

Christophe STAVRAKAKIS
Mathias PAPIN
Béatrice DUPUY
Karen RIOU
Christian PENISSON
Max NOURRY
Philippe-Jacques HATT
Vincent BUCHET
Hubert PALVADEAU

Mars 2017 – R. INT. RBE/SG2M-LSPC 2017

Désinfection de l'eau de mer – DESIMER

Etude des sous-produits de désinfection



**Désinfection de l'eau de mer –
DESIMER
Etude des sous-produits de désinfection**

**Rapport scientifique final de l'étude DESIMER,
convention Région Pays de la Loire-Ifremer
2014-04601**

Fiche documentaire

Numéro d'identification du rapport : Diffusion : libre : <input checked="" type="checkbox"/> restreinte : <input type="checkbox"/> interdite : <input type="checkbox"/> Validé par : Sylvie Lapègue Adresse électronique : sylvie.lapegue@ifremer.fr		date de publication : 2017 nombre de pages : 55 bibliographie : oui illustration(s) : 17 figures et 23 tableaux langue du rapport : français
Titre de l'article		
Contrat n° 14269F Rapport intermédiaire <input type="checkbox"/> Rapport définitif <input checked="" type="checkbox"/>		
Auteur(s) principal(aux) : Christophe STAVRAKAKIS Mathias PAPIN Béatrice DUPUY Karen RIOU Christian PENISSON Max NOURRY Philippe-Jacques HATT Vincent BUCHET Hubert PALVADEAU	Organisme / Direction / Service, laboratoire Ifremer / Département Ressources Biologiques et Environnement / Unité Santé, Génétique et Microbiologie des Mollusques / Laboratoire Sécurisation des Productions en Conchyliculture	
Contributeur(s) : Nicole FAURY Benjamin MORGA Marie-Agnès TRAVERS	Ifremer / Département Ressources Biologiques et Environnement / Unité Santé, Génétique et Microbiologie des Mollusques	
Encadrement(s) :		
Cadre de la recherche : Action : A070221 – DESIMER		
Destinataire : Ifremer		

Résumé

L'eau qui alimente des structures d'élevage ou encore des plateformes expérimentales aquacoles (et potentiellement l'eau qui en est issue) peut être contaminée par des agents pathogènes infectant les coquillages, et plus particulièrement les huîtres, ou encore par des agents pathogènes entériques représentant un risque pour les consommateurs. Par ailleurs, la production possible d'huîtres tétraploïdes dans les installations d'élevage implique l'étude de solutions de traitement adaptées pour éviter tout rejet de gamètes, larves ou naissain d'animaux polyploïdes dans l'environnement.

Le projet DESIMER a donc pour objectif d'étudier et de comparer différentes techniques de désinfection de l'eau de mer : la chloration, l'ozonation et le rayonnement UV afin de définir quelles approches techniques sont les plus adaptées tout en prenant en compte la création éventuelle de sous-produits de désinfection.

Ainsi, trois techniques de désinfection de l'eau ont été ciblées :

- la chloration, étudiée comme solution de référence car mise en œuvre dans de nombreuses structures aquacoles pour des opérations de nettoyage et de traitement des eaux intégrant différentes installations d'élevage de l'Ifremer;
- l'ozonation, mise en œuvre notamment dans quelques grands aquariums français;
- l'irradiation UV, largement utilisée à plusieurs étapes des circuits d'eau de mer alimentant les installations d'élevage d'écloseries privées et de la plateforme expérimentale de Bouin. Ce procédé présente l'avantage *a priori* de ne pas créer de sous-produits.

Les travaux ont donc porté sur l'adaptation de ces différentes techniques à l'échelle du laboratoire et sur la mise au point des méthodes d'analyses (cytométrie en flux, biologie moléculaire –qPCR) et de suivi des performances des désinfections pour inactiver les pathogènes, les gamètes et larves de l'huître creuse *Crassostrea gigas*.

Un suivi des sous-produits de désinfection a aussi été réalisé pour les différents traitements afin de les qualifier et de les quantifier.

Les doses pour les trois techniques ont été déterminées afin de satisfaire ces objectifs en faisant appel à des outils et méthodologies fiables permettant de vérifier les performances de ces techniques. De plus, la question de la création de sous-produits de désinfection a été traitée et a permis de confirmer la formation de substances telles que le bromoforme après chloration et ozonation de l'eau de mer.

Mots-clés – Désinfection, Traitement de l'eau, sous-produits, *Vibrio aestuarianus*, OsHV-1, *Crassostrea gigas*.

Words keys – Disinfection, Water Treatment, By-products, *Vibrio aestuarianus*, OsHV-1, *Crassostrea gigas*.

TABLE DES MATIERES

I. Introduction	9
II. La désinfection physico-chimique	11
II.1 Principe général	11
II.1.1 Définition	11
II.1.2 Le paramètre CT	12
II.2 Les principales méthodes de désinfection (Degremont – Suez, 2005)	12
II.2.1 La désinfection par chloration	12
II.2.2 La désinfection par ozonation	13
II.2.3 La désinfection par rayonnements ultraviolets	14
II.3 La mise en œuvre en aquaculture	14
II.3.1 Pour l'inactivation de pathogènes	14
II.3.2 Pour l'inactivation de gamètes et larves d'huîtres	17
Introduction	17
L'ajout d'acide chlorhydrique (HCl)	17
La filtration frontale et tangentielle	18
L'ozonation	19
Le rayonnement UV	20
Synthèse des traitements expérimentés pour l'élimination de gamètes et larves d'huîtres	21
III. Matériels et méthodes mis en œuvre pour la réalisation de tests de désinfection	23
III.1 La caractérisation de l'eau	23
III.1.1 Les analyses physico-chimiques	23
III.1.2 Comptage et tests de viabilité par cytométrie en flux	24
III.1.3 Détection d'ADN viral par biologie moléculaire	25
III.2 Les tests biologiques	25
III.2.1 Gamètes	25
III.2.2 Larves	26
III.3 Les protocoles expérimentaux	27
III.3.1 Chloration	27
Dispositif expérimental	27
<i>Vibrio aestuarianus</i>	27
Gamètes et larves d'huîtres	27
III.3.2 Ozonation	28
Dispositif expérimental	28
<i>Vibrio aestuarianus</i>	28
OsHV-1	29
Gamètes et larves d'huîtres	29
III.3.3 Irradiation UV basse pression	29
Dispositif expérimental	29
<i>Vibrio aestuarianus</i>	30
OsHV-1	30
Gamètes et larves d'huîtres	31
IV. Les performances de désinfection	32
IV.1 Chloration	32

DESIMER

IV.1.1	<i>Vibrio aestuarianus</i>	32
IV.1.2	Gamètes et larves d'huîtres	33
	<i>Tests de viabilité des ovocytes par cytométrie en flux</i>	33
	<i>Tests biologiques pour évaluer la viabilité des gamètes</i>	34
	<i>Tests biologiques pour les larves</i>	35
IV.2	Ozonation	36
IV.2.1	<i>Vibrio aestuarianus</i>	36
IV.2.2	OsHV-1	36
IV.2.3	Gamètes et larves d'huîtres	37
	<i>Tests de viabilité des gamètes par cytométrie en flux</i>	37
	<i>Tests biologiques pour évaluer la viabilité des gamètes</i>	39
	<i>Tests biologiques pour évaluer la viabilité des larves</i>	39
IV.3	Rayonnement UV basse pression	40
IV.3.1	<i>Vibrio aestuarianus</i>	40
IV.3.2	OsHV-1	41
IV.3.3	Gamètes et larves d'huîtres	43
	<i>Tests de viabilité des gamètes par cytométrie en flux</i>	43
	<i>Tests biologiques pour évaluer la viabilité des gamètes</i>	44
	<i>Tests biologiques pour évaluer la viabilité des larves</i>	45
V.	Les sous-produits de désinfection	47
V.1	Introduction	47
V.2	Résultats	47
V.2.1	Les sous-produits recherchés	47
V.2.2	Chloration	48
V.2.3	Ozonation	49
V.2.4	Rayonnement UV	50
V.2.5	Conclusion	50
V.3	Traitements complémentaires	50
VI.	Conclusion	51
VII.	Références bibliographiques	53

I. Introduction

Le Laboratoire de Sécurisation des Productions en Conchyliculture (LSPC) est localisé sur la station Ifremer de Bouin, située dans le polder ostréicole où sont implantées plusieurs écloseries et nurseries. Depuis 2012, grâce aux financements de la Région Pays de la Loire, du FEDER et du Département de Vendée, un nouveau bâtiment a vu le jour pour la mise en œuvre de projets des professionnels de la conchyliculture et des équipes de recherche, dans le cadre de la Plateforme Régionale pour l'Innovation Biosécurisation de Mollusques Bivalves d'Intérêt Commercial.

Dans les structures d'élevage de type écloserie et nurserie, les eaux entrante et sortante peuvent être contaminées par des agents pathogènes infectant les coquillages, notamment le virus OsHV-1 et la bactérie *Vibrio aestuarianus*, responsables de mortalités chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*. De plus, la production d'huîtres tétraploïdes dans les installations d'élevage s'accompagne de mesures de gestion des effluents. C'est dans ce contexte que le LSPC a développé le projet DESIMER, afin d'étudier des solutions de traitement adaptées pour protéger les élevages de contaminations biologiques et éviter le rejet dans l'environnement de polluants ainsi que de gamètes, larves ou naissains d'animaux tétraploïdes.

La désinfection fait partie des pratiques très courantes pour éliminer divers organismes biologiques, et celle-ci est majoritairement réalisée grâce à des méthodes d'oxydation (chloration, ozonation, ...) : une des activités du LSPC en matière de recherche et développement est de définir quelles approches techniques sont les plus adaptées pour mener à bien cette désinfection. En plus de l'efficacité vis-à-vis des contaminants ciblés, un des critères de choix en matière de méthodes de désinfection passe par la maîtrise de l'innocuité des produits traités. Cependant, dans l'eau de mer, la question de la création de sous-produits de désinfection est très rarement prise en compte malgré l'existence de nombreuses publications sur ce sujet (Abarnou, 1982 ; Lazarova *et al.*, 1999 ; Schroeder *et al.*, 2011 ; Shi *et al.*, 2013). Dans le cadre de traitement de l'eau dans les installations d'expérimentation et d'élevage, il est donc indispensable d'étudier et vérifier l'absence de sous-produits d'oxydation problématiques pour l'environnement. En effet, les espèces oxydantes (désinfectantes) réagissent aussi avec le brome, composé présent à hauteur de 60 mg/l dans l'eau de mer, en créant notamment le bromoforme (dans des conditions particulières), substance toxique pour l'environnement aquatique. Ainsi, afin de mettre en œuvre des solutions de traitement adaptées, il est nécessaire de réaliser en amont un certain nombre de tests à l'échelle du laboratoire. Ces tests permettent de vérifier l'efficacité de désinfection par différents procédés sur les composés d'intérêt dans le domaine de la conchyliculture, et d'identifier la présence ou non de sous-produits d'oxydation problématiques. Les procédés étudiés sont :

- **la chloration**, choisie comme solution de référence car mise en œuvre dans de nombreuses structures pour des opérations de nettoyage et de traitement des eaux ;
- **l'ozonation**, utilisée au sein d'établissements aquacoles privés ou encore dans quelques aquariums en France ;
- **l'irradiation UV**, déjà mise en œuvre à plusieurs étapes des circuits d'eau de mer alimentant la majorité des écloseries conchylicoles. Ce procédé présente l'avantage, *a priori*, de ne pas créer de sous-produits de désinfection. Un système UV basse pression, « classique » pour les professionnels, fait l'objet de tests dans cette étude.

Le projet DESIMER prévoit donc trois volets distincts qui sont :

- i. **la définition des moyens analytiques** nécessaires à la caractérisation de l'eau de mer lors des différents tests afin de vérifier les performances des différentes technologies ciblées ;
- ii. **l'évaluation des performances** des trois technologies citées plus haut pour l'inactivation de gamètes et larves d'huîtres, et de pathogènes de l'huître creuse *Crassostrea gigas* tels que le virus OsHV-1 et la bactérie *Vibrio aestuarianus*. Dans ce volet, l'impact de facteurs tels que la température ou la présence de matières en suspension sur les performances de traitement est étudié ;
- iii. **la recherche de sous-produits de désinfection** pour les trois technologies et une première approche bibliographique pour identifier les moyens de les éliminer si nécessaire.

Dans ce rapport, après une première partie présentant une rapide étude bibliographique sur les trois techniques ciblées et leur application pour inactiver des pathogènes, des gamètes et des larves, une seconde partie présentera les matériels et méthodes mis en place pour la réalisation des différents tests. La partie 3 présentera ensuite les performances obtenues pour les différentes techniques alors que la partie 4 abordera la question des sous-produits de désinfection.

Enfin, **un document technique sur les opérations de désinfection de l'eau de mer en conchyliculture** est adossé à ce projet pour informer précisément les utilisateurs de ces techniques et les paramètres à prendre en compte pour sécuriser les élevages et éviter tout rejet de substances néfastes pour l'environnement.

II. La désinfection physico-chimique

II.1 Principe général

II.1.1 Définition

Selon le mémento technique de l'eau (Degremont – Suez, 2005), la désinfection consiste à inactiver les organismes pathogènes tels que les bactéries, les virus et les parasites. Elle se distingue de la stérilisation qui vise l'élimination totale des germes.

L'action germicide des désinfectants est basée sur des mécanismes d'oxydoréduction. L'efficacité d'un désinfectant chimique est donc directement liée à son pouvoir oxydant, lui-même fonction de la température et du pH.

L'efficacité de la désinfection physico-chimique est exprimée en unité logarithmique du pourcentage d'organismes vivants résiduels (voir Tableau ci-dessous).

Taux d'inactivation	90,00%	99,00%	99,90%	99,99%	100,00%
Unité log	1	2	3	4	5

Tableau 1 : Unité d'inactivation

Un Log d'inactivation est une mesure du pourcentage de micro-organismes inactivés pendant une opération de désinfection et est défini comme suit :

$$\log Inactivation = \log(N_0/N_T)$$

avec,

N_0 = concentration initiale en micro-organismes vivants

N_T = concentration en micro-organismes au temps T de traitement

Les principaux oxydants utilisés en désinfection sont :

- l'oxygène ;
- le chlore et l'hypochlorite ;
- le dioxyde de chlore ;
- l'ozone ;
- le permanganate ;
- le peroxyde d'hydrogène ;
- l'acide peracétique ;
- les rayons UV ;
- les systèmes d'oxydation avancés.

Cependant, au regard de leur pouvoir oxydant et désinfectant, les techniques à base de chlore, d'ozone et de rayonnements UV sont les plus utilisées.

Le Tableau 2 présente les applications potentielles de ces principaux désinfectants.

Agent désinfectant	Chlore	Chloramines	Dioxyde de chlore	Ozone	UV
Inactivation des bactéries	++	+	++	+++	++
Inactivation des virus	+++	+	++	+++	++
Inactivation des kystes de protozoaires	0	0	0	+	+++
Effet rémanent	+	++	+	0	0

0 sans effet, + effet positif faible, ++ effet positif moyen, +++ effet positif excellent

Tableau 2 : Applications potentielles des principaux désinfectants (Degremont Suez, 2005)

II.1.2 Le paramètre CT

L'inactivation microbienne est réalisée sur la base des « tables CT » développées pour la loi United States Environmental Protection Agency (US EPA, 1999a et 1999b) qui concerne le traitement des eaux de surface. « C » est la concentration résiduelle en désinfectant (mg/l) et « T » est le temps de contact (minutes) entre l'eau à traiter et le désinfectant. Ces tables indiquent les valeurs de CT (produit des deux paramètres) pour des niveaux d'inactivation en fonction de différentes conditions opératoires. Différentes tables existent pour différents désinfectants. Quand la valeur de CT augmente, un meilleur rendement d'inactivation est obtenu par le désinfectant chimique concerné. Ainsi, le CT et donc le niveau d'inactivation peuvent être augmentés en appliquant des doses plus grandes de désinfectant ou en augmentant le temps de contact. Par exemple, pour un objectif d'inactivation de 4 Log de virus dans une eau ayant un pH compris entre 6 et 9 et une température de 15 °C, une valeur de CT de 4 a été définie par l'US EPA. Ainsi, dans ces conditions, une concentration de 1 mg/l de chlore libre et un temps de contact de 4 minutes devrait théoriquement suffire à réduire de 4 Log une population virale.

C'est ainsi que le concept « CT » est utilisé en pratique pour comparer l'efficacité des différents désinfectants chimiques. Les autres paramètres à prendre en compte pour juger de la qualité de désinfection sont :

- la rémanence de l'oxydant ;
- la reviviscence des micro-organismes sous l'effet du développement de mécanismes de réparation.

