologique des liquides d'élution par la méthode des plages se révèle difficile pour des raisons de toxicité, la méthode d'inoculation en milieu liquide a été choisie. Mais nous devons souligner que l'emploi de cette technique est peu satisfaisante sur le plan statistique lorsque, pour des raisons pratiques, un faible nombre d'inoculum est utilisé par dilution, inférieur à 10 par exemple. Dans ce cas, les résultats sont encadrés avec un intervalle de confiance

très large interdisant toute comparaison entre les résultats. Récemment HUGUES (1981) a proposé une nouvelle utilisation de la méthode du nombre le plus probable qui permet d'obtenir des résultats encadrés d'un intervalle de confiance excellent.

La méthode de numération des virus en plaque présente elle aussi certains inconvénients qui sont, d'une part, la nécessité de maintenir en vie le tapis cellulaire pendant au moins 2 à 3 semaines pour la mise en évidence des ECHO et des Réovirus, et d'autre part, le risque de destruction des tapis cellulaires par effets toxiques et l'apparition de fausses plages dues à des particules toxiques sur le tapis cellulaire.

D'après LEONG et al (1978) et FOURNIER et al (1978) 40 à 70 % des plages pourraient être dues à des effets toxiques locaux sur les cultures cellulaires. Le clonage et le repiquage que nous avons effectués sur 140 plages de virus indigènes confirment les résultats de ces auteurs puisque seulement 65 % des plages clonées ont donné un effet cytopathogène positif sur le même système cellulaire en tubes. Et toute manière et quelque soit la méthode de numération choisie, l'utilisation d'un seul système cellulaire, et en particulier en lignée continue, constitue un facteur limitant pour la mise en évidence d'un large spectre de virus entériques (GRABOW et al, 1980 ; BRISOU et DENIS, 1980 ; LAVERAN et al, 1974).

2. ETUDE DES FLUX DE VIRUS DANS LES EAUX USEES BRUTES ET TRAITÉES DE LA STATION D'EPURATION DE NANCY

Apprécier les concentrations virales dans les eaux usées, à l'entrée et en sortie d'une station d'épuration, nécessite de dégager une stratégie de prélèvement de telle manière que les résultats puissent représenter au mieux la réalité des flux quotidiens de polluants.

Pour échantillonner dans le milieu environnement, quatre niveaux d'intervention peuvent être envisagés :

1. Homogénéité ou hétérogénéité d'un échantillon ponctuel,
2. Variations instantanées des concentrations virales en un temps donné,
3. Variations horaires des concentrations virales,
4. Variations mensuelles ou saisonnières des concentrations virales.

Dans ce travail, seuls les trois premiers points ont été abordés.

2.1. Homogénéité ou hétérogénéité d'un prélèvement ponctuel

Les essais réalisés dans ce travail sur un échantillon préalablement homogénéisé ont montré que les résultats des analyses physico-chimiques, bactériologiques et virologiques des fractions prélevées étaient proches lorsque le mélange semblait, intuitivement ou a priori correctement réalisé (15 minutes à l'aide d'une pompe). Les écarts à la moyenne sont au maximum de 5,4 % pour la turbidité et les germes totaux, et les titres viraux des fractions ne diffèrent pas entre eux compte tenu de l'intervalle de confiance de la méthode de numération.

Ce type d'homogénéisation semble donc être satisfaisant puisque, même à l'échelle de 200 litres d'eaux usées avec une homogénéisation d'une demi-heure par pompe, les résultats des analyses physico-chimiques, bactériologiques et virologiques effectuées sur trois échantillons par JORET et al (1981b) ont montré des écarts de l'ordre de 10 % maximum pour les mesures physico-chimiques MEST et DCO. Ces écarts atteignent environ 12 % pour les virus, et 10 à 20 % pour les numérations de coliformes et streptocoques fécaux. Pour ces dernières analyses, le faible volume analysé et le nombre de dilutions nécessaires pour obtenir des résultats comptables, sont responsables des écarts importants entre les échantillons.

2.2. Variation instantanée des concentrations

La notion d'échantillons pris simultanément dans un milieu non statique peut soulever de nombreux problèmes quant à sa représentativité, compte tenu du fait qu'à quelques minutes d'intervalle, les concentrations virales, entre autres, peuvent varier énormément. Des études préalables sur eaux de rivière (VILAGINES et al, 1979) ont montré la grande hétérogénéité du milieu, aussi bien pour les petits échantillons que pour les grands échantillons.

Nos propres résultats (dix échantillons prélevés dans une lame d'eau usée à débit constant) ont montré une relative variation d'un échantillon à l'autre, d'un facteur 1,6 sur les mesures de turbidité ainsi que sur les numérations virales (non significative dans ce cas, le titrage étant réalisé par la méthode du NPP). Il faut garder à l'esprit cet aspect négatif d'un échantillonnage instantané pour l'appréciation des variations horaires. En tout cas, si nos résultats laissent apparaître des titres virologiques égaux à 0 ou nettement supérieurs à 0, sans doute du fait des concentrations virales dans les eaux usées très faibles, on peut dire que, dans une eau usée et dans un temps court, les variations instantanées sont faibles et n'ont rien de comparable à celles observées sur rivières ; par exemple variation de 0 à 283 UFP/l dans des échantillons de 20 litres prélevés à 2 minutes d'intervalle sur la Moselle (BLOCK et al, 1978).

Une des raisons possibles de cette homogénéité relative sur 10 minutes des eaux usées brutes est leur mélange dans les collecteurs déjà, puis dans l'ouvrage de prise de la station, et le bac de relèvement des vis d'Archimède.

2.3. Variations horaires

Nous discuterons nos résultats selon l'ordre suivant :

- Variations horaires dans les eaux usées brutes,
- Variations horaires dans les eaux usées traitées,
- Exploitation des résultats - Rendement d'épuration,
- Comparaison des types d'échantillonnages réalisés.

2.3.1. Variations horaires dans les eaux usées brutes

L'enregistrement des débits d'eau usée passée sur la station d'épuration de Nancy pendant une période de 24 heures a permis de montrer que cette station a reçu $146\ 100\ m^3$ d'eaux usées brutes à traiter. Si l'on estime que 25 % des eaux usées sont d'origine industrielle et que 256 000 habitants sont branchés sur le réseau, chaque habitant contribue à apporter 421 litres d'eaux usées par jour. Ces chiffres se rapprochent de ceux cités par SUBRAHMANYAN (1977), soit 600 litres d'eaux usées par jour dans une région nord-américaine.

Ces rejets d'eaux usées ne s'effectuent pas d'une manière constante au cours des 24 heures et les débits enregistrés à la station d'épuration au cours de ces 24 heures passent de $1,2 \text{ m}^3/\text{s}$ à une heure du matin au minimum à $2,14 \text{ m}^3/\text{s}$ à 2 heures du matin (maximum), avec 4 pics principaux sur la période de 24 heures à 12 h, à 15 h, entre 20 et 21 h, et enfin le pic le plus faible à 3 h du matin.

Ces observations sont générales et la position des pics de débit dépend à la fois de la taille des communautés urbaines, de la conception et de la longueur du réseau d'assainissement.

Ainsi, BOUTIN et TORRE (1979b) observent également trois pointes de débit sur la journée, la plus importante entre 10 et 12h, puis vers 16 h et 20 h, et cela pour une petite communauté rurale (600 habitants).

En ce qui concerne les mesures physico-chimiques et microbiologiques, de la même manière, des variations de concentration, et surtout des flux, sont observées journalièrement dans les eaux usées brutes. Globalement, 50 % des charges polluantes sont reçues par la station entre 6 h et 14 h, et ce, en accord avec les observations de MAC COY (1971) travaillant en Grande Bretagne sur des communautés urbaines importantes. Il faut souligner comme nous l'avions déjà observé sur la figure flux entrée que ces charges de pollution arrivent en 2 vagues principales, l'une entre 10 h et 12 h en conjonction avec la pointe de débit, l'autre entre 22 h et 24 h, survenant cette fois malgré un débit minimum des eaux usées. Ce qui contredit les observations de BOUTIN et TORRE (1979b) pour lequel l'eau est utilisée comme fluide porteur des déchets et consommée d'autant plus que la quantité de déchets à éliminer est importante.

Au cours de cette journée d'étude, les caractéristiques physico-chimiques et microbiologiques moyennes des eaux usées brutes obtenues par intégration sur 24 heures des résultats des échantillons ponctuels sont rassemblées ci-après :

pH	7,8
DBO ₅	121 mg/l
DCO	266 mg/l
MEST	109 mg/l
Coliformes fécaux	1.10^8 /l
Virus	15,8 UFP/l

Ces mesures physico-chimiques sont caractéristiques d'une eau usée urbaine et le rapport DCO / DBO₅ de 2,2 témoigne d'une bonne biodégradabilité des eaux usées.

Par contre, les concentrations de microorganismes peuvent présenter certaines différences par rapport à celles observées par d'autres, aussi bien pour les coliformes fécaux (Tableau 36) que pour les virus (Tableau 37).

Auteurs		Concentration de coliformes fécaux
Mac Coy	(1971)	1,8 - 18.10 ⁶ /100 ml (saison humide) 0,18 - 40.10 ⁶ /100 ml (saison chaude)
Berg et Metcalf	(1978)	38 000 - 4,6.10 ⁶ /100 ml (automne)
Boutin <u>et al</u>	(1979a)	4.10 ⁷ /100 ml
Boutin et Torre	(1979b)	1 - 30.10 ⁶ /100 ml
Hugues	(1981)	8,8.10 ⁷ /100 ml (Cagnes sur Mer) 3,4.10 ⁷ /100 ml (Cannes)

TABLEAU 36 : Concentration de coliformes fécaux dans les eaux usées brutes.

Les méthodes de titrage et d'identification des coliformes fécaux dans le milieu hydrique sont suffisamment standardisées et appliquées dans l'ensemble des laboratoires pour que des résultats puissent être comparés sans que les méthodes soient mises en cause. Les différences observées entre les résultats des auteurs sont sans doute imputables aux phénomènes de dilutions des eaux usées (quantité d'eau pour transporter les déchets, eaux parasites dans les réseaux d'assainissement, eaux industrielles) et aux différences entre les heures de prélèvements.

Cependant l'importance des matières en suspension dans de telles analyses, leur présence dans une dilution ou non entraînent une modification importante du taux de bactéries.

Nos résultats restent voisins de ceux présentés par différents auteurs, ce qui n'est pas étonnant, étant donné l'excrétion normale et constante des coliformes fécaux, bactéries commensales des intestins chez l'homme.

Auteurs		Concentrations virales
Kelly et Sanderson	(1960)	2 - 44 UFP/100 ml
Kelly et Sanderson	(1960)	200 - 300 ECP 50/l
Clarke <u>et al</u>	(1964)	7 000 UFP/l
Chin <u>et al</u>	(1967)	2 000 - 5 000 UFP/l
Wallis et Melnick	(1967)	16 - 185 UFP/l
Windle-Taylor	(1968)	28 - 1800 UFP/l
Shuval <u>et al</u>	(1969)	91 - 1 711 UFP/l
Berg	(1971)	260 UFP/l
Rao <u>et al</u>	(1972)	3 150 UFP/l (été) 11 575 UFP/l (hiver)
Berg	(1973a)	31 - 106 UFP/l
Lund et Ronne	(1973)	10 TCIP 50/ml
Buras	(1974)	1 000 - 80 000 UFP/l
Nupen <u>et al</u>	(1974)	100 000 UFP/l
Buras	(1976)	600 - 49 200 UFP/l
Fattal et Katzenelson	(1976)	220 - 3 180 UFP/l
Rao <u>et al</u>	(1977)	2 900 UFP/l
Selna et Miele	(1977)	$7,9 \cdot 10^4$ UFP/l
Berg et Metcalf	(1978)	16 - 54 UFP/l

TABLEAU 37 : Concentrations virales dans les eaux usées brutes.

Fujioka et Loh	(1978)	27 - 19 000 UFP/1
Hugues <u>et al</u>	(1978)	1 - 86 UFP/1
Sattar et Westwood	(1978)	1 000 UI/1
Schwartzbrod <u>et al</u>	(1979)	38 - 4 600 NPPUC/1
Hugues <u>et al</u>	(1979)	1 - 54,1 NPPUC/1 (Nice)
Katzenelson et Kedmi	(1979)	79 - 8 580 UFP/1
Payment <u>et al</u>	(1979)	2 - 31 UFP/1
Hugues	(1981)	6,1 - 132 NPPUC/1 (Cagnes/Mer) 80 - 2 000 NPPUC/1 (Cannes)

**TABLEAU 37 : Concentrations virales dans les eaux usées
(suite) brutes.**

Par contre, les virus sont des microorganismes qui sont excrétés a priori par quelques individus malades ou porteurs sains, ce qui peut expliquer une grande diversité des concentrations virales retrouvées. En effet le taux d'isolement des virus dans les feces des individus d'une communauté est de 2 à 4 % selon COONG et al (1972), et de 1 à 20 % selon CLIVER (communication personnelle). La présence constante de virus dans les eaux usées a été soulignée par de nombreux auteurs (CHIN et al, 1967 ; LUND et HEDSTROM, 1969b ; BERG, 1973).

A cette diversité géographique et ethnologique vient s'ajouter la variété des méthodes de concentration ainsi que les techniques de mise en évidence sur cultures cellulaires qui limitent l'objectivité et interdit pratiquement toute comparaison.

Les variations journalières de charges polluantes reflètent les schémas de défécation et les habitudes de vie quotidienne de la communauté, selon les données bibliographiques (FAIR et al, 1968; MAC COY, 1971).

Les corrélations entre les flux des paramètres physico-chimiques (DBO , DCO, MEST) et les coliformes fécaux apparaissent normales puisque avec un réseau d'assainissement à temps de séjour court (2 h 30 au maximum), les différents paramètres cités ci-dessus ne peuvent certainement guère évoluer.

Par contre, la présence constante de virus bien corrélée avec les autres paramètres semble moins évidente, d'autant plus que MARZOUK et al (1980) n'ont pas mis en évidence de corrélation entre virus et coliformes fécaux dans des eaux polluées en Israël, tout comme HUGUES (1981) pour les eaux usées brutes de Cannes. Cette corrélation entre les virus et les autres paramètres peut cependant s'expliquer par le fait que dans une population donnée, un pourcentage caractéristique d'individus excrète des virus dans les feces.

A partir de nos résultats et des données bibliographiques rassemblées ci-après, nous proposons un calcul arbitraire permettant de rapporter la quantité de coliformes fécaux et de virus excrétée par habitant.

Quantité d'urines excrétée par jour	1400 ml selon ELIOT et ROWE (1971)
Quantité de fécès	100 g selon MAC COY (1971)
Coliformes fécaux / g fécès	10^7 - 10^9 /g selon GELDREICH (1978)
Virus / g fécès	10^7 selon GELDREICH (1978)
Habitants raccordés sur la station d'épuration	256 000
Volume total passé sur la station	146 096 m ³ /j

Si l'on considère les chiffres rapportés par GELDREICH (1978) à savoir 10^9 coliformes fécaux par gramme de fécès, la quantité quotidienne de coliformes fécaux rejetée est d'environ 10^{11} par jour et par habitant.

La quantité totale de coliformes fécaux reçue sur la station en 24 heures est de $1,46 \cdot 10^{16}$ /jour (compte tenu de nos numérations et des volumes d'eaux usées brutes reçus en 24 heures). Un calcul théorique peut nous amener à estimer la population excrétrice à environ $\frac{1,46 \cdot 10^{16}}{1 \cdot 10^{11}} = 1,46 \cdot 10^5$, soit 146 000 individus, ce qui est inférieur à la réalité de 43 %.

Le même raisonnement effectué pour les virus nous amène à évaluer la population excrétrice à $\frac{2,19 \cdot 10^9}{10^9} = 2,19$ individus.

Ce résultat, extrêmement surprenant, ne peut à l'évidence refléter le niveau de contamination virale de la population nancéien-

ne. Il est sans aucun doute très largement sous-estimé en raison, d'une part, d'un mauvais rendement de la méthode de concentration (de 12 à 25 %) et, d'autre part, de l'utilisation d'un seul système cellulaire pour la mise en évidence des virus.

Les concentrations virales dans les eaux usées ne sont pas constantes, et des variations sont observées tout au long de l'année. Il ressort de certaines investigations de plusieurs auteurs que les concentrations les plus basses surviennent en hiver et les plus fortes d'Avril à Septembre. Ceci est en fait lié à l'épidémiologie au sens large des virus dans les populations.

Au cours de cette étude sur 24 heures, et malgré les faibles concentrations virales trouvées dans les eaux usées brutes, nous avons observé des variations importantes de concentrations virales telles que deux pics majeurs peuvent être définis sans ambiguïté, le premier survenant entre 10 h et 12 h du matin en parfaite corrélation avec les coliformes fécaux et les paramètres physico-chimiques, le second, plus faible en concentration que le premier, mais plus élevé en flux apparaissant à minuit. A notre connaissance, peu d'études similaires ont été réalisées pour les virus des eaux usées. RAO et al (1977) ont réalisé trois expérimentations sur les eaux usées brutes en Inde, à différentes périodes de l'année (Novembre, Mars et Avril). Les variations observées par ces auteurs pour ces trois expérimentations peuvent se résumer en deux maxima de concentration virale sur 24 heures : le premier, le plus important, entre 8 h et 12 h, et le second entre 18 h et 22 h. HUGUES (1981), dans les eaux usées brutes de Cannes, trouve les pics de contamination virale dans les tranches horaires de 12 - 16 h et 18 - 20 h ; RUITER et FUJIOKA (1978) déterminent également deux pics entre 11 h et 14 h, et 20 h - 23 h dans les eaux usées d' Honolulu. Les investigations de SAFFERMAN et MORRIS (1976) effectuées sur les concentrations virales d'un effluent primaire (c'est à dire après sédimentation primaire) font également apparaître deux pics de concentrations virales à 18 h et à 2 h du matin. Ces résultats, décalés dans le temps d'une durée correspondant au temps de décantation primaire s'apparentent à nos observations sur les eaux usées brutes.

Récemment IRVING et SMITH (1981) ont montré aussi les variations similaires de concentrations virales dans les eaux usées de Melbourne pour les Entérovirus, les Adénovirus et les Réovirus, avec cette fois les maxima situés à minuit et les minima à midi.

Les différences de position des pics pouvant exister d'un auteur à l'autre sont en fait imputables en partie à la taille des communautés urbaines et surtout à la disposition et la longueur du réseau drainant les eaux usées vers la station de traitement.

Les variations de concentrations virales dans les eaux usées brutes apparaissent donc bien définies sur 24 heures, avec deux principaux, et cela, quelque soit le lieu géographique et la période de l'année. En ce qui concerne nos résultats, les variations de concentrations virales observées sur 24 heures d'expérimentation sont rigoureusement calquées sur les variations de coliformes fécaux. Les concentrations maximales de virus surviennent donc, dans les eaux usées brutes, aux "pointes fécales" définies par BOUTIN et al (1979) pour les bactéries fécales.

2.3.2. Variations horaires dans les eaux usées traitées

Les caractéristiques moyennes des eaux traitées obtenues par intégration sur 24 heures des résultats des échantillons ponctuels sont rassemblées ci-après :

pH	7,35
DBO ₅	13 mg/l
DCO	47 mg/l
MEST	40,5 mg/l
Coliformes fécaux	$8,5 \cdot 10^6$ /l
Virus	2,7 UFP/l

Les résultats moyens sur 24 heures des analyses physico-chimiques de l'eau traitée rendent compte d'un bon fonctionnement de la station pour l'élimination de la DBO₅ et de la DCO. Si ces deux mesures sont en accord avec les résultats obtenus par l'Institut de Recherches Hydrologiques lors des bilans annuels (1977, 1978, 1979, 1980) et sont conformes aux normes de rejets (circulaire du 10 Juin 1976 relative à l'assainissement des agglomérations et à la protection

sanitaire du milieu récepteur ; J.O. du 21 Août 1976, p. 4256), par contre, le résultat des MEST révèle un taux supérieur à la norme de rejet (qui est de 30 mg/l). Cependant ce résultat ne provient pas d'un échantillon composé sur 24 heures comme cela doit être, mais d'une "moyenne de résultats", ce qui explique peut-être cette différence. La teneur en MEST de l'eau usée traitée est par contre sujette à des variations importantes et aléatoires, non liées aux variations de concentration des MEST dans l'eau usée brute. Ainsi, les variations de débit, donc de temps de rétention sur les décanteurs, les turbulences provoquées par les forces d'inertie ou les différences de densités, l'influence du vent sur les bassins ouverts engendrent une diminution de l'efficacité de la décantation secondaire (CROWTHER et al., 1980).

Les variations de certains paramètres physico-chimiques (DBO_5 , DCO, turbidité, pH, résistivité) sont relativement faibles au cours des 24 heures malgré les fluctuations importantes des concentrations à l'entrée.

Comme pour les études décrites par BOUTIN et al. (1979a) sur plusieurs stations d'épuration urbaines, nous observons un lissage des caractéristiques physico-chimiques de l'effluent en sortie de station d'épuration, mais pour les coliformes fécaux et les virus, apparaît encore la "pointe fécale", étalée dans le temps et décalée.

Les tableaux 38 et 39 présentent les concentrations de coliformes fécaux et de virus dans les eaux traitées rapportées par différents auteurs. Comme nous l'avons déjà discuté précédemment, ces données bibliographiques n'ont qu'un intérêt relatif étant donné les nombreux facteurs pouvant affecter ces résultats (nombre d'habitants sur la communauté, débit, eaux industrielles, eaux parasites, longueur et type de réseau d'assainissement).

De plus, et contrairement aux paramètres physico-chimiques, dans l'eau traitée, les paramètres microbiologiques, coliformes fécaux et virus, montrent des variations importantes de concentration comme dans les eaux usées brutes. Mais il n'apparaît cette fois pour ces paramètres qu'un seul pic majeur sur 24 heures dont le maximum apparaît vers 18 h. Un second pic plus faibles apparaît à minuit. Il existe environ un facteur 10 entre les concentrations minimales et maximales de ces paramètres, comme dans l'eau usée brute d'ailleurs.

Auteurs		Concentration de coliformes fécaux
Mac Coy	(1971)	$1,8.10^8 - 5,5.10^9/1$
Fluegge <u>et al</u>	(1978)	$1,8.10^5 - 6,9.10^6/1$
Boutin <u>et al</u>	(1979a)	$3,2.10^7/1$

TABLEAU 38 : Concentration de coliformes fécaux dans les eaux usées traitées.

De telles variations de concentrations virales ont déjà été observées par FLUEGGE et al (1978) dans une eau traitée d'une station d'épuration de l'Ohio (USA), avec également un facteur 10 environ entre les concentrations minimales et maximales. A la suite de deux investigations en Décembre 1976 et Juin 1977, ces auteurs ont montré l'existence d'un pic majeur de concentrations virales (0,1 UFP/1) entre 2 h et 4 h du matin. Sur le reste des 24 heures, une légère augmentation du titre viral (0,026 UFP/1) apparaît vers 15 h ou vers 18 h sur les graphes présentés par ces auteurs. Contrairement à ce que nous pensons, ces auteurs n'attribuent pas ces variations à celles observables dans les eaux usées brutes durant la même période, et proposent un effet d'inactivation des virus par les U.V. solaires durant le jour. Dans les eaux traitées de la station de Cagnes sur Mer, HUGUES (1981) met en évidence un seul pic de pollution virale entre 14 h et 16 h, et à la station de Cannes, trois pics dans les tranches horaires suivantes : 12 h - 14 h, 16 h - 18 h et 22 h - 24 h. Nous ne pouvons engager la comparaison de nos résultats avec ceux de ces auteurs puisque ce type de résultats dépend directement du temps de rétention des eaux usées sur la station d'épuration et du fonctionnement des stations de traitement.