II.2 Les principales méthodes de désinfection (Degremont – Suez, 2005)

II.2.1 La désinfection par chloration

La chloration des eaux est effectuée à partir de chlore gazeux ou des hypochlorites de sodium et de calcium, plus faciles à mettre en œuvre. L'hypochlorite de sodium, majoritairement utilisé par de nombreux établissements, est formé par dissolution du chlore gazeux dans une solution de soude en excès. La solution aqueuse commerciale connue sous le nom « eau de javel » est un liquide jaune verdâtre de pH 11,5 à 13. La solution technique est caractérisée par une concentration de 47 à 50° chlorométriques correspondant à 149-159 g/l de chlore actif. L'eau de javel pour usage ménager est à 15° chlorométriques environ (47,5 g/l de chlore actif).

Le temps de contact nécessaire est essentiellement lié à la cible visée, à la présence de composés

interférents (MES, composés oxydables) et aux conditions d'application du chlore : concentration en chlore libre, pH, température de l'eau et qualité de la mise en contact (mélange, hydraulique du réacteur).

Parmi les facteurs dont dépend l'efficacité du chlore, le pH et la température de l'eau ont un effet prépondérant :

- le pH conditionne la distribution des espèces acide hypochloreux et anion hypochlorite ; or l'acide hypochloreux, reconnu comme le plus germicide, prédomine en milieu acide à neutre ;
- la vitesse d'inactivation des micro-organismes augmente à température croissante.

Ainsi le pH de l'eau de mer étant situé autour de la valeur de 8,2, les performances de chloration en aquaculture ne peuvent pas être maximales.

II.2.2 La désinfection par ozonation

L'ozone est capable d'oxyder beaucoup de substances organiques et inorganiques dans l'eau. Sa solubilité dans l'eau (570 mg/l) est 12 fois plus faible que celle du chlore, ce qui explique des concentrations mises en œuvre le plus souvent comprises entre 0,1 et 1 mg/l.

L'ozone réagit rapidement avec les micro-organismes, de sorte que les valeurs de CT sont en général faibles. L'ozone est capable de détruire les principaux organismes pathogènes rencontrés. Il apparaît que :

- les micro-organismes les plus résistants sont les protozoaires qui peuvent impliquer des CT plus de 100 fois supérieurs à ceux nécessaires pour la bactérie *E. coli* ;
- un CT égal à 2 mg.min/l est suffisant pour détruire à 99 % les bactéries, les virus et l'ensemble des kystes de *Giardia*.

L'action de l'ozone sur les micro-organismes dépend des conditions du milieu dont le pH, la température, la présence d'autres composés oxydables et la concentration en MES. En effet :

- le pH conditionne la décomposition de l'ozone ; une augmentation de cette dernière vers des pH basiques a pour effet de réduire la concentration en ozone dissous et donc l'efficacité de désinfection ;
- bien que la température joue en sens inverse sur la solubilité de l'ozone et sur la vitesse d'inactivation, l'efficacité de désinfection augmente à température croissante ;
- les matières organiques contribuent à la demande en ozone de l'eau et entrent en compétition avec les micro-organismes ;
- les matières en suspension peuvent protéger les micro-organismes et, de ce fait, rendre la désinfection plus difficile.

La formation de bromates, au cours de l'ozonation, résulte de l'oxydation des ions bromures selon un mécanisme complexe dans lequel l'ozone et le radical hydroxyle sont impliqués. Dans les eaux naturelles de pH compris entre 6 et 8, l'ozone joue un rôle clé dans la formation de l'acide hypobromeux (HOBr) que le radical hydroxyle ($\text{HO}\cdot$) oxyde ensuite en ion bromite (BrO_2^-) alors facilement converti en ion bromate (BrO_3^-) par l'ozone. La formation de composés organobromés reste un phénomène minoritaire. Il s'ensuit que la conversion des bromures en bromates peut être minimisée moyennant :

- le contrôle du pH pour limiter la décomposition de l'ozone en radical hydroxyle et orienter l'équilibre HOBr/BrO^- ;
- l'addition d'ammoniaque qui réagit très rapidement avec l'acide hypobromeux ;
- la maîtrise de l'hydrodynamique du contacteur avec adaptation des conditions d'application de

l'ozone.

II.2.3 La désinfection par rayonnements ultraviolets

Le rayonnement utilisé en traitement de désinfection se situe dans la gamme UVC qui définit le domaine germicide. En effet, les constituants des matériaux cellulaires, protéines et acides nucléiques, absorbent la lumière entre 200 et 300 nm avec un maximum d'absorbance à 260 nm pour l'ADN.

Ce rayonnement UV est produit majoritairement à partir de lampes à gaine de quartz et à vapeur de mercure à faible ou à moyenne pression. Selon les cas, l'émission est respectivement quasi-monochromatique à 254 nm ou polychromatique. Le mécanisme d'action germicide est basé sur l'absorption des photons par les bases pyrimidine de l'ADN, principalement thymine mais aussi cytosine. L'irradiation provoque alors la dimérisation de bases voisines avec rupture de la chaîne ADN de telle sorte que la réplication ultérieure est inhibée. L'efficacité du rayonnement UV est prouvée concernant l'élimination des bactéries, sous forme sporulée ou non, des rotavirus, poliovirus et des kystes de protozoaires tels que les kystes de *Cryptosporidium*. En revanche, les œufs d'Helminthe ne seraient pas inactivés.

La reviviscence de certains micro-organismes peut limiter la qualité de désinfection. Ce problème est lié au développement de mécanismes capables de régénérer la structure ADN. Les études montrent que la photo-réactivation est possible pour les germes coliformes totaux et fécaux, *Escherichia coli*, *Streptomyces*, *Aerobacter*, *Penicillium*, *Saccharomyces* et *Micrococcus*.

Les rayonnements UV appliqués en désinfection sont réputés pour leur production minimale de sous-produits. Les composés chimiques présents dans l'eau, qui absorbent aux longueurs d'onde émises pour la désinfection, peuvent cependant donner lieu à la formation de produits secondaires. Ce phénomène est d'autant plus important que le spectre de lumière propre au système de production UV est large par rapport à la longueur d'onde germicide (cas des lampes moyenne pression).

La dose UV (mJ/cm^2) est fonction du ou des micro-organismes visés et de l'objectif de désinfection recherché. Cette dose augmente avec la sévérité de l'objectif à atteindre et cette relation n'est pas linéaire en présence de matières en suspension venant protéger voire encapsuler les micro-organismes.

II.3 La mise en œuvre en aquaculture

II.3.1 Pour l'inactivation de pathogènes

En 1995, Torgersen et Hastein ont tenté d'établir des règles afin de réduire au minimum les opérations et donc les quantités de désinfectants mis en œuvre en aquaculture. L'étude portait sur les élevages de saumons, mais les auteurs ont considéré que les procédures et principes de désinfection étaient équivalents pour d'autres types d'élevages comme par exemple les mollusques bivalves.

La désinfection physico-chimique

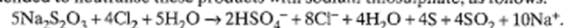
Le tableau ci-après montre les différentes méthodes de désinfection mises en œuvre en aquaculture.

Process	Indications	Method of use *	Comments
Physical			
Desiccation, light	Fish pathogens on earthen bottoms	Dry for three months at an average temperature of 18°C	Drying period can be reduced by the use of a chemical disinfectant
Dry heat	Fish pathogens on concrete, stone, iron, plastic surfaces	Flame-thrower, blow-lamp	
Damp heat	Fish pathogens in transportation vehicle tanks	Steam at 100°C or higher for 5 min	
Ultra-violet rays	Viruses and bacteria in water <i>Myxosporidia</i> spores in water IPN virus in water	5 mJ/cm ² 35 mJ/cm ² 125 mJ/cm ²	Minimum lethal dose
Chemical			
Quaternary ammonium compounds	Virus, bacteria, hands Gill bacteria, plastic surfaces	1 mg/l for 1 min 2 mg/l for 15 min	IPN virus resistant
Calcium oxide	Fish pathogens on dried earthen base	0.5 kg/m ² for one month	Replace in water and empty disinfected pools, keeping the effluents at pH < 8.5
Calcium hypochlorite **	Bacteria and viruses on all clean surfaces and in water	Solution with chlorometric degree of 0.01 (i.e. 30 mg Cl ₂ /l) left to inactivate for several days	Can be neutralised with sodium thiosulphate **
Calcium cyanamide	Spores on earthen base	3,000 kg/ha on dry surfaces; leave in contact for one month	
Formalin	Fish pathogens in sealed premises	Released from formogenic substances, generally trioxymethylene. Comply with instructions	
Iodine (iodophors)	Bacteria, viruses on hands and smooth surfaces Eyed eggs Gametes during fertilisation Tanks	> 200 mg/l for a few seconds 100 mg/l for 10 min 25 mg/l for several hours	See special recommendations **
Ozone	Fish pathogens, water, sterilisation	1 mg/l for 1 min	Costly
Sodium hydroxide	Fish pathogens on resistant surfaces with cracks (unpainted concrete, etc.). May be used in dried earthen ponds	Mixture: – sodium hydroxide 100 g – teepol 10 g – calcium hydroxide 500 g – water 10 l. Surfaces: spray 0.1 l/m ² , leave for 48h. Earth ponds: spray 2 l/m ² , leave for at least 2 weeks	The most active disinfectant (Ca[OH] ₂) stains the surfaces treated; teepol is a tensio-active agent. Turn water on, checking pH
Sodium hypochlorite **	Bacteria and viruses on all clean surfaces and in water Nets, boots, clothing, hands	Chlorometric degree of solution = 0.01 (i.e. 30 mg/l chlorine). Leave to inactivate for a few days or neutralise with sodium thiosulphate after 3 h Chlorometric degree of solution = 0.06. Leave for 20-30 secs; rinse with clean water or neutralise with sodium thiosulphate	Based on bleach

IPN: infectious pancreatic necrosis

* Concentrations indicated are those for the active substance

** Chlorine and iodine are highly toxic for fish and, in order to prevent serious accidents which could result from a manipulation error, it is recommended to neutralise these products with sodium thiosulphate, as follows:



Hence, five moles of thiosulphate neutralise four moles of chlorine; the proportions are the same for iodine. It is therefore possible to prepare a thiosulphate solution at 1%, in which case the neutralising volumes (in ml) will be as follows:

– for chlorine: 28.5 (number of litres of the disinfecting solution × concentration mg/l)/100

– for iodine: 7.8 (number of litres of the disinfecting solution × concentration mg/l)/100

Tableau 3 : Les différentes méthodes de désinfection mises en œuvre en aquaculture

(Torgersen et Hastein, 1995)

Selon ce tableau, des doses de 30 mg/l d'hypochlorite de sodium (temps de contact non précisé), de 1 mg/l d'ozone pendant 1 minute et de minimum 5 mJ/cm² seraient suffisantes pour l'inactivation de

bactéries et virus. Concernant le traitement par rayonnement UV, cette valeur a été confirmée lors du projet européen Bivalife lors duquel des tests d'inactivation du virus OsHV-1 ont été réalisés avec une efficacité démontrée dès 3 mJ/cm² montrant la forte sensibilité du virus aux UVC (Rapport final Bivalife, 2014).

Plus récemment, Hick *et al.* (2016) ont évalué la stabilité de l'herpès virus OsHV-1 dans l'eau de mer et des tissus d'huître après désinfection par différentes techniques de traitement. Des tests laboratoire en petits volumes ont été menés afin d'évaluer l'efficacité de désinfection de méthodes diverses dont l'irradiation UV et l'hypochlorite de sodium, comme indiqué dans le tableau suivant pour des essais dans l'eau de mer.

Disinfection of OsHV-1 in seawater assessed using a bioassay in conjunction with qPCR. The concentration of OsHV-1 in the seawater before treatment was 3.5×10^2 OsHV-1 genome copies/ μ L.

Treatment ID	Disinfection method				Bioassay result				
	Treatment	Dose/description	Buffer exchange	Quantity OsHV-1 ^a (after treatment)	n	Mortality (%)	qPCR oysters		Outcome
							No. positive	Quantity OsHV-1 ^a (Range)	
1	No treatment	Positive control	No	1.7×10^2	6	100	6	1.4×10^5 – 2.9×10^6	Positive
2	No treatment	Positive control	Yes	1.9×10^2	3	100	3	3.0×10^5 – 9.5×10^5	Positive
3	heat	42 °C 5 min	No	9.1×10^1	6	83	6	9.3×10^2 – 1.2×10^5	Positive
4	UV irradiation	> 1000 mW/cm ² 10 min	No	1.4×10^1	5	0	0	0	Negative
5	Sodium hypochlorite	50 ppm available chlorine 15 min	Yes	1.8×10^2	5	0	0	0	Negative
6	Sodium hypochlorite	10% v/v foetal bovine serum + 50 ppm available chlorine 15 min	Yes	2.2×10^2	5	100	5	1.0×10^4 – 1.7×10^6	Positive
7	Virkon	1% w/v 15 min	Yes	0	4	0	0	0	Negative

^a OsHV-1 genome copies/mg tissue or μ L seawater.

Tableau 4 : Résultats de tests de désinfection d'eau de mer pour inactiver OsHV-1 (Hick *et al.*, 2016)

Les performances de traitement ont été vérifiées grâce à des tests biologiques et des analyses qPCR pour déterminer la quantité d'ADN viral présent dans l'eau. Les résultats montrent une nette diminution du nombre de copies d'ADN par μ L (de l'ordre de 95 %) après traitement par irradiation UV (1000 mW/cm² pendant 10 minutes) et ajout d'hypochlorite de sodium (50 mg/l pendant 15 minutes soit un CT de 750), et une absence totale de mortalité d'huîtres maintenues 7 jours dans l'eau traitée. Par ailleurs, une diminution des performances d'une désinfection par ajout d'hypochlorite de sodium lorsque d'autres composés sont présents dans l'eau (ici du sérum de fœtus bovin), montre l'importance de connaître la qualité de l'eau devant être traitée afin de prendre en compte la compétition pouvant exister entre les espèces devant être inactivées et les autres composés présents dans l'eau. A noter que les doses mises en œuvre dans cette étude sont élevées et dans des conditions opératoires de laboratoire avec des tests de désinfection réalisés sur 10 ml d'eau de mer. Ces conditions sont donc éloignées d'un traitement en conditions réelles, particulièrement pour le traitement par irradiation UV pour lequel la plupart des systèmes utilisés ne permettent pas d'atteindre de telles doses.

Enfin, une autre étude a montré qu'une filtration à un seuil de coupure de 5 μ m était suffisante pour protéger les élevages d'une infection par OsHV-1, sans ajout de système d'irradiation UV (Whittington *et al.*, 2015). L'efficacité de ce traitement simple n'a cependant pas été démontrée pour d'autres pathogènes tels que la bactérie *Vibrio aestuarianus*.

II.3.2 Pour l'inactivation de gamètes et larves d'huîtres

Introduction¹

La production d'huîtres *Crassostrea gigas* triploïdes issues d'huîtres tétraploïdes en France, génère des effluents en sortie d'écloserie qu'il faut impérativement traiter. L'objectif est d'éviter toute interaction dans l'environnement entre des animaux tétraploïdes et diploïdes. Dans ce contexte, peu de travaux, hors Ifremer, ont été effectués pour l'inactivation de gamètes et larves d'huîtres dans les effluents d'écloserie. Cette partie fera donc principalement état d'études réalisées à l'Ifremer concernant l'efficacité de quelques techniques de désinfection qui sont :

- l'ajout d'acide chlorhydrique ;
- la filtration frontale et tangentielle ;
- l'ozonation ;
- l'irradiation UV.

L'ajout d'acide chlorhydrique (HCl)

Dès 2004, des tests d'élimination de larves oeillées de 200 à 250 μm ont été réalisés dans les installations Ifremer de Bouin. Les quantités d'acide chlorhydrique² dilué au 1/10^{ème} pour atteindre des valeurs de pH inférieures ou égales à 2 (des essais préalables à pH 3 avaient montré une efficacité insuffisante) étaient les suivantes.

pH	Volume (ml) d'HCl 1/10 pour 200 ml d'eau
2	2,6
1,5	6
1	19,5

Tableau 5 : Proportion d'acide chlorhydrique à mettre en œuvre pour différentes valeurs de pH

Les essais d'élimination des larves ont été réalisés sur des durées de 30 minutes, 3 heures, 5 heures et 24 heures, avec la vérification de la mortalité à ces temps d'expérience pour des échantillons « témoin » en eau de mer sans acide chlorhydrique.

L'efficacité du traitement a été suivie sur la base de la perte d'activité des larves qui sont normalement mobiles. Dans des conditions de pH égal à 2 et pour un temps de mise en contact de trois heures, tous les essais ont montré une absence totale d'activité des larves grâce à une observation au microscope. Cependant, si des larves non actives étaient systématiquement observables, le traitement ne conduisait pas à la destruction totale de ces dernières.