Les calculs de corrélation effectués entre les flux des paramètres analysés dans l'eau traitée révèlent peu de liaisons significatives. A souligner, d'une part les corrélations positives entre coliformes fécaux et DBO/DCO, ainsi qu'entre virus et DBO/DCO, et virus et coliformes fécaux très fortement corrélés et, d'autre part, les corrélations négatives entre virus et résistivité.

Auteurs		Concentrations virales
Kelly et Sanderson	(1960)	2 UFP/l*
Mack <u>et al</u>	(1962)	1 900 UFP/l
Chin	(1967)	2 000 - 5 000 UFP/l
Grabow	(1968)	0,5 - 60 UFP/l*
Malherbe et Strickland-Cholmey	(1967)	46.10 ⁶ TCD 50/l
Windle-Taylor	(1968)	200 - 800 UFP/l
Grinstein <u>et al</u>	(1970)	max 220 UFP/l
Lund	(1973)	10 - 100 UFP/l*
Buras	(1974)	1 000 - 500 000 UFP/l
Buras	(1974)	600 - 94 000 UFP/l
Kalter et Millstein	(1974)	9 UFP/l
Cliver	(1975)	0,1 - 3 UFP/l
Wellings <u>et al</u>	(1976)	0 - 204 UFP/l (après Cl ₂)
Buras	(1976)	3 000 - 450 000 UFP/l
Buras	(1976)	300 - 44 650 UFP/l
Kool <u>et al</u>	(1976)	81 - 310 UFP/l
Sproul	(1976)	100 UFP/l
Wellings <u>et al</u>	(1976)	0 - 80 UFP/l
Fujioka et Loh	(1978)	7 - 5 222 UFP/l

TABLEAU 39 : Concentrations virales des eaux usées après traitement biologique (effluents secondaires).

Rao <u>et al</u>	(1977)	6 - 13 UFP/1
Sattar et Westwood	(1977)	1 - 50 UFP/1
Selna et Miele	(1977)	0,4 - 130 UFP/1
Berg <u>et al</u>	(1978)	1 - 4 UFP/1*
Berg et Metcalf	(1978)	0,1 - 0,5 UFP/1*
Block <u>et al</u>	(1978)	1 - 100 MPN/1
Fluegge <u>et al</u>	(1978)	0,002 - 0,33 UFP/1
Hugues <u>et al</u>	(1978)	4 NPPUC/1
Kott <u>et al</u>	(1978)	18 - 65 UFP/1
Schwartzbrod et Lucena- Gutierrez	(1978)	2 NPPUC/1
Hugues <u>et al</u>	(1979c)	1 - 41 MPN/1
Hugues <u>et al</u>	(1979b)	1 - 13,5 NPPUC/1
Schwartzbrod <u>et al</u>	(1979b)	3,72 NPPUC/1
Joret <u>et al</u>	(1980b)	1,8 - 115 NPPUC/1

* Résultats calculés à partir des concentrations virales des eaux usées brutes annoncées par l'auteur et en estimant l'abattement au cours du traitement biologique voisin de 99 %.

TABLEAU 39 : Concentrations virales des eaux usées après
(suite) traitement biologique (effluents secondaires)

L'absence de corrélation entre certains paramètres, alors que ceux-ci étaient corrélés dans les eaux usées brutes, montre que l'impact du traitement biologique n'est pas le même pour chacun d'eux. Au contraire, il est intéressant d'observer que l'excellente corrélation entre coliformes fécaux et virus subsiste, ce qui tend à montrer que ces deux types de microorganismes subissent les mêmes effets au cours du traitement.

Les résultats des travaux de BOUTIN et al (1979a) déjà cités précédemment n'ont pas permis de dégager des liaisons significatives entre les caractéristiques chimiques et microbiologiques des effluents traités, ce qui fait conclure ces auteurs à une indépendance absolue entre épuration biologique des matières organiques et l'élimination des germes dans la phase liquide.

L'analyse des résultats de FLUEGGE et al (1978) ne vient pas éclaircir ces questions puisque lors de deux essais à 6 mois d'intervalle sur la même station d'épuration, les résultats obtenus dans certains cas sont contradictoires, c'est à dire en premier lieu, corrélation positive entre virus et DCO, COT, virus et coliformes totaux/coliformes fécaux et absence de corrélation entre virus et turbidité/MEST, et en second lieu, pas de corrélation entre virus et coliformes fécaux/coliformes totaux, et corrélation positive pour virus et DCO, COT, MEST et turbidité.

Nos résultats sont en fait plus proches des corrélations obtenues lors de la première expérimentation de ces auteurs. Cependant notre méthode de concentration virale ne prend pas en compte la totalité des matières en suspension de l'échantillon et il est donc difficile d'admettre qu'une corrélation aussi faible existe entre virus et coliformes fécaux avec les MEST. Beaucoup d'auteurs ont en effet décrit que l'association virus et matières en suspension dans les eaux usées brutes et traitées peut atteindre la proportion de 16 à 100 % (WELLINGS et al, 1976).

2.3.3. Exploitation des résultats - Rendement d'épuration

Parallèlement aux études de corrélation, nous nous sommes intéressés aux rapports de certains paramètres entre eux, d'une part virus/coliformes fécaux et, d'autre part, DCO/DBO₅. Ce rapport virus/coliformes fécaux varie de $1/3,1 \cdot 10^6$ à $1/11,4 \cdot 10^6$ dans les eaux usées brutes, et de $1/1,7 \cdot 10^6$ à $1/6,2 \cdot 10^6$ dans les eaux usées traitées. Pour les eaux usées, BERG et METCALF (1973) avancent les chiffres de $1/7,5 \cdot 10^3$ à $1/2,9 \cdot 10^6$, soit une fourchette assez large.

En fait la valeur et les variations de ces rapports virus/coliformes fécaux sont très variables pour des études effectuées sur des eaux usées différentes avec des techniques d'analyses virologiques différentes, et également dans le cas de notre étude. En effet, les différences de valeurs observées ainsi que leurs variations dans le temps tendent plus à montrer une influence des caractéristiques physico-chimiques des eaux usées sur le rendement de la méthode de concentration, que des variations dues aux fluctuations de débits ou de charges microbiennes des eaux usées. Par ailleurs, BERG et METCALF (1973) ont fait remarquer que les conditions écologiques différentes dans le milieu hydrique (survie, multiplication, adsorption) influencent le rapport virus/coliformes.

L'expression en terme de flux (concentration x débit) de certains paramètres dans l'eau traitée fait apparaître des fluctuations des charges rejetées au cours des 24 heures. Parmi ces fluctuations de charges, en majeure partie dues aux variations de débit se dégage vers 18 h une pointe de flux maxima pour les paramètres DBO_5 , DCO, MEST, virus et coliformes fécaux, alors que les concentrations de DBO_5 , DCO, MEST dans l'eau traitée étaient faibles à 18 h. Par contre, les concentrations de coliformes fécaux et virus sont maximales dans les échantillons de 18 h et représentent ainsi le traqueur de la pointe fécale sur la station d'épuration.

Le calcul des rendements d'épuration de la station d'épuration vis à vis de certains paramètres s'effectue généralement par le rapport entre les flux de pollution rejetés sur les flux de pollution en entrée, et selon l'horaire de la prise des échantillons, il est tenu compte ou non d'un décalage de temps correspondant au temps de rétention des eaux usées sur la cuverie de la station. Le choix d'un temps de rétention moyen approchant le plus la réalité n'est pas une chose facile. En effet, la station d'épuration fonctionnant en système gravitaire, les variations de débits engendrent des variations du temps de rétention théorique dans une gamme de temps de 4 h 45 pour un débit de 2 140 l/s à 8 h 30 pour un débit de 1200 l/s.

L'échantillonnage horaire conduit sur la station effectué toutes les deux heures, avec un décalage initial de 4 heures, ne nous laisse le choix qu'entre un temps de rétention de 4 h, 6 h ou 8 h. De toutes façons, quelque soit le décalage choisi, les calculs de rendements effectués pour chaque heure de prélèvement, et leur moyenne sur 24 heures seront erronées puisqu'il s'agit en fait d'un phénomène continu dans le temps.

Cependant, nous avons calculé les rendements d'épuration pour chaque paramètre par une méthode d'intégration graphique des flux de pollution en entrée et en sortie, avec donc un temps de rétention de 4 h, et qui nous a semblé refléter le plus la réalité de cette question.

En ce qui concerne les paramètres physico-chimiques DBO_5 et DCO, les rendements d'épuration sont très corrects (respectivement 90 % et 83,5 %) et ne diffèrent pas de ceux déterminés lors des bilans annuels effectués par l'Institut de Recherches Hydrologiques (par analyse d'échantillons composés sur 24 heures) sur la station d'épuration (91 % pour le DBO_5 et 92 % pour la DCO en 1980) ; l'élimination des MEST, par contre, n'est que de 66 %...

Il est également intéressant de noter l'élimination relativement importante des coliformes fécaux (92 %) et des virus (84,3 %).

Les bactéries coliformes semblent donc subir un abattement assez important lors du traitement biologique ; de tels résultats ont été obtenus par BOUTIN et al (1979a) pour les coliformes fécaux et totaux avec 92 % d'élimination ; KABLER (1959) et KAMPELMACHER et NOORLE-JANSEN (1970) ont observé également des pourcentages d'élimination important de 90 à 99 % pour des Salmonella (bactéries ajoutées) par épuration biologique. HUGUES (1981) constate un abattement de 84 à 92 % pour les streptocoques fécaux et de 87 à 99 % pour les coliformes fécaux après traitement biologique à Cagnes sur Mer.

D'après les récentes investigations de VAN DER DRIFT et al (1977) réalisées avec une souche d'E. coli, l'élimination bactérienne dans le traitement par boues activées s'effectuerait selon deux processus.

En premier lieu, adsorption rapide des bactéries sur les floccs selon une isotherme d'adsorption de Langmuir. A ce stade, ces bactéries ne seraient pas inactivées. Puis les protozoaires ciliés présents dans les floccs de boues activées sont responsables de cette élimination. Ce processus d'élimination bactérienne par les protozoaires a déjà été souligné dans les eaux d'estuaire (ENZINGER et COOPER, 1976), et de plus, de nombreux protozoaires sont présents dans les floccs de boues activées (CURDS et FEY, 1969 ; COLLIN, 1977 ; PIKE, 1978). Les bactéries lytiques présentes dans les floccs (CURDS et FEY, 1969) seraient également responsables de l'élimination bactérienne.

En ce qui concerne l'élimination virale par le traitement des boues activées, nous disposons de résultats effectués en laboratoire et sur le terrain, et présentés sur le tableau 40.

L'élimination virale par les boues activées étudiée en laboratoire dans la majorité des cas avec du poliovirus de type 1 pour modèle, a été évaluée de 64 à 98 %. Les études effectuées sur le terrain confirment les résultats obtenus en laboratoire puisque pour les virus indigènes, cette élimination est de l'ordre de 79 à 100%. Ces résultats de terrain peuvent a priori montrer que cette élimination virale s'étend à tous les sérotypes des eaux usées connus et quantifiables par les techniques virologiques. Les travaux de SELLWOOD et al (1981) récapitulant sur 3 ans, de 1974 à 1977, les virus isolés dans les eaux usées brutes et traitées d'une station de traitement biologique montrent en effet que le rapport souches virales isolées dans l'eau usée traitée / souches virales isolées dans l'eau usée brute est de 58 % pour les ECHOvirus, 56 % pour les Coxsackie virus, 41 % pour les Adénovirus, 42 % pour les Réovirus et seulement 24 % pour les Poliovirus. Les poliovirus semblent donc survivre moins bien au traitement d'épuration, et cela est une limite à l'utilisation des poliovirus comme indicateur de la présence des virus dans l'environnement (KATZENELSON, 1976).

En fait, de récents travaux (GERBA, 1980) montrent que l'élimination des Rotavirus par les boues activées n'atteint pas les chiffres précités.

Expérimentation en laboratoire		
Virus	% élimination	Auteurs
Bacteriophage T 2	98	Kelly <u>et al</u> , 1961
Poliovirus 1 (MK 500)	64 - 78	Kelly <u>et al</u> , 1961
Coxsackie A 9	96 - 99,4	Clarke <u>et al</u> , 1961
Poliovirus 1 (Mahoney)	79 - 94	Clarke <u>et al</u> , 1961
Poliovirus 1, 2, 3 (Sabin)	76 - 90	England <u>et al</u> , 1967
Poliovirus 1 (Sabin)	98	Malina et Sagik, 1974
Poliovirus 1 (Sabin)	90	Ranganathan <u>et al</u> , 1975
Poliovirus 1 (Mahoney)	90	Block <u>et al</u> , 1979
Réovirus, Enterovirus	92	Malherbe, Strickland-Cholmey, 1967
Expérimentation sur le terrain		
Situation géographique	% élimination	Auteurs
Station de Cagnes/Mer (France) (temps de rétention 3 heures)	79	Hugues <u>et al</u> , 1979
(temps de rétention 4 heures)	60 - 83	Hugues, 1981
Station de Nancy (temps de rétention 0 heure)	98 - 100	Schwartzbrod, 1979
Station de Dadar (Indes)	90 - 99	Rao <u>et al</u> , 1977
?	1,5 log	Lund et Hedstrom, 1969
Bacteriophage F 2 ajouté	37,1	Shuman, 1972
Poliovirus 1 ajouté (Mahoney)	26 - 55	Clarke <u>et al</u> , 1964
Poliovirus 1, 2, 3 (Sabin) (sans ajout)	0 - 12	England <u>et al</u> , 1967
Phage F 2 ajouté	99,97	Safferman et Morris, 1976

TABLEAU 40 : Rendements d'élimination des virus pour des expérimentations en laboratoire et sur le terrain selon différents auteurs.

Cette adsorption des virus se ferait au niveau des chaînes sucrées du floc bactérien (RIDEAU et MORFEAUX, 1976 ; STEINER et al, 1976) et s'effectuerait selon une isotherme d'adsorption de Freundlich (PIKE, 1978) et selon une cinétique du premier ordre (GLASS et O'BRIEN 1980).

Les virus ainsi adsorbés sur les floccs bactériens ne sont pas retrouvés dans leur totalité (CLARKE et al, 1961 ; RANGANATHAN et al, 1974 ; BLOCK et al, 1979b). Et déjà en 1961, KELLY et al obtiennent des cultures bactériennes (Flavobacterium, Klebsiella aerobacter) à partir des boues, capables d'inactiver le poliovirus sous conditions expérimentales. Des observations identiques ont mis en évidence cette activité antivirale des bactéries (MAGNUSSON et al, 1967 ; SHUVAL, 1970 ; SOBSEY et COOPER, 1973).

CLIVER et HERRMANN (1972) ont précisé l'action de quelques enzymes protéolytiques de sources variées (Pseudomonas) vis à vis de certains entérovirus (Coxsackie A9) et compte tenu de la masse et de la diversité des enzymes produites par les systèmes à boues activées (HANKINS et SANDS, 1974), il est probable que l'élimination virale se poursuit au sein des floccs bactériens par "digestion enzymatique".

Comme l'a souligné BERG (1973b), le temps de rétention sur les ouvrages de traitement des eaux est un facteur important. En effet si ces mêmes calculs de rendement pour des prélèvements ponctuels sont effectués avec un non respect des temps de rétention, les erreurs iront dans le sens d'une surestimation de l'efficacité de traitement par rapport aux calculs effectués avec un temps de rétention moyen de 6 h, et selon les heures de prélèvements, atteignent dans certains cas + 26 % (à 12 h par exemple).

A partir de nos résultats des variations horaires des paramètres, nous avons cherché à évaluer le temps de rétention réel des eaux usées sur la station d'épuration lors de notre expérimentation.

Généralement, la détermination des temps de rétention sur des bassins ou la station dans son ensemble, s'effectue par injection de traceurs, produits colorés (MARCH et HAMLINS, 1966), produits chimiques ou produits radioactifs (THOMAS et ARCHIBALD, 1952 ; BURGESS et GREEN, 1958). En fait, les résultats obtenus sont

erronés par les variations de flux hydrauliques, des effets de turbulence et d'inertie, des différences de densité, l'influence du vent sur les surfaces des bassins ouverts, le mode d'injection au traceur (FAIR et al, 1968 ; PIKE, 1978 ; CROWTHER et al, 1980). Pour ces différentes raisons, CROWTHER et al (1980) proposent d'utiliser pour traceur les variations de qualité des influents et effluents et de suivre ces variations par échantillonnage à intervalle de temps très court. Le calcul du temps de rétention s'effectue alors par une analyse complexe de corrélation entre les paramètres des influents et des effluents (BALACHADRAN et al, 1978 ; KAGHAZCHI et al, 1978 ; CROWTHER et al, 1980).

Dans notre étude, les paramètres présentant encore des variations de concentration après épuration sont les coliformes et les virus, les autres paramètres DBO_5 , DCO, MEST, turbidité ayant été nivellés. Les virus peuvent être, à notre avis, utilisés comme traceur pour une évaluation du temps de rétention, étant donné les états physiques particulières, non sédimentables s'ils ne sont pas adsorbés au MEST, et ne pouvant se multiplier lors de l'épuration biologique. Les bactéries coliformes, ne prenant pas part au processus d'oxydation biologique, peuvent être également utilisées comme traceur.

Nous avons recherché les meilleures corrélations existantes entre les séries de flux de virus en entrée et en sortie de station d'épuration avec un décalage de 0 h, 2 h, 4 h et 8 h. Le meilleur coefficient de corrélation (significatif à 98 %) a été obtenu pour un temps de rétention de 6 h, ce qui, de toutes manières, correspond au temps de rétention moyen sur la station d'épuration. Il est à notre avis illusoire de vouloir préciser ce temps de rétention étant donné l'absence de maîtrise des paramètres hydrauliques, des variations de flux sur les ouvrages de la station d'épuration, et de l'intervalle de temps trop important entre chaque prise d'échantillon.

Dans le traitement des eaux usées, il est parfois procédé à une égalisation des flux d'eaux usées afin d'envoyer sur la station de traitement des eaux usées de qualité constante et à débit constant sur 24 h après rétention sur bassin de stockage (LA GREGA et al, 1974) Cela évite d'une part les variations de débits et de charges sur les

bassins, qui comme nous l'avons vu lors de notre étude, influent sur les rendements d'épuration. L'égalisation du flux d'eaux usées permet donc à une station d'épuration par boues activées de travailler à charge constante et à temps de rétention constant. Les rendements en sont donc améliorés.

2.3.4. Comparaison des types de prélèvements réalisés

Il nous reste à discuter, éclairés par ces résultats, la question complexe de savoir quand et comment prélever les eaux usées sur une station d'épuration pour en étudier la concentration virale.

Nous avons montré que la prise d'un échantillon ponctuel dans les eaux usées à un moment donné permet de connaître le titre viral pour cet instant et pour une durée d'environ 10 minutes. Mais les variations du titre viral des eaux usées brutes sont telles sur 24 heures que la prise seule d'un échantillon ponctuel ne peut renseigner avec précision l'expérimentateur. Il est préférable, pour avoir une idée plus juste des choses, de réaliser un mélange de plusieurs échantillons ponctuels sur 1 à 2 heures comme BURAS (1974) le relate dans ses protocoles, et si possible dans un intervalle de temps correspondant à la "pointe fécale".

Dans le cas de Nancy, si dans les eaux usées brutes, la pointe fécale survient en début de journée, dans les eaux traitées, les plus fortes concentrations virales surviennent en fin de journée, et même au milieu de la nuit. Ceci complique fort l'emploi du temps de l'expérimentateur s'il veut prélever des échantillons correspondant au flux maximum dans les eaux usées brutes et traitées, et dans la majorité des cas, les prélèvements en entrée et en sortie de la station sont effectués au même moment. L'utilisation d'échantillonneur automatique présente l'intérêt de collecter des eaux usées sur 24 heures ou une période déterminée, et peut permettre ainsi l'évaluation de la charge virale moyenne journalière.

Les essais que nous avons réalisés par pompage en continu sur 24 heures et par pompage séquentiellement pendant 15 minutes par heure ont donné des résultats assez voisins aux résultats moyens inté-

grés sur 24 heures des 13 prélèvements ponctuels, aussi bien pour les paramètres physico-chimiques que pour les paramètres microbiologiques. Bien que l'échantillonnage intégré sur 24 heures apparaisse représentatif comparé à l'intégration des 13 échantillons horaires, les paramètres physico-chimiques sont dans la plupart des cas sous-estimés par effet de dilution. Les pompes n'étant pas asservies au débit, les eaux pompées pendant les périodes de charge minimale diluaient les échantillons. Pour les paramètres coliformes fécaux et surtout virus, les résultats des échantillons intégrés sont toujours supérieurs à la moyenne des échantillons horaires. L'explication suivante peut être avancée. Les eaux usées moins chargées permettent d'améliorer le rendement des concentrations virales, et d'ailleurs au niveau des systèmes cellulaires, moins d'effets cytotoxiques apparaissent pour les eaux usées brutes.

En effet, pour les eaux usées brutes, lors de l'inoculation des liquides d'élution issus des échantillons ponctuels, nous avons vu apparaître pratiquement pour chaque augmentation de charge polluante, des phénomènes toxiques rendant impossible l'analyse virologique. Il s'agissait principalement des prélèvements de 12 h, 14 h, 16 h et 22 h.

Les prélèvements intégrés sur 24 heures n'ont absolument pas révélés de phénomènes toxiques sur cultures cellulaires, et nos observations sur ce sujet rejoignent ainsi celles de RAO et al (1977). Pour ces auteurs, les effets toxiques apparaissent dans les échantillons ponctuels chaque fois que des eaux industrielles sont mixées aux eaux usées, alors que des échantillons composés sur une partie de la journée ne posent pas ces problèmes.

Outre les risques de colmatage des tuyaux d'aspiration, plusieurs auteurs (HARRIS et KEFFER, 1975 ; BARKLEY et al, 1975 ; SYKES et al, 1978) font état de dépôt de matières organiques autour de la crépine d'aspiration, modifiant ainsi l'environnement du tuyau de prélèvement. Il en résulte des taux plus élevés de DCO, DBO_5 et MEST par rapport à des échantillons au trempé.

En ce qui concerne nos prélèvements composés effectués en continu et séquentiellement, seules les MEST sont en concentration

plus élevée. Les valeurs de DBO_5 et DCO sont inférieures aux valeurs des échantillons ponctuels intégrés sur 24 heures. Même le cycle de purge avant le pompage de l'échantillon ne suffit pas à obtenir un prélèvement correct ; en fait, trois cycles de purge sont nécessaires avant d'obtenir des résultats comparables aux échantillons au trempé (SYKES et al, 1978).