¹ Dans tous les essais laboratoire présentés ci-dessous, les mélanges de spermatozoïdes et d'ovocytes utilisés respectaient un ratio 100/1 et la mise en contact des gamètes était réalisée avant la réalisation du traitement. Toutes les expériences se sont déroulées à l'échelle du laboratoire, c'est-à-dire pour des volumes allant de 200 ml à 10 l maximum d'eau de mer à traiter.

² Qualité non connue

Ainsi, avec l'objectif d'un traitement efficace pour des rejets d'écloserie possédant des huîtres tétraploïdes, les quantités d'acide chlorhydrique 10 % à apporter pourraient être les suivantes :

pH	Conditions expérimentales V = 200 ml	Débit moyen estimé : 1 m ³ /h	Débit maximum estimé : 5 m ³ /h	Volume annuel d'HCl pour Q = 1 m ³ /h
2	0,0026 l	13 l/h	65 l/h	570 m ³
1,5	0,006 l	30 l/h	150 l/h	1314 m ³
1	0,0195 l	97,5 l/h	487,5 l/h	4270 m ³

Tableau 6 : Quantités d'acide chlorhydrique à mettre en œuvre en fonction du débit d'eau à traiter et de la valeur de pH visée

Il est important de rappeler que les chiffres donnés dans le tableau précédent sont le résultat d'une extrapolation faite à partir d'informations obtenues pour de faibles volumes. Une étape de validation serait de ce fait nécessaire. Cependant, au regard des volumes d'acide chlorhydrique à mettre en jeu pour atteindre une valeur de pH de 2, du temps de contact de 3 heures et d'une étape de neutralisation des effluents à prévoir avant rejet dans le milieu naturel, cette solution n'est pas envisageable.

La filtration frontale et tangentielle

Des essais ont été réalisés en 2006 en partenariat avec la société Pall (Pall Corporation, 2006a et 2006b ; Martin, 2008) qui a effectué des tests de filtration sur des solutions concentrées en spermatozoïdes d'huîtres creuses. Des tests biologiques étaient ensuite réalisés avec des ovocytes et comparés avec une fécondation témoin réalisée à partir de spermatozoïdes non traités.

Deux types de filtration ont été envisagés :

- la filtration frontale avec des médias filtrants sous forme de plaques ou de disques. Les essais étaient réalisés pour un débit de 20 ml/min. Des tests complémentaires ont également été réalisés pour observer l'impact de la présence de phytoplancton sur le colmatage des médias ;
- la filtration tangentielle de type microfiltration avec des membranes (système MICROZA, série UMP) possédant des diamètres de pores de 0,2 µm. Pour un volume initial de 5 l à traiter, le débit de perméat était d'environ 13 ml/min et le débit de recirculation d'environ 160 ml/min. Au bout de 360 minutes de filtration, le volume de perméat recueilli était d'environ 4,6 l.

La désinfection physico-chimique

Les résultats des tests biologiques pour ces deux configurations de traitement sont les suivantes³ :

	comptage larves		nb total
	0.5ml	0.5ml	
Témoin	180	230	16400
frontale 8ml/mn du 20/04 PDH4(K700+KS50) 15µ-1µ sperme	20	23	1720
tangentielle du 20/04	1	6	280
frontale 20ml/mn du 20/04 PDH4(K700+KS50) 15µ-1µ sperme	0	0	0
frontale monoseuil 21/04 KS50 1µ sp+ov+phyto	0	0	0
frontale double seuil du 21/04 PDH4(K700+KS50) 15µ-1µ sp+ov+phyto	0	0	0

Tableau 7 : Résultats de tests biologiques suite à la filtration d'eau de mer contenant des spermatozoïdes, mis ensuite en contact avec des ovocytes sains

Ces résultats montrent que la filtration frontale permet une absence totale de fécondation, sauf lors du test à 8 ml/mn avec filtre PDH4 lors duquel le filtre a été endommagé et ne remplissait donc plus son rôle de barrière physique. Par contre, la filtration frontale nécessite une étape préalable de filtration à un seuil de 25 µm en présence de phytoplancton, ceci afin d'éviter un colmatage accéléré des médias filtrants.

En ce qui concerne la filtration membranaire, quelques larves ont pu être comptées lors des tests biologiques (moins de 2 % du nombre de larves comptées dans le ballon témoin).

La filtration membranaire a déjà été étudiée à la station Ifremer de Bouin en 2005 (Batoula, 2005). Les expériences étaient réalisées durant 1h30 avec un débit d'environ 2 ml/min en eau de mer contenant uniquement des spermatozoïdes d'huîtres. Tous les essais menés avec différents types de membranes, minérales et organiques, ont montré 100 % d'efficacité, soit 0 larve D lors des tests biologiques effectués après filtration. Ceci indique que, dans les conditions d'essai, soit les spermatozoïdes étaient arrêtés physiquement par les membranes, soit ils pouvaient passer au travers des membranes mais en subissant une altération suffisante pour leur faire perdre leur pouvoir fécondant.

L'ozonation

En 2009, une étude d'élimination des gamètes d'huîtres creuses⁴ par ozonation a été réalisée par Baudon *et al.* dans les installations Ifremer de Bouin. Le principe consistait à préparer une solution de gamètes mâles et femelles à différentes concentrations, puis de mettre cette solution en contact avec l'ozone sur différentes durées.

³A confirmer par des essais à plus grande échelle

⁴ Les gamètes étaient mis en contact avant le traitement puis le taux de fécondation était évalué

Les concentrations en ozone testées dans des ballons de 10 l étaient de 5 mg/l, 10 mg/l, 12,5 mg/l et 15 mg/l.

Le nombre de larves compté dans les différents ballons d'essai est présenté dans le tableau ci-dessous.

Concentration en ozone (mg/l)	Nombre de larves « témoin »	Nombre de larves ballons 1 et 2 (moyenne)
6,02	4156	11
9,60	4462	4
12,60	6440	2
15,80	2428	0
16,14	4014	3

Tableau 8 : Résultats de tests biologiques suite à l'injection de différentes doses d'ozone

Les résultats montrent que, pour une concentration en ozone de l'ordre de 11 mg/l, le nombre de larves D est plus de 99,9 % inférieur au nombre de larves D comptées dans les ballons témoin, sans ozone.

En 2010, une étude complémentaire a été réalisée par Chauvelot *et al.* afin d'observer l'impact de plus faibles concentrations en ozone dans l'eau, de 0,1 mg/l à 2 mg/l. Les solutions de gamètes ont été préparées de façon similaire aux essais présentés ci-dessus. Les principaux résultats sont présentés dans le tableau ci-après.

	Concentration ORT (mg.l-1 eq O ³)	Pourcentage de mortalité larvaire
Essais 2010	0,1	99,56
	0,2	98,81
	0,5	98,70
	0,6	99,65
	1,8	99,54
Essais 2009	1,9	99,05
	6,0	99,76
	9,6	99,87
	12,6	99,97
	16,0	99,98

Tableau 9 : Mortalités larvaires suite à l'injection de différentes doses d'ozone

Les résultats montrent que, quelle que soit la concentration en ozone testée durant tous ces essais, le nombre de larves D est de 98,7 % à 99,9 % plus faible que lors de fécondations « témoin ». Ainsi, des concentrations en ozone de 0,1 à 0,2 mg/l permettraient d'obtenir une efficacité très proche de ce qui a été obtenu avec des concentrations supérieures en ozone. Dans ces conditions, la concentration en ozone résiduelle serait inférieure à 0,02 mg/l, permettant ainsi le rejet dans le milieu naturel sans traitement complémentaire (sans neutralisation).

Le rayonnement UV

En 2010, des essais succincts d'élimination de gamètes (ovocytes + spermatozoïdes) par rayonnement UV ont été réalisés à la station Ifremer de Bouin, mais sur des appareils de faible puissance destinés à effectuer de la climatisation d'eau en aquariophilie et équipés de lampes UV. Dans les conditions testées, des taux de fécondation d'environ 50 % ont été observés et l'impact du

pompage n'a pas été évalué. Des essais doivent être conduits avec un système de traitement UV conçu pour le traitement des eaux afin d'étudier l'efficacité d'un tel traitement vis-à-vis des gamètes et larves d'huîtres.

En 2000, Li *et al.* ont étudié l'effet d'une irradiation UV sur des spermatozoïdes d'huîtres creuses *Crassostrea gigas*. Avec une lampe délivrant une dose de 72 erg/mm²/s pendant 60 s soit une dose UV d'environ 43 mJ/cm², une inactivation des spermatozoïdes a été observée puisque toute fécondation réalisée avec des ovocytes sains n'a pas permis d'atteindre le stade de larve D. La dose délivrée correspond aux systèmes mono-lampes utilisés dans beaucoup d'établissements conchylicoles.

Synthèse des traitements expérimentés pour l'élimination de gamètes et larves d'huîtres

Traitement	Efficacité maximale obtenue	Méthode de vérification des performances	Coût annuel estimé *	Remarques
Acide chlorhydrique 10%	100%	Tests biologiques	114 k€	Non prise en compte d'une étape de neutralisation
Filtration frontale	100%	Tests biologiques	De 10 à 28 k€ selon les types de filtres	Étude réalisée pour un traitement complémentaire à l'ozone (5 mois par an)
Filtration membranaire	100%	Tests biologiques	29 k€	Étude réalisée pour un traitement complémentaire à l'ozone (5 mois par an)
Ozonation	99,9%	Tests biologiques	4 k€	Non prise en compte de l'achat ou la production d'oxygène nécessaire au procédé et d'un traitement complémentaire afin d'éliminer les sous-produits d'oxydation
Rayonnement UV	Environ 50%	Comptage larves D actives	-	Étude très succincte, doit être approfondie avec du matériel adapté

* ne tient pas compte des consommations électriques et des frais de maintenance / entretien.

Tableau 10 : Synthèse des principales caractéristiques des traitements envisagés pour l'élimination de gamètes et larves d'huîtres

Une durée de vie des équipements de 10 ans a été choisie comme base de calcul des montants indiqués dans le tableau ci-dessus. Ainsi, pour les procédés de filtration et d'ozonation, les coûts sont le résultat du coût d'investissement divisé par 10. Pour les autres techniques, il ne s'agit que des coûts relatifs à l'achat de produits chimiques.

L'ozonation et la chloration semblent être les solutions étudiées les moins chères, mais n'ont pas montré 100% d'efficacité lors de ces études et nécessitent une surveillance accrue des espèces oxydantes résiduelles pouvant être créées. De plus, les phases de neutralisation et d'élimination des sous-produits de désinfection éventuels n'ont pas été prises en compte.

DESIMER

De manière générale, pour tous les procédés testés, les performances doivent être vérifiées vis-à-vis de gamètes mâles seuls ou gamètes femelles seuls, car cela n'a pas ou peu été étudié dans les essais présentés ici.

III. Matériels et méthodes mis en œuvre pour la réalisation de tests de désinfection

III.1 La caractérisation de l'eau

III.1.1 Les analyses physico-chimiques

En traitement des eaux, la caractérisation préalable de l'eau est une étape essentielle pour le choix des techniques de traitement et la détermination de paramètres opératoires pertinents. La partie 2 du présent rapport fait notamment référence à des composantes de la qualité d'eau pouvant altérer les performances de désinfection. Ainsi la recherche de carbone organique dissous, de fer ou encore de manganèse a été ciblée pour caractériser les eaux utilisées pour tous les essais. Ces analyses ont été confiées à un laboratoire d'analyses environnementales (Inovalys). Les paramètres mesurés et les valeurs associées pour l'eau de mer mise en œuvre pour l'ensemble des expérimentations sont les suivants :

Analyses	Résultat
Brome	< 0,11 mg/l
Brome total	< 0,11 mg/l
Bromures	60,8 mg/l
Azote Kjeldahl	0,7 mg (N)/l
Carbone Organique Dissous	1,9 mg/l
Bromates	< 1 000 µg/l
Fer	0,02 mg/l
Manganèse	< 5,0 µg/l

Tableau 11 : Caractérisation de l'eau de mer mise en œuvre dans les expérimentations

Au regard de ces résultats, la qualité de l'eau de mer mise en œuvre dans les expérimentations ne présente pas d'élément à des teneurs susceptibles d'altérer les performances de désinfection par oxydation.

Durant les tests de désinfection par oxydation, des mesures de potentiel Redox ont été réalisées mais les sondes, peu adaptées au milieu eau de mer, n'ont pas permis d'obtenir de mesures fiables, au mieux d'observer une augmentation de ce potentiel en présence d'oxydant dans l'eau.

III.1.2 Comptage et tests de viabilité par cytométrie en flux

La cytométrie en flux est une technique d'analyse qualitative et quantitative de cellules en suspension dans un flux de liquide (caractéristique optique/ excitation par laser). La détermination des caractéristiques physiques (taille, complexité, ...) et chimiques (auto-fluorescences ou fluorescences liées à l'incorporation de molécules sondes) permet le phénotypage des populations cellulaires et l'évaluation de nombreuses fonctions cellulaires.

Un cytomètre en flux de paillasse Cyflow Space PARTEC (2012) a été mis en œuvre pour la détermination des concentrations dans l'eau en bactéries *Vibrio aestuarianus*, en spermatozoïdes et en ovocytes. L'appareil est équipé d'un laser bleu (488 nm) et d'une source UV (LED). Le signal peut ensuite être traité sur 6 paramètres : taille, forme, émission dans le vert, l'orange et le rouge.

Pour *V. aestuarianus*, une méthode a été développée afin de compter de façon juste et reproductible les bactéries présentes dans un échantillon d'eau de mer. Cette phase de développement a été réalisée en collaboration avec le Laboratoire de Génétique et Pathologie des Mollusques Marins (LGPM) de la station Ifremer de La Tremblade qui a réalisé la mise en culture de la bactérie et maîtrisait déjà son analyse par cytométrie en flux.

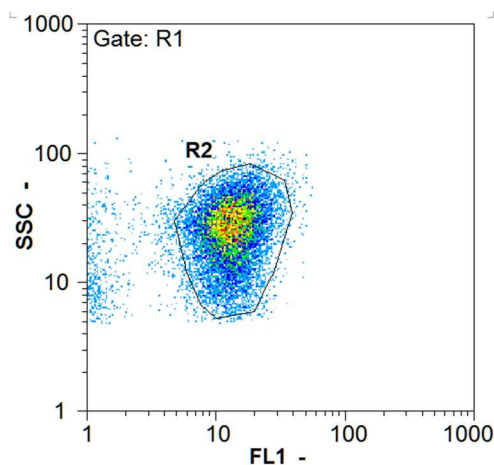


Figure 1 : Cytogramme montrant la zone de fluorescence de la bactérie *V. aestuarianus*

De la même façon, deux autres méthodes ont été développées afin de compter les gamètes et ainsi maîtriser les quantités mise en jeu lors des différentes expérimentations. Ces développements se sont notamment appuyés sur les travaux menés par Le Goïc *et al.* (2014) sur l'évaluation de la viabilité d'ovocytes d'huître creuse *Crassostrea gigas*. Deux méthodes ont été développées pour les spermatozoïdes et les ovocytes avec la possibilité de déterminer les concentrations cellulaires dans un échantillon d'eau de mer et de distinguer la part de cellules viables de celles non viables comme montré sur la figure suivante.