Le choix du mode de fonctionnement d'un appareil échantillonneur automatique pour effectuer un échantillonnage représentatif doit tenir compte des données suivantes :

- asservissement au débit pour que les résultats puissent représenter les flux des paramètres pendant le temps de l'expérimentation,
- prélèvement à intervalle de temps le plus rapproché possible,
- prélèvement d'un volume d'eau suffisant pour être représentatif, soit, à notre avis, de 100 à 200 ml.

En fait, c'est ce dernier critère "volume prélevé" qui déterminera le précédent "intervalle de temps entre chaque prélèvement" dans la mesure où l'on désire obtenir un volume d'échantillon précis pendant le temps de l'expérimentation (par exemple 22 litres dans notre cas).

Bien que nos expérimentations ne permettent pas d'opter pour un mode d'échantillonnage automatique en continu ou séquentiel, l'échantillonnage séquentiel, mais à intervalle de temps rapproché de 5 à 10 minutes, nous semble préférable à un échantillonnage en continu, au "goutte à goutte".

CONCLUSION

Notre travail s'est déroulé en deux temps :

1. Une méthode de concentration des virus s'avérant nécessaire au moins pour des eaux usées traitées, nous avons cherché à maîtriser les paramètres (quantité de poudre de verre, vitesse ascensionnelle, volume de l'échantillon, technique d'élution) pouvant limiter l'efficacité de la technique d'adsorption-élution proposée par SARRETTE et al (1977) et SCHWARTZBROD et LUCENA-GUTIERREZ (1978). Nous avons également cherché à optimiser la mise en évidence des virus entériques sur le système cellulaire utilisé au laboratoire (cellules BGM en lignée continue) en ce qui concerne la détoxification du liquide d'élution et la survie des virus.

2. Nous avons appliqué cette méthode de concentration à l'étude des variations horaires des flux de virus entériques, comparativement aux flux des paramètres physico-chimiques (DBO_5 , DCO, MEST) et bactériologiques (coliformes thermorésistants). Cette étude a été conduite pendant 24 heures sur la station d'épuration biologique de Nancy.

En ce qui concerne la méthode de concentration des virus, les conclusions suivantes ont pu être dégagées de ce travail :

a) La quantité de poudre de verre n'apparaît pas comme un facteur limitant ; il nous a semblé que 150 g de poudre de verre pouvaient être utilisés raisonnablement pour concentrer des échantillons de 20 litres d'eau.

b) La vitesse ascensionnelle de l'eau n'influe pas sur la quantité de virus retrouvée ; un débit de 100 litres par heure convient pour la concentration des virus des eaux résiduaires.

c) Le volume de l'échantillon d'eau usée de 10 litres est dans bien des cas suffisant pour retrouver des virus.

d) Le rendement de l'élution des virus entériques indigènes ne dépasse pas 60 % dans les conditions expérimentales (35 ml de liquides d'élution récupérés).

e) Le rendement de la méthode d'adsorption-élution sur poudre de verre est au maximum de 12 à 25 % pour des eaux usées brutes.

f) La méthode adsorption-élution ne s'adresse pas seulement aux virus, mais aussi à des molécules inorganiques (métaux) ou organiques (acide humique, détergents, hydrocarbures) ou des bactéries.

g) La détoxification des liquides d'élution toxiques pour les cellules peut être conduite par centrifugation à 10 000 g pendant 10 minutes et par 5 extractions successives au chloroforme. La détoxification des liquides d'élution par passage sur résine XAD 2, d'emploi facile demanderait à être améliorée.

h) La survie des virus dans les eaux usées peut atteindre 2 à 3 jours à + 4°C, dans les liquides d'élution : 1 semaine à + 4°C et plus d'une semaine à - 26°C. Cette température de conservation n'apparaît pas idéale pour une plus grande période de conservation.

i) Les deux méthodes de numération, méthode des plages et méthode du nombre le plus probable (NPP) en milieu liquide, présentent des résultats similaires pour un faible titre viral : 10 UFP/ml.

En ce qui concerne l'étude des flux de virus en entrée et en sortie de la station d'épuration biologique de Nancy :

a) Il existe des variations importantes des flux de virus entériques et des coliformes thermorésistants en entrée et en sortie de station. Dans les eaux usées brutes, les flux maxima de virus et coliformes thermorésistants surviennent entre 10 h et 12 h le matin, et vers 24 h le soir. Dans les eaux usées traitées, un seul pic apparaît entre 16 h et 18 h.

b) Il existe des corrélations significatives entre paramètres physico-chimiques, bactériologiques et virologiques dans les eaux usées brutes. Après passage sur la station d'épuration, ces corrélations sont moins fortes pour les paramètres physico-chimiques. Seule la corrélation virus-coliformes thermorésistants reste importante.

c) Pour le calcul du rendement d'épuration, il est nécessaire de tenir compte du temps de rétention sur la station d'épuration.

d) Les rendements d'épuration moyen sur 24 heures ont été de :

- 90 % pour la DBO_5
- 83,5 % pour la DCO
- 66 % pour les MEST
- 92 % pour les coliformes thermorésistants
- 84,3 % pour les virus entériques.

e) L'utilisation d'échantillonneur automatique collectant des échantillons composés, en continu ou séquentiellement sur 24 heures, permet d'obtenir des évaluations correctes de la charge virale et bactérienne circulant dans les eaux usées sur 24 heures.

Enfin, à partir des résultats de cette étude, la quantité de virus entériques rejetés quotidiennement dans le milieu est d'environ $3,6 \cdot 10^8$ particules virales. Ce résultat est de toute manière très fortement sous-estimé, compte tenu du rendement de la méthode, et de la sélectivité des systèmes cellulaires.

BIBLIOGRAPHIE

ASHWOOD-SMITH M.J.

Preservation of Mouse Barre Marrow at - 79°C with dimethyl sulfoxide.
Nature, Lond., 1961, 190 (4782), 1204-1205.

BALACHANDRAN W., PAGE H.R.S.

A novel method of measuring flow-rate and suspended solids concentration of sewage sludges.
Progr. Wat. Technol., 1978, 9 (5/6), 53-58.

BARKLEY J.J. et al

Water pollution sampler evaluation.
Nat. Tech. Inf. Serv., U.S., Dept Commerce, Springfield, VO, 1975.

BERG G.

Integrated approach to problem of viruses in water.
J. San. Engrs Div., Proc. Am. Soc. Civ. Engrs, 1971, 97, 867-882.

BERG G.

Removal of viruses from sewage, effluents and waters. 1. A review.
Bull. Wld Hlth Org., 1973a, 49, 461-469.

BERG G.

Removal of viruses from sewage, effluents and waters. 2. Present and future trends.
Bull. Wld Hlth Org., 1973b, 49, 461-469.

BERG G.

Reassessment of the virus problem in sewage and in surface and renovated waters.
In "Progress in Water Technology", S.H. Jenkins (Ed.), Pergamon Press, New York, 1973c.

BERG G. and METCALF T.G.

Indicators of viruses in waters.
In Indicators of viruses in water and food, G. Berg (Ed.), Ann Arbor Science, 1978, 267-280.

BERG G., SCARPINO P.V. and BERMAN D.

Survival of bacteria and viruses in natural waters.
In Proceedings of the National Symposium on Quality Standards for Natural Waters, Ann Arbor, Michigan, 1967.

- BERG G., DAHLING D.R., BROWN G.A. and BERMAN D.
Validity of fecal coliforms, total coliforms, and fecal streptococci as indicators of viruses in chlorinated primary sewage effluents. Appl. Environ. Microbiol., 1978, 36, 6, 880-884.
- BERKANE K., CAISSIE G.E. and MALLER V.N.
The use of Amberlite XAD 2 resin for the quantitative recovery of fenitrothion from water. A preservation technique. J. Chromatogr., 1977, 139, 2, 386-390.
- BLOCK J.C., JORET J.C., MORLOT M. et FOLIGUET J.M.
Recherche des entérovirus dans les eaux superficielles par adsorption-élution sur microfibre de verre. T.S.M. L'Eau, 1978, 73, 3, 181-184.
- BLOCK J.C., COLLIN J.F., JORET J.C., ROLLAND D. et FOLIGUET J.M.
Elimination des entérovirus au cours du traitement par boues activées des eaux usées urbaines. T.S.M. L'Eau, 1979b, 3, 201-206.
- BLOCK J.C., JORET J.C., CHAUVIN A. et STOERKEL D.
Etude virologique des eaux de surface dans le bassin de la Haute Moselle. Rapport Final, Agence Financière de Bassin Rhin-Meuse, Metz, 1979a.
- BLOCK J.C. and ROLLAND D.
A method for Salmonella concentration from water at pH 3.5 using microfiberglass filters. Appl. Environ. Microbiol., 1979c, 38, 1, 1-6.
- BLOCK J.C.
Viruses in environmental waters. In Viral pollution of the environment, Berg G. (Ed.), C.R.C. Press Publ., à paraître.
- BOUTIN P., BOUDOT J. et ETIENNE M.
Charge microbienne des effluents urbains bruts et traités par voie biologique. T.S.M. L'Eau, 1979a, 74, 2, 63-78.
- BOUTIN P. et TORRE M.
Variations de la charge bactérienne d'un effluent urbain. J. Fr. Hydrol., 1979b, 10 (3), 30, 189-202.
- BRISOU J.F. et DENIS F.A.
Techniques de surveillance de l'environnement maritime. Ed. Masson, Paris, 1980.
- BURAS N.
Recovery of viruses from wastewater and effluent by the direct inoculation method. Water Res., 1974, 8, 19-22.
- BURAS N.
Concentration of enteric viruses in wastewater and effluent : a two year survey. Water Res., 1976, 10, 4, 295-298.
- BURGESS S.G. and GREEN A.F.
The use of radioactive isotopes for the investigation of sewage treatment plant. Proc. Inst. Civ. Eng., 1958, 11, 297-312.

- CAPEN C.H. Jr
Study of sewage settling tank design.
Eng. News Record, 1927, 99, 833-837.
- Commissariat à l'Energie Atomique
Statistique appliquée à l'exploitation des mesures, tome 1, tome 2,
Masson (Ed.), Paris, 1978.
- CHENG K.L.
Separation of humic acid with XAD resins.
Mikrochimica Acta, 1977, 2 (5/6), 389-396.
- CHIN T.D.Y., MOSLEY W.H., ROBINSON S. and GRAVELLE C.R.
Detection of enteric viruses in sewage and water - Relative sensitivity of the method.
In Transmission of viruses by the water route, G. Berg (Ed.), John Wiley and Sons Publ., New York, 1967.
- CLARKE N.A., STEVENSON R.E. and KABLER P.W.
Survival of Coxsackie virus in water and sewage.
J. Am. Wat. Wks Ass., 1956, 48, 677.
- CLARKE N.A., STEVENSON R.E., CHANG S.L. and KABLER P.W.
Removal of enteric viruses from sewage by activated sludge treatment.
Am. J. Pub. Hlth, 1961, 51, 1118-1129.
- CLARKE N.A. et al
Human enteric viruses in water : source, survival and removability.
Proc. 1st Intern. Conf. on Water Pollution Research, London, 1962,
Pergamon Press, 1964, 523-542.
- CLIVER D.O.
Virus association with wastewater solids.
Environ. Letters, 1975, 10 (3), 215-223.
- CLIVER D.O. and HERRMANN J.C.
Proteolytic and microbial inactivation of enteroviruses.
Water Res., 1972, 6, 797-805.
- COLLIN J.F.
Contribution à l'étude microbiologique des boues activées.
DEA d'Ecotoxicologie, Université de Metz, 1979.
- COONG M.K., HALL C.E. and FOX J.P.
The seattle virus watch. III. Evaluation of isolation methods and summary of infections detected by virus isolation.
Am. J. Epidem., 1972, 96, 286-305.
- CROWTHER J.M., DALRYMPLE J.F., WOODHEAD T., COACKLEY P. and HAMILTON I.M.
A correlation method for the estimation of retention times at full-scale sewage treatment plants.
Water Res., 1980, 14 (6), 567-574.

- CURDS C.R. and FEY G.J.
The effect of ciliated protozoa on the fate of Escherichia coli in the activated sludge process.
Water Res., 1969, 3, 853-867.
- DAHLING D.R. and SAFFERMAN R.S.
Survival of enteric viruses under natural conditions in a subarctic river.
Appl. Environ. Microbiol., 1979, 38 (6), 1103-1110.
- DRIFT C. (van der), SEGGELEN E. (van), STUMM D., HOL W. and TUINTE J.
Removal of Escherichia coli in wastewater by activated sludge.
Appl. Environ. Microbiol., 1977, 34 (3), 315-319.
- ELLIOTT L.P. and ROWE D.R.
The microbial contribution of usine to sewage.
Wat. Sew. Wks, 1971, 118, 260-261.
- ENGLAND B., LEACH R.E., ADAME B. and SHIOSAKI R.
Virologic assessment of sewage treatment at Santee, California.
In transmission of the viruses by the water route, Berg (Ed.), Inter-science, New York, 1967, 401-417.
- ENZINGER R.M. and COOPER R.C.
Role of bacteria and protozoa in the removal of Escherichia coli from estuarine waters.
Appl. Environ. Microbiol., 1976, 31, 758-763.
- FAIR G.M., GEYER J.C. and OKUN D.A.
Water and wastes : engineering water purification and wastewater treatment and disposal.
Edit. Wiley 2, 1968, 3111-3114.
- FARRAH S.R., GOYAL S.M., GERBA C.P., WALLIS C. and SHAFFER P.T.B.
Characteristics of humic acid and organic compounds concentrated from tapwater using the aquella virus concentrator.
Water Res., 1976, 10 (10), 897-901.
- FATTAL B., KATZENELSON E. and SHUVAL H.I.
Comparison of methods for isolation of viruses in water.
In Virus survival in water and wastewater systems, by J.F. Malina and Jr B.P. Sagik, 1974.
- FATTAL B. and KATZENELSON E.
Evaluation of gauze pad method to recover viruses from water.
Water Res., 1976, 10 (12), 1135-1140.

- FELDMAN H.A. and WANG S.S.
Sensitivity of various viruses to chloroform.
Proc. of the Society for Experimental Biology and Medicine, 1961,
106, 736-738.
- FIELDS H.A. and METCALF T.G.
Concentration of Adenovirus from seawater.
Water Res., 1975, 9, 357-364.
- FINANCE C., LUCENA F., BRIGAUD M., AYMARD M., PARES R. et SCHWARTZBROD L.
Etude quantitative et qualitative de la pollution virale de l'eau
de mer à Barcelone.
Communication, Journées d'Hydrologie Appliquée, Nancy, 4 Mars 1981.
- FLOYD R. and SHARP D.G.
Viral aggregation : effects of salts on the aggregation of poliovirus
and reovirus at low pH.
Appl. Environ. Microbiol., 1978, 35, 1084-1094.
- FLUEGGE R.A., METCALF T.G. and WALLIS C.
Virus inactivation in wastewater effluents by chlorine, ozone and
ultraviolet light.
EPA 600/9-79-018, June 1979, Progress in wastewater disinfection
technology, Proc. of the National Symposium, Cincinnati, Ohio, Sept.
18-20, 1978.
- FOLIGUET J.M., BLOCK J.C., COLLIN J.F., JORET J.C., MORLOT M. et PATERNOTTE P.
Méthodologie de concentration et inactivation des virus dans le milieu
hydrique.
Rapport final, Ministère de la Qualité de la Vie, 1978
- FOLIGUET J.M., SCHWARTZBROD L. et GAUDIN O.G.
La pollution virale des eaux usées, de surface et d'alimentation.
Bull. Wld Hlth Org., 1966, 35, 737-749.
- FOURNIER J.G., ROUSSET S. et BOUTEILLE M.
Application de l'immunomicroscopie électronique à la détection de
virus en milieu hydrique.
C. R. Acad. Sc. Paris, 1978, 22, 1637-1639.
- FUJIOKA R.S. and LOH P.C.
Recycling of water for irrigation : persistence of enteroviruses in
sewage effluent and natural waters receiving the effluent.
Water, Air and Soil Poll., 1978, 9, 213-226.
- GELDREICH E.E.
Bacterial populations and indicator concepts in feces, sewage, storm-
water and solid wastes.
In "Indicators of viruses in water and food", Berg G. (Ed.), Ann Arbor
Sc. Publ., 1978, 51-97.
- GERBA C.P.
Virus survival in wastewater treatment.
Symp. on Viruses and Wastewater treatment, Guildford, U.K., Sept 15-
17, 1980.

- GILBERT R.G., RICE R.C., BOUWER H., GERBA C.P., WALLIS C. and MELNICK J.L.
Wastewater renovation and reuse : virus removal by soil filtration.
Science, 1976, 192, 1004-1005.
- GLASS J.S. and O'BRIEN R.T.
Enterovirus and coliphage inactivation during activated sludge treatment.
Water Res., 1980, 14 (7), 877-882.
- GRABOW W.O.K.
The virology of wastewater treatment.
Water Res., 1968, 2, 675-679.
- GRABOW W.O.K., BURGER J.S. and NUPEN E.M.
Evaluation of acid fast bacteria, Candida albicans, enteric viruses and conventional indicators for reclamation systems.
Prog. Wat. Tech., 1980, 12, 803-817.
- GREIFF D. and MYERS M.
Effect of dimethyl sulfoxide on the cryo-tolerance of Mitochondria.
Nature, Lond., 1961, 190, 1202-1204.
- GREIFF D., RIGHTSEL W.A. and SCHULER E.E.
Effects of freezing, storage at low temperatures, and drying by sublimation in vacuo on the activities of Measles virus.
Nature, Lond., 1964, 202, 624-625.
- GREIFF D. and RIGHTSEL W.
Freezing and freezing drying of viruses.
In cryobiology, 1966, Meryman H.T. (Ed.), Academic Press, N.Y., 15, 697-728
- GRINSTEIN S., MELNICK J.L. and WALLIS C.
Virus isolations from sewage and from a stream receiving effluents of sewage treatment plants.
Bull. Wld. Hlth. Org., 1970, 42, 291-296.
- HANKIN L. and SANDS D.C.
Bacterial production of enzymes in activated sludge systems.
J. Wat. Poll. Control Fed., 1974, 46 (8), 2015-2025.
- HARRIS D.J. and KEFFER W.J.
Performance of automatic wastewater compositors.
Proc. 30th Ind. waste conf., Purdue Univ., Lafayette Ind., 1975.
- HUGUES B.
Essai de détermination du pouvoir d'arrêt d'une station d'épuration biologique vis à vis de la charge virale de l'effluent.
Journées Françaises d'Hydrologie, Montpellier, 20 Oct. 1978.
- HUGUES B., BOUGIS M.A., PLISSIER M., ANDRE M., LAURENT D. and PAGLIARDINI A.
Evaluation of the viral contamination of the seawater after the emission of an effluent into the sea.
Zbl. Bakt. Hyg., 1, Abt B, 1979, 169, 3-4, 253.
- HUGUES B., PLISSIER M., PAGLIARDINI A., LAURENT D. et ANDRE M.
Application de la méthode d'adsorption-élution sur filtre en fibre de verre pour déterminer la charge virale à l'entrée et à la sortie d'une station d'épuration biologique.
J. Fr. Hydrol., 1979b, 10 (1), 28, 21-28.

- HUGUES B., PLISSIER M., ANDRE M., PAGLIARDINI A. et LAURENT D.
 Evaluation de la charge virale dans les eaux d'une station d'épuration biologique au moyen de deux méthodes de concentration de virus par adsorption-élution sur poudre de verre ou sur microfibre de verre.
 Water Res., 1979, 13, 1117-1123.
- HUGUES B.
 Nouvelle utilisation de la méthode du nombre le plus probable en virologie. Application à la mise en évidence et à la quantification des virus dans le milieu hydrique.
 Thèse de Doctorat d'Etat, Université de Metz, 1981.
- IRVING L.G. and SMITH F.A.
 One year survey of enteroviruses, adenoviruses and reoviruses isolated from effluent at an activated sludge purification plant.
 Appl. Environ. Microbiol., 1981, 41, 1, 51-59.
- JACOBS R.R. and SOBSEY M.D.
 Improved methods for concentrating adenovirus from drinking water.
 Abstracts of the Am. Soc. Microbiol., 1978
- JAKUBOWSKI W., HILL W.F., CLARKE J.R. and CLARKE N.A.
 Comparative study of four microporous filters for concentrating viruses from drinking water.
 Appl. Microbiol., 1975, 30 (1), 58-65.
- JORET J.C., BLOCK J.C., HARTEMANN P. and FOLIGUET J.M.
 Virus recovery from wastewater using microfiberglass filters
 Symp. on Viruses and wastewater treatment, Guildford, University of Surrey, Sept. 15-17, 1980b.
- JORET J.C., BLOCK J.C., LUCENA-GUTIERREZ F., SCHWARTZBROD L., HUGUES B. and PLISSIER M.
 Virus concentration from secondary wastewater : comparative study between epoxy-fiberglass and glass powder adsorbents.
 Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol., 1980a, 10, 245-252.
- JORET J.C. et BLOCK J.C.
 Survie de virus entériques adsorbés sur microfibre de verre au cours d'un transport postal.
 Can. J. Microbiol., 1981, 27, 246-248.
- JORET J.C., BLOCK J.C., HARTEMANN P. et RICHARD Y.
 Désinfection des eaux usées : élimination des bactéries fécales et des virus entériques.
 5e Congrès Mondial de l'Ozone, Berlin, 31 Mars- 3 Avril 1981.
- JUNK G.A., RICHARD J.J., GRIESER M.D., WITIAK O., WITIAK J.L., ARGUELLO M.D., VICK R., SVEC H.J., FRITZ J.S. and CALDER G.V.
 Use of macroreticular resins in the analysis of water for trace organic contaminants.
 J. Chromatogr., 1974, 99, 745-762.
- KABLER P.
 Removal of pathogenic microorganism by sewage treatment processes.
 Sew. Ind. Wastes, 1959, 31, 1373-1382.
- KAGHAZCHI B., BECK M.S. and BATHURST P.M.
 Non-contacting method for flow measurement in sewers by cross correlation of surface information.
 Progr. Wat. Technol., 1978, 9 (5/6), 59-66.

- KALTER S.S., PATTERSON W.R. and MILLSTEIN C.H.
Efficacy of methods for the detection of viruses in treated and untreated sewage.
Symp. on virus survival in water and wastewater systems, Univ. of Texas, Austin, April 1-3, 1974.
- KAMPELMACHER E.H. and NOORLE-JANSEN L.M. (van)
Salmonella - Its presence in and removal from a wastewater system.
J. Wat. Poll. Control Fed., 1970, 42, 2069-2073.
- KATZENELSON E.
Virologic and engineering problems in monitoring viruses in water.
In Viruses in water, Berg G. (Ed.), Ann Pub. Hlth Ass., 1976, 162
- KATZENELSON E. and KEDMI S.
Unsuitability of poliovirus as indicators of virological quality of water.
Appl. Environ. Microbiol., 1979, 37 (2), 343-344.
- KELLY S. and SANDERSON W.W.
Density of enteroviruses in sewage.
J. Wat. Poll. Control Fed., 1960, 32 (12), 1269-1273.
- KELLY S., SANDERSON W.W. and NEIDL C.
Removal of enteroviruses from sewage by activated sludge.
J. Wat. Poll. Control Fed., 1961, 33, 1056-1062.
- KOOL H.J., GENT M.V. and KRANEN H.J. (van)
Het isoleren van "entero" virussen uit diverse typen water met behulp van verschillende concentratie technieken
R.I.D. mededeling 76-4 rijksinstituut voor drinkwater-voorziening, 1976.
- KOTT Y., BEN ARI H. and VINOKUR L.
Coliphages survival as viral indicator in various wastewater quality effluent.
Prog. Wat. Technol., 1978, 10, 1-2, 337-346.
- LABELLE R.L., GERBA C.P., GOYAL S.M., MELNICK J.L., CECH I. and BOGDAN G.F.
Relationship between environmental factors, bacterial indicators and the occurrence of viruses in estuarine sediments.
Appl. Environ. Microbiol., 1980a, 39 (3), 588-596.
- LABELLE R.L. and GERBA C.P.
Influence of estuarine sediment on virus survival under field conditions.
Appl. Environ. Microbiol., 1980b, 39 (4), 749-755.
- LA GREGA M.D., KEENAN J.D.
Effects of equalizing wastewater flows.
J. Wat. Poll. Control Fed., 1974, 46 (1), 123-132.