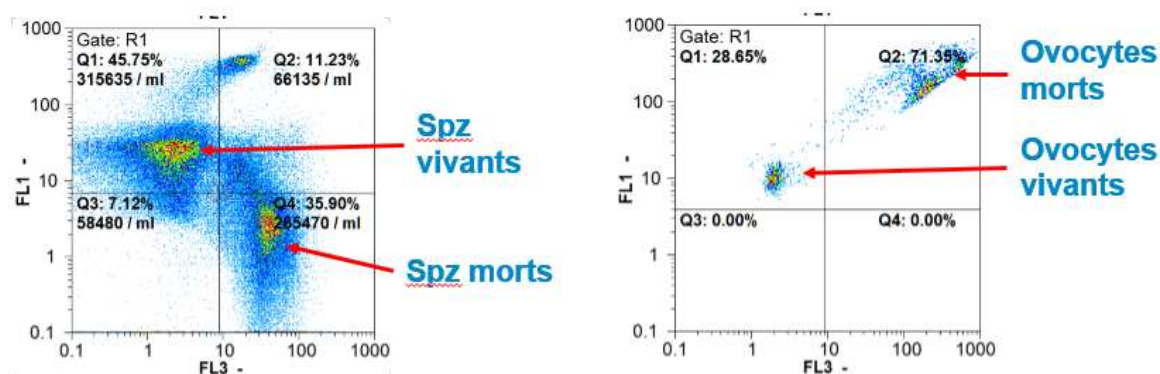


Figure 2 : Comptage et test de viabilité de spermatozoïdes et d’ovocytes d’huître creuse *Crassostrea gigas*

III.1.3 Détection d’ADN viral par biologie moléculaire

La biologie moléculaire dont l’objet est la compréhension des bases moléculaires des processus fondamentaux du vivant, en particulier ceux impliqués dans la reproduction et l’expression de l’information génétique (ADN et ARN), utilise des techniques de manipulation des acides nucléiques (ADN et ARN). La PCR (polymerase chain reaction) ou amplification en chaîne par polymérase est une méthode d’analyse de biologie moléculaire qui permet de détecter la présence d’une séquence d’ADN ou d’ARN spécifique et connue par amplification génique in-vitro après extraction de l’ADN ou de l’ARN contenu dans les échantillons (d’eau ou de tissus). La qPCR, ou PCR quantitative ou en temps réel, permet en plus de la détection de la séquence d’ADN connu et recherché d’estimer la quantité de cet ADN présente dans l’échantillon grâce à un suivi de la fluorescence (marqueur de fluorescence) à chaque cycle d’amplification et à un étalon. Cette technique a donc été mise en œuvre pour déterminer la présence du virus OsHV-1 dans l’eau ou dans des tissus de l’huître grâce à des méthodes développées par le LGPMM à La Tremblade (Renault and Lipart, 1998 ; Renault *et al.*, 2000 ; Pepin *et al.*, 2008).

III.2 Les tests biologiques

III.2.1 Gamètes

Le test biologique permet d’apprécier la viabilité des gamètes après le traitement. Si aucune population morte n’est révélée par cytométrie, le traitement peut cependant altérer la capacité des gamètes à féconder. Le test consiste à réaliser différents croisements de gamètes pour connaître l’impact du traitement sur les spermatozoïdes et sur les ovocytes. Chaque condition de fécondation est réalisée en duplica avec l’objectif d’atteindre les conditions suivantes :

Volume ballon	10 L
Température	25 °C
Concentration ovocytes	100 o/mL
Concentration spermatozoïdes	10 000 s/mL

Tableau 12 : Conditions de fécondation -Test biologique gamètes

Quatre croisements différents sont réalisés :

A1/A2 : ovocytes sains + spermatozoïdes sains (fécondation témoin)

B1/B2 : ovocytes sains + spermatozoïdes traités

C1/C2 : ovocytes traités + spermatozoïdes sains

D1/D2 : ovocytes traités + spermatozoïdes traités

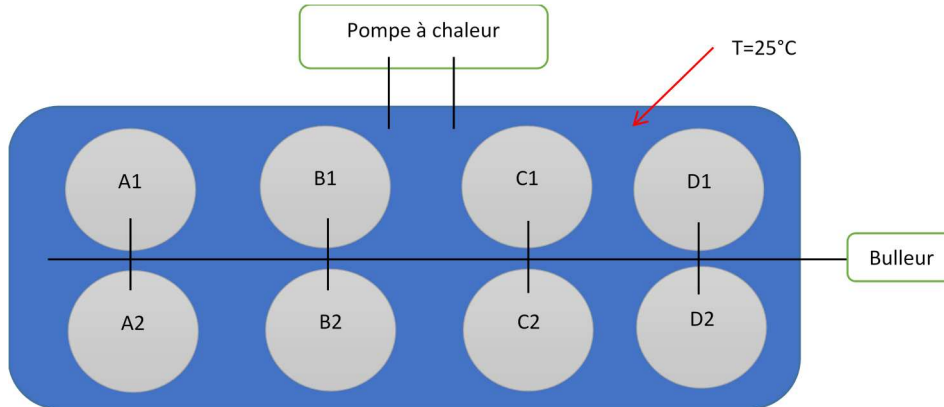


Figure 3 : Dispositif expérimental pour les tests biologiques avec gamètes traités

Les volumes d'ovocytes et spermatozoïdes sains et traités à utiliser pour les fécondations sont calculés d'après les concentrations en gamètes déterminées par cytométrie en flux avant et après traitement. Après mise en contact des gamètes durant 10 minutes, les mélanges de gamètes sont introduits dans des ballons pré-remplis avec de l'eau de mer filtrée 1 µm, désinfectée par rayonnements UV et chauffée à 25 °C. Le test biologique consiste alors à étudier les larves obtenues 24 h puis 48 h après la fécondation. Les ballons sont tamisés sur 21 µm, afin de collecter les larves et les ovocytes qui n'auraient pas été fécondés, puis récupérés dans 100 ml d'eau de mer.

III.2.2 Larves

Pour juger de l'efficacité d'un traitement sur des larves D (stade normalement obtenu 24 heures après fécondation), il est nécessaire de suivre leur développement et de le comparer à celui de larves D témoins n'ayant pas subi le traitement. Des observations et prélèvements des larves traités et témoins pour comptage sont réalisés :

- 24 h après fécondation

Un premier calcul du taux d'éclosion est calculé sur les témoins et les larves avant traitement.

Après traitement, un taux de survie est réalisé afin de déterminer l'effet direct de celui-ci sur les larves. Ce taux correspond au rapport suivant :

$$\text{Taux de survie 1} = \frac{\text{Nombre de larves après traitement}}{\text{Nombre de larves avant traitement}}$$

Après traitement les larves sont remises en conditions d'écloserie contrôlées.

- 48 h après fécondation

48 h après remise en eau, les larves sont de nouveau tamisées puis un comptage est réalisé. Un deuxième taux de survie est calculé et peut alors être comparé à celui obtenu pour les bacs témoins.

III.3 Les protocoles expérimentaux⁵

III.3.1 Chloration

Dispositif expérimental

Des ballons de 10 l sont disposés dans un bac dont l'eau est thermorégulée grâce à deux pompes à chaleur équipées d'un système de traitement U.V. Le temps de contact au sein des ballons entre l'hypochlorite de sodium et les organismes cibles a été fixé à 60 minutes, soit des valeurs de CT allant de 300 à 6 000, valeurs volontairement élevées afin de prendre en compte la complexité de l'eau de mer par rapport à une eau douce. Une agitation douce est réalisée afin d'optimiser la mise en contact.

Vibrio aestuarianus

Seuls des tests sur la bactérie *Vibrio aestuarianus* ont été menés puisque le virus OsHV-1 ne permettait pas de réaliser de test avec une méthode de vérification des performances fiable (le chlore présent dans l'eau empêche toute analyse et tout test biologique). Concernant la bactérie, selon un protocole de mise en culture et remise en suspension défini par le LGPMM (Station de La Tremblade)⁶, il a été possible de mettre en place des tests simples qui visaient à suivre la concentration bactérienne par cytométrie en flux puis à récupérer les bactéries après traitement par filtration de 350 ml à 0,22 µm et remise en culture sur milieu LBS + Kanamycine à 22°C pendant 48 à 72 heures.

Les tests de chloration ont été réalisés en ballon de 5 l (agité) et pour une concentration bactérienne initiale de 10⁶ bactéries/ml. Un temps de contact de 60 minutes et une dose de 10 mg/l de chlore actif ont été appliqués aux différents tests (CT de 600).

Gamètes et larves d'huîtres

6 séries d'expériences de chloration ont été menées en ballons de 10 l afin de tester :

- 3 concentrations en hypochlorite de sodium : 5, 10, 30 (et 100 mg/l pour un test de création de sous-produits d'oxydation) ;
- 3 températures d'eau : 5 °C, 15 °C et 20 °C ;
- l'impact de la présence de phytoplancton (à hauteur de 30 000 cellules / larve).

Les densités en organismes biologiques ont été définies en trouvant le bon compromis entre les concentrations réelles pouvant être observées dans les effluents d'écloseries et les limites analytiques du matériel disponible au laboratoire.

⁵ Tous les tests de désinfection des pathogènes ont été réalisés en duplicat du fait de la bonne répétabilité observée lors des traitements. Pour l'inactivation des gamètes et des larves d'huîtres, les résultats présentés sont issus de tests de désinfection réalisés en triplicat.

⁶ La souche de *Vibrio aestuarianus* fournie par le LGPMM présente la particularité d'être modifiée par l'incorporation dans le cytoplasme d'une protéine fluorescente (GFP), facilitant son observation en cytométrie en flux. A partir d'une souche conservée sur milieu solide, la bactérie est mise en culture en milieu LBS liquide (24 h à 22 °C) enrichi d'un antibiotique, la kanamycine (celui-ci permet au milieu d'être spécifique à cette bactérie).

Organisme biologique	Densité en nombre d'unités/ ml
Larves < 100 µm	25
Ovocytes	250
Spermatozoïdes	50 000

Tableau 13 : Densités de matériel biologique pour la réalisation des essais de chloration

III.3.2 Ozonation

Dispositif expérimental

La production d'ozone est réalisée grâce à un ozoneur Ozonia de la marque Triogen qui permet la production d'ozone à partir d'air sec. Celui-ci est alimenté par un compresseur Comptair muni d'un assécheur d'air, ce qui permet d'augmenter le rendement de production de l'ozone. La quantité d'ozone produite peut être réglée par la modification du débit d'air en sortie d'ozoneur et par la modification du variateur. Le dispositif expérimental est présenté sur la figure suivante.

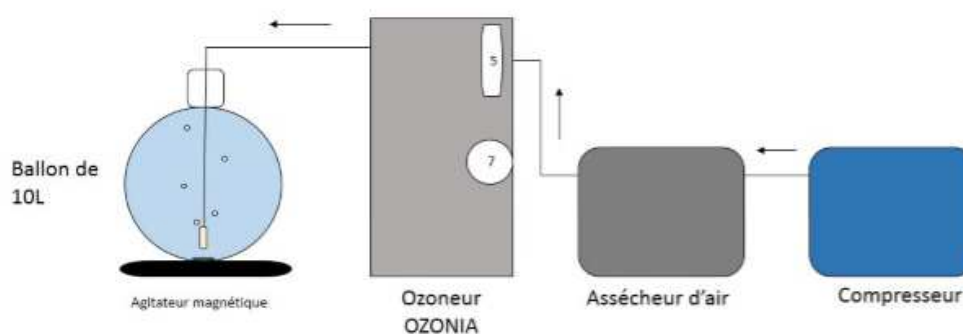


Figure 4 : Dispositif expérimental pour la réalisation des tests d'ozonation

Les tests sont effectués dans des ballons de 10 l avec de l'eau de mer filtrée à 1 µm et désinfectée par rayonnement UV (température de 20 °C). L'injection d'ozone est réalisée sous agitation constante pour une bonne homogénéisation du milieu. La teneur en ozone est déterminée par un dosage indirect de la concentration en chlore actif total (Test chlore Spectroquant) par spectrophotométrie à une densité optique de 550 nm (spectrophotomètre Thermo Scientific Evolution 220). Cette analyse permet de déterminer une valeur en équivalent Ozone (en mg/l).

Vibrio aestuarianus

La concentration en bactéries dans chaque ballon a été fixée à 10^6 bactéries/ml et la teneur en ozone était fixée à 1 mg/l. Le temps de mise en contact entre les bactéries et l'ozone était de 30 minutes soit une valeur CT de 30.

Pour le suivi de la bactérie, deux techniques sont utilisées :

- la cytométrie en flux qui permet de suivre la présence et la concentration des bactéries ;
- l'ensemencement sur gélose LBS + Kanamycine après filtration sur filtre 0,22 µm (idem tests chloration).

OsHV-1

Avant toute expérimentation, la première étape consistait à réaliser un test de virulence d'une suspension virale produite par le LGPMM selon une méthodologie publiée par Shikorski *et al.* (2011). Ainsi 100 µl de la solution mère diluée au 1/10^{ème} étaient injectés dans 10 huîtres âgées de 8 à 10 mois puis un suivi des mortalités était opéré dans les 48 heures suivantes.

Une fois la virulence vérifiée, 2 huîtres infectées par l'injection de 100 µl de la solution mère diluée au 1/10^{ème} sont mise en œuvre par litre d'eau de mer à infecter. Après 24 à 48 heures de maintien des huîtres dans l'eau, ce protocole permet théoriquement d'atteindre une concentration virale de 10⁴ copies d'ADN par µl.

Pour chaque essai, 3 tests biologiques sont réalisés en duplicat :

- un témoin négatif en eau de mer,
- un témoin positif dans la solution virale produite,
- un test sur la solution virale traitée (triplicat).

Pour ces tests, 10 huîtres sont placées dans la solution à tester. La mortalité est suivie sur 72 h et des prélèvements d'1 ml d'eau (conservés par congélation à -20 °C) sont réalisés à T0 et toutes les 24 h afin de réaliser des analyses par qPCR pour mesurer la quantité de virus (ADN viral) présente. En complément, les huîtres retrouvées mortes sont conservées au congélateur pour analyse ultérieure par qPCR. De même, sur les lots ne présentant pas de mortalité après les 72 h de test, 3 huîtres sont conservées par congélation.

Gamètes et larves d'huîtres

Les expériences d'ozonation ont été menées en ballons de 10l afin de tester l'impact de concentrations en ozone allant de 0,1 à 1 mg/l. L'étude de l'impact de la température de l'eau et de la présence de microalgues dans le milieu étant déjà programmée lors des tests de chloration, elle n'est pas renouvelée dans le cas de l'ozonation.

Les densités en organismes biologiques sont identiques à celles définies pour les tests de chloration. Le temps de contact entre l'ozone et les organismes cibles a été fixé à 30 minutes, soit des valeurs de CT allant de 3 à 30. Une agitation par agitateur magnétique est réalisée afin d'optimiser la mise en contact. Après ozonation, un test biologique est réalisé selon le protocole présenté précédemment dans ce rapport.

III.3.3 Irradiation UV basse pression

Dispositif expérimental

Un système fourni par Bio UV, équipé d'une lampe UV basse pression capable de fournir une dose UV de l'ordre de 42 mJ/cm², a été mis en œuvre pour ces essais. Ce système est prévu pour des plages de débit compris entre quelques l/h et quelques m³/h.⁷ L'installation est présentée ci-après.

⁷ Ce travail a notamment fait l'objet d'un stage de DUT Génie chimique (Samy Palombo), génie des procédés de l'IUT de Saint Nazaire

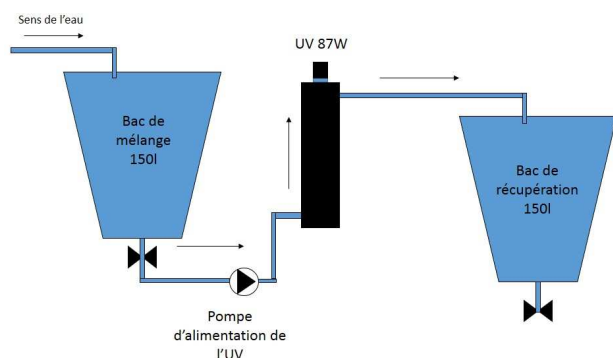


Figure 5 : Dispositif expérimental de désinfection par rayonnement UV basse pression

Les conditions expérimentales sont les suivantes :

- lampe UV 87 W, capable de délivrer 42 mJ/cm^2 dans les limites d'utilisation spécifiées par le fabricant ;
- débit eau de mer : $1 \text{ m}^3/\text{h}$;
- température : $20 \text{ }^\circ\text{C}$.

Le mélange à traiter est réalisé dans un bac de 150 l en amont du système UV. Le passage dans celui-ci est réalisé à l'aide d'une pompe à un débit de $1 \text{ m}^3/\text{h}$. L'effluent traité est récupéré dans un second bac cylindrique de 150 l. Les prélèvements sont réalisés dans ce bac qui sert ensuite de bac de traitement par chloration à hauteur de 50 mg/l .

Vibrio aestuarianus

La concentration en bactéries dans le bac a été fixée à 10^6 bactéries/ml pour un volume total de 30 l et sa caractérisation est réalisée selon deux techniques :

- la cytométrie en flux qui permet de suivre la présence et la concentration des bactéries ;
- l'ensemencement sur gélose LBS + Kanamycine après filtration sur filtre $0.22\mu\text{m}$ (cf tests chloration).

OsHV-1

Le volume passé dans le système UV est de 30 l (volume limité dû au nombre d'huîtres requis pour produire le virus). En début de test, 3 huîtres sont placées au congélateur pour analyse par qPCR afin d'établir l'état initial (référence) du lot suivi.

Après le passage dans le système UV, 5 l du milieu sont placés dans des aquariums de 10 l avec 10 huîtres. La température est maintenue à 21°C et une oxygénation en continu est réalisée. Les huîtres ne sont pas nourries durant toute la durée de l'expérimentation. La concentration de la charge virale dans les aquariums est mesurée par qPCR sur des prélèvements d'eau réalisés à T_0 , et toutes les 24 heures pendant 7 jours. En complément, un prélèvement est opéré directement dans l'eau après traitement afin de mettre en évidence l'effet instantané du rayonnement UV.

La mortalité est suivie pendant 7 jours à raison d'une observation toutes les 24 heures. Les huîtres retrouvées mortes sont retirées de l'aquarium et conservées au congélateur en vue d'une analyse qPCR sur les chairs.

Gamètes et larves d'huîtres

Les densités en organismes biologiques sont identiques à celles définies pour les tests de chloration et d'ozonation. 50 l de solution de matériel biologique étaient préparées pour être pompées dans le système UV (un seul passage). L'eau traitée était ensuite récupérée dans un bac afin d'effectuer sa caractérisation et réaliser les tests biologiques de vérification des performances.

IV. Les performances de désinfection

IV.1 Chloration

IV.1.1 *Vibrio aestuarianus*

Pour chaque test, un suivi de la concentration bactérienne a été effectué par cytométrie en flux durant les 60 minutes de mise en contact avec de l'hypochlorite de sodium à une concentration de 10 mg/l. Pour une concentration initiale de 10^6 bactéries/ml, les résultats suivants ont été obtenus :

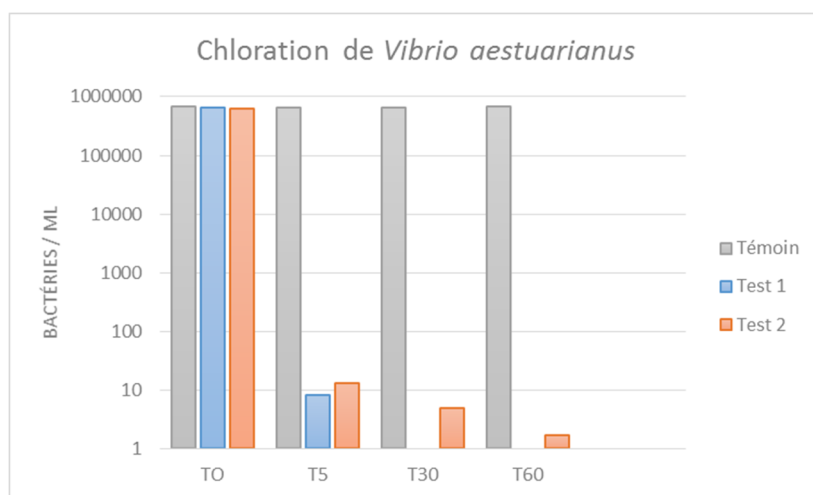


Figure 6 : Suivi de la concentration de *Vibrio aestuarianus* pendant une chloration à 10 mg.l⁻¹ pendant 60 minutes ($C_0 = 10^6$ bactéries/ml)

Les résultats montrent un abattement de presque 5 log dès 5 minutes de chloration, soit pour une valeur de CT de 50. Dans ces conditions, une dizaine de bactéries par ml a pu être comptée par cytométrie en flux. Après 30 minutes de chloration, seul un test a conduit à l'identification de bactéries dans l'échantillon analysé à hauteur de 5 bactéries par ml, puis à peine 2 bactéries/ml au terme des 60 minutes de test.

En complément, des échantillons de 350 ml ont été filtrés sur filtre stérile de 0,22 μm afin de récupérer les bactéries restantes et les remettre en milieu de culture adapté afin d'identifier un éventuel développement après traitement.

Les performances de désinfection

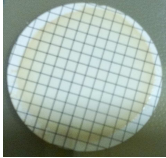
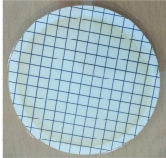
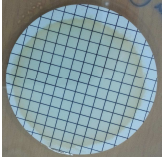
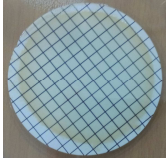
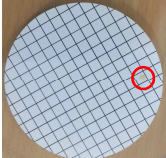
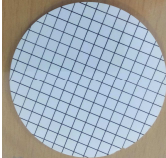
	Témoin	Test 1	Test 2
T0			
T60			

Tableau 14 : Analyses bactériennes avant et après traitement par chloration

Les analyses montrent l'efficacité du traitement après 60 minutes puisque les filtres posés sur le milieu de culture ne présentent pas de développement bactérien. Une colonie seulement reste visible sur le filtre T60 du test 1 (pour une analyse sur deux car réalisées en duplica) ce qui correspond pour les 350 ml d'échantillon filtrés à une concentration de $1,4 \cdot 10^{-3}$ bactéries/ml, et donc à une désinfection efficace.

IV.1.2 Gamètes et larves d'huîtres

Tests de viabilité des ovocytes par cytométrie en flux

Après chaque essai de traitement des gamètes, la première approche a été de réaliser un test de viabilité par cytométrie en flux. Cette étape n'a été possible que pour les ovocytes car ceux-ci ont pu être extraits du milieu chloré par tamisage sur une maille de 21 μm . Ce tamisage n'étant pas possible pour les spermatozoïdes en raison de leur trop petite taille, une analyse d'un échantillon d'eau traitée était envisageable mais le chlore encore présent dans le milieu conduisait à une inactivation des fluorochromes ajoutés dans un second temps pour le test de viabilité. Une amélioration a pu être obtenue en neutralisant le chlore avec du thiosulfate de sodium mais la méthode n'était pas reproductible.

Sur la figure ci-après sont présentés les cytogrammes obtenus après 60 minutes de chloration d'ovocytes à 5 et 10 mg/l de chlore actif et à une température de 15 °C.

DESIMER

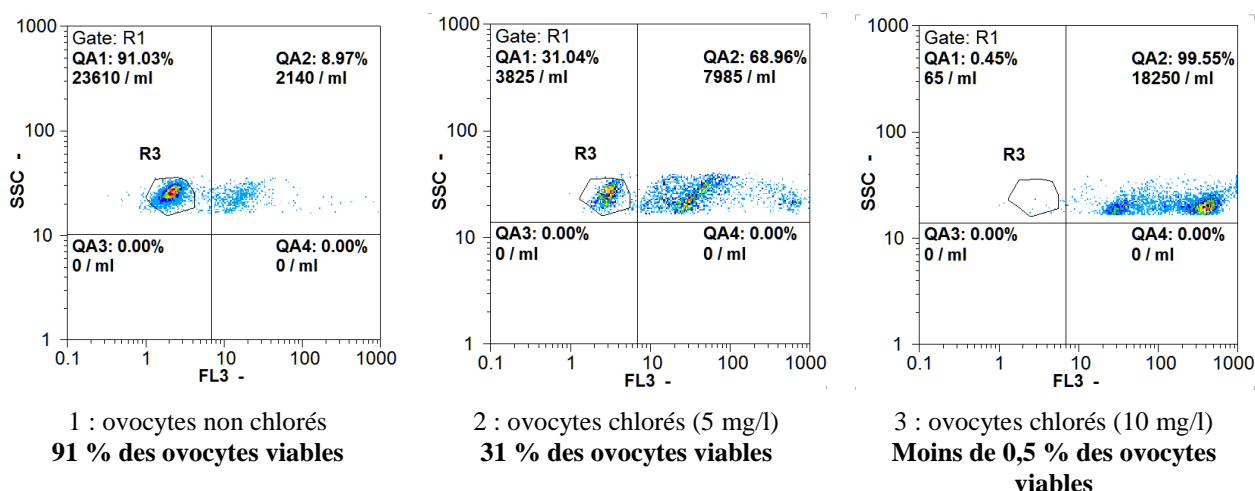


Figure 7 : tests de viabilité d'ovocytes avant et après chloration à 15 °C

L'effet du chlore est nettement visible sur les ovocytes dont la fluorescence sur le canal 3 (FL3 en abscisse), spécifique des cellules mortes, augmente de 2 à 3 log lorsque la concentration en chlore est de 10 mg/l.

Tests biologiques pour évaluer la viabilité des gamètes

Après chaque traitement des gamètes (séparément), des fécondations croisées ont été réalisées entre les gamètes traités et ceux non traités. Ce schéma a permis d'observer après 24 heures et 48 heures l'impact du traitement sur la formation de larves D lors de la chloration des spermatozoïdes seuls, des ovocytes seuls et des deux types de gamètes, en comparaison avec une fécondation témoin (gamètes sains). Dans le tableau ci-après sont présentés les résultats obtenus lors des traitements effectués dans différentes conditions opératoires. Les expériences ont toutes été validées suite à l'observation de larves D dans les ballons témoins.

Expériences sur ovocytes et spermatozoïdes				
	20°C	15°C	5°C	20°C + phytoplancton
5 mg/l chlore actif	Absence de fécondation/ovocytes « éclatés »	Fécondation : quelques larves observées	Fécondation : quelques larves observées	Fécondation : quelques larves observées
10 mg/l chlore actif	Absence de fécondation/ovocytes « éclatés »	Absence de fécondation/ovocytes « éclatés »	Absence de fécondation/ovocytes « éclatés »	Absence de fécondation/ovocytes « éclatés »
30 mg/l chlore actif	Absence de fécondation/ovocytes « éclatés »	Absence de fécondation/ovocytes « éclatés »	Absence de fécondation/ovocytes « éclatés »	Absence de fécondation/ovocytes « éclatés »

Tableau 15 : résultats des tests de chloration sur gamètes (durée de chloration : 60 minutes)

A compter de 10 mg/l de chlore actif, soit un paramètre CT élevé de 600, aucune larve D n'a pu être observée 24 heures après fécondation lorsque l'un ou les deux types de gamètes avaient été traités. En dessous de cette dose, quelques larves D ont pu être observées lors de tests réalisés dans une eau à 5 °C ou lors de l'ajout de *Skeletonema costatum* à hauteur de 30 000 cellules/larve, montrant l'impact de la température et des matières organiques sur les performances de désinfection.

Les performances de désinfection

Tests biologiques pour les larves

Après traitement, les larves étaient caractérisées immédiatement par observation au microscope puis remises en conditions d'élevage durant 24 à 72 heures et alimentées avec *T-isochrysis* afin d'observer une éventuelle reprise d'activité. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau ci-après.

Expériences sur larves de 24 à 48 heures				
	20°C	15°C	5°C	20°C + phytoplancton
5 mg/l chlore actif	Absence de mobilité / éclatement des cellules	Larves intègres, mobilité faible	Larves intègres, mobilité faible	Larves intègres, mobilité faible
10 mg/l chlore actif	Absence de mobilité / éclatement des cellules	Absence de mobilité	Absence de mobilité	Absence de mobilité
30 mg/l chlore actif	Absence de mobilité / éclatement des cellules	Absence de mobilité	Absence de mobilité	Absence de mobilité

Tableau 16 : résultats des tests de chloration sur larves *D* (durée de chloration : 60 minutes)

Pour une dose de chlore actif de 10 mg/l pendant 60 minutes, les larves observées les jours qui suivaient le traitement étaient soit mortes, soit inactives et donc considérées comme non viables. L'impact de la température de l'eau et la présence de microalgues en suspension sur les performances de chloration sont également confirmés par cette série d'essais.

La concentration retenue est donc de 10 mg/l pour toutes les températures et ce même en présence de phytoplancton :

- inactivation de *Vibrio aestuarianus* ;
- absence de fécondation pour les gamètes ;
- inactivation ou mort des larves.

Concernant le virus OsHV-1, aucune solution expérimentale n'a été trouvée à ce jour pour évaluer l'efficacité du chlore vis-à-vis de ce pathogène. Dans tous les cas, un facteur de sécurité de 2 peut être appliqué pour le traitement d'effluents conchylicoles et ainsi palier des pics de matières organiques ou des conditions météorologiques dures qui pourraient réduire les performances observées au laboratoire. La valeur de CT préconisée serait de 1 200 soit une chloration de 60 minutes à 20 mg/l ou encore une chloration de 20 minutes à 60 mg/l.

Lors des tests suivants, l'impact de la température et de la présence de matières en suspension n'est plus étudié.

IV.2 Ozonation

IV.2.1 *Vibrio aestuarianus*

Pour chaque test réalisé, un suivi de la concentration bactérienne a été réalisé par cytométrie en flux durant les 30 minutes de mise en contact avec l'ozone à une concentration mesurée proche de 1 mg/l. Pour une concentration initiale de 10^6 bactéries/ml, les résultats suivants ont été obtenus :

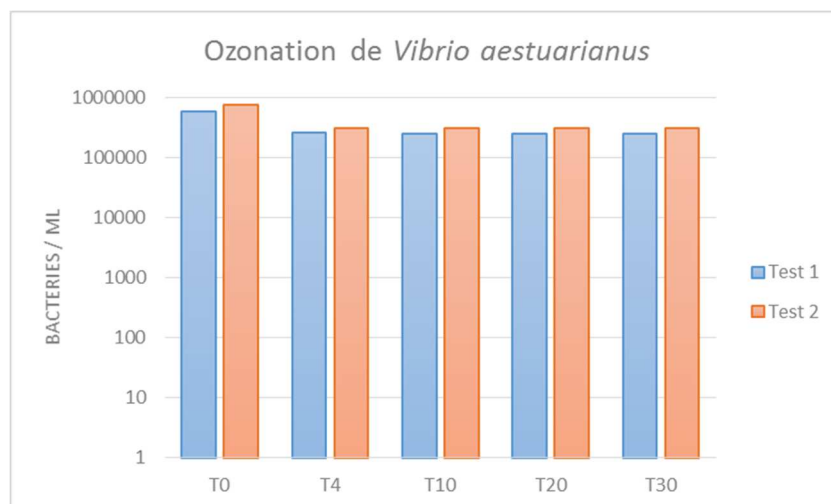


Figure 8 : Suivi de la concentration de *Vibrio aestuarianus* pendant un traitement par ozonation à 1 mg/l pendant 30 minutes ($C_0 = 10^6$ bactéries/ml)

L'abattement du nombre de bactéries obtenu au bout de 30 minutes est faible, à peine 60 % contre 99,6 % lors des tests de chloration sur le même temps. Toutefois, après la filtration de 350 ml d'eau pour chaque test sur filtre stérile de $0,22 \mu\text{m}$ et remise en milieu de culture adapté, aucune colonie n'a pu être identifiée après traitement. Ce résultat montre l'inactivation totale de la bactérie suite à un traitement par ozonation à 1 mg/l durant 30 minutes (CT de 30). Les résultats obtenus en cytométrie en flux mettent en avant des mécanismes d'inactivation probablement différents entre la chloration et l'ozonation. Tandis que la chloration conduit à une destruction des cellules dans les conditions des essais réalisés, l'ozonation ne les dégrade que très peu pour un résultat similaire lors de la remise en culture sur un milieu favorable. Toutefois des tests complémentaires à plus forte dose d'ozone pourraient être conduits afin d'observer une dégradation plus nette des cellules et garantir une désinfection totale et durable.

A noter la valeur de CT très inférieure pour l'ozonation, 30 au lieu de 300 pour la chloration sur 30 minutes de test. Pour d'autres pathogènes, il est très classique de devoir appliquer un CT très supérieur lors d'une chloration que lors d'une ozonation puisque l'ozone est un oxydant bien plus puissant que le chlore.

IV.2.2 OsHV-1

Après un test de virulence positif (100 % de mortalité après 72 heures), le protocole tel que décrit précédemment a été mis en place. Au terme des 72 heures de mise en contact, aucune mortalité (sur 10 huîtres par aquarium) n'est observée ni dans les aquariums témoins négatifs (eau de mer seule), ni dans les aquariums avec eau de mer contaminée puis ozonée. Dans les aquariums témoins positifs (eau de mer + virus), 30 % de mortalités cumulées sont observés. Pour confirmer ce résultat, le test a été poussé jusqu'à 7 jours, montrant l'absence totale de mortalité dans les aquariums témoins négatifs

et les aquariums de test ozone, alors qu'une mortalité cumulée de 60 % a été atteinte dans les aquariums témoins positifs. Dans ces conditions, une ozonation à 1 mg/l pendant 30 minutes (CT de 30) semble être efficace. Pour le confirmer, des recherches d'ADN viral ont été effectuées par qPCR dans les chairs et dans l'eau.