- LAVERAN H., BEYTOUT D., CLUZEL R. et JOLY B.
Mise en évidence de virus entériques humains dans les eaux usées.
Comparaison de trois méthodes de concentration virale.
Med. Mal. Inf., 1974, 4 (2), 69-78.
- LEONG L.Y.C., BARRETT S.J. and TRUSSELL R.R.
False positives in testing of secondary sewage for enteric viruses.
Abstracts of the 78th A.S.M. Annual Meeting, Las Vegas, Nev.,
14-19 May 1978.
- LUCENA-GUTIERREZ F.
Contribution à l'étude de la concentration des virus par adsorption-
élution sur poudre de verre. Application à la recherche des virus
dans le milieu hydrique.
Thèse de 3e cycle de Nutrition, Sciences de l'Alimentation et Biochi-
mie Appliquée, Université de Nancy I, 1979.
- LUND E.
The effects of pretreatments on the virus contents of sewage samples.
Water Res., 1973, 7 (6), 873-879.
- LUND E., HEDSTROM C.E. and JANTZEN N.
Occurrence of enteric viruses in wastewater after activated sludge
treatment.
J. Wat. Poll. Control Fed., 1969a, 41 (2), 169-174.
- LUND E. and HEDSTROM C.E.
A study on sampling and isolation methods for the detection of virus
in sewage.
Water Res., 1969b, 3, 823-832.
- LUND E. and RONNE V.
On the isolation of virus from sewage treatment plant sludges.
Water Res., 1973, 7, 863-871.
- MAC COY J.H.
Sewage pollution of natural waters.
In Microbial aspects of pollution, Sykes G. and Skinner F.A. (Ed.),
Academic Press, 1971, 33-69.
- MAC GRADY M.H.
The numerical interpretation of fermentation tube results.
J. Inf. Dis., 1915, 17, 183-212.
- MACK W.N., FREY J.R., RIEGLE B.J. and MALLMAN W.L.
Enterovirus removal by activated sludge treatment.
J. Wat. Poll. Control Fed., 1962, 34, 1133-1139.
- MAGNUSSON S., GUNDERSEN K., BRANDBERG A. and LYCKE E.
Marine bacteria and their possible relation to the virus inactivation
capacity of seawater.
Acta Path. Microbiol. Scand., 1967, 71, 274.

- MALHERBE H.H. and STRICKLAND-CHOLMEY M.
Quantitative studies on viral survival in sewage purification process.
In Transmission on viruses by the water route, Berg G. (Ed.), Wiley
Publ., New York, 1967, 379-387.
- MALINA Jr J.F. and SAGIK B.P.
Virus survival in water and wastewater systems.
Water Research Symp. N° 7, Avril 1974, Center for Research in water
ressources, Austin, Texas.
- MAN J.C. (de)
M.P.N. tables for more than one test.
Europ. J. Appl. Microbiol., 1977, 4, 307-316.
- MARCH R.P. and HAMLIN M.J.
An investigation into the performance of a full scale sedimentation
tank.
J. Proc. Inst. Sew. Purif., 1966, 2, 118-133.
- MARZOUK Y., GOYAL S.M. and GERBA C.P.
Relationship of viruses and indicator bacteria in water and wastewater
of Israel.
Water Res., 1980, 14 (11), 1585-1590.
- MERYMAN H.T.
Review of biological freezing.
In Cryobiology, Meryman H.T. (Ed.), Ac. Press., N.Y., 1966, 2-114.
- METCALF T.G., STILES W.C.
Survival of enteric viruses in estuary waters and shellfish.
In Transmission of viruses by the water route, Berg G. (Ed.), Inter-
science Publ., London, 1967.
- METCALF T.G., WALLIS C. and MELNICK J.L.
Environmental factors influencing isolation of enteroviruses from
polluted surface waters.
Appl. Microbiol., 1974, 27, 920-926.
- MOORE B.E., SAGIK B.P. and MALINA Jr J.F.
Viral association with suspended solids.
Water Res., 1975, 9, 197-203.
- NUPEN E.M., BATEMAN B.W. and Mc KENNY N.C.
The reduction of viruses by the various unit processes used in the
reclamation of sewage to potable water.
In Virus survival in water and wastewater systems, Malina J.F. Jr
and Sagik B.P. (Ed.), 1974, 107-114.
- PAYMENT P., LAROSE Y. and TRUDEL M.
Polioviruses as indicator of virological quality of water.
Can. J. Microbiol., 1979, 25 (10), 1212-1214.
- PAYMENT P., LAROSE Y. and TRUDEL M.
Polioviruses and other enteroviruses in urban sewage from Laval
(Canada) : presence of wild strains of poliovirus.
Can. J. Microbiol., 1979, 25 (11), 1305.

- PAYMENT P. and TRUDEL M.
Efficiency of several microfiberglass filters for recovery of poliovirus from tap water.
Appl. Environ. Microbiol., 1979, 38 (3), 365.
- PIKE E.B. and CARRINGTON E.G.
The fate of enteric bacteria and pathogens during sewage treatment.
Int. Symp. on biological indications of water quality, University of Newcastle upon Tyne, 1978.
- POLGE C., SMITH A.V. and PARKES A.S.
Cité par Meryman H.T.
Nature, Lond., 1949, 164, 666.
- POTTENGER L.H., GILBERT E., BLOCK J.C. and HARTEMANN P.
Variations in cytotoxicity during ozonation of substituted aromatics.
Ozone Sc. Eng., 1980, 2 (1), 25-37.
- RANGANATHAN K.R., MALINA J.F. and SAGIK B.P.
Inactivation of enteric virus during biological wastewater treatment.
7th Int. Conf. on Water Pollution Research, Paris, Sept 9-13, 1974.
- RAO V.C., CHANDORKAR U., RAO N.U., KUMARAN P. and LAKHE S.B.
A simple method for concentrating and detecting viruses in wastewater.
Water Res., 1972, 6, 1565-1576.
- RAO V.C., LAKHE S.B., WAGHMARE S.V. and DUBE P.
Virus removal in activated sludge sewage treatment.
Prog. Wat. Tech., 1977, 9, 113-127.
- REES G.A.V. and AU L.
Use of XAD 2 macroreticular resin for the recovery of ambient trace levels of pesticides and industrial organic pollutants from water.
Bull. Environ. Contam. Toxicol., 1979, 22, 561-566.
- RIDEAU J.P. et MORFAUX J.N.
Etude des polyiosides du mucilage des boues activées.
Water Res., 1976, 10, 999-1003.
- RODIER J.
L'analyse de l'eau : eaux naturelles, eaux résiduaires, eau de mer.
Dunod Techniques Ed., Paris, 1978.
- ROLLAND D. and BLOCK J.C.
Simultaneous concentration of Salmonella and Enterovirus from surface water by using micro-fiber glass filters.
Appl. Environ. Microbiol., 1980, 39 (3), 659-661.
- RUITER G.G. and FUJIOKA R.S.
Human enteric viruses in sewage and their discharge into the ocean.
Water, Air and Soil Poll., 1978, 10, 95-103.

- SAFFERMAN R.S. and MORRIS M.E.
Assessment of virus removal by a multistage activated sludge process.
Water Res., 1976, 10, 413-420.
- SARRETTE B., DANGLLOT C. et VILAGINES R.
Virologie : nouvelle méthode permettant la détermination quantitative
des virus présents dans les eaux de surface.
C. R. Acad. Sc. Paris, 1977a, 285, D, 1359-1361.
- SARRETTE B.A., DANGLLOT C.D. and VILAGINES R.
A new and simple method for recuperation of enteroviruses from water.
Water Res., 1977b, 11, 355-358.
- SARRETTE B., DANGLLOT C. et VILAGINES R.
Nouvelle technique de concentration quantitative des entérovirus des
eaux.
Techn. Sc. Munic. L'Eau, 1978, 73 (3), 185-188.
- SATTAR S.A. and WESTWOOD J.C.N.
Isolation of apparently wild strains of poliovirus type 1 from sewage
in the Ottawa area.
C.M.A. Journal, 1977, 116, 25-27.
- SATTAR S.A. and WESTWOOD J.C.N.
Viral pollution of surface waters due to chlorinated primary effluents
Appl. Environ. Microbiol., 1978, 36 (3), 427-431.
- SCHMIDT N.J., HO H.H., RIGGS J.L. and LENNETTE E.H.
Comparative sensitivity of various cell culture systems for isolation
of viruses from wastewater and fecal samples.
Appl. Environ. Microbiol., 1978, 36, 480-486.
- SCHWARTZBROD L.
Contamination virale des eaux de rivière et cotières de la région
de Barcelone.
Symp. Marine Microbiol., Marseille, Oct. 11, 1979a.
- SCHWARTZBROD L. et LUCENA-GUTIERREZ F.
Concentration des entérovirus dans les eaux par adsorption sur poudre
de verre : proposition d'un appareillage simplifié.
Microbia, 1978, 4, 1, 55-58.
- SCHWARTZBROD L., LUCENA-GUTIERREZ F. et FINANCE C.
Etude quantitative de la population virale dans l'affluent et l'ef-
fluent d'une station d'épuration d'eaux résiduaires.
J. Fr. Hydrol., 1979b, 10 (1), 20, 7-20.
- SELNA M.N. and MIELE R.P.
Virus sampling in wastewater - Field experiences.
J. Environ. Eng. Div., 1977, 103, 693-705.
- SELLWOOD J., DADSWELL J.V. and SLADE J.S.
Viruses in sewage as an indicator of their presence in the community.
J. Hyg. Camb., 1981, 86, 217.

- SHUVAL H.I., FATTAL B., CYMBALISTA A. and GOLDBLUM N.
The phase separation method for the concentration and detection of viruses in water
Water Res., 1969, 3, 225-240.
- SHUVAL H.I.
Detection and control of viruses in the water environment.
In Developments in water quality research, Shuval H.I. Ed., Humphrey Science Publ., Ann Arbor, Michigan, 1970, 47-71.
- SIGEL M.M., RIPPE D.F., KING S.D. et al
Survival of enteric viruses under different environmental conditions.
Symp. Proc. of virus aspect of applying municipal waste to land, Baldwin L.B., Davidson J.M., Gerber J.F. (Ed.), University of Florida, Center for Environ. Programs., June 1976? 53-58.
- SMITH and GERBA C.P.
Concentration of rotavirus from tap water.
Abstracts of 78th Am. Soc. Microbiol. Meeting, 1978.
- SOBSEY M.D. and COOPER R.C.
Enteric virus survival in Algal bacterial wastewater treatment systems I. Laboratory studies.
Water Res., 1973, 7, 669-685.
- SOBSEY M.D., WALLIS C., HENDERSON M. and MELNICK J.L.
Concentration of enteroviruses from large volumes of water.
Appl. Microbiol., 1973, 26, 529-534.
- SOBSEY M.D., JENSEN H.R. and CARRICK R.J.
Improved methods for detecting enteric viruses in oysters.
Appl. Environ. Microbiol., 1978, 37, 121-128.
- SPROUL O.J., LAROCHELLE L.R., WENTWORTH D.F. and THORUP R.T.
Virus removal in water reuse treating processes.
Chem. Engrs Prog. Symp., N° 78, 1967, 63, 130-136.
- STARK L.M., WELLINGS F.M. and LEWIS A.L.
Freon treatment : a simple method to reduce cytotoxicity of water and sewage specimens processed for virus isolation.
Abstracts of the 81 annual meeting of the A.S.M., Dallas, 1981.
- STEINER A.E., Mc LAREN D.A. and FORSTER C.F.
The nature of activated sludge flocs.
Water Res., 1976, 10, 25-30.
- SUBRAHMANYAN T.P.
Persistence of enteroviruses in sewage sludge.
Bull. Wld Hlth Org., 1977, 55 (4), 431-434.

- SYKES R.M., RUBIN A.J., RATH S.A., MING C.C.
Spurious results from automatic samplers.
J. Wat. Poll. Control Fed., 1978, 50 (8), 2046-2049.
- THOMAS H.A. and ARCHIBALD R.S.
Longitudinal mixing measured by radioactive tracers.
Trans. Am. Soc. Civ. Engrs, 1952, 117, 839-852.
- UEMATSU T. and SASAKI T.
Separation of 3', 5' and 2', 3' cyclic ribonucleotides from their related mononucleotides by amberlite XAD 4 column chromatography.
J. Chromatogr., 1979, 179 (1), 229
- VILAGINES P., SARRETTE B., DANGLLOT C. et VILAGINES R.
Détection d'entérovirus par concentration sur poudre de verre en lit fluidisé à partir d'échantillons de 500 litres d'eaux superficielles.
Bull. Acad. Nat. Med., 1979, 163 (7), 668-673.
- VOS O. and KAALEN M.C.A.C.
Review of biological freezing
Cited by Harold T. Meryman, Cryobiology, 1965, 1, 249.
- WALLIS C. and MELNICK J.L.
Concentration of viruses from sewage by adsorption on Millipore membranes.
Bull. Wld Hlth Org., 1967, 36, 219-225.
- WALLIS C., HENDERSON M. and MELNICK J.L.
Enterovirus concentration on cellulose membranes.
Appl. Microbiol., 1972a, 23, 476-480.
- WALLIS C., HOMMA A. and MELNICK J.L.
Apparatus for concentrating viruses from large volumes.
J. Am. Wat. Wks Ass., 1972b, 64, 189-196.
- WALLIS C., HOMMA A. and MELNICK J.L.
A portable virus concentrator for testing water in the field.
Water Res., 1972c, 6, 1249-1256.
- WARD R.L. and ASHLEY C.S.
Identification of the virucidal agent in wastewater sludge
Appl. Environ. Microbiol., 1977, 53, 860-864.
- WARD R.L. and ASHLEY C.S.
Identification of detergents as components of wastewater sludge that modify the thermal stability of reovirus and enteroviruses.
Appl. Environ. Microbiol., 1978, 36 (6), 889-897.
- WEBB R.G.
Solvent extraction of organic water pollutants.
Int. J. Environ. Anal. Chem., 1978, 5 (5), 239-252.

WELLINGS F.M., LEWIS A.L. and MOUNTAIN C.N.

Demonstration of solids associated virus in wastewater and sludge.
Appl. Environ. Microbiol., 1976, 31 (3), 354-358.

WINDLE-TAYLOR E.

41st report on the bacteriological, chemical and biological examination of the London Waters for the years 1963-1964, London, Metropolitan Water Board.

ANNEXE

Heure	Débit (l/s)
6	1 480
7	1 480
8	1 620
9	1 880
10	2 100
11	2 100
12	2 140
13	1 950
14	1 900
15	2 050
16	2 000
17	1 900
18	1 800
19	1 760
20	1 830
21	1 850
22	1 410
23	1 330
24	1 260
1	1 200
2	1 300
3	1 500
4	1 470
5	1 440
6	1 480
7	1 500
8	1 680
9	1 850
10	2 000

TABLEAU I : Débits enregistrés dans le chenal de rejet de la station d'épuration du 23.04.1980 à 6 h au 24.04.1980 à 10 h.

Heures prélèvements	pH	DBO ₅ mg/l	DCO mg/l	MEST mg/l	Turbidité J.T.U.	Résistivité /cm
6	8,00	21	50	19	8	1 571
8	8,00	61	136	47	26	1 325
10	7,90	201	407	117	70	1 230
12	7,70	241	531	198	80	1 223
14	7,85	221	487	167	79	1 265
16	8,40	141	319	113	45	1 307
18	7,65	101	267	114	47	1 304
20	7,50	91	208	92	42	1 390
22	7,50	161	351	142	90	1 390
24	7,80	111	216	144	49	1 279
2	7,65	51	124	87	28	1 473
4	7,80	31	74	76	23	1 404
6	8,00	36	78	48	21	1 585

TABLEAU II : Caractéristiques physico-chimiques des eaux usées brutes prélevées toutes les deux heures pendant 24 heures.

Heures prélèvements	pH	DBO ₅ mg/l	DCO mg/l	MEST mg/l	Turbidité J.T.U.	Résistivité /cm
10	7,4	6	30	36	3	1 487
12	7,4	8	38	54	4	1 112
14	7,4	7	36	40	3,5	1 245
16	7,5	15	61	50	4	1 279
18	7,4	17	53	55	3	1 307
20	7,4	16	47	21	3,7	1 213
22	7,7	16	57	50	3,4	1 279
24	7,4	17	59	48	4,5	1 314
2	7,4	14	51	54	4	1 314
4	7,25	14	53	6	3,5	1 369
6	7	16	43	41	4,2	1 369
8	7,4	11	39	39	2,8	1 369
10	7,4	9	20	11	4	1 460

TABLEAU III : Caractéristiques physico-chimiques des eaux usées traitées prélevées toutes les deux heures pendant 24 heures.

Heures de prélèvements	Coliformes thermorésistants par litre d'eaux usées brutes x 10 ⁶	Coliformes thermorésistants par litre d'eaux usées traitées x 10 ⁶
6	26,6 ± 5,7	
8	53,2 ± 10,3	
10	153,2 ± 15,9	0,4 ± 0,5
12	216,2 ± 30,5	3,1 ± 0,85
14	136 ± 20,2	8,4 ± 3,2
16	63 ± 10,8	18,5 ± 1,5
18	92,6 ± 13,4	21,2 ± 1,9
20	82 ± 10,3	13,1 ± 2,1
22	93,5 ± 14,5	10,3 ± 1,05
24	183,7 ± 26,5	8,4 ± 1,1
2	120,2 ± 19,3	5,2 ± 0,74
4	43,7 ± 5,2	4,81 ± 0,89
6	31,4 ± 4,1	4,66 ± 2,5
8		1,3 ± 0,38
10		0,83 ± 0,57

TABEAU IV : Concentration des coliformes thermorésistants dans les échantillons d'eaux usées brutes et traitées.
 (±) : Intervalle de confiance à 95 % de la méthode de numération.

Heures de prélèvements	Titre viral des échantillons d'eaux usées brutes UFP/1	Titre viral des échantillons d'eaux usées traitées UFP/1
6	3,25 ± 2,8	
8	14,5 ± 2,3	
10	23,25 ± 6,7	0
12	20,5 ± 9,2	1,75 ± 1,45
14	20 ± 6,2	2,5 ± 1,85
16	14 ± 2,75	4,5 ± 8,2
18	17,75 ± 5,4	6,75 ± 2,2
20	13,5 ± 2,9	6,25 ± 2,5
22	14 ± 4,1	1,75 ± 1,45
24	31,75 ± 4,5	3,25 ± 1,7
2	11,25 ± 4,7	1,25 ± 1,25
4	10,25 ± 2,27	1,25 ± 1,25
6	2,75 ± 2,27	0,75 ± 0,85
8		0
10		0

TABLEAU V : Titre viral (UFP/1) obtenu après concentration sur poudre de verre d'échantillons de 20 litres d'eaux usées brutes et traitées prélevés toutes les deux heures pendant 24 heures.

(±) : Intervalle de confiance à 95 % de la méthode de numération

Heures de prélèvements	Liquide d'élution traité par la résine XAD 2		Liquide d'élution traité par le chloroforme	
	non dilué UFP/l	dilué au 1/10 UFP/l	non dilué UFP/l	dilué au 1/10 UFP/l
12	9 ± 2,75	10	20,5 ± 9,26	10
14	8,5 ± 7,25	30	20 ± 6,25	15
16	12 ± 5	15	14 ± 2,75	5
22	12,5 ± 5,75	20	14 ± 4,15	20

TABLEAU VI : Titre viral (UFP/l) des échantillons d'eaux usées brutes prélevés à 12 h, 14 h, 16 h et 22 h, après détoxification des liquides d'élution par résine XAD 2 et extraction au chloroforme.
 (±) : Intervalle de confiance à 95 % de la méthode de numération.

Heures de prélèvements	Flux DBO ₅ g/s	Flux DCO g/s	Flux MEST g/s	Flux turbidité x 10 ³ *	Flux coliformes thermorésistants 10 ¹¹ /s	Flux virus x 10 ³
6	31	74	28	11,8	0,4	4,8
8	99	220	76	42,1	0,86	23
10	422	855	245	147	3,2	49
12	516	1136	424	171,2	4,6	44
14	420	925	317	150,1	2,6	38
16	282	638	226	90	1,2	28
18	182	480	205	84,6	1,6	32
20	166	380	168	76,8	1,5	25
22	227	495	200	126,9	1,3	20
24	139	272	181	61,7	2,3	40
2	66	161	113	36,4	1,6	14
4	45	109	112	33,8	0,64	15
6	53	115	71	31,1	0,46	4

* Les flux de turbidité ont été obtenus en effectuant le produit de la turbidité mesurée sur l'échantillon (exprimé en J.T.U.) par le débit en l/s. Ces valeurs étant virtuelles, elles sont présentés sans unités.

TABLEAU VII : Flux des paramètres physico-chimiques DBO₅, DCO, MEST, turbidité, et des paramètres coliformes thermorésistants et virus dans les eaux usées brutes pendant 24 heures.

Heures de prélèvements	Flux DBO ₅ g/s	Flux DCO g/s	Flux MEST g/s	Flux turbidité x 10 ³ *	Flux coliformes thermorésistants 10 ⁹ /s	Flux virus 10 ³
10	12,6	63	75,6	6,3	0,8	0
12	17	81,3	115	8,5	6,6	3,7
14	13,3	68,4	76	6,6	16	4,7
16	30	122	100	8	37	9
18	30,6	95,4	99	5,4	38	12,1
20	29,2	86	38	6,8	24	11,4
22	22,5	80	70,5	4,8	14,5	2,5
24	21,4	74	60,5	5,7	10,6	4
2	18,2	66	70	5,2	6,7	1,6
4	20,6	78	8,8	5,1	7	1,8
6	23,7	63,6	60,7	6,2	6,9	1,1
8	18,5	65,5	65,5	4,7	2	0
10	18	40	22	8	1,6	0

* Les flux de turbidité ont été obtenus en effectuant le produit de la turbidité mesurée sur l'échantillon (exprimé en J.T.U.) par le débit en l/s. Ces valeurs étant virtuelles, elles sont présentées sans unités.

TABLEAU VIII : Flux des paramètres physico-chimiques DBO₅, DCO, MEST, turbidité, et des paramètres coliformes thermorésistants et virus dans les eaux usées traitées pendant 24 heures.