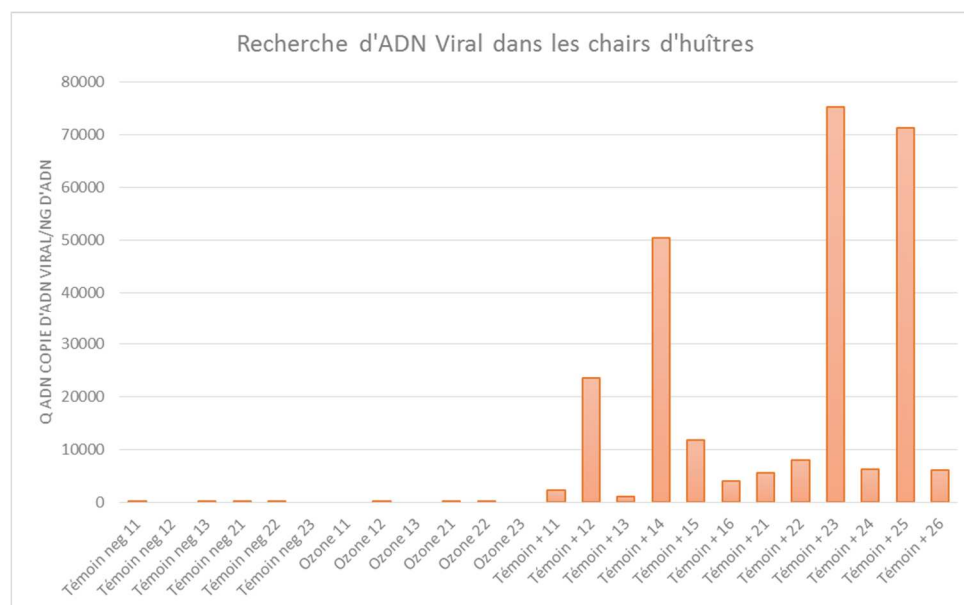


Figure 9 : Quantité d'ADN viral par nanogramme d'ADN dans les huîtres dans les différentes conditions d'essai

La figure montre des quantités d'ADN viral nulles ou quasi nulles dans toutes les chairs d'huîtres positionnées dans les aquariums ne présentant pas de mortalité, alors que les huîtres mortes dans les aquariums témoins positifs présentent des quantités d'ADN allant de 1 010 à 75 263 copies d'ADN viral. Ce résultat permet de confirmer que les mortalités observées sont dues au virus OsHV-1 et montrent l'efficacité du traitement par ozonation pour l'inactiver avec une valeur CT de 30.

Concernant les analyses effectuées dans l'eau, les résultats montrent la présence d'ADN viral en faible quantité dans tous les aquariums, sans pouvoir effectuer de différence entre les différentes conditions.

IV.2.3 Gamètes et larves d'huîtres

Tests de viabilité des gamètes par cytométrie en flux

Après chaque essai de traitement des gamètes, la première approche a été de réaliser un test de viabilité par cytométrie en flux. Ainsi un comptage et un test de viabilité ont été effectués pour les ovocytes et les spermatozoïdes à t_0 et à t_{30} . Les résultats obtenus pour une série de prélèvements effectués lors d'une ozonation à moins de 0,1 mg/l d'ozone sont présentés ci-après.

DESIMER

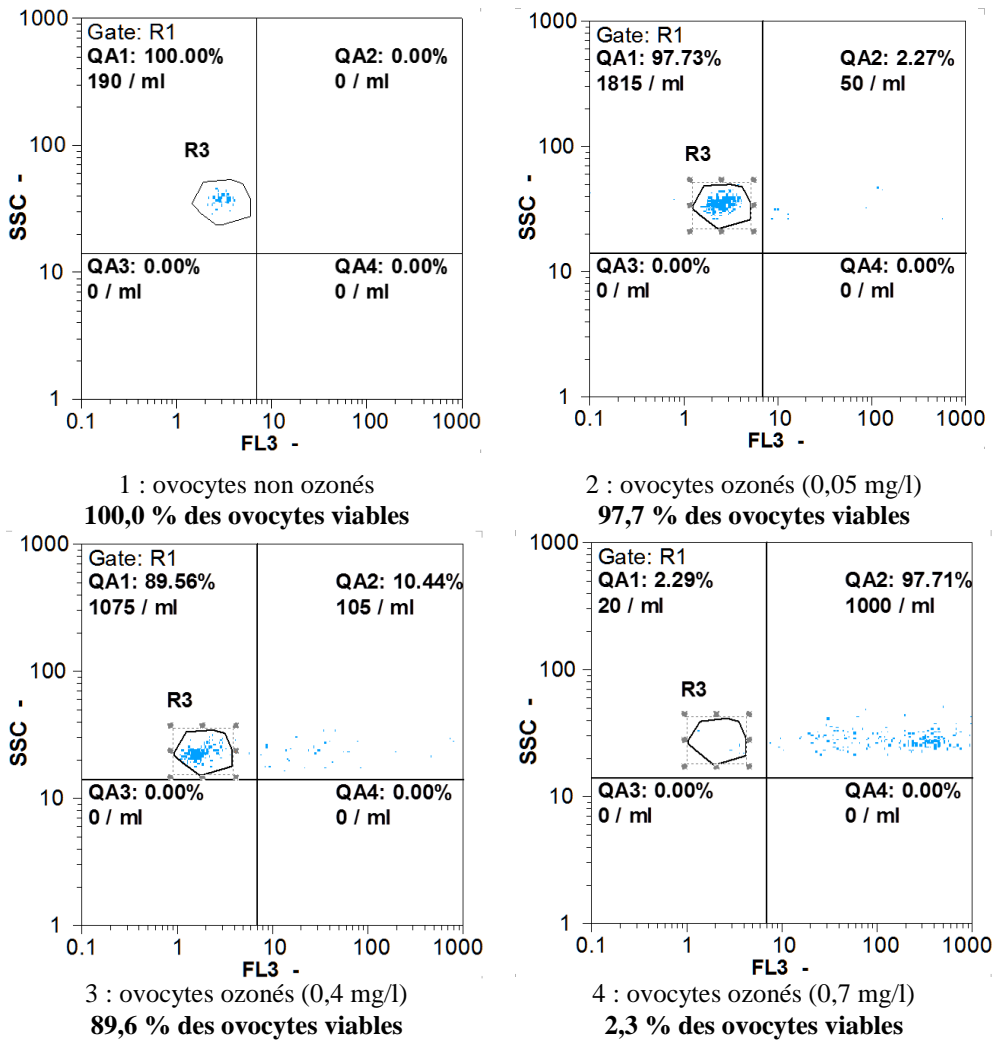


Figure 10 : tests de viabilité d'ovocytes avant et après ozonation à 20 °C

Plus la dose en ozone augmente, plus la part d'ovocytes viables diminue, pour atteindre presque 98 % de cellules non viables pour une teneur en ozone de 0,7 mg/l (CT de 21). Ces résultats confirment le grand potentiel de désinfection de cette technique. Par ailleurs, il faut préciser que dans tous les cas, le taux de récupération des ovocytes après traitement était au maximum de 80 % pour les plus faibles doses d'ozone injectées et au minimum de 28 % pour les plus fortes doses, traduisant une dégradation des cellules lors du traitement.

Lors de tous les essais réalisés, la viabilité des spermatozoïdes n'a pas pu être évaluée à cause d'une dégradation complète des cellules comme montré sur la figure suivante.

Les performances de désinfection

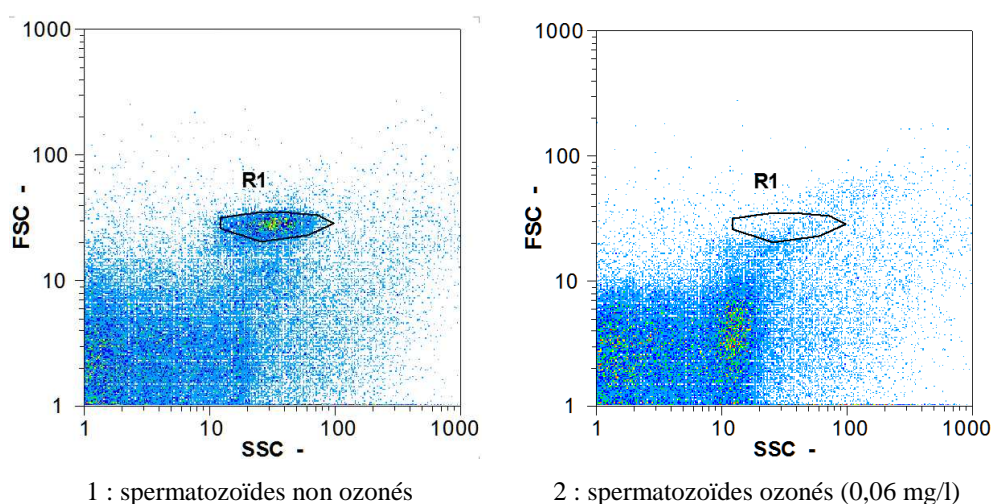


Figure 11 : comptage de spermatozoïdes avant et après ozonation à 20 °C

La zone R1 a été définie lors du développement de la méthode et permet le comptage des spermatozoïdes selon les paramètres de taille et de forme. Après ozonation, les spermatozoïdes n'apparaissent plus dans cette zone ce qui pourrait traduire une dégradation des cellules dès 0,06 mg/l d'ozone (CT < 2).

Tests biologiques pour évaluer la viabilité des gamètes

Après chaque traitement des gamètes (séparément), des fécondations croisées ont été réalisées entre les gamètes traités et ceux non traités. Ce schéma a permis d'observer après 24 heures et 48 heures l'impact du traitement sur la formation de larves D lors de l'ozonation des spermatozoïdes seuls, des ovocytes seuls et des deux types de gamètes, en comparaison avec une fécondation témoin (gamètes sains). Les expériences ont toutes été validées suite à l'observation de larves D dans les ballons témoins.

Pour tous les tests biologiques réalisés, les fécondations croisées ont permis d'obtenir au mieux 0,3% du nombre de larves obtenues dans les ballons témoin après 24 heures. Le traitement par ozonation semble donc inactiver les gamètes de manière très efficace à très faible dose (dès 0,05 mg/l d'ozone).

Tests biologiques pour évaluer la viabilité des larves

Quant à l'ozonation des larves, des essais ont été menés de 0,1 mg/l à 1 mg/l d'ozone avec un temps de contact de 30 minutes. Les résultats obtenus pour chaque réplicat sont présentés sur la figure suivante.

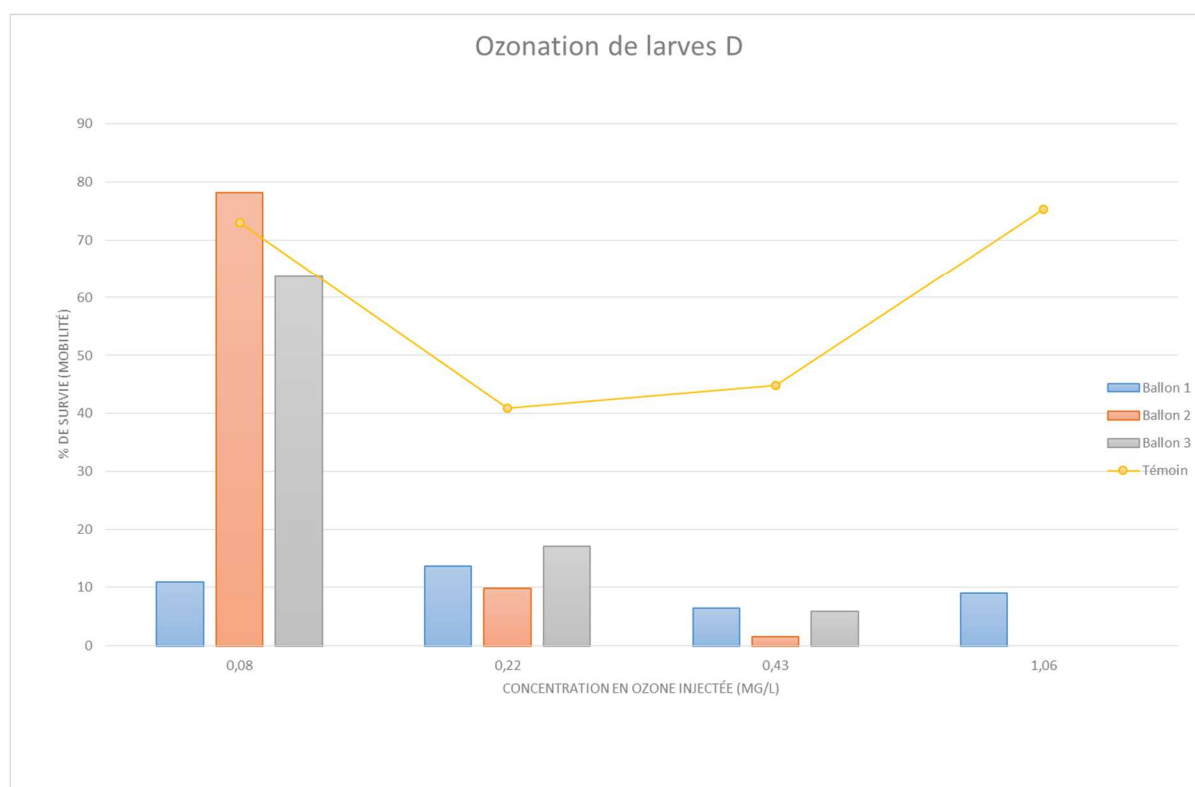


Figure 12 : Taux de survie de larves D 24 heures après ozonation

Avec 1 mg/l d'ozone, l'élimination de toutes les larves est observée dans deux tests sur trois. Contrairement aux gamètes, une dose plus élevée d'ozone est nécessaire pour obtenir un résultat satisfaisant. Si ce type de procédé devait être utilisé à l'avenir, des tests complémentaires devraient être conduits et notamment sur des stades larvaires plus avancés.

IV.3 Rayonnement UV basse pression

IV.3.1 *Vibrio aestuarianus*

Pour chaque test réalisé, une mesure de la concentration bactérienne a été réalisée par cytométrie en flux avant et après irradiation UV. Pour une concentration initiale de 10^6 bactéries/ml, les résultats montrent une diminution du nombre d'individus de l'ordre de 30%. Cette perte peut être incombée au dispositif expérimental qui ne permet pas de récupérer l'ensemble des bactéries mises en jeu au départ (volume des tuyauteries et du corps de pompe).

Pour vérifier l'efficacité du traitement, des échantillons de 350 ml ont été filtrés sur filtre stérile de $0,22 \mu\text{m}$ afin de récupérer les bactéries restantes et les remettre en milieu de culture adapté afin d'identifier un éventuel développement après traitement.

Les performances de désinfection


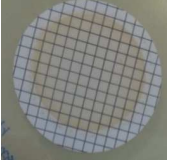
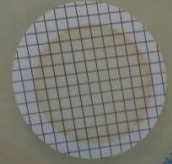
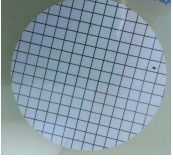
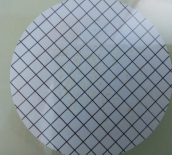
	Témoin (eau avant contamination)	Test 1	Test 2
Avant UV			
Après UV			

Tableau 17 : Analyses bactériennes avant et après traitement par irradiation UV

Les analyses montrent l'efficacité du traitement puisque les filtres posés sur le milieu de culture ne présentent peu voire pas de développement bactérien. Quelques colonies ont pu être comptés après traitement, ce qui correspondait pour les 350 ml d'échantillon filtrés à une concentration maximale de 0,8 bactéries/ml, et donc à une désinfection de l'ordre de 6 log considérée comme satisfaisante.

IV.3.2 OsHV-1

Après un test de virulence positif (100 % de mortalité après 72 heures), le protocole tel que décrit en partie III a été mis en place. Au terme des 72 heures de mise en contact, aucune mortalité (sur 10 huîtres par aquarium) n'est observée ni dans les aquariums témoins négatifs (eau de mer seule), ni dans les aquariums avec eau de mer contaminée puis traitée par rayonnement UV. Dans les aquariums témoins positifs (eau de mer + virus), 100% de mortalité ont été observés après 8 jours de balnéation. Ainsi l'irradiation UV du virus OsHV-1 à une dose de 42 mJ/cm² semble être efficace. Pour le confirmer des recherches d'ADN viral ont été effectuées par qPCR dans les chairs et dans l'eau.

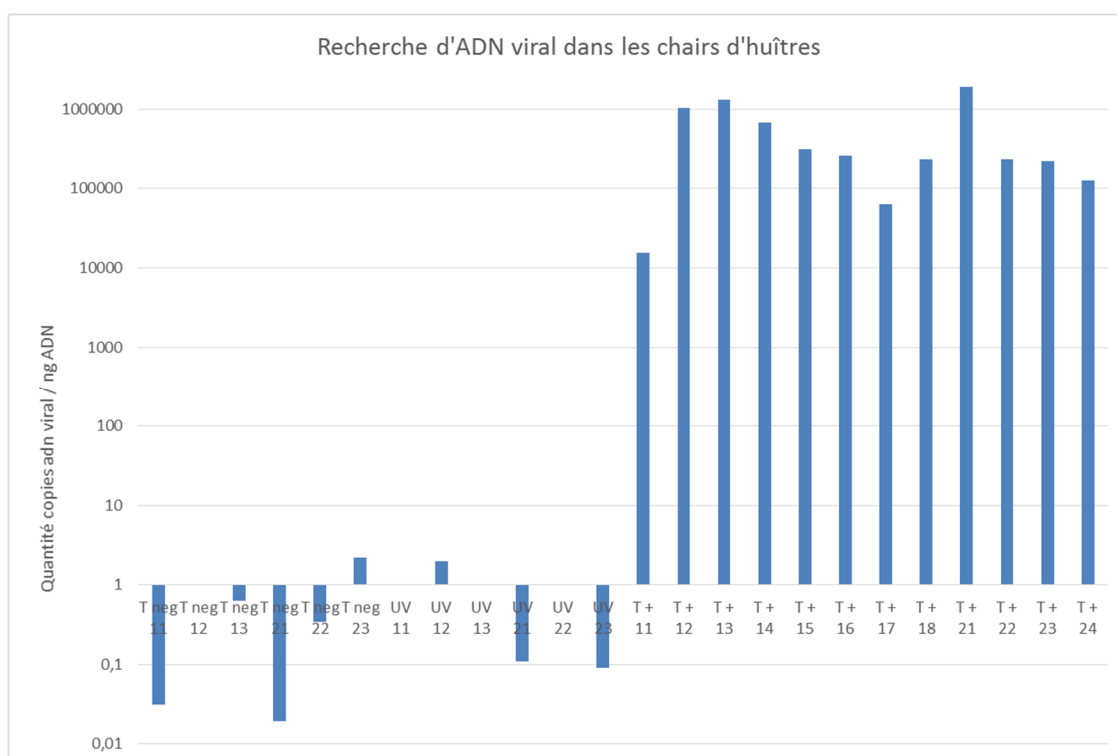


Figure 13 : Quantité d'ADN viral par nanogramme d'ADN dans les huîtres dans les différentes conditions d'essai

La figure montre des quantités d'ADN viral nulles ou quasi nulles dans toutes les chairs d'huîtres positionnées dans les aquariums ne présentant pas de mortalité, alors que les huîtres mortes dans les aquariums témoins positifs présentent des quantités d'ADN allant de 15 500 à 1 920 000 copies d'ADN viral. Ce résultat permet de confirmer que les mortalités observées sont dues au virus OsHV-1 et montrent l'efficacité du traitement par irradiation UV pour l'inactiver à une dose de 42 mJ/cm².

Concernant les analyses effectuées dans l'eau, les résultats sur la figure suivante montrent la présence d'ADN viral dans l'eau contaminée et non traitée alors que des valeurs nulles sont observées dans les autres conditions et notamment celle où l'eau contaminée a été traitée par irradiation UV.

Les performances de désinfection

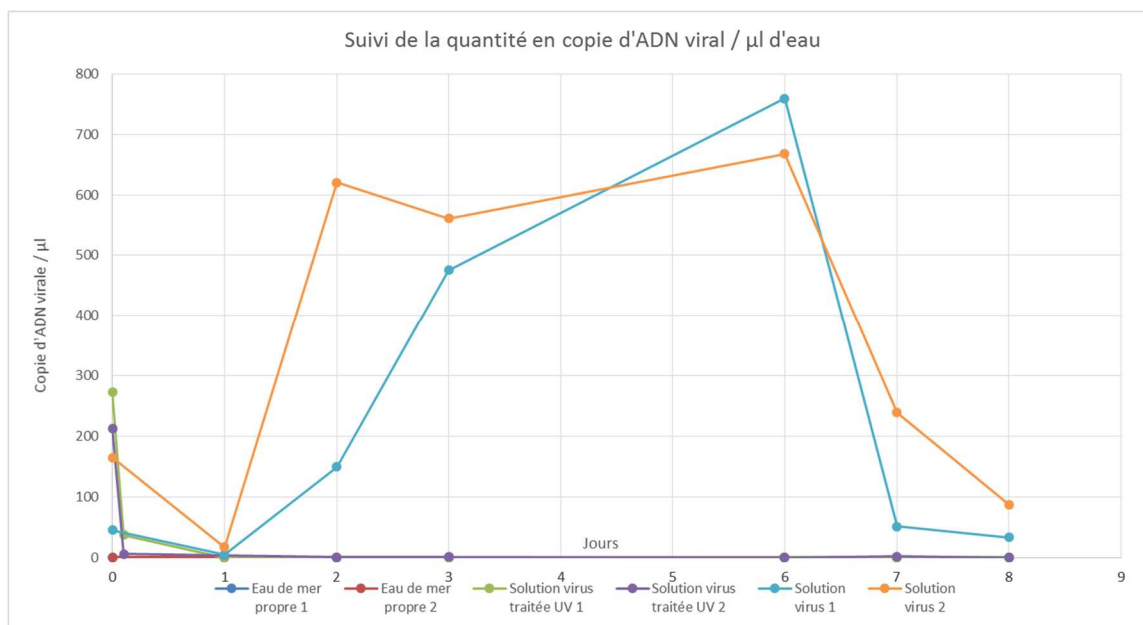
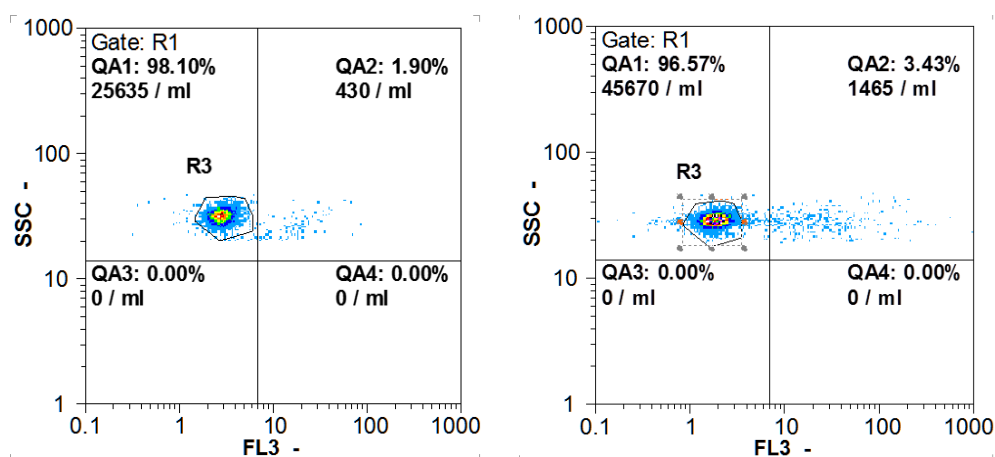


Figure 14 : Quantité d'ADN viral par nanogramme d'ADN dans les différents aquariums

IV.3.3 Gamètes et larves d'huîtres

Tests de viabilité des gamètes par cytométrie en flux

Après chaque essai de traitement des gamètes, la première approche a été de réaliser un test de viabilité par cytométrie en flux. Ainsi un comptage et un test de viabilité ont été effectués pour les ovocytes et les spermatozoïdes avant et après traitement. Les résultats pour les ovocytes sont présentés sur la figure ci-après.



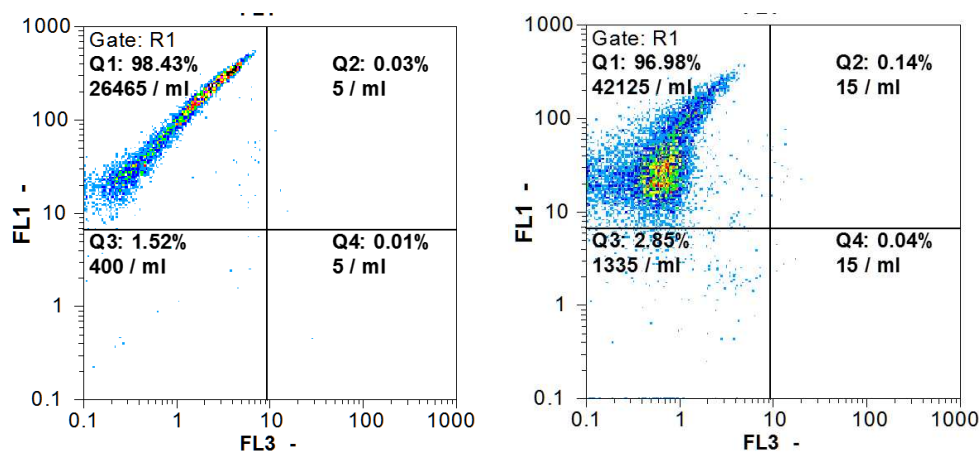
1 : ovocytes non traités
98,1 % des ovocytes viables

2 : ovocytes traités par rayonnement UV
96,6 % des ovocytes viables

Figure 15 : tests de viabilité d'ovocytes avant et après traitement par rayonnement UV à 20 °C

L'impact du traitement par UV sur les ovocytes n'est pas visible par cytométrie en flux. Si une baisse de la part d'ovocytes viables est observée après traitement, elle reste trop mince pour l'attribuer au traitement seul.

Concernant les spermatozoïdes, les résultats suivants ont été obtenus.



1 : spermatozoïdes non traités 2 : spermatozoïdes traités par irradiation UV
 Figure 16 : tests de viabilité de spermatozoïdes avant et après irradiation UV

Les cytogrammes montrent une baisse de fluorescence sur le canal 1 (FL1) après irradiation UV, traduisant un marquage plus faible des cellules considérées comme viables. Cependant aucune augmentation de fluorescence sur le canal 3 (FL3, fluorescence des cellules non viables) n'est observée.

Tests biologiques pour évaluer la viabilité des gamètes

Après chaque traitement des gamètes (séparément), des fécondations croisées ont été réalisées entre les gamètes traités et ceux non traités. Ce schéma a permis d'observer après 24 heures et 48 heures l'impact du traitement sur la formation de larves D lors de l'irradiation UV des spermatozoïdes seuls, des ovocytes seuls et des deux types de gamètes, en comparaison avec une fécondation témoin (gamètes sains). Les expériences ont toutes été validées suite à l'observation de larves D dans les ballons témoins. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau suivant.

Les performances de désinfection

	Observations	Densité	Commentaires
Configuration A (Spz et Ovo sains) TEMOIN	Larves D après 24 h Larves très mobiles	Forte	
Configuration B (Spz sains et Ovo UV)	Larves D après 24 h Mobilité faible	Faible	En plus des larves D, des ovocytes non fécondés sont observés ainsi que des larves difformes
Configuration C (Spz UV et Ovo sains)	Larves majoritairement difformes après 24 h Mouvements anarchiques Cellules en dégradation	Très faible	Inactivation estimée > 99 %
Configuration D (Spz UV et Ovo UV)	Larves majoritairement difformes après 24 h Mouvements anarchiques Cellules en dégradation	Très faible	Inactivation estimée > 99 %

Tableau 18 : Résultats des tests biologiques après traitement par irradiation UV des gamètes

Dans la configuration B du test biologique, celle où seuls les ovocytes ont été irradiés, des larves D ont pu être obtenues 24 heures après fécondation, montrant l'impact limité des UVC sur l'inactivation des ovocytes. Toutefois, en comparaison à la fécondation témoin, la densité de larves obtenue était beaucoup plus faible. Les conditions C et D montrent la fragilité plus importante des spermatozoïdes face à une irradiation par UVC. Mais, il est important de souligner que l'on note systématiquement la présence de larves survivantes, quelles que soient les configurations, même si elles ne semblent pas toujours viables. Dans toutes les configurations du test biologique, l'efficacité du traitement a été estimée supérieure à 95 % lors de tous les tests réalisés.

Tests biologiques pour évaluer la viabilité des larves

L'irradiation par UVC de larves D a également été réalisée dans les mêmes conditions que précédemment puis ces larves ont été remises en conditions d'écloserie afin de suivre leur développement dans les 48 heures qui suivaient un traitement. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau suivant.

DESIMER

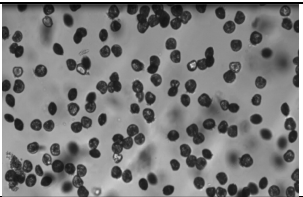
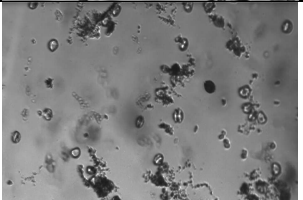
	Observations	Densité	Commentaires
Témoins	Larves très mobiles	Densité élevée	
Traitées par UV	Larves survivantes Nombreuses larves immobiles, <i>a priori</i> mortes. Cellules en décomposition	Densité très faible	

Tableau 19 : Résultats des tests biologiques après traitement par irradiation UV de larves *D*

En ce qui concerne les larves, les résultats montrent une efficacité partielle du traitement. Même si l'on observe une part non-négligeable de larves mortes, les larves ayant survécu se comportent et se développent normalement dans les conditions des tests. Néanmoins, les performances ont été estimées supérieures à 95 %.

V. Les sous-produits de désinfection

V.1 Introduction

Les trihalométhanes sont les produits organo-halogènes qui se forment le plus facilement. Dans le cas de la chloration de l'eau de mer, le bromoforme est le principal produit formé confirmant l'importance du brome dans ces mécanismes réactionnels. Pour des chlurations à des taux de 1 mg/l et des temps de contact de 30 minutes, le bromoforme est produit à des concentrations de 25 µg/l en moyenne. Le bromoforme, formé de façon prépondérante, n'est qu'un des exemples des composés organo-halogènes susceptibles d'être formés lors de la chloration de l'eau de mer. De très nombreux sous-produits de nature chimique les plus diverses ont été identifiés dans les eaux (trihalométhanes, acides haloacétiques, haloacétonitriles, halophénols,...) (Abarnou, 1982; Lazarova *et al.*, 1999; Kornmueller, 2007; Schroeder *et al.*, 2011; Shi *et al.*, 2013; Delacroix *et al.*, 2013 ; Penru *et al.*, 2013). Les principaux sous-produits identifiés dans la littérature sont donc le bromoforme, mais aussi les bromamines / chloramines (mono principalement) et les ions bromates et le bromate de sodium. Parmi ces composés, certains sont listés par l'IMO (International Maritime Organization) pour leur impact sur l'environnement et les organismes aquatiques, particulièrement à cause de leur présence dans les effluents de traitement des eaux de ballast par désinfection (IMO, Marine Environment Protection Committee, MEPC 59/2/13, 16 March 2009) et dans les effluents de centrales thermiques (Stewart, 1979). Il semblerait d'ailleurs que les larves d'huîtres soient particulièrement sensibles aux effluents chlorés comparativement à d'autres espèces (Bellanca et Bailey, 1977). Leur identification et leur mesure sont possibles avec des techniques du type chromatographie en phase gazeuse ou liquide couplées à la spectrométrie de masse (Delacroix *et al.*, 2013).

Ces nuisances chimiques doivent être évaluées sous l'angle de leur formation, de leur devenir et de leurs effets biologiques (Abarnou *et al.*, 1990 ; Abarnou et Miossec, 1992) dans les conditions du milieu marin. Les oxydants libres sont consommés très rapidement dans l'eau de mer et ne présentent pas d'effets toxiques pour le milieu. Les oxydants combinés se dégradant moins rapidement (durée de demi-vie de l'ordre de quinze heures dans l'eau de mer) peuvent présenter des effets toxiques, notamment à proximité immédiate du rejet de station de traitement des eaux usées. Dès 1979, Stewart *et al.* ont montré que pour des concentrations comprises entre 0,05 et 10 mg/l en bromates, bromoforme et chloroforme, des mortalités sur des larves d'huîtres pouvaient être observées.

V.2 Résultats

V.2.1 Les sous-produits recherchés

Dans ce contexte, tous les essais menés dans la présente étude ont conduit à la réalisation de prélèvements afin de réaliser des analyses et rechercher des sous-produits de désinfection connus. Les substances en question sont présentées dans le tableau suivant.

DESIMER

Substance	N° CAS
Bromodichlorométhane	75-27-4
Bromoforme	75-25-2
Chloroforme	67-66-3
Dibromomonochlorométhane	124-48-1

Tableau 20 : Substances recherchées lors des tests de désinfection. Analyses réalisées par le laboratoire Inovalys (Nantes)

Dans l'eau de mer brute, aucune de ces substances n'a été détectée lors des nombreux prélèvements réalisés avant les tests de traitement.

V.2.2 Chloration

A l'issue de plusieurs tests de chloration sur les gamètes et larves d'huîtres, de nombreux prélèvements ont été effectués et envoyés au laboratoire Inovalys pour analyse. Ainsi des analyses ont été effectuées pour différentes concentrations de chlore actif et les résultats obtenus sont présentés dans le tableau suivant.

Substance	Chloration 5 mg/l	Chloration 10 mg/l	Chloration 30 mg/l	Chloration 100 mg/l
Bromodichlorométhane (µg/l)	< 0,2	< 0,2	0,3	0,9
Bromoforme (µg/l)	39,7	78,9	167,0	128,0
Chloroforme (µg/l)	< 0,2	< 0,2	0,6	1,3
Dibromomonochlorométhane (µg/l)	1,1	3,2	8,0	12,2

Tableau 21 : Résultats d'analyses obtenus suite aux tests de chloration. Analyses réalisées par le laboratoire Inovalys

Pour tous les composés recherchés, plus la dose de chlore mise en œuvre est grande, plus la création de sous-produits de désinfection est grande. Le bromoforme est le sous-produit créé majoritairement avec des teneurs supérieures à 120 µg/l dès 30 mg/l de chlore mis en œuvre. Au-delà de cette dose de chlore la concentration en bromoforme ne semble pas croître davantage puisque que lors d'un test à 100 mg/l de chlore actif, une concentration en bromoforme inférieure a été mesurée (167 µg/l de bromoforme déterminé après chloration à 30 mg/l et 128 µg/l après chloration à 100 mg/l). Le dibromomonochlorométhane arrive en seconde position des composés recherchés et créés, présentant des teneurs après chloration allant de 1,1 µg/l à 12,2 µg/l.

V.2.3 Ozonation

A l'issue des tests d'ozonation sur les gamètes et larves d'huîtres, des prélèvements ont aussi été effectués et envoyés au laboratoire Inovalys pour analyse. Ainsi des analyses ont été effectuées pour différentes concentration d'ozone et les résultats obtenus sont présentés dans le tableau suivant.

Substance	Ozonation 0,1 mg/l	Ozonation 0,3 mg/l	Ozonation 1,4 mg/l	Ozonation 3,2 mg/l	Ozonation 5,2 mg/l	Ozonation 7,5 mg/l	Ozonation 9,0 mg/l
Bromodichlorométhane (µg/l)	< 0,2	< 0,2	< 0,2	< 0,2	< 0,2	< 0,2	< 0,2
Bromoforme (µg/l)	1,7	16,6	28,5	39,7	51,5	57,0	54,2
Chloroforme (µg/l)	< 0,2	< 0,2	< 0,2	< 0,2	< 0,2	< 0,2	< 0,2
Dibromomonochlorométhane (µg/l)	< 0,2	< 0,2	0,2	0,3	0,4	0,5	0,5

Tableau 22 : Résultats d'analyses obtenus suite aux tests d'ozonation. Analyses réalisées par le laboratoire Inovalys

Comme pour les tests de chloration, le bromoforme et le dibromomonochlorométhane sont les deux sous-produits de désinfection majoritairement créés. Comparativement aux tests de chloration, la quantité de bromoforme créée semble plafonner au-delà d'une certaine dose d'ozone, comme le montre la figure qui suit.

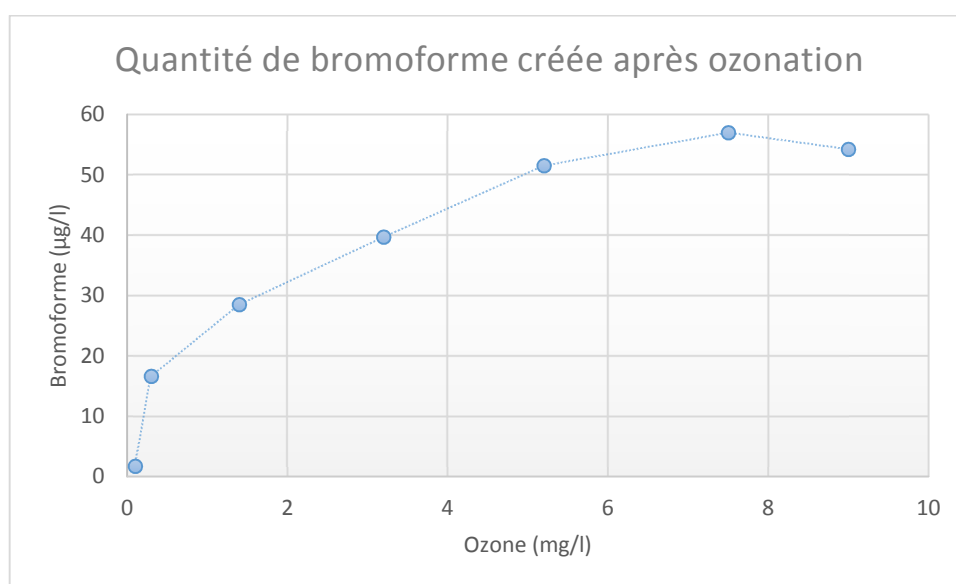


Figure 17 : Evolution de la concentration en bromoforme en fonction de la dose d'ozone mise en œuvre

Une désinfection d'eau de mer avec de l'ozone semble donc créer moins de bromoforme que lors d'une désinfection avec du chlore puisque lors de cette dernière, des teneurs jusqu'à deux fois plus élevées ont été déterminées dans l'eau après traitement.

V.2.4 Rayonnement UV

Aucun sous-produit de désinfection ciblé n'a été détecté dans l'eau de mer après désinfection par rayonnement UV.

V.2.5 Conclusion

Comme indiqué dans la littérature, le bromoforme est la substance qui a été détectée et quantifiée de façon majoritaire lors des différents tests réalisés. Ponctuellement, d'autres substances ont pu être détectées mais les résultats ne sont pas présentés. Ainsi, en se concentrant sur le cas du bromoforme, substance toxique pour les organismes aquatiques, les analyses montrent que lors des tests de chloration et d'ozonation, plus la dose d'oxydant augmente, plus la concentration en bromoforme après traitement est élevée. En effet, pour une dose de 10 mg/l de chlore actif les concentrations mesurées en bromoforme étaient de l'ordre de 80 µg/l dans l'eau désinfectée. Après un traitement à l'ozone à hauteur de 1,4 mg/l des teneurs en bromoforme de l'ordre de 30 µg/l ont été mesurées. Aucun des sous-produits recherchés n'a été détecté dans les échantillons prélevés après un traitement par irradiation UV.

Dans ces conditions, particulièrement dans le cas du traitement des effluents, afin d'éviter tout impact négatif sur l'environnement, il serait donc préférable de mettre en œuvre des traitements complémentaires lorsque la chloration ou l'ozonation sont les techniques de désinfection retenues.

V.3 Traitements complémentaires

Particulièrement dans le cas de l'utilisation d'un désinfectant à base de chlore, le résiduel d'oxydant peut être réduit ou totalement éliminé afin de limiter la formation ultérieure de sous-produits indésirables dans le milieu récepteur. Les agents les plus fréquemment utilisés sont le dioxyde de soufre, le bisulfite de sodium et le thiosulfate de sodium. Le charbon actif peut aussi être utilisé après chloration avec l'avantage de capter à la fois le chlore en excès et les sous-produits formés. Cette dernière technique peut également être mise en œuvre après ozonation tel que décrit par Schroeder *et al.* en 2011.

En fonction des conditions opératoires de traitement des effluents d'une éclosérie conchylicole, une étude spécifique devrait être menée afin de déterminer la technique adéquate pour capter ces sous-produits de désinfection. Si possible, avec l'objectif de simplifier cette étape et de réduire les coûts, le choix d'une technologie évitant la création de sous-produits de désinfection doit être privilégiée.

VI. Conclusion

L'étude DESIMER avait pour objectif d'établir des valeurs de référence pour des opérations de désinfection en conchyliculture avec des techniques connues. Les performances ont donc été évaluées et vérifiées pour trois technologies, la chloration, l'ozonation et l'irradiation UV pour l'inactivation de pathogènes de l'huître creuse *Crassostrea gigas* ainsi que pour des gamètes et des larves de ce même modèle. Ces cibles ont été choisies dans un contexte de sécurisation des élevages d'huîtres creuses contre des maladies / mortalités à différents stades de leur développement, mais aussi avec l'objectif de réduire tout impact négatif des effluents d'écloserie conchylicole sur l'environnement.

Les doses pour les trois techniques ont été déterminées afin de satisfaire ces objectifs en faisant appel à des outils et méthodologies fiables permettant de vérifier les performances de ces techniques. De plus, la question de la création de sous-produits de désinfection a été traitée et a permis de confirmer la formation de substances telles que le bromoforme après chloration et ozonation de l'eau de mer.

La synthèse des résultats obtenus associés aux performances de désinfection est présentée dans le tableau suivant.

Chloration				
	OsHV-1	<i>Vibrio aestuarianus</i>	Gamètes	Larves 24h-48h
Performances	Non évalué	+++	+++	++
Dose requise	-	10 mg/l chlore actif	10 mg/l chlore actif	10 mg/l chlore actif
Création de sous-produits de désinfection	L'ajout de chlore dans l'eau de mer à une concentration de 10 mg/l conduit à la formation du bromoforme, composé toxique, à hauteur de presque 80 µg/l. D'autres sous-produits ont été identifiés. Constat vérifié par des analyses sur un traitement réel d'effluents par chloration.			
Ozonation				
	OsHV-1	<i>Vibrio aestuarianus</i>	Gamètes	Larves 24h-48h
Performances	+++	+++	+++	++
Dose requise	1 mg/l O ₃	1 mg/l O ₃	1 mg/l O ₃	1 mg/l O ₃
Création de sous-produits de désinfection	L'ajout d'ozone dans l'eau de mer à une concentration de 1 mg/l conduit à la formation du bromoforme, composé toxique, à hauteur d'environ 30 µg/l. D'autres sous-produits ont été identifiés.			
Rayonnement UV basse pression				
	OsHV-1	<i>Vibrio aestuarianus</i>	Gamètes	Larves 24h-48h
Performances	+++	+++	+	+
Dose requise	42 mJ/cm ²	42 mJ/cm ²	42 mJ/cm ²	42 mJ/cm ²
Création de sous-produits de désinfection	Pas de sous-produits identifiés.			

Tableau 23 : Synthèse des résultats obtenus lors des différents tests de désinfection et sous-produits créés

DESIMER

Ces résultats ont été présentés à la profession lors de la journée de restitution organisée par le SMIDAP à Noirmoutier-en-l'île le 12 septembre 2016. Ces travaux ont également fait l'objet d'un livret pour « Mieux connaître la désinfection de l'eau de mer en conchyliculture » disponible sur demande.

VII. Références bibliographiques

A. ABARNOU, 1982.

Les rejets chlorés en mer. Science et Pêche, Bull. Inst. Pêches marit., n° 321.

A. ABARNOU, JF GUILLAUD, L. MIOSSEC, A. BATT, 1990.

La chloration des effluents urbains avant rejet en mer. Rapport scientifique.

A ABARNOU, L. MIOSSEC, 1992.

Chlorinated waters discharged to the marine-environment chemistry and environmental impact – An overview. Science of the Total Environment, Vol. 126, n° 1-2, pp. 173-197.

J.J. BATOULA, 2005,

Traitement d'effluents d'huîtres *Crassostrea gigas* par procédé membranaire. Rapport de stage.

V. BAUDON, J. HUSSENOT, C. PENISSON, H. PALVADEAU, J. HAURE, 2009.

Traitement des gamètes d'huîtres *Crassostrea gigas* à l'ozone. Document interne Ifremer.

BELLANCA M. A, BAILEY D. S., 1977.

Effects of chlorinated effluents on aquatic ecosystem in the lower James river. Water Pollution Control Federation, Vol. 49, n° 4, pp. 639-645.

T. CHAUVELOT, J. HUSSENOT, M. PAPIN, C. PENISSON, J. HAURE, 2010.

Inactivation des gamètes d'huîtres *Crassostrea gigas* par ozonation.

DEGREMONT SUEZ, 2005,

Memento technique de l'eau – Dixième édition,

S. DELACROIX, C. VOGELSANG, A. TOBIESEN, H. LILTVED, 2013.

Disinfection by-products and ecotoxicity of ballast water after oxidative treatment - Results and experiences from seven years of full-scale testing of ballast water management systems. Marine Pollution Bulletin 73, pp 24-36.

P. HICK, O. EVANS, R. LOOI, C. ENGLISH, R. J. WHITTINGTON, 2016.

Stability of Ostreid herpesvirus (OsHV-1) and assessment of disinfection of seawater and oyster tissues using a bioassay. Aquaculture 450, 412-421.

INTERNATIONAL MARINE ORGANIZATION, 2009.

Harmful aquatic organisms in ballast water. Marine Environment Protection Committee, MEPC 59/2/13, 16 March 2009.

KORNMUELLER, 2007.

Review of fundamentals and specific aspects of oxidation technologies in marine waters. Water Science & Technology Vol 55 n° 12 pp 1-6.

V. LAZAROVA, P. SAVOYE, M.L. JANEX, E.R. BLATCHLEY III, M. POMMEPUY, 1999.

Advanced wastewater disinfection technologies : state of the art and perspectives. Wat. Sci. Tech. Vol 40, n° 4-5, pp. 203-213.

N. LE GOIC, H. HEGARET, M. BOULAIS, J.F. BEGUEL, C. LAMBERT, C. FABIUUX, P. SOUDANT (2014)

Flow cytometric assesment of morphology, viability, and production of reactive oxygen species of *Crassostrea gigas* oocytes. Application to toxic donoflagellate (*Alexandrium minutum*) exposure. Cytometry, Part A, Vol.

85, Issue 12, pp. 1049-1056.

Q. LI, M. OSADA, M. KASHIHARA, K. HIROHASHI et A. KIJIMA (2000)

Effects of ultraviolet irradiation on genetical inactivation and morphological features of sperm of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. Fisheries Science 66, 91-96.

J.L. MARTIN, 2008,

Synthèse des essais de filtration réalisés avec Pall pour l'élimination des gamètes d'huîtres dans les eaux effluentes. Document de travail interne Ifremer, CONFIDENTIEL.

PALL CORPORATION, 2006a.

Élimination de gamètes d'huîtres tétraploïdes par filtration frontale en profondeur. Document CONFIDENTIEL.

PALL CORPORATION, 2006b.

Élimination de gamètes d'huîtres tétraploïdes par filtration tangentielle. Document CONFIDENTIEL.

Y. PENRU, A.R. GUASTALLI, S. ESPUGLAS, S. BAIG, 2013.

Disinfection of seawater : application of UV and Ozone. The journal of the international ozone association, n° 35:1, pp. 63-70.

J.F. PEPIN, A. RIOU, T. RENAULT, 2008.

Rapid and sensitive detection of ostreid herpesvirus 1 in oyster samples by real-time PCR. J. Virol. Methods 149, 269-276.

T. RENAULT AND C. LIPART, 1998.

Diagnosis of herpes-like virus infections in oysters using molecular techniques. Presented at the Aquaculture and water: fish culture, shellfish culture and water usage.

T. RENAULT, R.M. LE DEUFF, C. LIPART, C. DELSERT, 2000.

Development of a PCR procedure for the detection of a herpes-like virus infecting oysters in France. J. Virol. Methods 88, 41-50.

T. RENAULT, 2014

BIVALIFE – Controlling diseases in oysters and mussels in Europe. Final report.

D. SCHIKORSKI, T. RENAULT, D. SAULNIER, N. FAURY, P. MOREAU, J.F. PEPIN, 2011.

Experimental infection of Pacific oyster *Crassostrea gigas* spat by ostreid herpesvirus 1 : demonstration of oyster spat susceptibility. Veterinary research 42:27.

J.P. SCHROEDER, S. REISER, P.L. CROOT, R. HANEL, 2011.

A comparative study on the removability of different ozone-produced oxidants by activated carbon filtration. The journal of the international ozone association, n° 33:3, pp. 224-231.

H. SHI, Z. QIANG, C. ADAMS, 2013.

Formation of haloacetic acids, halonitromethanes, bromate and iodate during chlorination and ozonation of seawater and saltwater of marine aquaria systems. Chemosphere 90, pp 2485-2492.

M.E. STEWART, W.J. BLOGOSLAWSKI, R.Y. HSU, G.R. HELZ, 1979.

By-products of oxidative biocides : toxicity to oyster larvae. Marine Pollution Bulletin, Vol. 10, pp. 166-169.

Y. TORGERSEN, T. HASTEIN, 1995.

Disinfection in aquaculture. Scientific and Technical Review of the Office International des Epizooties, 14(2), pp. 419-434.

Références bibliographiques

US EPA, OFFICE OF WATER (4607), 1999a.
Disinfection Profiling and Benchmarking. EPA 815-R-99-013.

US EPA, OFFICE OF WATER (4607) 1999b.
Alternative Disinfectants and Oxidants. EPA 815-R-99-014.

R. J. WHITTINGTON, P. M. HICK, O. EVANS, A. RUBIO, B. ALFORD, N. DHAND, I. PAUL-PONT,
2015.
Protection of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) spat from mortality due to ostreid herpesvirus 1 (OsHV-1
 μ Var) using sample treatments of incoming seawater in land-based upwellers. *Aquaculture* 437, 10-20.